3 Ergebnisse

Im folgenden werden die wesentlichen Ergebnisse der Studie zusammenfassend dargestellt. Gemäß des allgemeinen Aufbaus der Arbeit beschäftigt sich der erste Teil mit den kolloidalen Eigenschaften des hTfR in detergenzfreier Lösung. Im zweiten Teil wird das Aggregationsverhalten untersucht und im dritten Teil die Wechselwirkung zwischen hTfR und seinem Liganden Transferrin betrachtet.

3.1 Kolloidale Eigenschaften

Der humane Transferrinrezeptor wurde nach einer von Turkewitz et al. (1988) angegebenen Vorschrift isoliert, wobei durchschnittlich 3 mg Protein pro Plazenta (350 g) gewonnen werden konnten. Gemäß der Orginalvorschrift wird die Elution des hTfR von der Affinitätssäule in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt die Elution mit 2 M KCl, die jedoch nicht vollständig ist. Eine zweite Fraktion kann durch Elution mit KSCN erhalten werden. Dieses Vorgehen bewirkt jedoch Denaturierung dieser Fraktion. Durch die Entfernung der Fe(III)-Ionen vor Beginn der Elution mit KCl konnte nahezu das gesamte Protein in einem Schritt gewonnen und die nach der Orginalvorschrift auftretenden Verluste vermieden werden. Die Reinheit des Materials wurde mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft, wobei das Material homogen erschien (Abb. 3-1)



Abb. 3-1 SDS-PAGE des gereinigten hTfRs. Nach der Elution von der Affinitätssäule wurden die erhaltenen Fraktionen gegen PBS, pH 7,5 dialysiert. Ein Aliquod jeder Fraktion wurde auf ein 10% SDS-PAGE Gel aufgetragen. Es wurden nur Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 95 kD gefunden, welches dem hTfR Monomer entspricht. Folgende Marker wurden verwendet: a: Myosin (200 kD), b: b-Galactosidase (116,25 kD), c: Phosphorylase B (97,4 kD), d: Serumalbumin (66,2 kD), e: Ovalbumin (45 kD)

In einer detergenzfreien hTfR-Lösung (PBS, pH 7,5) lassen sich mit Hilfe der PCS zwei getrennte Partikelpopulationen nachweisen. Abb. 3-2 zeigt die Häufigkeitsverteilungen der beiden Populationen, die in einem typischen PCS Experiment beob-



Abb. 3-2 Typische Häufigkeits-

verteilungen der Radien der Partikelpopulationen. Es wurden 200 Autokorrelationsfunktionen ausgewertet und die Radien mit CONTIN bestimmt. Für die kleinere Komponente (3-2A) ergibt sich ein Median von 17 nm, für die größere (3-2B) einer von 173 nm. Alle Messungen wurden bei einem Streuwinkel von 20° und einer
Temperatur von 293 K durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml in PBS, pH 7,5

achtet wurden. Insgesamt wurden hierzu 200 Autokorrelationsfunktionen aufgenommen und die hydrodynamischen Radien mit CONTIN bestimmt.

Die Radien der kleineren der beiden Komponenten liegen in einem relativ engen Bereich zwischen 10 nm und 26 nm mit einem Median von 17 nm (Abb 3-2A). Im Gegensatz dazu zeigt die größere Population eine viel höher Polydispersität. Die Radien liegen zwischen 50 nm und 350 nm mit einem Median von 173 nm (Abb 3-2 B). Nach einer Abschätzung mit Hilfe von Ultrazentrifugationsdaten macht die Masse der großen Komponente ca. 5% bezogen auf die gesamte Masse des eingesetzten Proteins aus. Da das Material elektrophoretisch einheitlich erscheint (Abb. 3-1) ist es unwahrscheinlich, daß es sich bei der größeren Komponente um eine Verunreinigung handelt, sondern eher um im Verlauf der Präparation denaturiertes und aggregiertes Material. Da die Anwesenheit dieser Komponente sich jedoch nachteilig auf die Datenqualität der Lichtstreu- und FCS Experimente auswirken kann, wurde sie durch Gelfiltration mit Hilfe einer Sephacryl S-400 Säule abgetrennt.

Die molare Masse der kleineren Komponente wurde auf zwei verschiedene Arten mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation bestimmt. Die direkte Bestimmung auf der Basis der radialen Konzentrationsverteilungen (Abb. 3-3A) im Sedimentationsgleichgewichts-Experiment ergab eine molare Masse von (1722 \pm 87) kD, die dem 17 nm Partikel entspricht (s. Abb. 3-2). Ein ähnlicher Wert wurde aus den durch Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten ermittelten Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten berechnet. Aus dem hier bestimmten Sedimentationskoef-



