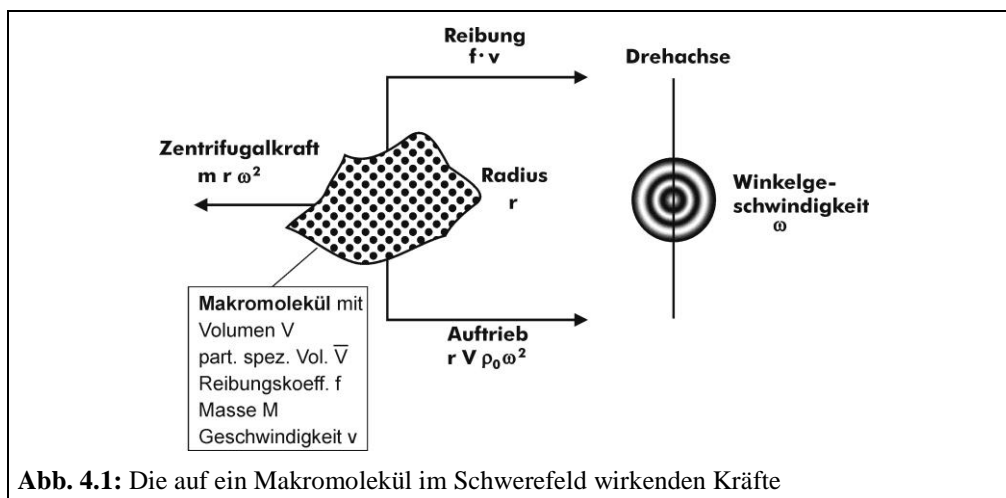


4 Theorie „Zentrifugationstechniken zur Reinigung von Purpormembranen und Kontrolle der Bakteriorhodopsinrekonstitution in Liposomen“

Unter dem Einfluss der Schwerkraft sedimentieren größere Teilchen in einer Lösung beim Stehenlassen allmählich zu Boden. Kleinere Teilchen wie Proteine zeigen im Erdschwerefeld aber kaum Sedimentation, wegen ihrer schnellen Diffusion. Hier müssen Zentrifugen eingesetzt werden, um die Absinkgeschwindigkeit deutlich zu erhöhen. Ein Rotor mit dem Radius r , der sich mit der Winkelgeschwindigkeit ω dreht, erzeugt dabei die Zentrifugalbeschleunigung $r \cdot \omega^2$. Eine wichtige Kennzahl zur Beschreibung von Zentrifugationsvorgängen ist die relative Zentrifugalbeschleunigung RZB, angegeben als Vielfache der Erdbeschleunigung ($\times g$). Dieser Wert lässt sich meist nicht direkt an der Zentrifuge einstellen. Somit ergibt sich die Notwendigkeit, Angaben, die in der Literatur als RZB-Werte vorliegen, auf die Umdrehungen (U) pro Minute eines bestimmten Rotors (Radius r in mm) umzurechnen:

$$RZB = 1,12 \cdot r \cdot \left(\frac{U \cdot \text{min}^{-1}}{1000} \right)^2$$

Die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Moleküls ist direkt proportional zur angelegten Zentrifugalkraft, hängt aber auch von seiner Größe und Gestalt und Dichteunterschied Molekül zu Medium ab. Um sie zu berechnen, werden Kräftebilanzen aufgestellt (Abb. 4.1).



Für die in Abb. 4.1 gezeigten Kräfte wird nach kurzer Zeit ein Kräftegleichgewicht erreicht, d.h. nach der kurzen Anlaufphase sind beschleunigende und verzögernde Kräfte gleich groß, das Molekül sedimentiert mit konstanter Geschwindigkeit.

$$f \cdot v + V \cdot \rho_0 \cdot \omega^2 \cdot r - m \cdot r \cdot \omega^2 = 0$$

Das Volumen V des Makromoleküls lässt sich substituieren durch seine Masse m und sein partielles spezifisches Volumen $\bar{V} = \frac{V}{m}$, das unabhängig bestimmt werden kann.

