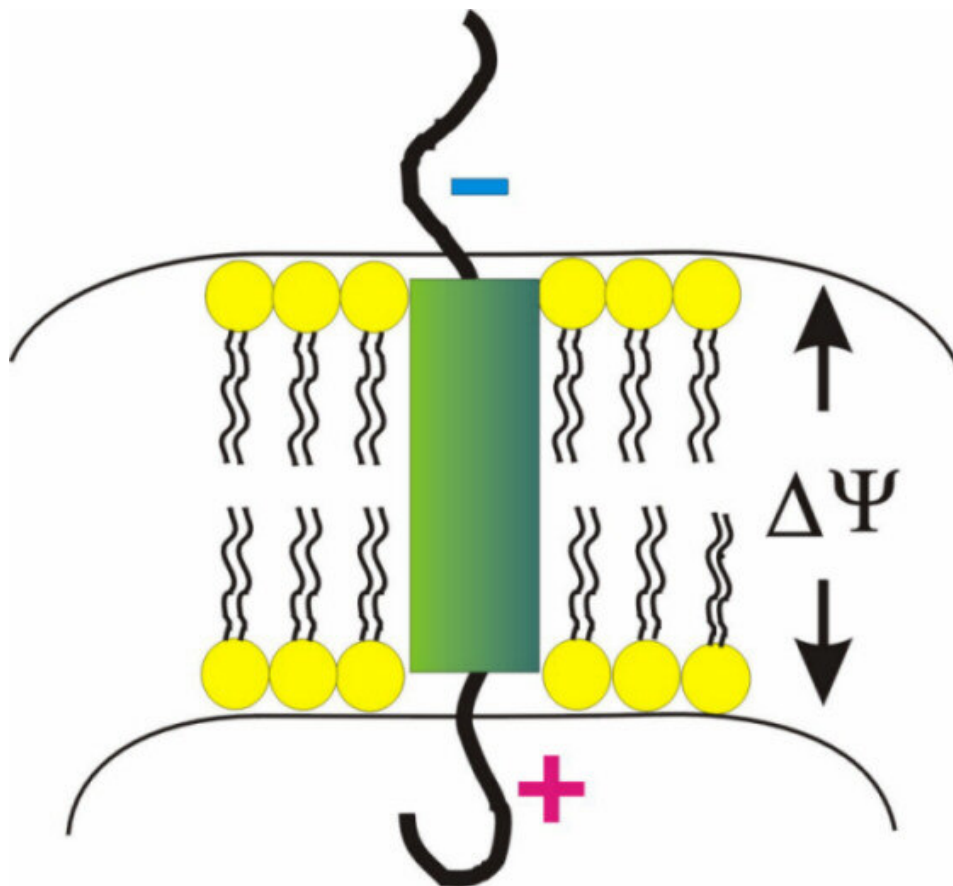


Aufbaupraktikum *Biophysik*

für Biologen

„Modellsysteme zur Untersuchung von Membranen und Membranproteinen“



Universität des Saarlandes, Homburg
Bereich Theoretische Medizin, Fachrichtung Biophysik

Inhalt

1	Lipide, proteinfreie und -enthaltende Modelmembranen	3
1.1	Grundlagen zur biologischen Membran	3
1.2	Der chemische Aufbau von Membranlipiden	4
1.3	Bildung von Lipid- und Detergenzaggregaten	5
1.4	Das integrale Membranprotein <i>Bakteriorhodopsin</i> als Modellsystem einer Protonenpumpe	7
1.5	Experimenteller Teil	10
1.5.1	Eigenschaften schwarzer Lipidmembranen (BLM)	10
1.5.1.1	Präparation der Membran	10
1.5.2	Bestimmung der Protonenpermeabilität von farbstoffgefüllten Lipidvesikeln	11
1.5.2.1	Präparation kleiner unilamellarer Vesikel (SUV's) durch Beschallung mit hoher Leistungsdichte	11
1.5.3	Charakterisierung der Purpurmembran	11
1.5.3.1	Absorptionsspektren von BR	11
1.6	Literatur	11
2	Periphere Membranproteine	13
2.1	V ₁ -ATPase aus <i>Manduca sexta</i> als Model eines peripheren Membranproteinkomplexes	13
2.2	Experimenteller Teil	13
2.2.1	Isolierung der V ₁ -ATPase	13
2.2.1.1	Vorreinigung des ATPase-Rohextraktes	13
2.2.1.2	Chromatographische Trennung	14
2.3	Literatur	15

