

KOOPERATIVITÄT DER LIPID-PROTEIN- WECHSELWIRKUNG

Dem Fachbereich Physik der
Georg-August-Universität Göttingen
im Januar 1994 vorgelegte

Habilitationsschrift

von

Thomas Heimburg

aus London

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden zum Teil am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen bei Dr. Derek Marsh in der Abteilung Spektroskopie (Prof. Dr. J. Troe), und zum Teil an der Universität von Virginia in Charlottesville, U.S.A. in der Abteilung von Prof. Rodney L. Biltonen, Ph.D., mit Hilfe von Stipendien der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Ich danke Dr. Marsh vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie für seine stetige Diskussionsbereitschaft, für hilfreiche Anregungen und kritische Kommentare. Desweiteren danke Herrn Prof. Dr. Biltonen für seine Begeisterung und Diskussionsfreude und seine Unterstützung in der Lehre in Charlottesville. Herrn Prof. R. Pottel vom III. Physikalischen Institut der Universität Göttingen danke ich für die Unterstützung meiner Vorlesung im Fachbereich Physik.

Besonders danke ich allen Wissenschaftlern in Göttingen und Charlottesville, die mir die Biochemie durch stetige, geduldige Diskussion näherbrachten, und Dr. Jutta Engel, Manfred Wick und Anja Schnake, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit durch kritische Kommentare sehr behilflich waren.

(Diese Schrift wurde im Jahre 2001 leicht überarbeitet)

Inhaltsverzeichnis

I	Einführung	1
II	Kooperativität von Lipidumwandlungen in Lipid-Protein-komplexen	
	Das thermotrope Verhalten von Dimyristoyl Phosphatidylglycerol und seine Wechselwirkung mit Cytochrom c	11
II-1	Zusammenfassung von Kap. II	12
II-2	Einleitung	13
II-3	Materialien, Methoden und Modelle	14
	II-3.1 Materialien und Methoden	14
	II-3.2 Modell für die Bindung von Proteinen an veränderliche Lipidoberflächen	16
II-4	Resultate	17
	II-4.1 Differentialkalorimetrie	17
	II-4.2 Viskosimetrie und Lichtstreuung	20
	II-4.3 Titrationskalorimetrie	22
	II-4.4 "Negative Stain"-Elektronenmikroskopie	27
	II-4.5 Magnetische Resonanz	29
II-5	Diskussion	33
II-6	Literatur	39
III	Kooperativität von Proteinumwandlungen in Lipid-Proteinkomplexen	
	Untersuchung von Sekundär- und Tertiärstruktur von Cytochrom c in Komplexen mit anionischen Lipiden	43
III-1	Zusammenfassung von Kap. III	44
III-2	Einleitung	45

III-3 Materialien und Methoden	46
III-3.1 Materialien	46
III-3.2 Probenzubereitung	46
III-3.3 "Fourier Transform"-Infrarot (FTIR) Spektroskopie	47
III-4 Ergebnisse	48
III-4.1 FTIR-Spektren von Cytochrom-c-Komplexen mit anionischen Lipiden	48
III-4.2 Austausch von Amidprotonen gegen Deuteronen in Cytochrom-c-Lipid-Komplexen	52
III-5 Diskussion	58
III-5.1 Veränderung der Sekundärstruktur in Cytochrom-c-Lipid-Komplexen	58
III-5.2 Veränderung der Tertiärstruktur in Cytochrom-c-Lipid-Komplexen	59
III-6 Literatur	63

IV Kooperative Bindung

Über die Bindung peripherer Proteine an Lipidmembranen	65
IV-1 Zusammenfassung von Kap. IV	66
IV-2 Einleitung	66
IV-3 Materialien und Methoden	69
IV-4 Theorie	70
IV-4.1 Bindungsisothermen an Oberflächen mit nichtlokalisierten Bindungsplätzen	70
IV-4.2 Die freie Energie der Ligandenverteilung	71
IV-4.3 Bindung von Liganden an geladene Oberflächen in Elektrolyten	73
IV-4.3.1 Elektrostatische freie Energie von Liganden in Lösung	74
IV-4.3.2 Elektrostatische freie Energie von geladenen Oberflächen	75
IV-4.3.3 Elektrostatische freie Energie der Bindung von Liganden an Oberflächen	76
IV-5 Resultate und Diskussion	82
IV-5.1 Bindungsisothermen aus Ultrazentrifugation	82

IV-5.2 Bindungsisothermen aus Elektronenspinresonanz-Experimenten	90
IV-6 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen	95
Anhang I Herleitung von Gl.(4.3)	96
Anhang II Bindung an eindimensionale Oberflächen (McGhee/von Hippel 1974)	97
IV-7 Literatur	99
 V Modell der kalorimetrischen Umwandlung	
Monte-Carlo-Simulationen von Lipid-Protein-Wechselwirkungen ..	103
V-1 Zusammenfassung von Kap. V	104
V-2 Einleitung	104
V-3 Materialien und Methoden	106
V-4 Modell für die Lipid-Protein-Wechselwirkung	107
V-4.1 Zwei-Zustandsmodell für die Gel→Flüssig- Umwandlung in Lipiden	107
V-4.2 Wechselwirkung von Lipiden mit Proteinen	110
V-4.3 Monte-Carlo Simulationen	113
V-5 Resultate	115
V-5.1 Lipidmembranen	115
V-5.2 Wechselwirkung von Lipidmembranen mit peripheren Proteinen	119
V-5.3 Wechselwirkung von Lipidmembranen mit integralen Proteinen	126
V-6 Diskussion	132
V-7 Literatur	135
 VI Zusammenfassung	 139