Damit ergibt sich: $m \cdot r \cdot \omega^2 - m \cdot \bar{V} \cdot \rho_0 \cdot \omega^2 \cdot r = f \cdot v$

bzw. zusammengefasst: $m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot (1 - \bar{V} \cdot \rho_0) = f \cdot v$

somit beträgt die Sedimentationsgeschwindigkeit:

$$v = \frac{m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot (1 - \bar{V} \cdot \rho_0)}{f}$$

Svedberg (Nobelpreis für Chemie, 1926) hat für den Quotienten aus Sedimentationsgeschwindigkeit v und Zentrifugalbeschleunigung $r \cdot \omega^2$ den Sedimentationskoeffizienten s eingeführt:

Svedberg-Gleichung:

$$\text{Sedimentationskoeffizient } s = \frac{v}{r \cdot \omega^2} = \frac{m \cdot (1 - \bar{V} \cdot \rho_0)}{f}$$

Damit ergibt sich ein Maß für die Sedimentation, das nur noch von den Eigenschaften der Probe abhängt. Für viele biologisch wichtige Teilchen liegen die Sedimentationskoeffizienten in der Größenordnung von 10^{-13} Sekunden. Daher gibt man den Sedimentationskoeffizienten häufig in Svedberg-Einheiten an: $1 \text{ S} = 10^{-13}$ Sekunden. Um den **S-Wert** einer Substanz zu bestimmen, werden keine Standard-Zentrifugen eingesetzt, sondern speziell konstruierte analytische Ultrazentrifugen: In denen werden die Zellen eines Rotors mit einer homogenen Lösung des zu analysierenden Makromoleküls gefüllt. Dadurch, dass die Makromoleküle vom Meniskus zum Boden wandern, entsteht eine Grenzschicht, deren Wanderungsgeschwindigkeit gemessen wird. Die Registrierung der jeweiligen Konzentrationsprofile kann mit zwei prinzipiell unterschiedlichen Methoden erfolgen. Bei der UV-Absorptionsmethode wird das radiusabhängige Absorptionsprofil und damit das Konzentrationsprofil in der Rotorzelle gemessen. Die Vorteile dieser aufwändigen Methode sind zum einen die hohe Empfindlichkeit ($10 \mu\text{g}$ Nukleinsäure bzw. $100 \mu\text{g}$ Protein lassen sich pro Zelle nachweisen), zum anderen die selektive Beobachtbarkeit verschiedener Chromophore. Bei einer Mehrkomponentenlösung mit hinreichend unterschiedlichen Sedimentationskonstanten erhält man so aus mehreren Banden zusammengesetzte Sedimentationsprofile. S- und Absorptionswerte können dann für jede Bande getrennt ausgewertet werden.

Die S-Werte von Makromolekülen, die nicht im UV-Bereich absorbieren, müssen durch Schlierenoptik bestimmt werden, wobei die Erhöhung des Brechungsindex registriert wird. Ein spezielles optisches System zeichnet dabei die Änderung des Brechungsindex pro Radiuszunahme (dn/dr) auf. Dadurch entsteht ein Bild, das die Änderung der Konzentration c mit dem Radius r darstellt (dc/dr). Für Nukleinsäuren braucht man für diese Methode etwa 100mal soviel Substanz wie bei der Absorptionsmessung.

Die Molekularmasse einer Substanz lässt sich durch analytische Ultrazentrifugation nur mit Kenntnis des Reibungskoeffizienten f aus der Sedimentationskonstanten errechnen, wobei f abhängig ist von Form und Volumen eines Moleküls. Bei der Gleichgewichtssedimentation kann das Molekulargewicht ohne Einfluss dieser Formparameter bestimmt werden. Man nutzt dabei aus, dass sedimentierende Teilchen nicht nur der beschleunigenden Kraft folgen, sondern auch entgegen dem Konzentrationsgradienten diffundieren. Wählt man die beschleunigende Kraft klein genug, so stellt sich nach längerer Zeit ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion ein, man erhält ein zeitunabhängiges Konzentrationsprofil.

