

Selbstständige Arbeitsgruppe „Biophysik und Thermodynamik von Membranen“

Leiter: T.Heimburg

FLUKTUATIONEN IN BIOMEMBRANEN

Abstract:

Our group is predominantly interested in cooperative phenomena of artificial and biological membranes. In particular, we study lipid melting, elastic constants, relaxation processes and permeation. We use a variety of spectroscopic and thermodynamics techniques, from infrared and fluorescence correlation spectroscopy to calorimetry and pressure jump measurements. Simultaneously we develop the theoretical methodology to analyze our experiments, e.g. by Monte Carlo simulations. The aim is to establish a view of biological membranes as being complex multi-particle systems in which thermodynamics phenomena play an important role that cannot be understood solely on the basis of single molecules.

Unsere Gruppe interessiert sich vorwiegend für kooperative Phänomene in künstlichen und biologischen Membranen, insbesondere für das Schmelzen der Lipidmembranen, für elastische Konstanten, Relaxationsprozesse und für die Membranpermeabilität. Wir verwenden eine Vielzahl von spektroskopischen und thermodynamischen Methoden, von Infrarotspektroskopie und Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie bis hin zu Kalorimetrie und Drucksprungmessungen. Gleichzeitig entwickeln wir theoretische Konzepte zur Analyse unserer Experimente, z.B. Monte-Carlo Simulationen. Das Ziel ist es, eine Sichtweise von biologischen Membranen als komplexe Multikomponentensysteme zu etablieren, in denen thermodynamische Phänomene eine wichtige Rolle spielen, die sich nicht auf der Ebene von einzelnen Molekülen verstehen lassen.

Arbeitsgebiete:

Ein wichtiger Trend in den Biowissenschaften ist das Interesse an einzelnen Molekülen und die Miniaturisierung der Methoden zu ihrer Untersuchung. Viele Proteine kann man als Nanomaschinen verstehen, und es liegt nahe, die Funktion biologischer Systeme als eine Summe der Funktionen ihrer Komponenten zu betrachten. Diese unausgesprochene Annahme führt dazu, dass die Bedeutung kooperativer Phänomene unterschätzt wird. Es gibt eine Reihe von thermodynamischen Vorgängen, die sich ausschließlich auf der Ebene von vielen Molekülen verstehen lassen. Mit diesen Prozessen beschäftigt sich unsere Gruppe. Damit sind insbesondere Fluktuationen der Membraneigenschaften (Volumen, Fläche, Energie, Krümmung und Konzentration der Komponenten) gemeint, die sich in den Antwortfunktionen der Membranen äußern. Dazu gehören die elastischen Konstanten der Membranen, deren Wärmekapazität, aber auch das Relaxationsverhalten. Eine besondere Bedeutung spielt zudem die Ausbildung von Domänen, die laterale Inhomogenitäten der Verteilung der Membranlipide wiederspiegelt oder sich in der Aggregation von Proteinen ausdrückt. Die Anordnung von Molekülen spielt eine wichtige Rolle bei Signalübertragungskaskaden in Proteinnetzwerken. Kooperative Phänomene stellen eine vermutlich bedeutende Ebene der biologischen Regelung dar, denn sie werden empfindlich durch pH-Änderungen, sowie Calcium-, Neurotransmitter- oder Proteinbindung beeinflusst.

Methoden:

Unsere Gruppe beschäftigt sich mit der Entwicklung theoretischer und experimenteller Techniken zum Untersuchen kooperativer Vorgänge in Membranen. Die von uns benutzten Methoden sind insbesondere Differential- und Titrationskalorimetrie, sowie kalorimetrische Drucksprungmethoden zur Bestimmung von Relaxationsprozessen in Membranen, teilweise auf Basis von Eigenentwicklungen. Des Weiteren verwenden wir Einzelmolekülfluoreszenz-Methoden (z.B. Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) zur Bestimmung von lokalen Fluktuationen in Membranen, sowie konfokale Mikroskopie und

Kraftmikroskopie (AFM) zur bildlichen Darstellung von Membranheterogenitäten. Unsere Experimente werden stets von statistisch thermodynamischer Modellierung (z.B. Monte-Carlo-Rechnungen) begleitet, die die experimentellen Befunde verstehbar macht und Vorhersagen ermöglicht.

