

5

Diskussion der Ergebnisse

Die erzielten Meßergebnisse dieser Arbeit sollen dazu dienen, einen Einblick in die Prozesse der Proteinaggregation und somit eine Unterstützung für die qualitative und quantitative Vorhersage von Kristallisationsbedingungen bei der Herstellung von Proteinkristallen aus Lösungen zu geben. In technischer Hinsicht wurden zur Meßwerterfassung Eigenbauten verwendet, die die mögliche Verwendung bei der Automatisierung der Proteinkristallisation ausloten sollen.

Dazu gehören die Klein-Goniometer-Apparatur, mit der Messungen zum Anfangsstadium einer aggregierenden Proteinlösung unter dem Einfluß verschiedener zugesetzter Elektrolyte durchgeführt wurden. Mit der Hängender-Tropfen-Apparatur wurden Untersuchungen zu Proteinaggregationsprozessen gemacht, die unter günstigen wie ungünstigen Kristallisationsbedingungen in einem $10\mu\text{l}$ Tropfen ablaufen.

Mittels der vorgenannten Aufbauten wurden Untersuchungen zur Startphase der Aggregation und zu Aggregationskinetiken präsentiert. Mit der Laser-Doppler-Elektrophorese-Apparatur wurden Messungen zur elektrophoretischen Beweglichkeit vorgestellt, die die Berechnung des Zetapotentials zur Beschreibung des gesamten Phasenüberganges ermöglichen.

Grundsätzlich ist das System Lysozym in 0,1M Na-Acetat Puffer bei einem pH-Wert von 4,26 als Studienobjekt verwendet worden. Dieses System ist u.a. in dieser Arbeitsgruppe bezüglich der dynamischen Lichtstreuung bereits ausführlich untersucht worden. Weiterhin wurden auch das Protein Concanavalin A und diverse Latexpartikel zur Meßdatenanalyse herangezogen.

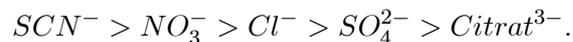
Das Neue an dieser Arbeit ist die Reduzierung des Meßaufwandes ohne Einschränkung der Reproduzierbarkeit, die Verringerung der Probenmengen durch sehr kleine Volumina bis in den Tropfenbereich von nur $10\mu l$ und die Ermittlung von elektrophoretischen Meßdaten, wie des sogenannten Zetapotentials ζ .

Zunächst ist insgesamt festzustellen, daß die dynamische wie auch die elektrophoretische Lichtstreuung ein geeignetes Mittel darstellen, den Arbeitsaufwand bezüglich der Proteinkristallisation erheblich zu verringern. Die Grundanwendung der dynamischen Lichtstreuung bestätigt sich in der schnellen Messung einer Proteinlösung hinsichtlich ihrer Homogenität, d.h. eine zügige Aussage über die Modalität und die Dispersität machen zu können. Auch die elektrophoretische Lichtstreuung ist geeignet, schnell Aufschluß über die Stabilität einer Probe zu geben.

Mit Hilfe von Theorien lassen sich zu Beginn eines aggregierenden Systems wie auch während der Aggregation (z.B. im Verlaufe eines Tages) Voraussagen über das Endresultat einer Proteinlösung machen. Bei diesen Meßverfahren sind eine große Sorgfalt hinsichtlich der Sauberkeit, eine genaue Durchführung und ein korrektes Beachten der Umgebungsbedingungen Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse.

Liegen darüber hinaus instabile Systeme vor, die einen irreversiblen Prozess in Richtung eines neuen Gleichgewichtszustandes durchlaufen, wie die in dieser Arbeit im wesentlichen untersuchten, so werden die Anforderungen an den Experimentator größer.

Mit der Klein-Goniometer-Apparatur wurden die Monomer-Monomer-Wechselwirkungen des Lysozyms zu Beginn der Aggregation durch die Einwirkung verschiedener Salze studiert. Insbesondere beziehen sich diese Messungen auf das Standardsystem Lysozym plus NaCl im 0,1M Na-Acetat Puffer (pH 4,26) durch die systematische Variation der Salz- sowie der Lysozymkonzentration. Diese Elektrolyte folgten bezüglich ihrer Anionen der Hofmeister-Serie:



Die Effektivität der Anionen auf die Proteinaggregation steigt von links nach rechts. Es ergibt sich für das aggregierende Lysozym-Monomer die umgekehrte Reihenfolge der Hofmeister-Serie, wobei in allen Fällen das Kation Na^+ ist.