Die Bestimmung der Dichte einer Substanz erfolgt durch Dichtegradientenzentrifugation, die sowohl für die analytische wie auch für die präparative Ultrazentrifugation von großem Interesse ist. Hier können unterschiedliche Substanzen aufgrund ihrer spezifischen Dichte in einem Dichtegradienten (Schwebedichte) aufgetrennt werden.

Schwere Alkalimetallionen wie beispielsweise Cs^+ können in wässriger Lösung bei hohen Zentrifugalfeldern bereits deutlich sedimentiert werden. Aus einer zu Beginn des Laufs homogenen Konzentrationsverteilung des Cäsiumchlorids bildet sich in Abhängigkeit von der Drehzahl ein annähernd linearer Gradient aus. Wenn die Gesamtkonzentration an CsCl sehr hoch ist, geht mit dem

Konzentrationsgradienten ein Dichtegradient mit der Bodendichte ρ_B und der Meniskusdichte ρ_M einher (Abb. 4.2).

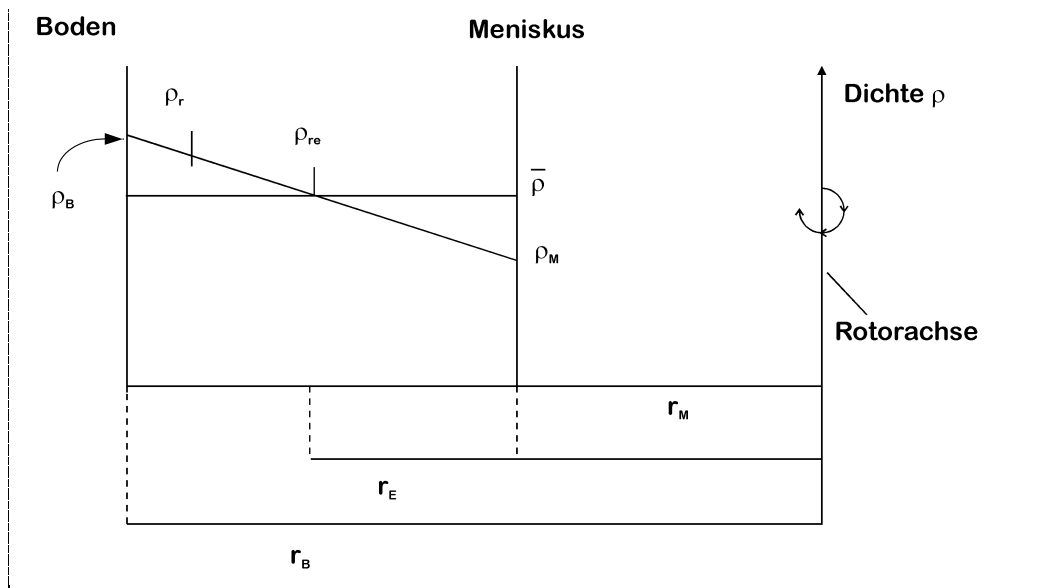


Abb. 4.2: Ausbildung eines linearen CsCl-Gradienten ausgehend von einer homogenen Lösung. Am Anfang der Zentrifugation liegt zwischen Meniskus und Boden des Zentrifugenröhrchens eine konstante CsCl-Konzentration und damit eine konstante Dichte $\bar{\rho}$ vor. Im Laufe der Zentrifugation stellt sich der Gradient ein mit einer maximalen Dichte ρ_B am Boden (links) und einer minimalen Dichte ρ_M am Meniskus. Der Punkt am ρ_{r_E} ist der Hinge-Punkt (s. Text). Ein Molekül mit der Schwebedichte ρ_s wandert zum Radius r , wo $\rho_s = \rho_r$, d.h. seine Schwebedichte der Dichte der Lösung am Punkt r entspricht.

Aufgrund der im Vergleich zu Makromolekülen relativ geringen Molekularmasse des CsCl ist der Gradient relativ flach. Er kann näherungsweise als linear betrachtet werden. Von Bedeutung für die Auswertung ist der sogenannte "Hinge-Punkt", bei dem die Dichte $\rho = \rho[r_E] = \bar{\rho}$ der Anfangsdichte der homogenen CsCl-Lösung entspricht.