Abb. 3-3 (A) Sedimentationsgleichgewichts-Experiment. Die Detektion erfolgte bei 270 nm, 275 nm und 280 nm. Durch Anpassung der Kurven gemäß Gleichung 32 wurde ein Wert von (1722 ± 87) kD für hTfR bestimmt. (B) Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment. Die radialen Konzentrationsverteilungen wurden alle 10 min bei 280 nm detektiert. Es ist nur jede dritte Meßkurve dargestellt. Eine Anpassung an die Daten ergibt einen Sedimentationskoeffizient von $(30, 4 \pm 0, 5)$ S und einen Diffusionskoeffizienten von $(1,610 \pm 0,017) \times$ $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$

fizienten von $(30,4 \pm 0,5)$ S und dem Diffusionskoeffizienten von $(1,610 \pm 0,017) \times 10^{-7}$ cm²/s ergab sich eine molare Masse von (1675 ± 46) kD. Interessanterweise konnten weder mit PCS noch mit analytischer Ultrazentrifugation kleinere Partikel, wie z. B. einzelne hTfR Dimere, nachgewiesen werden. Dies ist nur möglich, wenn man hTfR mit geeigneten Detergentien solubilisiert, wobei sich jedoch nur ein Teil der untersuchten Detergentien als effektiv erwies. Die Ergebnisse der Solubilisierungsversuche sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Detergenzkonzentration betrug jeweils 1%, die Proteinkonzentration 50 µg/ml. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Partikelverteilungen in der Lösung durch PCS bestimmt.

Detergenz	Radius (nm)
β-DM	$5,0 \pm 0,2$
Octylglucosid	$4,3 \pm 1,2$
Triton X-100	$4,5 \pm 1,2$
C12E8	$4,7 \pm 0,6$

Tabelle 1: Hydrodynamische Radien von hTfR nach Solubilisierung mit verschiedenen Detergentien

Andere untersuchte Detergentien, darunter LDAO, Brie, Tween 20 und Nonidet erwiesen sich als uneffektiv. Es waren zwar z. T. kleinere Partikel vorhanden, doch blieb zumindest ein Teil der 1722 kD Partikel erhalten und konnte mit PCS nachgewiesen werden.

3.2 Aggregationsverhalten

Eine Aggregation des hTfR läßt sich auf verschiedene Arten induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Temperaturerhöhung, pH-Wert Erniedrigung und N-Deglykosylierung mittels PCS und statischer Lichtstreuung untersucht.

Zur Ermittlung der thermischen Stabilität der 1722 kD Partikel wurden lineare Temperaturgradienten angewandt. In Abb. 3-4 ist der apparente hydrodynamische Radius der hTfR Partikel in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Die Temperatur wurde von 293,2 K mit einer Geschwindigkeit von 0,21 K/min auf 340,2 K erhöht und bei diesem Wert konstant gehalten. Bei 293,2 K, sind hTfR Partikel mit einem mittleren hydrodynamischen Radius von 17 nm zu erkennen. Bei steigender Temperatur nimmt der Radius ab und erreicht ein Minimum von 3,5 nm bei ca. 320 K. Von da an nimmt er wieder leicht zu, bis bei 340,2 K eine rasche Aggregation einsetzt, die zu Aggregaten mit einem Radius von über 1 μ m führt.

Die Aggregation bei 340,2 K äußert sich auch direkt in der Form der gemessenen Au-



Abb. 3-4 Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius von der Temperatur. Die Temperatur wurde von 293,2 K mit einer Geschwindigkeit von 0,21 K/min auf 340,2 K erhöht. Ab 340,2 K tritt eine rasche Aggregation auf. Die Messung wurde in PBS, pH 7,5, durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml.

tokorrelationsfunktionen, sowie den aus diesen durch Laplace-Inversion mit CON-TIN berechneten Partikelverteilungsfunktionen. In Abb. 3-5A ist die zeitliche Änderung der Autokorrelationsfunktionen während der Aggregation dargestellt. Bei dem hier dargestellten Experiment wurde kein Temperaturgradient verwendet, sondern die Messung sofort bei einer Temperatur von 340,2 K gestartet. Mit Fortschreiten der Aggregation ist eine klare Verschiebung der Autokorrelationsfunktionen zu höheren Relaxationszeiten zu erkennen. Dies äußert sich auch in der Änderung der Partikelverteilungsfunktionen mit der Zeit (Abb. 3-5B). Die Amplitude nimmt kontinuierlich zu, bis sie nach ca. 2500 s ein Maximum erreicht. Gleichzeitig wird die Verteilung breiter, was auf eine Zunahme der Polydispersität der gebildeten Aggregate hinweist.

Aus einer Analyse des zeitlichen Verlaufs einer Aggregation lassen sich Rückschlüsse auf deren Mechanismus sowie auf die geometrischen Eigenschaften der gebildeten Aggregate ziehen. In Abb. 3-6A ist der zeitliche Verlauf eines Aggregationsexperiments bei 340,2 K dargestellt. Nach etwa 50 min erreichen die Aggregate einen Radius von 50 nm. Danach läßt sich das weitere Wachstum durch ein Potenzgesetz beschreiben. Dies wird deutlich durch die lineare Abhängigkeit des Radius von der Zeit bei doppelt-logarithmischer Auftragung. Die Steigung der Ausgleichsgraden beträgt in dem dargestellten Fall 1,91 \pm 0,02.



Abb. 3-5 (A) Autokorrelationsfunktionen gemessen zu verschiedenen Zeiten während der Aggregation von hTfR bei 340,2 K. Alle Messungen wurden bei einem Streuwinkel von 20° durchgeführt. Mit zunehmender Zeit verschieben sich die Relaxationszeiten zu höheren Werten. Eine Auswertung mit CONTIN liefert die in (B) dargestellten Verteilungsfunktionen. Die Angabe von N(R) erfolgt in willkürlichen Einheiten. Radius und Polydispersität nehmen mit der Zeit zu.