1. Lipide, proteinfreie und -enthaltende Modelmembranen

1.1 Grundlagen zur biologischen Membran

Biologische Membranen gehören zu den wichtigsten physiologischen Systemen, die am Aufbau lebender Zellen beteiligt sind. Sie bestehen aus einem strukturellen Grundgerüst und werden durch komplizierte biochemische Apparate, membranständige und angelagerte Proteine, funktionalisiert. Dieses Gerüst wiederum wird aus zwei grundverschiedenen Komponenten aufgebaut, der *Lipid-Doppelschicht* und angelagerten *Strukturelementen*. Während allen Membranen das Element der Lipid-Doppelschicht gemeinsam ist, kann die andere Komponente, die häufig zu einem überwiegenden Anteil aus Strukturproteinen besteht, bei verschiedenen Membranen stark unterschiedlich sein. Lipid-Doppelschichten besitzen also in allen Zellen bedeutende Aufgaben bei der Zell- und Organellen-Kompartimentierung und separieren auf der einen Seite Zell- (Organellen-) Inneres und -Äußeres, z.B. zur Aufrechterhaltung chemischer und elektrischer Potentiale. Auf der anderen Seite sind sie in die Regulation selektiver Transportprozesse involviert, sei es direkt durch ihre Permeabilität für bestimmte chemische und/oder elektrische Spezies, sei es indirekt in Zusammenarbeit mit Transport-Mediatoren, z.B. Carrier- oder Porenproteinen. Darüberhinaus stellt die Lipid-Doppelschicht für in ihr eingelagerte Funktionsproteine eine spezifische Matrix dar, die häufig erst den effizienten Ablauf komplexer Reaktionen ermöglicht. Das *fluid-mosaic* Modell (s. Abb. 1.1) der Biomembran trägt dieser Tatsache Rechnung, indem es die Biomembran als *Mosaik* von Proteineinheiten beschreibt, die in einer zweidimensionalen Matrix von Lipid-Molekülen „schwimmen“, und ihre Funktionsfähigkeit im Gesamt-organismus durch spezifische Wechselwirkung mit bestimmten Lipid-Molekülen (*boundary lipids*) und durch lipidmedierte Protein-Protein-Wechselwirkung erhalten. Grundsätzlich stellen die Lipid-Komponenten der verschiedenen Biomembranen eines Organismus, also die eigentlichen Doppelschichten, komplizierte Legierungen amphiphiler Moleküle dar, deren Eigenschaften entscheidend von ihren Wechselwirkungen mit der Umgebung, also den elektrolytischen Phasen, abhängen. Gleichzeitig fällt eine Eigenschaft amphiphiler Moleküle in wässrigen Phasen ins Auge, die Fähigkeit zur *spontanen Selbstorganisation*, die derartige Moleküle für ihre Rolle in Zellen prädestiniert.

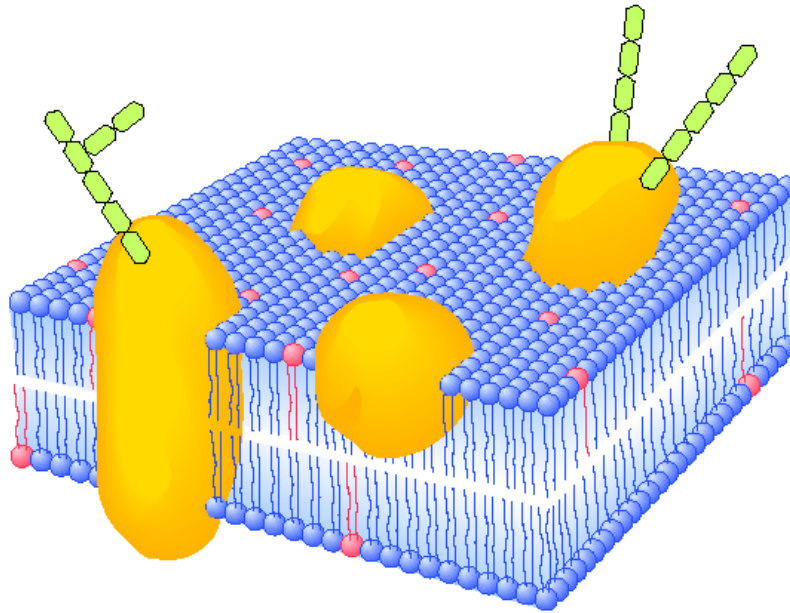


Abb. 1.1 Struktur einer biologischen Membran nach Singer und Nicolson (Adam *et al.*, 1995)

1.2 Der chemische Aufbau von Membranlipiden

Phospholipide bilden die wichtigste Gruppe der Membranlipide. Zu ihnen zählen z. B. Phosphatidylcholin (Lecithin), Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin (s. Abb. 1.2a). Die Stammverbindung dieser Lipide ist die Phosphatidsäure, der 1,2-Di-Acyl-Ester des 3-Phosphoglycerins mit zwei langkettigen Fettsäuremolekülen (Phosphatidylrest). In der Regel ist am C_1 -Kohlenstoffatom des Glycerins eine gesättigte und am C_2 -Kohlenstoffatom eine ungesättigte Fettsäure (z.B. Ölsäure, Linolsäure) gebunden. Die cis-Doppelbindung führt zu einer Störung der Anordnung der Alkylgruppen in der Membran und damit zu einer Herabsetzung des Schmelzpunktes (*Fluidisierung*).