Befinden sich in der Lösung Makromoleküle mit der Dichte ρ_s , so sedimentieren sie im Bereich der Rotorzelle, wo $\rho_s > \rho(r)$ und erfahren einen Auftrieb, wenn $\rho_s < \rho(r)$. Das führt zu einer Anreicherung beim Radius r_0 , wo $\rho_s = \rho_r$. Die Diffusion wirkt hierbei der Bandenbildung entgegen und man beobachtet um r eine Verteilungskurve der Makromoleküle (Abb. 4.3).

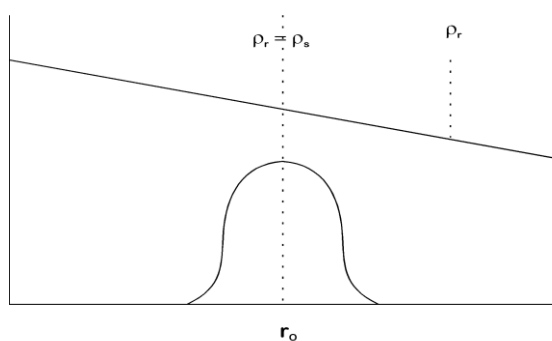


Abb. 4.3: Verteilungsprofil von Molekülen mit der Schwebedichte ρ_s . Um die Dichte der Makromoleküle zu bestimmen, muss $\rho_r = \rho_s$ ermittelt werden.

Befinden sich in der Lösung verschiedene Makromoleküle unterschiedlicher Dichte, so lassen sie sich in verschiedene Banden auftrennen. Die Breite der Banden G ist proportional zu $1/\sqrt{M}$, so dass sich nur große Moleküle mit hinreichender Genauigkeit vermessen lassen.

Die Technik der Dichtegradientenzentrifugation fand erstmals große Beachtung durch das Experiment von Meselson, Stahl und Vinograd, denen es gelang, die semikonservative Replikation der DNA zu beweisen.

Eine Trennung der ribosomalen Untereinheiten in einem Dichtegradienten ist nicht möglich, da die 50- und 30S-Ribosomen annähernd gleiche Dichten haben. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Svedberg-Konstanten lassen sie sich jedoch in einer Zonalzentrifugation durch ihre unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit auftrennen. Die Zentrifugation erfolgt ferner statt in einem Cäsiumchlorid- in einem Zuckergradienten (Saccharose), da bei den für den Gradienten notwendigen hohen Salzkonzentrationen die Proteine denaturiert werden. Hierbei muss der Gradient allerdings in den Zentrifugenröhrchen vorgelegt werden, da sich aufgrund des großen Molekülradius, der Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, Diffusionseffekten und durch die mit den gegebenen Zentrifugen erreichbaren Bedingungen kein linearer Zuckergradient während der Zentrifugation ausbilden kann.

4.1 Geschwindigkeitszentrifugation

4.1.1 Differentialzentrifugation

Die Differentialzentrifugation beinhaltet meist mehrere Zentrifugationsschritte nacheinander. Sie wird oft als erster Schritt zur Fraktionierung eines Zellaufschlusses eingesetzt. Hierbei geht man von einem sehr heterogenen Gemisch aus, das Zellbestandteile unterschiedlicher molarer Massen, wie z.B. Mitochondrien, Ribosomen, tRNAs und Proteine enthält. Die Aufschlusslösung wird zunächst bei einer niedrigen Drehzahl für eine bestimmte Zeit zentrifugiert. Nachdem nun hochmolekulare Zellbestandteile wie Organellen oder Membranfragmente am Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentiert sind, kann der Überstand in einem zweiten Zentrifugenlauf bei höherer Drehzahl - und damit höherer Zentrifugalbeschleunigung - zentrifugiert werden. Dieses Verfahren lässt sich oft wiederholen, so dass bei steigender Drehzahl Moleküle immer kleinerer Molekularmassen sedimentieren. Die Methode hat allerdings den Nachteil, dass keine hundertprozentige Trennung der Moleküle unterschiedlicher Größe stattfindet. Da die einzelnen Partikel unterschiedlich lange Wege im Zentrifugenröhrchen zurücklegen müssen, werden immer auch kleinere Moleküle, die nur eine kurze Strecke wandern müssen, zusammen mit größeren, die einen langen Weg zurücklegen, sedimentiert. Bei der Differentialzentrifugation wird man daher immer einen Kompromiss zwischen Ausbeute und Reinheit eingehen müssen.