Die Anfangsphase der Aggregation ist in Abb. 3-6B im Detail dargestellt. Aus der halb-logarithmischen Darstellung ergibt sich, daß das Wachstum der Aggregate während der ersten 50 min exponentiell erfolgt. Die Regressionsgerade zeigt eine Steigung von $(5,13 \pm 0,08) \times 10^{-4}$ s⁻¹ und einen Achsenabschnitt von (13 ± 1) nm.

Die Geometrie der Aggregate läßt sich durch die massenfraktale Dimension d_m beschreiben. Hierzu bestimmt man das zeitliche Mittel der Intensität des gestreuten Lichts, $\langle I \rangle$, in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius R_h . Innerhalb eines bestimmten Größenbereichs, in denen der Radius der Aggregate kleiner als die Lichtwellenlänge sein muß, ergibt sich die massenfraktale Dimension aus einer doppeltlogarithmischen Auftragung der Intensität gegen den Radius (Pusey und Rarity, 1987), wobei gilt:

$$\ln(\langle I \rangle) \propto d_m \ln(R_h) \tag{34}$$

Die theoretischen Voraussetzungen für diese Analyse sind während der Anfangsphase der temperaturinduzierten Aggregation gegeben. Abb. 3-7A zeigt ein entsprechendes Experiment. Wenn die Partikelradien zwischen 40 nm und 290 nm liegen, ergibt sich eine Steigung der Regressionsgeraden von 2,18 \pm 0,03. Bei größeren Radien sind die theoretischen Annahmen, die der Auswertung zugrunde liegen, nicht mehr gültig und der Kurvenverlauf wird nichtlinear.



Abb 3-6 (A) Doppelt-logarithmische Darstellung des Radius gegen die Zeit. Nach einer Anlaufphase läßt sich die Aggregation durch ein Potenzgesetz beschreiben. Die Steigung der Regressionsgerade *beträgt* 1,91 ± 0,02. (B) In der Anfangsphase verläuft die Aggregation gemäß einer Exponentialfunktion. Dies deutet auf eine Aggregation vom RLCA Typ hin. Der Achsenabschnitt ergibt einen Radius von (13 ± 1) nm für die kleinste aggregierende Einheit. Die Messung wurde bei einer Temperatur von 340,2 K durchgeführt. Das Streulicht wurde bei 20° detektiert. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml in PBS, pH 7,5.

Wenn die Radien der Aggregate größer sind als die Wellenlänge des verwendeten Lichts, läßt sich durch eine doppelt-logarithmische Auftragung des Quotienten $(\langle I \rangle (q)) / P_0(q)$ gegen den Streuvektor, q, der charakteristische Exponent bestimmen. $P_0(q)$ ist der Formfaktor der aggregierenden Spezies, in diesem Fall der 17 nm Partikel. Er läßt sich unter der Annahme kugelförmiger Teilchen mit Radius r_0 wie folgt berechnen (Kerker, 1969):

$$P_0(q) = \frac{9}{(qr_0)^6} (\sin(qr_0) - qr_0\cos(qr_0))^2$$
(35)



der Streuintensität vom hydrodynamischen Radius während der frühen Phase der Aggregation bei 340,2 K. Die Steigung der Ausgleichsgera*den beträgt 2,18* \pm 0,03. (B) Streuvektorabhängigkeit der normierten Streuintensität während der Endphase der *Aggregation*. *Die Steigung der* Ausgleichsgeraden beträgt

Während der Endphase der Aggregation erreichten die Partikel einen Radius, welcher viel größer als die Lichtwellenlänge war. Die Streuintensität ist in Abb. 3-7B als Funktion des Streuvektors dargestellt. Es ist klar zu erkennen, daß die Abhängigkeit zwischen dem Streuvektor und der mit dem Formfaktor (Gleichung 35) normierten Streuintensität einem Potenzgesetz entspricht. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt $-3,38 \pm 0,04$.

Nach Beendigung der Lichtstreumessungen wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und nach 18 Stunden lichtmikroskopisch untersucht. Hierbei wurden nicht nur fraktale Aggregate sondern auch kristalline Strukturen beobachtet,



Abb. 3-8 Lichtmikroskopische Aufnahmen von hTfR Aggregaten. Nach Aggregation bei 340,2 K wurden die Probelösungen auf Raumtemperatur abgekühlt und nach 18 Stunden lichtmikroskopisch untersucht. Es sind fraktale Aggregate erkennbar, deren Radius etwa 5 µm beträgt (A). Die Aggregate scheinen aus kleineren, kompakten Partikeln aufgebaut zu sein (A, Detailvergrößerung).

Neben den fraktalen Aggregaten sind auch dendritische Strukturen erkennbar (B). Diese sind dopplebrechend und müssen daher eine kristalline Struktur besitzen.

Alle Experimente wurden in PBS pH 7,5 durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 50 μg/ml. Der Balken entspricht einer Länge von 10 μm.