Lebenslauf

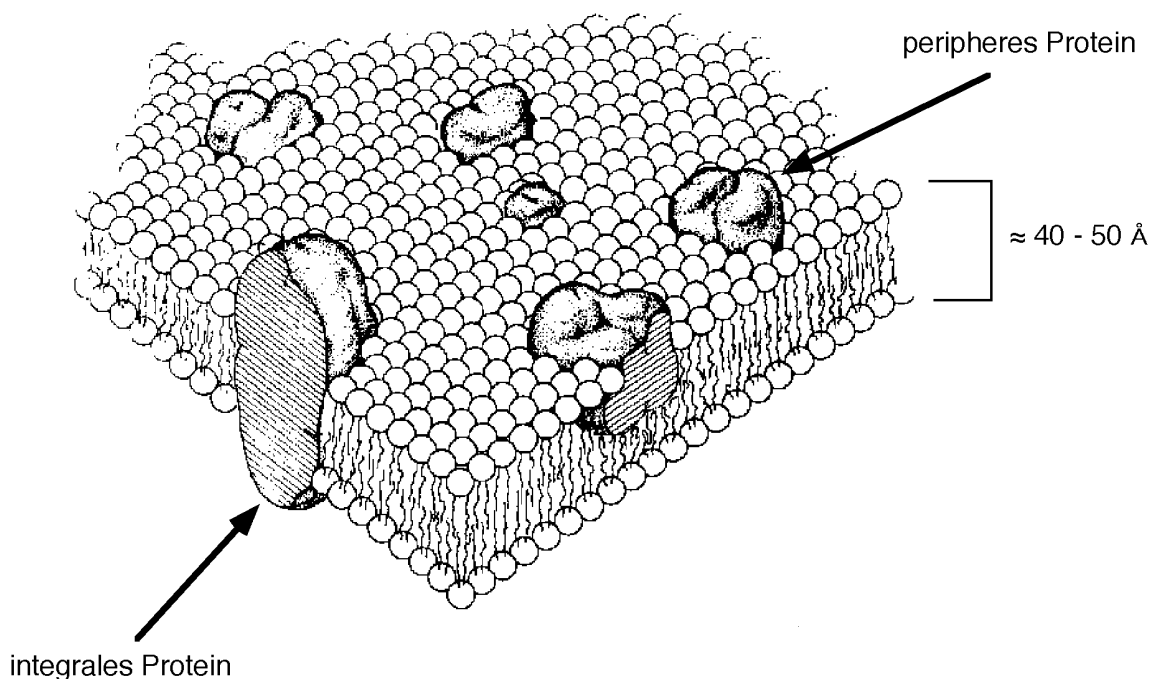
Kapitel I

Einführung

Vorgänge in der Biologie wurden in den letzten Jahrzehnten zunehmend Gegenstand physikalischen Interesses. Der Hauptgrund für den bislang im Vergleich zur biochemischen Forschung eher geringen Anteil physikalischer Untersuchungen auf diesem Gebiet besteht in der außerordentlichen Komplexität der biologischen Objekte, die nicht nur aus einer sehr großen Zahl von unterschiedlichen Molekülen bestehen, sondern sich in vielen Fällen auch nicht im thermodynamischen Gleichgewicht befinden. Es ist oft nicht leicht, Bedingungen zu schaffen, die Einblicke in Gemeinsamkeiten des Verhaltens und in physikalische Gesetzmäßigkeiten von biologischen Molekülen erlauben. Großen Auftrieb erhält dieses Gebiet nicht zuletzt durch die starke Verbesserung experimenteller Methoden, von Röntgenkristallographie über Elektronenstreuung bis hin zu magnetischer Kernresonanz.