4.1.2 Zonalzentrifugation

Bei der zuvor beschriebenen Differentialzentrifugation können nur Komponenten sehr unterschiedlicher Größe getrennt werden. Eine verbesserte Trennung kann erreicht werden, wenn die Lösung, z.B. ein Zellextrakt, als schmale Schicht auf eine im Zentrifugenröhrchen vorgelegte Salz- oder Saccharoselösung mit zum Röhrchenboden hin ansteigender Dichte geschichtet wird (durch Unterschichten bzw. wie in Abb. 4.4 durch Übersichten). Diese Art der Trennung bezeichnet man als Zonalzentrifugation. Während der Zentrifugation wandern die verschiedenen Komponenten als gesonderte Banden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Lösung. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der einzelnen Partikel wird dabei durch verschiedene Molekülparameter und

Lösungseigenschaften bestimmt, wobei üblicherweise die Molekülmasse als Eigenschaft des Moleküls am stärksten eingeht: Moleküle mit höherer Molekülmasse sedimentieren schneller als kleinere (Abb. 4.5).

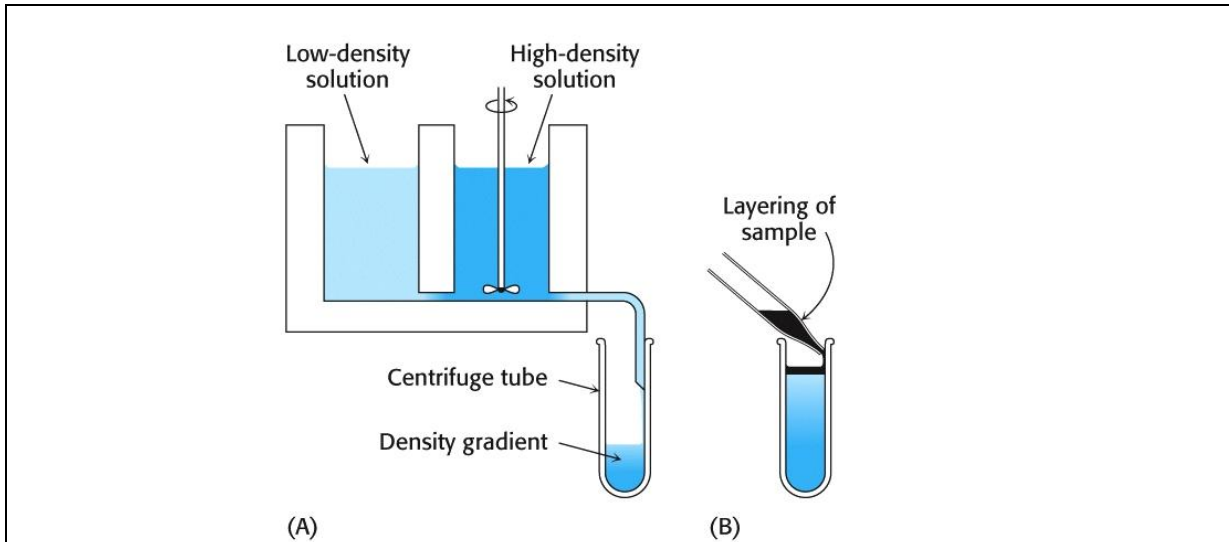


Abb. 4.4: Herstellung eines Saccharose-Dichtegradienten. A) Bei Saccharose als Gradientensubstanz müssen die Dichtegradienten vor der Zentrifugation mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen werden. B) Auf die Gradienten kann dann vorsichtig die Probe aufgetragen werden. (Bilder aus Berg et al. [3]) Der Gradient kann auch in anderer Anordnung gegossen werden, wie?