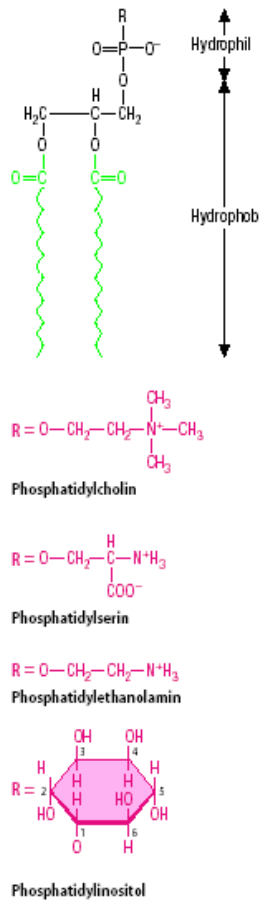


Abb. 1.2a: Strukturformel bekannter Phospholipide

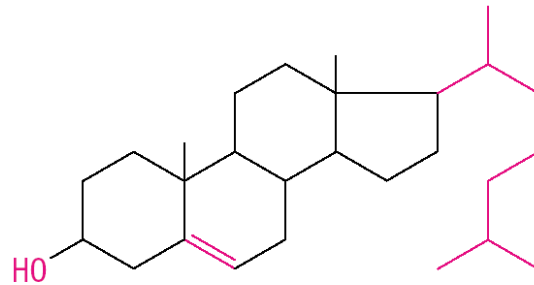


Abb. 1.2b: Chemische Struktur des Cholesterins

Bei vielen Bakterien wird ein ähnlicher Effekt durch Verzweigung der Fettsäuren erzielt. Archaeobakterien besitzen anstelle der Ester der Fettsäuren thermisch stabile Glycerin-Ether von langkettigen Fettalkoholen. In tierischen Membranen erfolgt eine weitere Fluidisierung durch den Einbau von Cholesterin (s. Abb. 1.2b). Wie in Abb. 1.3 gezeigt, wird dieses scheibenförmige Molekül aufrecht in die Lipiddoppelschicht eingebaut.



Abb. 1.4: Die BLM bildet sich spontan aus der bunten Membran.

Untersuchungen an proteinfreien und -haltigen, sog. rekonstituierten Membranen durchgeführt werden. Solche BLM's können in einem Teflontrog unter wässriger Lösung gebildet werden. Der Trog ist durch eine Trennwand in zwei Kompartimente geteilt. Wird über die Öffnung in der Trennwand (*Septum*) der Teflon-Kammer eine Lösung von Lipid, das in einer organischen Substanz gelöst ist, gestrichen, so bildet sich zunächst eine dicke Flüssigkeitslamelle (s. Abb. 1.4). Nach einigen Minuten fließt überflüssiges Lösungsmittel und Lipid zum Rand des Septums ab. Durch Selbstorganisation bildet sich dabei eine Lipid-Doppelschicht aus. Durch destruktive Interferenz der an den beiden Grenzflächen reflektierten Lichtstrahlen erscheint die BLM im Auflicht schwarz (die Phasendifferenz der Teilstrahlen beträgt 180°).

Das elektrische Verhalten einer proteinfreien BLM lässt sich auf einfache Weise durch ein Ersatzschaltbild beschreiben (s. Abb. 1.5). Vergleichbar einer Parallelschaltung eines (ohmschen) Widerstandes und eines Kondensators beschreibt der Widerstand die Ionenströme durch die Membran, der Kondensator die Anordnung der leitenden wässrigen Kompartimente (= Platten) auf den beiden Seiten der nicht-leitenden Lipidschicht (Dielektrikum). Der durch die Anordnung fließende Strom (I) ist demnach die Summe der Ströme durch den Widerstand (I_R) und den Kondensator (I_C):

$$I = I_R + I_C \quad \text{Gl. 1}$$

Dabei ist der „ohmsche“ Strom I_R der momentanen Spannung U an der Membran proportional, der kapazitive Strom I_C folgt jedoch dem zeitlichen Spannungsgradienten:

$$I_R = U/R \quad \text{Gl. 2}$$

$$I_C = C \cdot (\delta U / \delta T) \quad \text{Gl. 3}$$

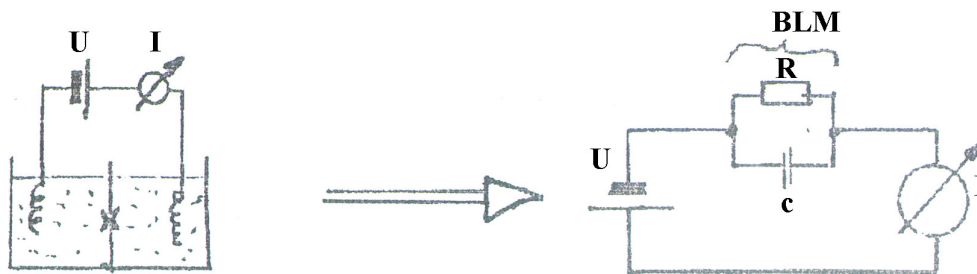


Abb. 1.5: Experimentelle Anordnung und Ersatzschaltbild einer BLM

Eine Suspension von Phospholipiden in Wasser bildet multilamellare Vesikel mit einer Anordnung von Lipiddoppelschichten und somit einen dritten Typ von Modelmembranen. Unter Beschallung (Vibration durch Ultraschall) entstehen daraus Liposomen (s. Abb. 1.6d) – geschlossene, sich selbstversiegelnde, flüssigkeitsgefüllte Vesikel, begrenzt durch eine Doppelschicht. Einmal gebildet, sind Liposomen sehr stabil und können nach der Dialyse durch Gelfiltration oder Zentrifugation getrennt werden. Wegen der hohen Oberfläche, die je Volumen Liposomenlösung herstellbar ist, lassen sich an Liposomen enzymatische Reaktionen von Membranproteinen und Vorgänge des Stofftransportes studieren.

Liposomen werden nach steigendem Durchmesser in SUV's (*small unilamellar vesicles*; $\varnothing = 20-100$ nm), LUV's (*large small unilamellar vesicles*; $\varnothing = 100-500$ nm) und MLV's (*multilamellar vesicles*; $\varnothing > 100$ nm) eingeteilt.