Schmelzphänomene in artifiziellen und in Biomembranen

Einer wichtiger kooperativer Prozess sind Schmelzvorgänge in Lipidmembranen. Es ist wenig bekannt, dass sich solche Umwandlungen in einigen biologischen Systemen direkt unterhalb der physiologischen Temperatur befinden, z.B. in den Plasmamembranen von *E.coli* (siehe Abb.1), aber auch im Lungen-Surfactant, dem Film auf der Lungenoberfläche und einigen anderen Membranen, bei denen diese Prozesse von uns untersucht wurden.

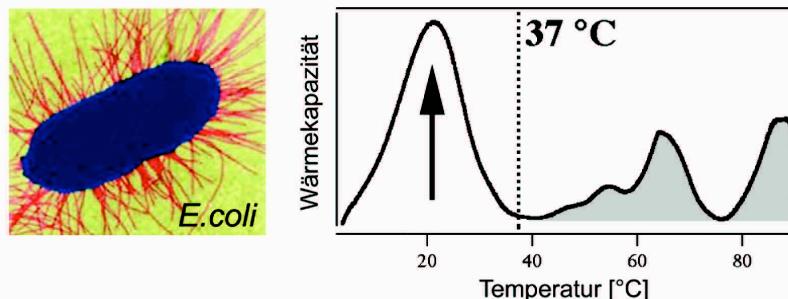


Abb.1: Kooperative Umwandlungen in Biomembranen. **Links:** *E.coli* Bakterium. **Rechts:** Wärmekapazitätsprofil der Plasmamembranen von *E.coli*. Der Pfeil zeigt die Lipidumwandlung, die grau schattierten Bereiche die Proteindenaturierungen an. Die gestrichelte Linie deutet die Wachstumstemperatur der Organismen an.

Die Schmelzvorgänge sind sehr empfindlich gegen Veränderung der Umgebungsbedingungen. Der Schmelzpunkt der *E.coli*-Membranen verschiebt sich beispielsweise in den physiologischen Bereich, wenn der pH abgesenkt wird. Auch die Calcium-Konzentration oder die Ionenstärke haben einen starken Einfluss.

Domänenbildung:

Biologische Systeme sind komplexe Mischungen, deren Zusammensetzung man oft nicht kennt. Aus diesem Grund werden häufig Modellesysteme untersucht, deren Physik man leichter verstehen kann. In Abb.2a ist das Schmelzprofil einer Lipidmischung wiedergegeben. Mit Hilfe von Computer-Simulationen versuchen wir, die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen zu verstehen. Eine wichtige Konsequenz der Schmelzvorgänge ist das Ausbilden von Domänen, deren Gestalt und Größe empfindlich von Temperatur, der Konzentration der Komponenten, aber auch von pH, Calcium-Konzentration oder Ionenstärke abhängen. Sie werden von den Simulationen vorhergesagt (Abb.2b), und sie werden in konfokalen mikroskopischen Aufnahmen von Lipidvesikeln im Schmelzbereich auch gefunden (Abb.2C,D). Außerhalb des Schmelzbereiches sind die Domänen kleiner als die mikroskopische Auflösung. Sie können aber mitunter im Kraftmikroskop (AFM) gesehen werden. Wir haben beispielsweise kleine Proteincluster in fluiden und gelförmigen Membranen mit AFM nachweisen können.

Der Nachweis dieser Domänen ist eine Entwicklung der letzten 5 Jahre, die durch die Fortschritte der mikroskopischen Techniken möglich wurde. Er hat ein enormes Interesse hervorgerufen hat, insbesondere da solche Domänen jetzt auch in biologischen Membranen gefunden werden, wo sie mitunter 'RAFTS' genannt werden. Aus unserer Arbeit wissen wir, dass Proteine und andere Membran-assoziierte Moleküle unterschiedliche Löslichkeiten in verschiedenen Domänen zeigen, d.h. sie werden von den Domänen sortiert und sie sind nicht mehr homogen verteilt. Da viele biologische Prozesse die Wechselwirkung zwischen Membranproteinen erfordern, ist zu vermuten, dass die Effizienz einer Signalübertragung sehr eng mit der Anordnung von Proteinen verknüpft ist. Dies birgt die Möglichkeit in sich, dass biologische Membranen ihre Funktion über die Anordnung von Domänen kontrollieren kann.