Da zu Beginn einer Proteinkristallisation die Monomer-Monomer-Wechselwirkungen den weiteren Verlauf der Aggregation bestimmen, werden mit Hilfe der DLVO-Theorie Aussagen über das Wechselwirkungspotential gemacht. Die qualitativen Ergebnisse stimmen

gut mit den Übergangsbereichen des Aggregationsverhaltens bezüglich der verwendeten Salze überein.

Das Gesamtwechselwirkungspotential $W(r)$ ist durch die anziehenden und abstoßenden Kräfte der Monomere bestimmt. Als Ergebnis kommt die reziproke Hofmeister-Serie der Salzanionen heraus, die aufgrund ihrer Hydratisierbarkeit, ihrer Größe und ihrer Wertigkeit das Aggregationsverhalten des Proteins beeinflussen. Aus der Meßreihe für das Lysozym läßt sich eine Hamaker-Konstante von $A_H = 7,9 \pm 0,12 k_B T$ und ein Bereich des Sternpotentials Ψ_S zwischen $16mV$ und $43mV$ angeben. Dadurch ergibt sich für die theoretisch ermittelte Ladungszahl Z_p ein Bereich von $+5,4$ bis $+14,3$ für das Protein Lysozym.

Dies bedeutet, daß aufgrund der verwendeten Salze das eigentliche Oberflächenpotential Ψ_0 innerhalb dieses Puffersystems soweit reduziert ist, daß in Abhängigkeit des Elektrolyts die Aggregation bei einer bestimmten Salzmolarität beginnt. D.h. die Elektrolyte verändern das Wechselwirkungspotential des Lysozym-Monomers so, daß die aggregationsverhindernde Energiebarriere unterschiedlich ausgeprägt ist.

Eine eindeutig positive Korrelation zwischen Salzart und -konzentration mit den Endresultaten (Kristall, Präzipitat) der verschiedenen übersättigten Lysozymlösungen bleibt jedoch aus, da sich die eingestellten Endresultate mit den gemessenen Daten zumindest für die Elektrolyte *NaCitrat* und Na_2SO_4 unterscheiden. Eine Feststellung ist aber, daß eine grundsätzliche Neigung zur erfolgreichen Kristallbildung des Lysozyms im Bereich der Umgebungsbedingungen des Puffersystems vorliegt.

Denn in dieser Arbeit wurde im Rahmen der Hofmeister-Serie festgestellt, daß das *NaCitrat* am schwächsten, d.h. erst bei höheren Salzkonzentrationen, die Aggregation fördert. Weiterhin wird in der Literatur öfter das Na_2SO_4 als eher trägeres Elektrolyt erwähnt, d.h. bei diesem Salz stellt sich die Aggregation erst bei höheren Konzentrationen im Gegensatz zum *NaCitrat* ein. Im Vergleich mit den Endresultaten würde das dem Kristallisationsverhalten des Lysozyms eher entsprechen. Denn beim *NaSCN* und Na_2SO_4 lagen keine Kristalle vor, dagegen war eindeutig seeigel- bzw. gelartiger Ausfall zu erkennen. Beim $NaNO_3$ wurde nur ein Kristall und beim *NaCitrat* eher viele kleine festgestellt.

Die Schlußfolgerung ist, daß das zugesetzte Salz die Pufferbedingungen nicht wesentlich verändern sollte, um erfolgreiche Kristallisationsbedingungen erzielen zu können. Der

Grund liegt darin, daß der metastabile Bereich der Proteinlösung bei dem NaCl so groß ist, daß sich der Phasenübergang ab einer bestimmten Salzkonzentration nicht schlagartig einstellt. D.h. daß die Aggregation der Proteine genügend langsam ablaufen kann, sodaß der Phasenübergang erfolgreich im Sinne einer günstigen Kristallproduktion stattfindet. Nützliche Hinweise für eine erfolgreiche Kristallisation liefern die Kinetikmessungen, auf die weiter unten eingegangen wird.

In dem oben genannten dynamischen Lichtstreuemeßverfahren (DLS) wurde u.a. das Aggregationsverhalten des Lysozyms mit dem Elektrolyt NaCl gelöst im 0,1M Na-Acetat Puffer mit pH 4,26 untersucht. In diesem Fall ergab sich ein Sternpotential von $\Psi_S = 25,7mV$ und eine Ladungszahl von $Z_p = 8,6$. Eine andere Herangehensweise ist das Messen des Zetapotentials ζ , um in erster Näherung Werte für das Sternpotential Ψ_s und damit für die Oberflächenladung Q zu bekommen.