Eine weitere Gruppe amphiphiler Moleküle stellen Detergentien dar, die in wässrigen Lösungen sog. *Micellen* bilden (s. Abb.1.6b), in denen hydrophobe und hydrophile Gruppen optimal miteinander wechselwirken können. Der Abschirmeffekt auf hydrophobe Gruppen durch die Micelle ist mit wenigen Molekülen nicht möglich. In verdünnter wässriger Lösung von Amphiphilen muß deren Konzentration daher erst eine bestimmte *kritische Micellenkonzentration* (*critical micelle concentration*, **cmc**) überschreiten, bevor sich Micellen bilden. Oberhalb der *cmc* bildet praktisch das gesamte zugesetzte Amphiphil Micellen.

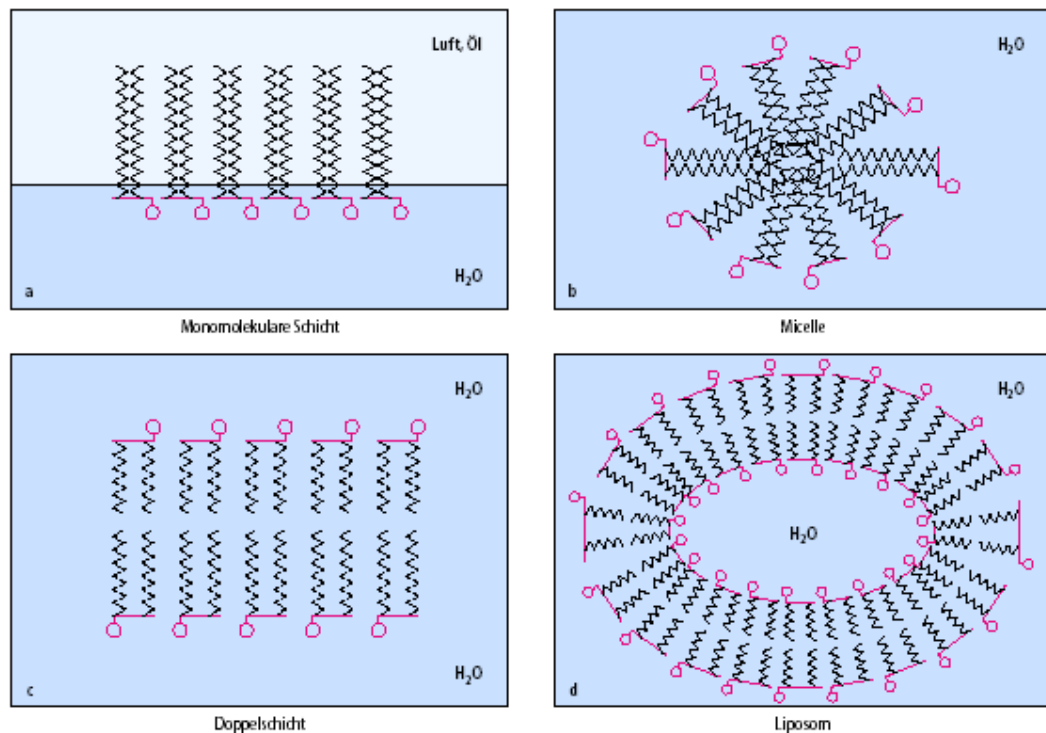


Abb. 1.6: Lipide und Detergeniten bilden in wässriger Suspension unterschiedliche Molekülaggregate (Löffler und Petrides, 1998).

1.4 Bakteriorhodopsin als Modellsystem einer Protonenpumpe

Membranproteine werden aufgrund ihrer Lokalisation (s. Abb. 1.1) innerhalb der Membran in *integrale* und *periphere* Membranproteine eingeteilt. Integrale Membranproteine tauchen mit einer oder mehreren hydrophoben Oberflächenproteinen in die hydrophobe Domäne der Membran ein oder durchspannen sie sogar. Die Assoziation dieser Proteine mit der Lipiddoppelschicht wird vor allem durch hydrophobe Bindungen vermittelt. Innerhalb der hydrophoben Oberflächendomäne der integralen Membranproteine werden praktisch nur hydrophobe Aminosäurereste exponiert. Die hydrophobe Binding zwischen Protein und Lipid würde jedoch allein keine stabile Lokalisation des Proteins bewirken, da hier keine gerichteten Kräfte vorliegen (Verdrängung von Wasser, entropischer Effekt). Bei vielen integralen Membranproteinen findet sich daher an den Grenzen zwischen hydrophoben und

hydrophilen Oberflächendomänen jeweils ein „streifenförmiger“ Bereich, in dem polare, vor allem basische, Aminosäureseitenreste exponiert werden. Die zwischen diesen beiden Domänen und den geladenen Kopfgruppen der Lipide, z. B. Cardiolipin, wirkenden gerichteten Kräfte halten das integrale Membranprotein in einer definierten Lage in der Membran (Ladungskäfig).

Ein sehr intensiv, unter anderem auch an der BLM, sehr intensiv studiertes Membranprotein ist das lichtgetriebene, ionentransportierende *Bakteriorhodopsin* (BR). BR wurde als integrales Membranprotein in *Halobacterium halobium*, entdeckt. Diese Halobakterien (s. Abb. 1.7) sind stäbchenförmig und haben eine Ausdehnung von etwas 5 μm in der Länge und 0,5 μm im Durchmesser. Sie leben in gesättigten Salzlösungen (3-5 M NaCl). BR tritt in *H. halobium* nur in der Purpurmembran (PM) auf, einem 4,5 nm dicken Bereich der Plasmamembran des Bakteriums, der neben bestimmten Lipiden (Anteil 25 %) als einziges Protein BR enthält (Anteil ca. 75 %). Innerhalb der Purpurmembran ist BR in einer monomolekularen Schicht aus Trimeren, die sich zweidimensional hexagonal anordnen, organisiert.