Die Aufnahmen wurden mit einem Axiovert 100 Mikroskop mit Achrostigmat 32X Objektiv (Zeiss) angefertigt. Die Vergrößerung wurde mit Hilfe kalibrierter Raster bestimmt. Die Bilder wurden mit einer schwarz-weiß CCD Kamera aufgenommen und direkt elektronisch gespeichert. welche Dopplebrechung aufwiesen. Der Radius der fraktalen Aggregate betrug ca. 5 μ m. Die Aggregate scheinen wiederum aus kleineren, kompakten Untereinheiten zu bestehen. Die kristallinen Strukturen sind von dendritischer Struktur und zeigen unter dem Polaristionsmikroskop Doppelbrechung. Bedauerlicherweise wachsen diese Strukturen nicht weiter. Auch Versuche, sie als Kristallisationskeime zu verwenden waren erfolglos.



Abb 3-9 Zeitlicher Verlauf eines Aggregationsexperiments bei 340,2 K. Die Kurven in (A) zeigen die Streuvektorabhängigkeit der Streuintensität im Zeitraum zwischen 1000 s und 16000 s nach Start der Aggregation. Aus Gründen der

Übersichtlichkeit ist nur jede zweite gemessene Kurve, parallel zur Ordinate verschoben, dargestellt. Jede Kurve besteht aus zwei linearen Abschnitten, deren Steigung durch Regression bestimmt werden kann. In (B) sind die charakteristischen Exponenten, die aus den Steigungen der Kurvensegmente in (A) bestimmt wurden, gegen die Zeit aufgetragen. Beide Kurven zeigen einen sigmoidalen Verlauf, und nähern sich im Verlauf des Experiments immer mehr an. Um ein detaillierteres Bild der Aggregationsprozesse zu erhalten, wurden die zeitlichen Änderungen des charakteristischen Exponenten während der Aggregation untersucht. Hierzu wurde die Streuvektorabhängigkeit der Streuintensität im Verlauf der Aggregation mit Hilfe der statischen Lichtstreuung untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 3-9 dargestellt. Es ist erkennbar, daß jede Meßkurve in Abb. 3-9A aus zwei linearen Segmenten zusammengesetzt ist. Daraus läßt sich schließen, daß mindestens zwei Wachstumsprozesse gleichzeitig, wenn auch in unterschiedlichen Größenbereichen stattfinden. Die Werte der charakteristischen Exponenten beider Prozesse können durch Bestimmung der Steigung der linearen Segmente ermittelt werden. Die Änderung der charakteristischen Exponenten mit der Zeit ist in Abb. 3-9B dargestellt. Beide Kurven zeigen einen sigmoidalen Verlauf. Am Ende der Aggregation nähern sich beide Kurven einem gemeinsamen Endwert, der im Bereich von –4 liegt.

Der Energieumsatz während der Aggregation wurde im DSC Experiment bestimmt. Abb. 3-10 zeigt eine typische Messung im Bereich zwischen 310 K und 360 K. In diesem Temperaturbereich ist nur ein Phasenübergang zu erkennen. Die Übergangstemperatur wurde zu $(341,3 \pm 0,2)$ K bestimmt. Eine weitere Unterteilung des Phasenübergangs in z. B. Denaturierung und Aggregation konnte nicht festge-



Abb. 3-10 Thermische Stabilität des hTfR. Dargestellt ist ein DSC Experiment im Bereich zwischen 310 K und 360 K. Es ist nur ein Phasenübergang bei (341,3 \pm 0,2) K zu erkennen. Die molare Enthalpieänderung des Übergangs beträgt (1860 \pm 150) kJ/mol.

stellt, bzw. nicht aufgelöst werden. Die molare Enthalpieänderung des Phasenübergangs beträgt (1860 ± 150) KJ/mol.

Thermisch induzierte Änderungen der Konformation von hTfR wurden mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Abb. 3-11A zeigt CD-Spektren von hTfR bei verschiedenen Temperaturen. Bei 298,2 K sind zwei Banden bei ca. 208 nm und 222 nm zu erkennen. Solche Banden sind typisch für Proteine mit einem hohen An-

teil an α-helikalen Bereichen (Manavalan und Johnson, 1983). Beide Banden wurden geringer, wenn die Temperatur auf 328,2 K, 348,2 K und schließlich auf 363,2 K erhöht wurde. Hierbei war die Abnahme der Bande bei 208 nm deutlicher als die derjenigen bei 222 nm. Anhand der Spektren kann man schließen, daß eine Konformationsänderung stattfindet. Es ist jedoch fraglich, ob man von einer kompletten thermischen Denaturierung sprechen kann. In Abb. 3-11A ist zum Vergleich zusätzlich ein Spektrum wiedergegeben, welches bei 363,2 K nach vollständiger Denaturierung des hTfR mit 1% SDS aufgenommen wurde. Hier ist die Bande bei 208 nm stark abgeschwächt, während die bei 222 nm überhaupt nicht mehr zu erkennen ist. Der Komplex zwischen hTfR und Transferrin scheint stabiler zu sein als



Abb. 3-11 (A) CD-Spektren von hTfR in 10 mM Cacodylatpuffer, pH 7,5. Die Spektren zeigen eine Verringerung der Banden bei 208 nm und 222 nm, welches auf eine Änderung der Konformation hindeutet. Zum Vergleich ist auch ein Spektrum nach Denaturierung des hTfR durch 1% SDS angegeben.