Der Nachweis dieser Domänen ist eine Entwicklung der letzten 5 Jahre, die durch die Fortschritte der mikroskopischen Techniken möglich wurde. Er hat ein enormes Interesse hervorgerufen hat, insbesondere da solche Domänen jetzt auch in biologischen Membranen gefunden werden, wo sie mitunter ‚RAFTS‘ genannt werden. Aus unserer Arbeit wissen wir, dass Proteine und andere Membran-assoziierte Moleküle unterschiedliche Löslichkeiten in verschiedenen Domänen zeigen, d.h. sie werden von den Domänen sortiert und sie sind nicht mehr homogen verteilt. Da viele biologische Prozesse die Wechselwirkung zwischen Membranproteinen erfordern, ist zu vermuten, dass die Effizienz einer Signalübertragung sehr eng mit der Anordnung von Proteinen verknüpft ist. Dies birgt die Möglichkeit in sich, dass biologische Membranen ihre Funktion über die Anordnung von Domänen kontrollieren kann.

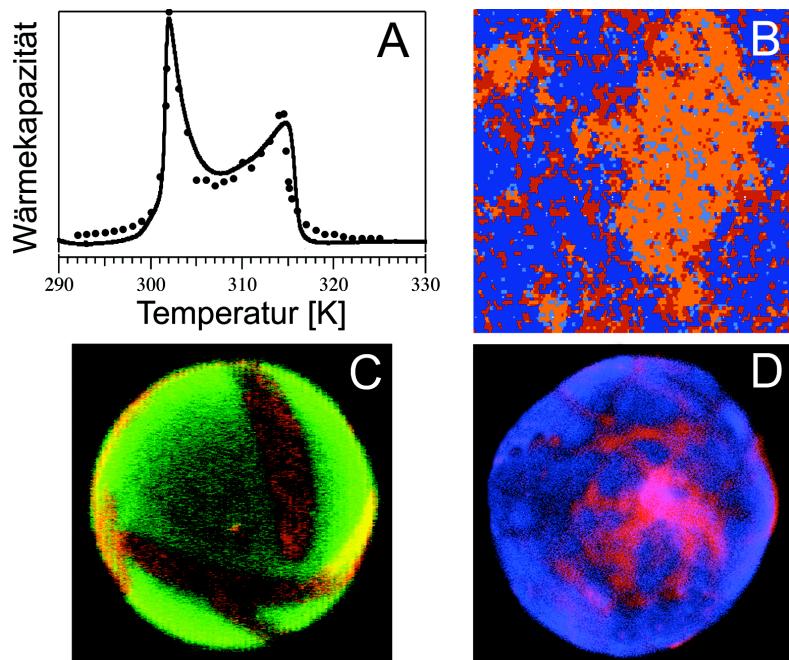


Abb.2: Domänenausbildung von Modellmembranen im Schmelzbereich. **A:** Wärmekapazitätsprofile einer zweikomponentigen Lipidmembran (— Experiment, ••• Monte-Carlo Simulation auf Basis eines modifizierten Ising-Modells) **B:** Domänenstruktur in der Monte-Carlo Simulation. Jeder Punkt stellt ein Lipid dar. Unterschiedliche Farben geben die verschiedenen Lipidspezien und deren molekulare Zustände wieder. **C,D:** Konfokale Mikroskopie an ähnlichen Lipidmischungen im Schmelzbereich. Der Durchmesser der gezeigten Vesikel ist ungefähr 30 μ m.

Elastische Konstanten:

Wir führen eine Reihe thermodynamischer Messungen an Membranen und ihren Komplexen mit Proteinen durch. Neben kalorimetrischen Messungen der Schmelzprozesse gehören dazu Druckkalorimetrie und Densitometrie, in Kollaborationen auch Ultraschallmessungen. Aus Druck- und densitometrischen Messungen kann man Volumenveränderungen bestimmen, und damit die elastischen Konstanten einer Membran. Des Weiteren untersuchen wir mit Drucksprungtechniken das Relaxationsverhalten des Schmelzprozesse. Dabei haben wir einige allgemeine Gesetze gefunden, die für Modellmembranen und für Biomembranen gleichermaßen gültig sind:

1. Die Wärmekapazität einer Membran im Schmelzbereich ist proportional zur isothermen Kompressibilität.
2. Die Wärmekapazität ist proportional zur Veränderung der Biege-Elastizität.
3. Die Wärmekapazität ist proportional zu den Relaxationszeiten der Domänenfluktuationen. Das bedeutet, dass eine plötzliche Veränderung der Membranstruktur, z.B. hervorgerufen durch Konformationsänderungen von Proteinen, oder plötzliches Verändern der Membrankrümmung (Exozytose) auf Zeitskalen geschieht, die von den Membraneigenschaften abhängen.