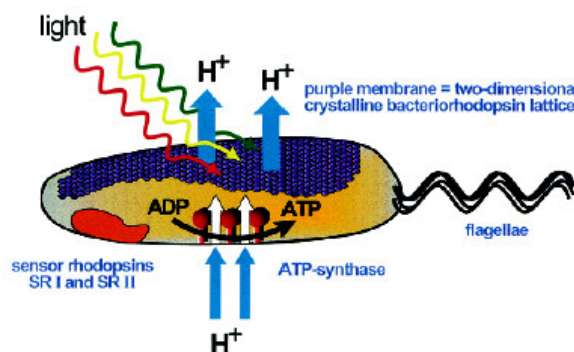


Abb. 1.7: Schematische Darstellung einer Halobakterien-Zelle (Hampp, 2000)

BR arbeitet als zellauswärtsgerichtete, primär aktive lichtgetriebene Protonenpumpe; Strahlungsenergie wird in einem Protonengradienten von bis zu vier pH-Einheiten zwischen Zellinnerem und Außenmedium umgewandelt. Dieser Gradient wird als Energiequelle von sekundär aktiven oder passiv gradientengetriebenen Transportsystemen genutzt. BR besitzt eine Molmasse von 26 kDa und stellt einen Vertreter der Rezeptoren mit 7 membrandurchspannenden α -Helices dar (s. Abb. 1.8). Es enthält als lichtabsorbierenden Chromophor ein Retinal, ein Derivat des Vitamins A. Das Retinal ist innerhalb der Primärstruktur von BR über eine Schiff'sche Base an das Lysin 216 gebunden.

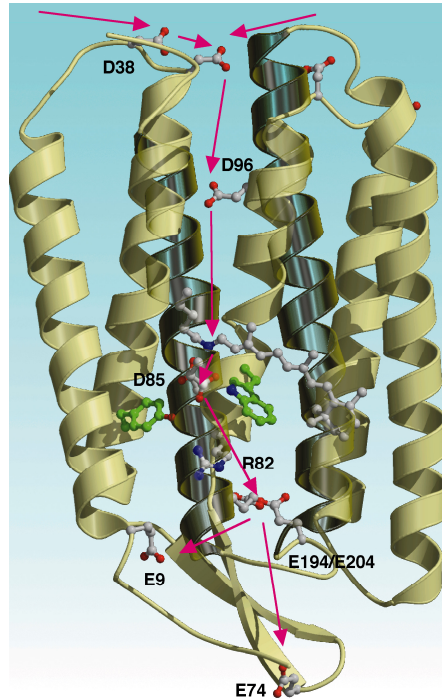


Abb. 1.8: Struktur und Protonenkanal in BR (essen *et al.* 1998)

Nach Absorption eines Photons kann BR einen Zyklus spektroskopisch unterscheidbarer Zustände durchlaufen (S. Abb. 1.9). BR transportiert pro durchlaufenem Zyklus ein Proton aus dem Zytoplasma auf die Extrazelluläre Seite der Plasmamembran. Der Photozyklus ist korreliert mit einem Zyklus von Konformationsänderungen sowohl des Retinals als auch des gesamten Proteins. Mit der Absorption eines Photons geht dieses in einen elektronisch angeregten Zustand über. Für das gesamte Protein führt dieser Übergang innerhalb von max. 200 fs zum primären Photoprodukt BR*. Vom angeregten Zustand fällt das Retinal thermisch zurück in den elektronischen Grundzustand. Dies geschieht entweder direkt oder über das Durchlaufen des Photozyklus (s. Abb. 1.9).

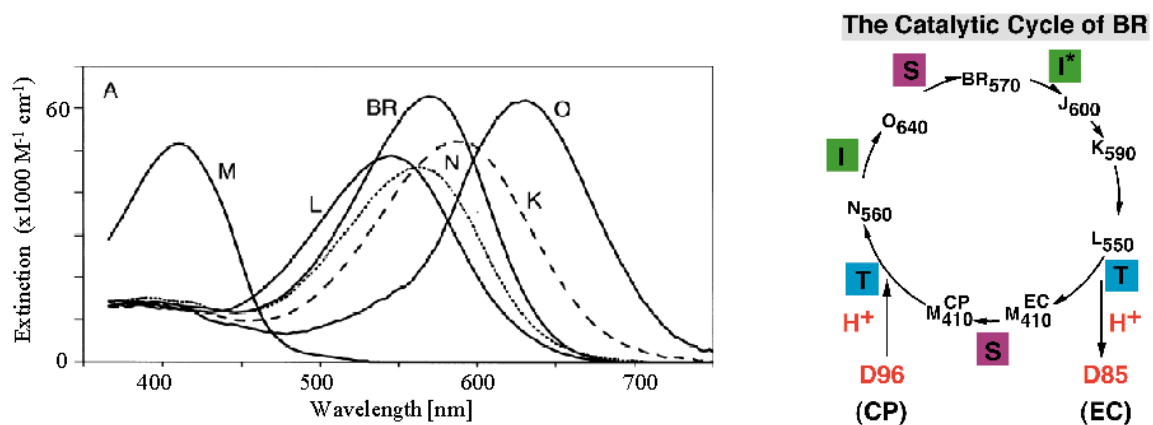


Abb. 1.9: Spektren (links) und Photozyklus (rechts) des BR's nach Absorption eines Photons (Oesterheld, 1999)