Der Komplex zwischen hTfR und seinem Liganden Transferrin ist thermisch stabiler als hTfR allein. Dies erkennt man aus den geringen Änderungen der Spektren bei 298,2 K und 348,2 K (B). hTfR allein. In Abb. 3-11B sind CD-Spektren des Komplexes bei 298,2 K und 348,2 K dargestellt. Wie erwartet zeigt das CD-Spektrum nach Komplexbildung kleine Abweichungen. Die Temperaturerhöhung führt jedoch nicht zu größeren Änderungen zwischen den beiden Spektren.

Die N-glykosydisch gebundenen Kohlenhydratgruppen lassen sich durch Behandlung des hTfR mit PNGase F abtrennen. Die Vollständigkeit der Deglykosylierung kann durch SDS-Gelelektrophorese überprüft werden. Hierbei läuft die deglykosylierte Form etwas weiter und läßt sich dadurch von der nativen Form un-



Abb. 3-12 N-deglykosylierter (A) und nativer hTfR (B). Nach N-Deglykosylierung läuft hTfR weiter als die native Form. Hierdurch lassen sich die beiden Varianten elektrophoretisch unterscheiden.

terscheiden. In Abb. 3-12 wird ein typisches Gel gezeigt, welches die elektrophoretischen Unterschiede zwischen beiden Formen verdeutlicht.

N-Deglykosylierung führt zur Aggregation des Rezeptors. Aufgrund der Präparationsbedingungen war es nicht möglich, mit Lichtstreuexperimenten detaillierte Kinetiken aufzunehmen und verschiedenen Komponenten zu identifizieren. Abb. 3-13A zeigt daher nur die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Partikelradien. Die Experimente ergaben einen Wert von 210 nm für den Median der Radiusverteilung, wobei die Polydispersität der Lösung sehr hoch war.

Für die Abhängigkeit zwischen Streuintensität und Streuvektor wurde in statischen Lichtstreuexperimenten ein Potenzgesetz beobachtet (Abb. 3-13B). Der charakteristische Exponent ergab sich zu $-3,56 \pm 0,04$.

Ein ähnliches Resultat zeigte die Absenkung des pH-Wertes von 7,5 auf 5,0 (Abb. 3-14). Auch hier war es nicht möglich, komplette Kinetiken der Aggregation zu messen, weil die Probenlösung über Nacht gegen PBS. pH 5,0 dialysiert wurde und die Aggregation danach abgeschlossen war. Es ergab sich für den Median der Häufigkeitsverteilung der

Partikelradien ein Wert von 627 nm. Dieser Wert liegt deutlich höher als im Fall der N-Deglykosylierung. Auch die Polydispersität der Lösung war bei pH induzierter Aggregation deutlich höher. Die statische Lichtstreuung ergab wiederum ein Potenzgesetz für die Abhängigkeit zwischen Streuintensität und Streuvektor. Der charakteristische Exponent betrug $-3,48 \pm 0,07$.

Die CD-Spektren zeigten eine Abnahme der Banden bei 208 nm und 222 nm, welche jedoch geringer war als die entsprechende Abnahme bei 340,2 K. Die Spektren



Abb. 3-13 *(A)* Häufigkeitsverteilung der Radien der hTfR Aggregate ermittelt aus 200 Autokorrelationsfunktionen nach N-Deglykosylierung. Der Median liegt bei 210 nm. Alle Spektren wurden bei einem Streuwinkel von 20° aufgenommen. Die Temperatur wurde bei 293,2 K konstant gehalten.

(B) Streuintensität als Funktion des Streuvektors. Aus der Regression ergibt sich ein charakteristischer Exponent von $-3,56 \pm 0,04$. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml.



Abb. 3-14 *(A)* Häufigkeitsverteilung der Radien der hTfR Aggregate ermittelt aus 200 Autokorrelationsfunktionen nach Aggregation bei pH 5,0. Der Median liegt bei 627 nm. Alle Spektren wurden bei einem Streuwinkel von 20° aufgenommen. Die Temperatur wurde bei 293,2 K konstant gehalten.

(B) Streuintensität als Funktion des Streuvektors. Aus der Regression ergibt sich ein charakteristischer Exponent von $-3,48 \pm 0,07$. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml.



Abb. 3-15 CD-Spektren der nativen Form des hTfR bei pH 7,5 und pH 5,0, sowie der Ndeglykosylierten Form. Sowohl nach pH Änderung als auch Deglykosylierung nehmen die Banden bei 208 nm und 222 nm ab. Generell sind die Spektren der aggregierten Formen praktisch identisch. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 293,2 K aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 50 µg/ml.

für nativen hTfR bei pH 5,0 bzw. N-deglykosylierten hTfR sind sonst praktisch identisch (Abb. 3-15).