Um ein Gefühl für die Größenordnungen dieser Effekte zu vermitteln, kann man als Faustregel sagen: In der Umwandlung kann sich die Elastizität um mehr als eine Größenordnung verändern, d.h. die Membran wird bis zu zehnmal weicher. Die Relaxationszeiten können bei Modellmembranen bei bis zu einer Minute liegen, für biologische Membranen wie der *E.coli* Plasmamembran oder dem Lungen Surfactant schätzen wir zeitliche Größenordnungen im Bereich von 10-100 ms ab. Das sind Zeitskalen, die in der Biologie häufig vorkommen, z.B. bei typischen Öffnungszeiten von Kanalproteinen. Wir sind dabei Methoden zu entwickeln, mit denen diese Prozesse auch gemessen werden können. Da diese Effekte bei Biomembranen durch pH und andere Variablen empfindlich geregelt werden können, kommt ihnen eine potentiell bedeutsame Funktion zu. Es gibt physikalische Modelle der Exozytose, die die Energie der Intermediate vermittels der elastischen Konstanten der Membrankrümmung abschätzen. Wenn die elastischen Konstanten innerhalb einer Größenordnung regelbar ist, hätte dies dramatische Folgen für die Wahrscheinlichkeit einer vesikulärer Fusion. Wir waren auf der Basis temperaturabhängiger elastischer Konstanten auch in der Lage, einige temperaturinduzierte Strukturumwandlungen in Lipidvesikeln zu erklären.

Unsere Ergebnisse haben zudem den Vorteil, dass man aus der Wärmekapazität die elastischen Konstanten und die Relaxationszeiten auch für Systeme abschätzen kann, deren Zusammensetzung man nicht kennt, was üblicherweise bei Biomembranen der Fall ist. Die von uns entwickelten thermodynamischen Methoden haben deshalb beträchtliche Vorhersagekraft.

Fluktuationen auf mikroskopischen und nanoskopischen Längenskalen:

Modellsysteme haben den Vorteil, dass die Zusammensetzung der Membran definiert ist, und dass man üblicherweise eine kleine Zahl von Komponenten vorliegen hat. Korrelierte Prozesse finden in solch einfachen Systemen oft auf makroskopischen Längenskalen statt, eine Tatsache, die biophysikalische Messprozesse meist enorm vereinfacht. Andererseits ist ein häufiger Einwand gegen die Verwendung von Modellsystemen, dass es unwahrscheinlich ist, dass in biologischen Membranen makroskopische Fluktuationen auftreten. Es ist viel eher wahrscheinlich, dass korrelierte Prozesse in Biomembranen auf mikroskopischen oder nanoskopischen Längenskalen erfolgen, beispielsweise in der Nähe von Proteinen, oder an Domäengrenzen. Es ist beispielsweise bekannt, dass die Domänen in Biomembranen meist deutlich kleiner sind als in den Modellsystemen in Abb.2, in der Regel unterhalb der Auflösungsgrenzen optischer Mikroskopie. Aus diesem Grund ist es wünschenswert, Techniken zu verwenden, die Fluktuationen lokal aufzeichnen können. Wir verwenden hierzu Einzelmolekül-Fluoreszenztechniken, z.B. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Uns interessieren dabei nicht in erster Linie die Eigenschaften einzelner Moleküle, sondern wir verwenden einzelne Fluoreszenzmarker als Sonden zum Darstellen von Fluktuationen in einer Mikroumgebung. Dabei untersuchen wir beispielsweise die laterale und die Rotationsdiffusion von Molekülen. Beide Eigenschaften sind sehr abhängig vom Zustand der Umgebung der Marker. Die Diffusion von Molekülen ist in der festen Lipidphase (Gelphase) um zwei Größenordnungen langsamer als in der flüssigen (fluiden) Phase. Das Selbe gilt für die Rotationsdiffusion. Da die Rotationsdiffusion typischerweise um einige Größenordnungen schneller ist als die laterale Diffusion durch den Mikroskop-Fokus, kann man dabei unterschiedliche Zeit- und Längenskalen untersuchen.

In Abb.3a wird unser konfokaler Aufbau gezeigt. Ein Laser wird auf eine planare Membran fokussiert, die eine Domänenstrukturen aufweist. Die Fluoreszenz-Emission wird polarisationsabhängig auf zwei Avalanche-Photodioden fokussiert. Die Zeitskala des Fluoreszenzrauschens hängt von der Umgebung der Label ab (in Abb.3b ist dies eine wässrige Umgebung, eine fluide Membran und eine gelförmige Membran). Eine Autokorrelation gibt Einblicke in die Zeitskala des Rauschens, und man kann in den Kurven erkennen, ob Domänenstrukturen vorhanden sind (Abb.3c zeigt die Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals von gelförmigen und fluiden Membranen, sowie aus einem Temperaturbereich, in dem beide Phasen koexistieren).