Dazu diente der Aufbau der Laser-Doppler-Elektrophorese (ELS), die auf das obige Standardsystem angewendet wurde. Die Lysozymmessungen ohne Elektrolytzusatz ergaben ein mittleres Zetapotential von $\zeta = 17mV$. Die Berechnung der Ladung Q führte zu einem mittleren Wert der Ladungszahl von $Z_p = 5,7$.

Das obige Zetapotential ergibt eine relative Abweichung von 19% zu dem theoretisch zu erwartenden Wert von $21mV$, der sich in erster Näherung für Lösungen mit dem verwendeten Puffer von 0,1M Na-Acetat einstellt. Das gemessene Zetapotential entspricht in sehr guter Näherung nur dann dem Sternpotential Ψ_s , wenn es im Falle einer Lösung mit sehr geringem Elektrolytgehalt ($10^{-6}M$) gemessen werden kann, d.h. mit großer Ausdehnung der diffusen Schicht und einem daher geringen Potentialunterschied zwischen Ψ_s und ζ .

Obwohl ein dünner Rest der diffusen Schicht während einer elektrophoretischen Messung am Protein verbleibt und das gemessene Zetapotential somit geringfügig kleiner als das Sternpotential ist, wird in der Praxis der gemessene Zetapotentialwert ζ mit dem Sternpotential Ψ_s und letztlich mit dem eigentlich interessanten Oberflächenpotential Ψ_0 gleichgesetzt.

Der verbleibende dünne Rest der diffusen Schicht ist auch dafür verantwortlich, daß mit zunehmendem Elektrolytgehalt geringere Zetapotentiale gemessen werden. Der Potentialunterschied zwischen Ψ_s und ζ nimmt mit zunehmender Elektrolytkonzentration zu. Wäre jeweils die komplette diffuse Schicht abgestreift, so ließe sich unabhängig von der Salzkonzentration ein identisches Zetapotential messen, das dann dem Sternpotential

entsprechen würde. Daher resultiert auch die große Abweichung zwischen den ermittelten Werten für die Ladungszahl des Lysozyms mittels der beiden obengenannten Meßverfahren (DLS und ELS).

Das Hauptinteresse gilt dem Aggregationsverhalten des Lysozyms in Abhängigkeit vom Oberflächenpotential Ψ_0 , d.h. der Nettoladung Q des Lysozym-Monomers, in Relation zur Ionenstärke I des Lösungsmittels. Dazu wurde das Lysozym in einer Matrix mit den Konzentrationen 20, 30, 40 und 50 mg/ml mit den NaCl-Konzentrationen zwischen 0,3 und 1,1 M in 0,1 M Schritten mittels des elektrophoretischen Meßverfahrens unmittelbar nach der Probenpräparation und nach drei Tagen untersucht.

Die Messungen des Zetapotentials bezüglich der Anfangsstabilität in Abhängigkeit der NaCl-Molarität, Abb.(4.26), ergaben mit wachsender Salzkonzentration einen Bereich von 15 mV abfallend bis auf 4,3 mV. Bei einem hohen Salzanteil von 0,9 M stieg das Zetapotential wieder durch die Zunahme der Clusterbildung des Lysozyms an, die aufgrund der niedrigen elektrostatischen Abstoßung gefördert wird.

Das Lysozymsystem (Monomere plus Cluster) durchlief im Mittel ein Minimum bei 0,9 M NaCl-Konzentration und strebte bei höheren Salzkonzentrationen ein größeres Zetapotential an, um den neuen Gesamtzustand zu stabilisieren. Nach drei Tagen stiegen die ζ -Werte, Abb.(4.27), auf Werte zwischen 16 mV und 24 mV, wobei sich ein Maximum im Bereich der Lysozymkonzentrationen von 30 bis 40 mg/ml und 0,8 M NaCl-Konzentration einstellte.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die gemessenen Zetapotentiale mit der Tendenz des Lysozyms zur Aggregatbildung und der Tendenz zur Erreichung eines stabileren Endzustandes gut korreliert werden können. Denn es ergab sich bis zu einer Lysozymkonzentration von 30 mg/ml mit einer NaCl-Molarität von 0,6 M keine Änderung des makroskopischen Zustandes, d.h. es lag stets eine stabile Suspension vor. Daneben wurden im Bereich 35 mg/ml bei 0,8 M NaCl die Existenz einiger größerer Kristalle festgestellt und ab 40 mg/ml bei 1,0 M NaCl lag ein weiß-flockiges Präzipitat vor.