3.3 Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen

Die Wechselwirkungen zwischen hTfR und seinem Liganden Transferrin wurden mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) untersucht. In einem typischen Ansatz für ein FCS Experiment können mehrere unterscheidbare fluoreszierende Spezies enthalten sein. Hierbei handelt es sich um freien Farbstoff, markierten Liganden und um Rezeptor-Ligand Komplexe verschiedener Stöchiometrie. Theoretisch kann die zur Auswertung verwendete Software drei Komponenten auflösen. In der Praxis ergab sich jedoch, daß die Anpassung bei Verwendung eines Drei-Komponenten-Modells instabil war, so daß eine konsistente Auswertung verschiedener Spektren nicht mehr gegeben war. Daher wurde der freie Farbstoff soweit wie möglich abgetrennt (s. Materialien und Methoden), was jedoch nur im Fall von TMR gelang. In Lösungen von mit BODIPY-FL markiertem Transferrin waren immer ca. 30% der fluoreszierenden Partikel freier Farbstoff. Es war zwar möglich eine Bindungskonstante unter Verwendung von BODIPY-Tf zu bestimmen, allerdings waren die Fehler recht hoch. Daher wurde BODIPY-Tf für weitere Versuche nicht mehr eingesetzt. Um mehrere fluoreszierende Komponenten in einer Probe nebeneinander durch FCS detektieren zu können ist es nötig, daß sich deren molare Massen ausreichend unterscheiden. Nach Angaben des Herstellers (EVOTEC GmbH) muß das Massenverhältnis zwischen zwei Spezies mindestens 1:7 betragen. Damit kann zwischen den Hauptkomponenten wie z. B. markiertem Liganden und Rezeptor-Ligand Komplex unterschieden werden. Es ist jedoch nicht möglich, Komplexe mit verschiedenem Sättigungsgrad, z. B. mit einem oder zwei gebundenen Liganden, zu unter-



Abb. 3-16 Typische Autokorrelationsfunktionen für TMR (23 nM), TMR-Tf (23 nM) und TMR-TfhTfR (1,2 μ M). Die Relaxationszeiten der einzelnen Spezies sind entsprechend dem zunehmenden Molekulargewicht zu höheren Werten verschoben. Alle Messungen wurden in PBS, pH 7,5 bei Raumtemperatur durchgeführt. Das konfokale Volumen betrug etwa 4 × 10⁻¹⁶ l.

scheiden. Diese Partikel zählen im FCS Experiment als eine Spezies.

In den in dieser Studie verwendeten Proben waren generell zwei fluoreszierende Spezies vorhanden: TMR-markiertes ferri-Transferrin (TMR-Tf), und Komplex aus hTfR und markiertem Transferrin (TMR-Tf-hTfR). Typische Autokorrelationsfunktionen für beide Spezies finden sich in Abb. 3-16. Zum Vergleich ist außerdem noch eine Autokorrelationsfunktion für freies TMR dargestellt. Die Autokorrelationsfunktionen sind gemäß des zunehmenden Molekulargewichts zu höheren Relaxationszeiten verschoben. Ferner ist zu erkennen, daß die Unterschiede der molaren Massen aller beteiligten Spezies groß genug sind, um eine Differenzierung zwischen ihnen zuzulassen.

Die in Abb. 3-16 dargestellten Autokorrelationsfunktionen wurden mit Proben aufgenommen, in denen nur jeweils eine fluoreszierende Spezies vorhanden war.

Damit konnten die translatorischen Diffusionszeiten, τ_{diff} , der einzelnen Spezies bestimmt werden. Dieser Parameter ermöglicht die Berechnung des translatorischen Diffusionskoeffizienten, *D*, aus dem wiederum ein apparenter hydrodynamischer

	$ au_{diff}$ (ms)	$D (\mathrm{m}^2/\mathrm{s})$	R_h (nm)
TMR	0,0581	$2,88 \times 10^{-10}$	0,76
TMR-Tf	0,3048	$4,13 \times 10^{-11}$	3,97
TMR-Tf-hTfR	1,0456	$1,60 \times 10^{-11}$	13,6

Radius, R_h , berechnet werden kann. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Translationsdiffusionszeiten τ_{diff} , Diffusionskoeffizienten D, und hydrodynamische Radien R_h der untersuchten Spezies.

Alle Messungen wurden in PBS, pH 7,5 bei Raumtemperatur durchgeführt. Das konfokale Volumen betrug $6,37 \times 10^{-16}$ l. Die Diffusionszeit von Rhodamin 6G wurde zu 0,0598 ms bestimmt, hiermit ergab sich für den Strukturparameter ein Wert von 5,853. Für die Darstellung des TMR-Tf-hTfR Komplexes wurde ein 30facher Überschuß von hTfR verwendet.

Zur Auswertung der Bindungsexperimente wurden die Diffusionszeiten der einzelnen fluoreszierenden Spezies auf die vorher bestimmten Werte fixiert. Als Parameter für die nichtlineare Anpassung der Autokorrelationsfunktionen diente dann, neben dem Triplettanteil, nur noch der relative Anteil jeder fluoreszierender Spezies am Gesamtsignal. Dieses Vorgehen ist nötig, da bei Freigabe beider Parameter eine große Zahl von Anpassungen möglich ist, die eine kohärente Auswertung der Experimente nicht mehr zuläßt.