Durch fünf der sieben α -Helices wird ein Kanal gebildet (s. Abb. 1.8), in dessen Mitte der Chromophor Retinal sitzt, der den Kanal in eine zytoplasmatische- und eine extrazelluläre Seite unterteilt. Durch Punktmutationen an der Aminosäuresequenz von BR wurden am Protonentransport wesentlich beteiligte Aminosäuren ermittelt. Auf der zytoplasmatischen

Seite des Moleküls befindet sich ein Aspartat (Asp_{96}), das als Protonendonator fungiert und beim M-Zustand das die Schiff'sche Base reprotonierende Proton liefert (s. Abb. 1.9). Es wird selbst durch Aufnahme eines Protons aus dem Zytoplasma reprotoniert, während sich BR im Zustand N befindet. Das aus der Deprotonierung der Schiff'schen Base bei der M-Bildung stammende Proton wird von einem normalerweise deprotoniert vorliegenden Asp_{85} aufgenommen. Asp_{85} befindet sich im extrazellulären Teil des Protonenkanals, aber noch in der Nähe der Schiff'schen Base. Beim M-Zustand wird Asp_{85} deprotoniert und das Proton möglicherweise über Arginin 82 an das extrazelluläre Medium abgegeben.

1.5 Experimenteller Teil

1.5.1 Eigenschaften schwarzer Lipidmembranen (BLM)

1.5.1.1 Präparation der Membran

Die BLM-Kammer aus Teflon ist vor dem Experiment mit (i) Wasser, (ii) Isopropanol und (iii) Hexan zu reinigen und zu trocknen. Das Septum in der Trennwand der Innenkammer ist direkt vor dem Experiment wie folgt mit 20 ml Lipidlösung in Chloroform zu imprägnieren:

- 50 μl 1%-ige Lipidlösung in Chloroform mit einer Pipette ansaugen; ca. 1/10 davon direkt auf das 1 mm Loch des Septums geben und nach 10 Sekunden freiblasen.
- Ca. 1/3 der Lipidlösung in drei kleinen Tröpfchen um den Rand des Loches verteilen (s. Abb. 1.10b) und nach 30 Sekunden trockenblasen.
- Weitere 1/3 der Lipidlösung in drei Tröpfchen um den Rand des Loches verteilen und trockenblasen (s. Abb. 1.10c).
- Den Rest des Lipids mit einer Bewegung über die Lipidflecken aus (b) und (c) hinweg um den Rand herum zu einem Flüssigkeitsring verteilen.

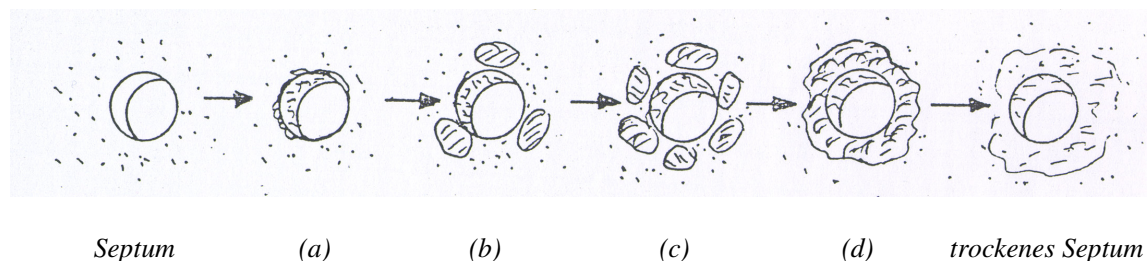


Abb. 1.10: Schema der Membranpräparation

Nach 30 Minuten (Verflüchtigung des Chloroforms) wird die Kammer zusammengebaut, in die Apparatur montiert. In beide Teilkammern werden 3,5 ml Puffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, pH 8,0) gegeben (Septum nicht anspritzen). Dann erst werden zunächst in die hintere Kammer und dann in die vordere 3,5 ml gegeben. Die Silberelektroden werden in die Lösung abgesenkt. Um eine BLM zu erhalten wird eine Pipettenspitze in eine 1%-ige Lipidlösung eingetaucht. Die Spitze wird zweimal an der Glaswand abgestreift. Die Spitze wird dann in die vordere Kammer der BLM-Apparatur eingetaucht und etwas 1-2 mm unterhalb des Septums gehalten. Mit gleichmäßigem Daumendruck wird nun eine Luftblase von 2-3 mm Durchmesser zusammen mit dem Lipid aus der Spitze gedrückt. Die lipidbeladene Blase wird vorsichtig über das Loch geführt, wobei sich eine bunte Lamelle ausbildet. Die bunte Lamelle wird durch festes Klopfen an die Kammer zerstört (überschüssiges Lipid/Lösungsmittel fließt ab). Ohne neues Lipid aufzunehmen wird eine

weitere Luftblase aus der Pipettenspitze gedrückt und über das Loch geführt. Die zweite bunte Lamelle wird in 10-40 min schwarz. Zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften wird an eine Elektrode eine kleine Testspannung (10 mV) angelegt. Die andere Elektrode wird vom elektronischen Amperemeter (Strom-Spannungswandler) auf Bezugspotential (0 V) gehalten. Der durch die Membran fließende Strom (ca. 10^{-12} A) wird mit Hilfe eines digitalen Speicheroszilloskopes (Transientenrekorder) aufgezeichnet.