Um einen Einblick in das dynamische Aggregationsverhalten, d.h. Beobachtung der Kinetik, bezüglich des Zetapotentials zu bekommen, wurden ebenfalls elektrophoretische Messungen durchgeführt, Abb.(4.24). Jedoch war der Materialaufwand sehr hoch, so daß Ergebnisse nur für eine feste Salzkonzentration von 0,7 M NaCl erhalten wurden.

In diesem Bereich stellten sich Zetapotentiale zwischen 7 mV und 3,7 mV ein. Im Ver-

lauf des Beobachtungszeitraumes von einer Stunde zeigte das Lysozym in Abhängigkeit der Proteinkonzentration eine unterschiedliche Tendenz, das Zetapotential zu senken. Je höher die Proteinkonzentration war, desto schneller stellte sich eine Verringerung des Zetapotentials ein. Dies führte sogar dazu, daß sich ab Beginn der Messungen ein von annähernd Null anwachsendes Potential ergab, welches durch die schon vorhandenen Aggregate (Cluster) beeinflußt wurde.

Ein weiterer Aufbau sollte die bereits an diesem Institut gewonnenen Erkenntnisse in der Hängender-Tropfen-Apparatur nochmals bestätigen. Dies gelang auch mit kleinen Abweichungen, die in der unterschiedlichen Probenmenge und -umgebung zu finden sind. Untersucht wurde das Standardsystem Lysozym mit NaCl im 0,1M Na-Acetat Puffer (pH 4,26) sowie das Protein Concanavalin A mit NaCl im 50mM Phosphat Puffer (pH 7,0).

Prinzipiell ist festzustellen, daß die dynamische Lichtstreuung auch an sehr kleinen Volumina ($10\mu\text{l}$) durchführbar ist, jedoch auch eine erhebliche subtile Angelegenheit darstellt. Es wurden Proteinlösungen unter günstigen wie ungünstigen Kristallisationsbedingungen untersucht und die Ergebnisse mit den Endresultaten, d.h. dem Vorliegen von Kristallen bzw. von amorphem Präzipitat, verglichen.

Es lassen sich wie in herkömmlichen Lichtstremessungen unter positiven Kristallisationsbedingungen RLCA- sowie DLCA-Regime identifizieren. Hier liegen kleine Abweichungen in den fraktalen Strukturen vor, die ein Hinweis für die Abhängigkeit der Aggregation von den Umgebungsbedingungen sind. Z.B. der Unterschied eines geschlossenen Systems in einer Küvette zu dem eines offenen wie beim Tropfen, bei dem sich die Salzkonzentration zusätzlich durch Verdampfung in Relation zum Reservoir verändert.

Bei Veränderung der obigen Mischungen war ein deutlicher Unterschied bei den Tropfenmessungen hinsichtlich ihrer Kristallisationsneigung feststellbar. Dazu wurde im Falle der Lysozymmessungen das Elektrolyt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und im Falle des Concanavalin A der Na-Acetat Puffer verwendet.

Die Verläufe der Kinetiken waren im Falle eines amorphen Präzipitats durch eine größere Schwankungsbreite charakterisiert (Lysozym) und durch ein sehr viel schnelleres Anwachsen der Cluster auf über $1\mu\text{m}$ innerhalb einiger Stunden. Waren die Suspensionen auch nach etlichen Tagen stabil (Concanavalin A), so manifestierte sich die Aggregationsbildung durch eine Clustergröße von nicht mehr als 200nm .

Obwohl eine grundsätzliche Übereinstimmung der gemessenen Daten mit den Endzuständen

der Proteine in Form von Kristallen oder amorphen Präzipitats bestätigt ist, bleibt eine vollständige Beschreibung des Proteinaggregationsprozesses weiterhin aus. Diese Arbeit konnte allerdings einige Punkte zum näheren Verständnis der Aggregation von Lysozym unter Fällungsbedingungen beitragen, die Voraussetzung für eine spätere Kristallisation sind.

Die entwickelten Methoden bieten außerdem die Möglichkeit, aus der Beobachtung der Aggregationsphase Parameter zu bestimmen, die Aufschluß über den Erfolg des Experiments geben können. In dieser Weise kann der Weg zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Kristallisation eines Proteins erheblich verkürzt werden.