Abb. 3-17 Gleichgewichtsbindung von TMR-Tf an hTfR. Die TMR-Tf Konzentration betrug 23 nM. Der relative Anteil an Komplex (in willkürlichen Einheiten) ist gegen die Konzentration der Bindungsstellen, welche der Konzentration der hTfR Monomere entspricht, aufgetragen. Eine nichtlineare Anpassung liefert einen Wert von 7 nM für die Dissoziationskonstante des Komplexes. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde TMR-Tf mit zunehmenden Mengen von hTfR titriert. Der relative Anteil des gebundenen Liganden, *Y*, bei konstanter TMR-Tf Konzentration wurde als Funktion der hTfR Konzentration bestimmt. Dieser Anteil wurde gegen die Rezeptorkonzentration aufgetragen. Abb. 3-17 zeigt eine typische Bindungskurve. An die Messwerte wurde ein nichtlineares Modell für die Bindung von TMR-Tf an gleichartige und voneinander unabhängige Bindungsstellen angepaßt. Hierbei wurde die Gleichgewichtskonzentration des Komplexes mit Hilfe des Massen-Wirkungsgesetzes formuliert. Damit ergibt sich folgender Ausdruck für das Modell:

$$Y = F \left\{ \frac{K_D + [hTfR] + [TMR - Tf]}{2} - \frac{K_D + [hTfR] + [TMR - Tf]}{2} - [TMR - Tf][hTfR] \right\}$$
(36)

F bezeichnet hier eine Proportionalitätskonstante und K_D steht für die Dissoziationskonstante. Die hier gemessenen Daten stützen die Annahme gleicher und unabhängiger Bindungsstellen für TMR-Tf. Die Anpassung liefert für die Dissoziationskonstante der Bindung von TMR-Tf an ein hTfR Partikel einen Wert von (7,0 ± 3,3) nM.

Um die Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung zu ermitteln, wurde die Abnahme des relativen Anteils des freien Liganden (1-Y) als Funktion der Zeit gemessen. Die Konzentration von TMR-Tf wurde konstant gehalten (23 nM) und die Konzentration des Rezeptors variiert. Hierbei wurde jedoch immer ein Überschuß an hTfR verwendet, so daß die Reaktion nach pseudo-erster Ordnung ablief. Der Anteil des freien TMR-Tf wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die beobachtete mono-exponentielle Abnahme der TMR-Tf Konzentration wurde durch folgendes Modell beschrieben:

$$(1 - Y)_t = A_0 \exp(t/\tau) + C$$
 (37)

 A_0 ist hier die Anfangsamplitude und *C* steht für einen konstanten Verschiebungsterm. Es muß beachtet werden, daß τ hier konventionsgemäß die Relaxationszeit der Reaktion bezeichnet und nicht mit der translationalen Diffusionszeit τ_{diff} verwechselt werden darf.

In Abb. 3-18A ist eine typische Abklingkurve dargestellt. Der Anteil an freiem TMR-Tf nimmt mono-exponentiell mit der Zeit ab. In Abb. 3-18B sind entsprechende Autokorrelationsfunktionen, welche zu Beginn und am Ende des Experimentes beobachtet wurden, dargestellt. Erwartungsgemäß zeigt sich eine Verschiebung zu längeren Relaxationszeiten, welche durch die Abnahme an freiem TMR-Tf und die Zunahme von TMR-Tf-hTfR hervorgerufen wird. Die geringe Zunahme der Amplitude im Verlauf der Reaktion wird möglicherweise durch eine Zunahme der Quantenausbeute der Fluoreszenz von TMR-Tf nach der Bindung an hTfR ausgelöst. Ein ähnlicher Effekt kann auch bei statischen Fluoreszenztitrationsexperimenten beobachtet werden. Hier nahm die Fluoreszenzintensität nach Komplexbildung um etwa



(A) Der relative Anteil von Abb. 3-18 freiem TMR-Tf nimmt durch Komplexbildung mono-exponentiell ab. Die hTfR Konzentration war in diesem Fall 0,7 µM, während die TMR-Tf Konzentration bei allen Messungen 0,23 nM war. Das Experiment wurde durch Mischen von hTfR mit TMR-Tf gestartet und dann mit FCS verfolgt. Die reziproke Relaxationszeit, $1/\tau$, für dieses Experiment betrug $8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. (B) Autokorrelationsfunktionen, die während der Komplexbildung zum Beginn der Reaktion und nach 24,75 min aufgenommen wurden. Durch die Komplexbildung verschiebt sich die Relaxationszeit zu höheren Werten.

10% zu. Dies kann jedoch vernachlässigt werden, da für die Auswertung nur die Form der Autokorrelationsfunktion von Interesse ist.

Zwischen den reziproken Relaxationszeiten, $1/\tau$, und der Konzentration des freien Rezeptors besteht ein linearer Zusammenhang. Dies ist charakteristisch für eine reversible, bimolekulare Bindungsreaktion gemäß:



Freie Bindungsstellen (µM)

Abb. 3-19 Zwischen der reziproken Relaxationszeit und der Konzentration der freien Bindungsstellen am hTfR besteht ein linearer Zusammenhang. Dies deutet auf das Vorliegen einer reversiblen, bimolekularen Reaktion hin. Aus der Steigung und dem Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden lassen sich die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten abschätzen. Es ergibt sich für k_{+1} ein Wert von $(1,1 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und für k_{-1} ein Wert von $(6 \pm 4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{+1} , und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{-1} , ergeben sich aus der Steigung und dem Ordinatenabschnitt einer Auftragung der reziproken Relaxationszeiten gegen die Konzentration der Bindungsstellen (Abb. 3-19). Eine lineare Anpassung liefert für k_{+1} einen Wert von $(1,1 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und für k_{-1} einen Wert von $(6 \pm 4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