1.5.2 Bestimmung der Protonenpermeabilität von farbstoffgefüllten Lipidvesikeln

1.5.2.1 Präparation kleiner unilamellarer Vesikel (SUV's) durch Beschallung mit hoher Leistungsdichte

50 mg Sojabohnenlipid werden in Gegenwart von 1 ml Puffer I (30 mM Tris/MES, pH 7,2) und 2 mM eines pH-Farbstoffes (Bromkresolgrün oder Bromthymolblau) beschallt. Dabei wird das Glas so montiert, dass der Schallrüssel knapp (2-3 mm) bis über den Boden des Gefäßes eintaucht. Das Beschallgefäß wird mit einem Wasserbad auf eine Temperatur knapp oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des Lipids gebracht (SBL ~ 20°C). Über eine Pasteurpipette mit Luftschlauch wird die Lipidsuspension vorsichtig mit Stickstoff begast. Die Pipettenspitze ist etwa 1 cm oberhalb der Flüssigkeit zu montieren. Nach 1-2 min. Begasung wird für 30 min bei 70 W beschallt. Zur Vermeidung von Flüssigkeitsverlusten kann das Gefäß mit Parafilm abgedichtet werden. Im Anschluß wird die Suspension für 2 min zentrifugiert, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Parallel dazu werden farbstofffreie Referenzvesikel hergestellt.

- Messen Sie dann die VIS-Absorptionsspektren der Liposomenlösungen
- Führen Sie mit den Indikatorliposomen ein pH-Sprungexperiment durch, indem Sie zu 1 ml mit Puffer I verdünnter Vesikellösung (Puffer I : Vesikellösung, 1 : 1) 100 µl 1 M MES geben. Bestimmen Sie nach schneller Durchmischung die Zeitabhängigkeit der Absorption des Indikatorfarbstoffes (5 – 10 min). Bestimmen Sie anschließend den pH-Wert der Lösung mit einer Glaselektrode.

1.5.3 Charakterisierung der Purpurmembran

1.5.3.1 Absorptionsspektren von BR

Nehmen Sie ein Absorptionspektrum der Purpurmembran auf. Hierzu geben Sie zu 980 µl Puffer (10mM Hepes, 100 mM NaCl bei pH 7.0) 20 µl gelöster Purpurmembranen. Im Anschluß daran nehmen Sie ebenso ein Spektrum der Purpurmembran der BR-Mutante Asp₉₆ auf.

1.6 Literatur

Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D.: *Molekulare Zellbiologie*, Walter de Gruyter, 1994

Stryer, L.: *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum der Wissenschaften, 1990

Donat-P.H.: *Photosynthese*, Thieme, 1999

Löffler und Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie*, 1998

Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. und Ziegler, H.: *Biophysik*, 1982

Hampp, N.: *Chem. Rev.* 100, 2000

2. Periphere Membranproteine

2.1 V₁-ATPase aus *Manduca sexta* als Model eines peripheren Membranprotein-komplexes

V-ATPasen sind heteromultimer, in allen Organismenreichen vertretene Ionentransportproteine. Sie bestehen aus einem peripheren, katalytischen V₁-Komplex und einem membranständigen, ionentranslozierenden V_O-Komplex. Bei Eukaryoten kommen sie ubiquitär in den Membranen "saurer" Organellen sowie in den Plasmamembranen vieler tierischer Zellen vor. Ihre Transportaktivität führt, kontrolliert durch eine Reihe von Regulationsmechanismen und bedingt durch die Natur parallel geschalteter Transportproteine sowie durch diese transportierten Ionen, zur Änderung der Ionenzusammensetzung; die Folge kann z. B., wie in vielen Organellen, eine Ansäuerung um mehrere pH-Einheiten sein, aber auch, wie im Darmlumen bestimmter Insekten eine Alkalisierung bis zu einem pH von mehr als 11.



Abb.: Entwicklungsstadien der Tabakswärmer-Raupe, *Manduca sexta*

Die V_1 -ATPase besteht aus acht Arten von Protein-Untereinheiten, die mit A-H bezeichnet werden. Bei der Plasmamembran V_1 -ATPase des Mitteldarms der Tabakswärmer-Raupe (*Manduca sexta*) besitzen diese Untereinheiten eine Molekularmasse von 67 (A), 56 (B), 54 (H), 40 (C), 32 (D), 28 (E), 16 (G) und 14 (F) kDa (Abb. 2.2). Die Untereinheitenstöchiometrie beträgt vermutlich $A_3B_3HCDEG_2F$. Die beiden großen Unter-einheiten A und B bilden jeweils an den Grenzflächen der A-B-Paare die drei katalytischen Zentren. Zusätzlich existieren weitere drei nukleotidbindende Zentren, denen regulatorische Funktionen zugeschrieben werden.