Zur Analyse der Autokorrelationsfunktion verwenden wir Monte-Carlo Simulationen, die sich auf Parameter aus kalorimetrischen Experimenten stützen. Man sieht in Abb.3c, dass die theoretischen Autokorrelationskurven (durchgezogene rote Linien) die experimentellen Daten (Punkte) gut beschreiben. Mit einer solchen Analyse gelingt es, ein selbstkonsistentes Bild des mikroskopischen Aufbaus von Membranen zu erhalten, und wie er von Parametern wie Temperatur, Ionenstärke oder pH abhängt.

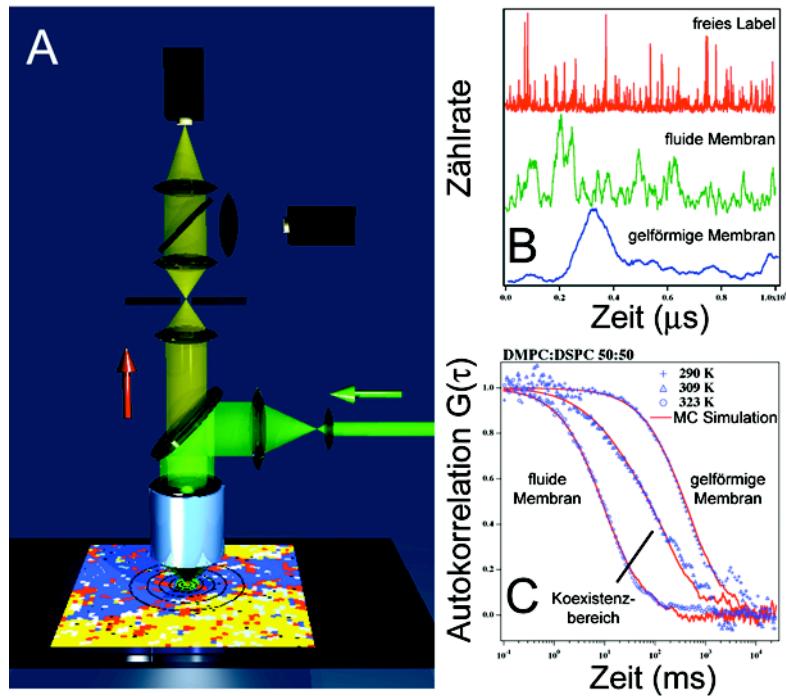


Abb.3: **A:** Schematische Darstellung des konfokalen Mikroskops zur Bestimmung von Domänenstrukturen. **B:** Fluoreszenz-Bursts für freie Label in Wasser (rot), Label influiden Lipidmembranen (grün) und Label in gelförmigen Membranen (blau) als Funktion der Zeit. Man erkennt die Unterschiede der typischen Diffusionszeitsskalen. **C:** Autokorrelationsfunktionen des Fluoreszenzsignals für gelförmige Membranen, fluide Membranen und Membranen im Koexistenzbereich der Domänen. Die roten durchgezogenen Linien sind Ergebnisse einer Simulation des Diffusionsprozesses auf der Basis kalorimetrischer Daten.

Ein mikroskopisches Bild der biologischen Membran

Wir sind der Ansicht, dass biologische Membranen mikrostrukturiert sind und dass kooperative Ereignisse eine wichtige Rolle spielen. In der Nähe von Domänengrenzen und Protein-Clustern können die Antwortfunktionen der Membranen signifikant verändert sein. Durch pH-, Ionenstärke- und Temperaturmodulationen ist eine Membran in der Lage, die laterale Verteilung der Membrankomponenten zu beeinflussen und damit Signalkaskaden zu verändern (zu regeln), ohne dass sich dafür notwendigerweise die Funktion einzelner Komponenten (z.B. der Protein) verändern muss. Die Umgebung von Proteinen kann, abhängig von den Umgebungsvariablen, weicher oder härter werden, und die Zeitskalen schneller oder langsamer werden. Wir sind der Ansicht, dass viele Effekte, die in experimentellen Studien auf spezifische Bindung zwischen einzelnen Molekülen zurückgeführt werden, tatsächlich auf eine starke Beeinflussung der Umgebung der Moleküle zurückzuführen sind. Das bedeutet, dass die biologisch kleinste Einheit nicht dass einzelne Molekül, sondern das Molekül in Einheit mit seiner kooperativ fluktuiierenden Mikroumgebung ist. Das Ganze ist mehr als die Summe der Teile.