(38)

Im Rahmen der Dissoziations-Austausch Experimente wurde ein hoher Überschuß unmarkierten ferri-Transferrins zu einer Lösung von TMR-Tf-hTfR gegeben und der Reaktionsverlauf solange mit FCS verfolgt bis, keine Signaländerungen mehr zu erkenne waren. Als Meßgröße diente hier dann die Abnahme des relativen Anteils des markierten Komplexes *Y*. Es ergaben sich doppelt-exponentielle Abklingkurven, an die folgende Gleichung angepaßt wurde:

$$Y = A_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) (39)$$

Bemerkenswert war, daß die Geschwindigkeit des Austauschs von



Abb. 3-20 Dissoziations-Austausch-Kinetiken bei zwei verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem ferri-Transferrin. Das unmarkierte Transferrin wurde zu einer Lösung von TMR-Tf-hTfR gegeben. Die Endkonzentration war 296 μ M (A) bzw. 6 μ M (B). Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den reziproken Relaxationszeiten, die durch Anpassung eines doppelt-exponentiellen Modells bestimmt wurden. Die doppeltexponentielle Anpassung ergab eine χ^2 Statistik von 24,5 (A) bzw. 28,65 (B), während eine mono-exponentielle Anpassung χ^2 Werte von 55,4 (A) bzw. 61,79 (B) lieferte. Daher erscheint die Beschreibung der Reaktion durch ein doppelt-exponentielles Modell gerechtfertigt.

der Konzentration des unmarkierten ferri-Transferrins unabhängig war. Typische Abklingkurven sind in Abb. 3-20 dargestellt. Eine Aufstellung aller gemessenen Amplituden und Relaxationszeiten findet sich in Tabelle 3. Es wurde auch versucht, die gemessenen Abklingkurven mit einem mono-exponentiellen Modell anzupassen. Diese Modell beschrieb die Daten jedoch wesentlich schlechter, wie anhand der χ^2 Statistik für beide Anpassungen deutlich wurde.

[Tf] (µM)	A ₁ (%)	$1/\tau_1 \; (s^{-1})$	A ₂ (%)	$1/\tau_2 \ (s^{-1})$
296	48,2	$4,3 \times 10^{-3}$	30,4	$2,2 \times 10^{-4}$
118	43,2	$3,7 \times 10^{-3}$	24,1	$2,1 \times 10^{-4}$
39	44,5	$4,6 \times 10^{-3}$	26	$3,5 \times 10^{-4}$
6	51,0	$4,1 \times 10^{-3}$	24,9	$1,6 \times 10^{-4}$

Tabelle 3: Im Dissoziations-Austauschexperiment gemessene Amplituden und Relaxationszeiten.

Die Energetik der Bindungsreaktion wurde mit Hilfe von DTC Experimenten untersucht. Es ergab sich, daß die umgesetzte Wärmemenge pro Injektion von ferri-Transferrin in eine hTfR Lösung konstant blieb. In Abb. 3-21 sind die Wärmemengen und die Bindungsenthalpien für 13 Injektionen dargestellt. Insgesamt wurde für die Bindungsreaktion eine Enthalpieänderung, DH, von –49,2 kJ mol⁻¹ bestimmt. Hiervon muß die Enthalpieänderung beim Lösen von Transferrin in PBS abgezogen werden. Für diese wurde in einem Vorexperiment ein Wert von +4,8 kJ mol⁻¹ bestimmt, womit sich eine Enthalpieänderung von –44,4 kJ mol⁻¹ für die Bindungsreaktion ergibt.

Aus ΔH und K_D lassen sich die anderen thermodynamischen Größen wie die Änderung der freien Enthalpie, ΔG , und die Änderung der Entropie, ΔS , gemäß folgender Gleichungen berechnen:

$$\Delta G = -RT \ln \frac{1}{K_D} \tag{40}$$

und

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \tag{41}$$

Diese Ausdrücke liefern eine Änderung der freien Enthalpie von -46,5 kJ mol⁻¹ und eine Änderung der Entropie von 7,1 J K⁻¹ mol⁻¹. Hieraus ergibt sich, daß die Trieb-

kraft der Reaktion hauptsächlich von der großen freigewordenen Enthalpie bestimmt wird. Die Entropie des Systems verringert sich, was zu erwarten war, da während der Reaktion die Zahl der Partikel und damit auch die Zahl der Freiheitsgerade des Systems abnimmt. Die Entropieabnahme ist jedoch viel zu klein, um die Enthalpieänderung zu kompensieren.



Abb. 3-21 Wärmeentwicklung (A) und Enthalpieänderung (B) während der Titration einer Lösung von 4,4 mg / ml hTfR mit jeweils 7 µl einer Lösung von 40,7 mg /ml ferri-Transferrin in PBS, pH 7,5. Das Experiment wurde bei einer *Temperatur von 298,2 K durchgeführt. ∆H für die* Bindungsreaktion ist -49,2 *kJ mol*⁻¹. *Nach Korrektur der* Verdünnungsenthalpie für Transferrin ergibt sich eine Enthalpieänderung von -44,4 kJ mol⁻¹ für die Bindung von ferri-Transferrin an hTfR.