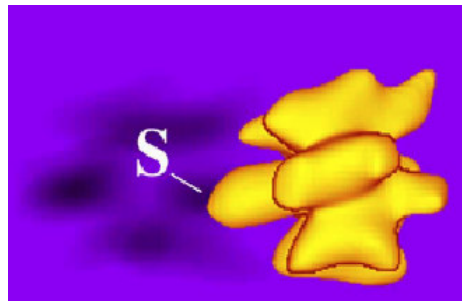


Abb. 2.1: 3D-Rekonstruktion der V_1 -ATPase aus *M. sexta* (Radermacher *et al.*, 2001)

2.2 Experimenteller Teil

2.2.1 Isolierung der V_1 -ATPase

2.2.1.1 Vorreinigung des ATPase-Rohextraktes

Eine Vorreinigung des ATPase-Rohextraktes erfolgt durch Ammoniumsulfatfällung. Dabei wird Ammoniumsulfat langsam unter Rühren bei ca. 4°C zur Proteinlösung gegeben. Salz und Protein konkurrieren um das Hydratwasser. Dadurch fallen wenig hydrophile Proteine mit geringer Hydratisierung zuerst aus. Durch anschließende Zentrifugation werden

die Proteine getrennt. Der ATPase-Niederschlag wird in wässrigem Puffer gelöst und einer weiteren Vorreinigung durch einen Sucrosegradienten unterworfen.

2.2.1.2 Chromatographische Trennung

Die ATPase-Fractionen des Sucrosegradienten werden in einem weiteren Schritt einer Ionenaustauscherchromatographie mit „Mono-Q“ unterzogen. Das Mono-Q-Material enthält quartäre Ammonium-Gruppen auf dem Trägermaterial, das mit den sauren Gruppen der V_1 -ATPase in Wechselwirkung tritt. Die Elution erfolgt durch einen Salzgradienten (NaCl) im Elutionspuffer. Dabei werden die geladenen Gruppen des Proteins durch elektrisch gleichnamige Ionen des Salzes vom Trennmaterial verdrängt. Daher erscheinen die Proteine am Säulenende in der Reihenfolge steigender Oberflächenladungsdichte. In einem zweiten chromatographischen Schritt werden die ATPase-haltigen Fraktionen der Mono-Q-Säule einer Gelpermeationschromatographie (Sephacryl 300-Material) unterzogen. Dabei permeieren die Proteine durch ein poröses Trennmaterial, dessen Hohlräume vergleichbare Größe wie die Proteinmoleküle besitzen. Große Proteine dringen nur in wenigen Hohlräumen ein und wandern daher auf kurzem Weg zurück (Labyrinth-Effekt). Sie werden daher vom Trennmaterial längere Zeit zurückgehalten wie große Moleküle. Die Proteine erscheinen am Säulenende in der Reihenfolge fallender Partikelgrößen (Molekulargewichte).

Die Reinheit und die Untereinheitenzusammensetzung des isolierten Proteins wird mittels Gelelektrophorese analysiert. Bei der Gelelektrophorese werden die Proteine bzw. Untereinheiten anhand ihrer Größe und Ladung unterschieden. Die Trennung erfolgt in wässrigen porösen Gelen aus Polyacrylamid. Polyacrylamid ist das Copolymerisat aus den Monomeren Acrylamid (AA) $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und N,N'-ethylen-bis-acrylamid (BIS) $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. BIS wirkt als Quervernetzer. Durch die Porenweite des Trenngels (s. Abb. 2.2) ist der Molekulargewichtsbereich der Trennung festgelegt. Die Probe wird bei der Elektrophorese zur Erhöhung der mechanischen Dichte mit Sucroslösung und einem Markierungsfarbstoff (z. B. Bromphenolblau, BPB) versetzt. Der Farbstoff besitzt eine höhere elektrophoretische Mobilität wie das am schnellsten wandernde Protein (*Frontmarker*). Das Trenngel wird mit einem Sammelgel hoher Porenweite abgedeckt. Durch die Vorschaltung des Sammelgels kommt es bei der Elektrophorese zur Konzentrierung der Probe in einer besonders dünnen Schicht. Die Gelanordnung wird nach der Probenbefüllung überschichtet.

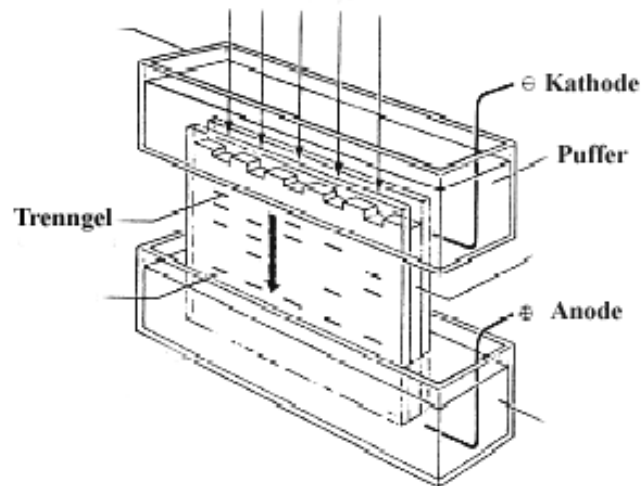


Abb. 2.2: Polyacrylamidgel in einer Gelkammer

2.3 Literatur

Grüber, G., Wiczorek, H., Harvey, W. R. und Müller, V.: *J. Exp. Biol.* 204, 2001

Affinity Chromatography: Principles and Methods. Applikationsschrift, amersham pharmacia biotech, 2000

Gel filtration: Principles and Methods. Applikationsschrift, amersham pharmacia biotech, 2000

Radermacher, M., Ruiz, T., Wiczorek, H. und Grüber, G.: *J. Struct. Biol.* 135, 2001