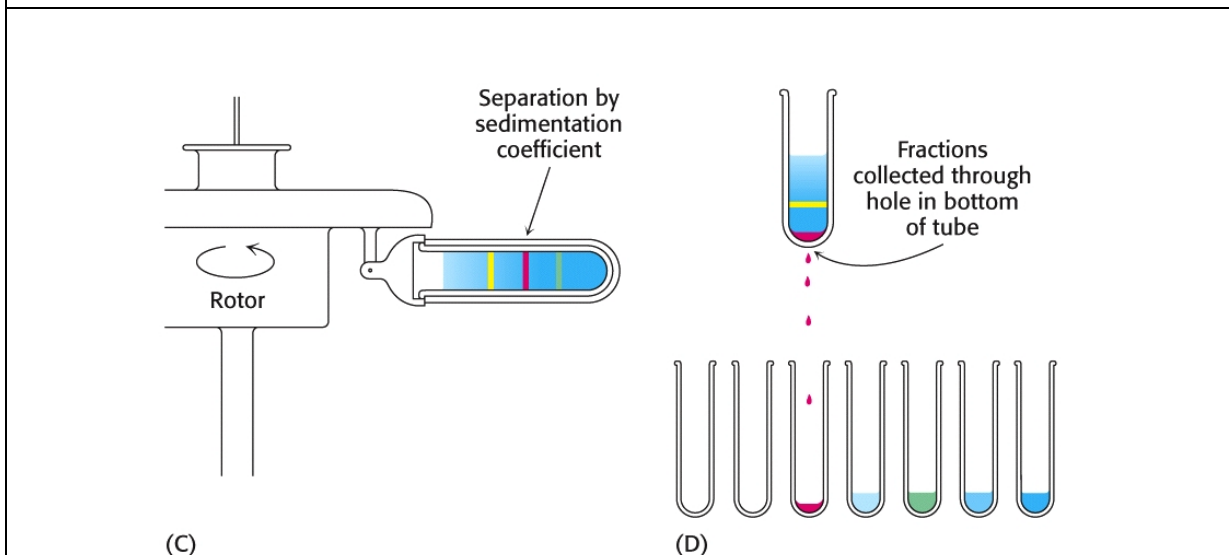


Abb. 4.5: Trennung einzelner Komponenten im Saccharosegradienten (Zonalzentrifugation). C) Die Röhrcchen enthalten einen kontinuierlichen Saccharosegradienten zum Schutz sedimentierender Bestandteile gegen Vermischung durch Temperaturunterschiede und damit verbundene Konvektion, sowie gegen Diffusion und frühzeitige Sedimentation. Gezeigt ist ein Schwenkbecherrotor während der Zentrifugation. D) Durch Anstechen der Plastikröhrcchen am Boden können die einzelnen Fraktionen aufgefangen werden. (Bilder aus Berg et al. [3])

Die Dichte der Trennlösung ist geringer gewählt als die Dichte der Partikel, so dass diese nach längerer Zentrifugation bis zum Boden des Zentrifugenröhrcchens sedimentieren würden. Die Zentrifugation wird daher vorzeitig abgebrochen, sobald die als einzelne Banden sedimentierenden Moleküle eine genügend große Trennstrecke zurückgelegt haben.

Als Trennlösung wird oft eine Saccharoselösung als Gradient mit nach unten ansteigender Dichte vorgelegt. Dies soll zum einen verhindern, dass die schneller sedimentierenden Partikel vorzeitig den

Boden des Röhrchens erreichen. Bei Wanderung durch eine Saccharoselösung mit ansteigender Dichte erfahren sie nämlich einen immer größeren Auftrieb. Zweitens besitzt die höher konzentrierte Lösung eine größere Viskosität, was ebenfalls die Sedimentation im unteren Teil des Gradienten verlangsamt. Die hohe Viskosität der Saccharoselösung hat aber auch eine verringerte Diffusion und Konvektion und damit eine geringere Bandenbreite der zu trennenden Partikel zur Folge.

4.2 Gleichgewichtszentrifugation (Isopyknische Zentrifugation)

Durch Ultrazentrifugation lassen sich Zellkomponenten nicht nur nach Masse, Gestalt und Größe, sondern auch nach ihrer Schwebedichte auftrennen. Hierbei wird die Probe in einem steilen Gradienten sedimentiert, der aus hochkonzentrierter Zucker- oder Cäsiumchloridlösung aufgebaut ist. Der Gradient soll den gesamten Bereich der Schwebedichten der zu trennenden Partikel abdecken. In einem solchen Gradienten wandern die einzelnen Komponenten bis zu dem Punkt, der ihrer eigenen Dichte entspricht. Hierbei sammeln sich die einzelnen Substanzen in Form von Banden, wobei sich am Boden des Zentrifugenröhrchens die Partikel mit der höchsten Schwebedichte befinden.

Die Gleichgewichtszentrifugation (oder isopyknische Zentrifugation) kann zur Bestimmung der Dichte einer Substanz im analytischen Maßstab eingesetzt werden. Aber auch für die präparative Ultrazentrifugation ist sie von großem Interesse. Damit können unterschiedliche Substanzen aufgrund ihrer spezifischen Dichte in einem Dichtegradienten aufgetrennt werden.

Die isopyknische Zentrifugation kann so empfindlich eingestellt werden, dass sich Makromoleküle, in die z.B. die Schwerisotope ^{13}C oder ^{15}N eingebaut sind, von den unmarkierten Spezies trennen lassen. Die Technik der Dichtegradientenzentrifugation fand erstmals große Beachtung durch das Experiment von Meselson und Stahl, denen es gelang, die semikonservative Replikation der DNA zu beweisen. Weiterhin lassen sich DNA-Moleküle verschiedener Konformationen ("supercoiled" und lineare DNA) sowie RNA und DNA trennen; hierbei werden Cäsiumchlorid-Gradienten verwendet.

Ein Vorteil von Cäsiumchlorid ist, dass sich ein Gradienten während des Laufs ausbilden kann. Schwere Alkalimetallionen wie beispielsweise Cs^+ können in wässriger Lösung bei hohen Zentrifugalfeldern bereits deutlich sedimentiert werden. Aus einer zu Beginn des Laufs homogenen Konzentrationsverteilung des Cäsiumchlorids bildet sich in Abhängigkeit von der Drehzahl ein annähernd linearer Gradienten aus.

Ein Nachteil von Cäsiumchlorid-Gradienten sind die hohen Salzkonzentrationen, die zur Einstellung der Dichte erforderlich sind. Da Proteine bei solchen Ionenstärken denaturieren können, sollten eher Zuckergradienten (Saccharose) gewählt werden. Hierbei muss der Gradient allerdings in den Zentrifugenröhrchen vorgelegt werden (Abb.). Als Alternative zu Mono-/Disacchariden bieten sich Polysaccharide an, da hiermit osmotische Effekte geringer sind (z.B. Ficoll). Generell gilt aber für Zucker, dass sich aufgrund des großen Molekülradius, der Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, Diffusionseffekten und durch die mit den gegebenen Zentrifugen erreichbaren Bedingungen kein linearer Gradienten während der Zentrifugation ausbilden kann. Um Gradienten während der Zentrifugation zu bilden, lassen sich kolloidale Polymer beschichtete Silicapartikel wie Percoll einsetzen.

Bei Zentrifugationen ist die Wahl der richtigen Variante entscheidend für den Erfolg der Trennung. So können ribosomale Untereinheiten über isopyknische Zentrifugation nicht separiert werden, da die 50- und 30S-Untereinheiten des 70S-Ribosoms von *E. coli* annähernd gleiche Dichten haben. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Svedberg-Konstanten lassen sie sich jedoch in einer Zonalzentrifugation durch ihre unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit auftrennen.