Biologische Zellen sind hochorganisierte Gebilde, die in strukturelle Untereinheiten wie Zellkern, Mitochondrien und andere Organellen untergliedert sind. Wesentliche Bestandteile des Zellkerns sind die Ribonukleinsäuren, die langkettige Polymere bilden, in denen die Erbinformation kodiert ist (DNA und RNA). Definierte Abschnitte der DNA, die Gene, enthalten die Information für die Struktur der Proteine. Im menschlichen Erbgut liegt der Code für schätzungsweise 200 000 verschiedene Proteinmoleküle vor. Proteine sind Polymere der Aminosäuren. Sie sind die wichtigsten Träger von Funktionen in einer biologischen Zelle. Die verschiedenen Organellen enthalten je nach ihrer Aufgabe sehr verschiedene Proteine. So ist das in der Atmungskette vorkommende Protein Cytochrom c nur in den Mitochondrien enthalten, Organellen, die den Energiehaushalt der Zelle kontrollieren. Jede Organelle wie auch die ganze Zelle ist von einer Membran-doppelschicht umgeben, die die funktionalen Einheiten begrenzt. Die Membranen sind hauptsächlich aus Lipiden aufgebaut, kleinen amphiphilen Molekülen, die sich in Wasser spontan zu Membranen zusammenlagern. In die Membranen sind Proteine eingebettet (integrale Proteine), während andere Proteine an die Oberfläche der Membran gebunden sind (periphere Proteine). Ein schematisches Bild gibt das sogenannte "fluid mosaic model" in Abb. I-1 (Singer & Nicolson, 1972). Innerhalb der Zelle findet zwischen und innerhalb der Organellen ein reger Austausch von Molekülen und Ionen statt, der zum Teil durch die Membranen hindurch oder an der Membran entlang geschieht. Als wichtige

Randbedingung für die Nervenreizleitung baut z.B. das integrale Protein Na^+/K^+ -ATPase Gradienten von Natrium- und Kalium-Ionen über die Membranen hinweg auf (Gennis, 1989). Andere Proteine dienen als Enzyme zur Katalyse wichtiger Stoffwechselvorgänge, beispielsweise bei der Hydrolyse von Fetten und Lipiden durch die peripheren Phospholipasen oder der Aktivierung anderer Proteine durch Protein-Kinase c. Das periphere Protein Cytochrom c transportiert Elektronen von der integralen Cytochrom-Reduktase zur integralen Cytochrom-Oxidase, und erfüllt eine wichtige Funktion bei der Energiegewinnung durch Oxidation von Zuckern.

**Abb.I-1**

Schematische Zeichnung einer biologischen Membran (fluid mosaic model, nach Singer & Nicolson, 1972). Integrale Proteine sind in die Lipidmembran eingebettet, periphere Proteine sind an die Oberfläche gebunden.

Viele wesentliche zelluläre Prozesse spielen sich offensichtlich innerhalb oder auf den Membranen ab. Die Rolle der Lipidmembran selber wird häufig auf die einer strukturbildenden Einheit reduziert, die die Proteine als Funktionsträger enthält und ihren Ort bestimmt. Es gibt andererseits viele Hinweise auf eine Kopplung zwischen der Funktion der Proteine und den physikalischen Eigenschaften der Membran, mit der sie in Wechselwirkung treten. Die Untersuchung dieser Kopplung ist ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit.

Aus den wechselnden Anforderungen an ein lebendes System ergibt sich die Notwendigkeit der Regulation von Enzymaktivitäten. Mechanismen, die die Aktivität von Enzymen und

Transportproteinen regulieren, können physikalischer als auch chemischer Natur sein. Physikalische Faktoren bestehen zum Beispiel in Veränderungen der Ladung und dem elektrostatischen Potential eines Moleküls. Diese Größen können durch Wechselwirkung mit anderen Molekülen des Systems beeinflusst werden. Auch die Veränderung von Zustandsgrößen wie Temperatur und Druck kann zur Regulierung der Proteinaktivitäten beitragen. Die Steuerung dieser Vorgänge ist komplex und muß durch kleinste Veränderungen der Randbedingungen kontrollierbar sein.

Dies geschieht in der Regel durch kooperative, nichtlineare Prozesse, in denen kleine Veränderungen der Randbedingungen zu großen Veränderungen der Funktion des Proteins führen. Kooperativität sei hier definiert als positive oder negative Rückkopplung in der Wechselwirkung von mehreren oder vielen Molekülen.

Ein klassisches Beispiel für einen positiv kooperativen Prozeß bietet das lösliche Protein Hämoglobin, das den roten Blutfarbstoff bildet. Dieses Protein ist für den Transport von Sauerstoff (O_2) und Kohlendioxyd (CO_2) im Blut verantwortlich. Es besteht aus vier nahezu identischen Oligomeren, die zusammen vier O_2 - oder CO_2 -Moleküle binden können, wobei die Bindung von O_2 eine von zwei möglichen Strukturen des Proteins begünstigt, die zu einer noch vorteilhafteren Bindung von O_2 führt. Dasselbe gilt umgekehrt für CO_2 (siehe z.B. Wyman & Gill, 1990). Hämoglobin kann deshalb nur in sehr geringem Maße beide Moleküle gleichzeitig binden. Welche strukturelle Form das Protein annimmt, hängt im wesentlichen vom Partialdruck des Sauerstoffs oder des Kohlendioxyds im Blut ab. Die Kooperativität folgt hier aus der Wechselwirkung von Hämoglobin mit vier Liganden. Die Wechselwirkung von einem Protein mit nur einem Liganden kann hingegen grundsätzlich nicht kooperativ sein, kann demzufolge auch zu keiner sehr empfindlichen Steuerung der Proteinfunktion führen.

Ein weiteres wichtiges Beispiel für einen kooperativen Prozeß in biologischen Systemen ist das "Schmelzen" von Lipidmembranen. Lipide durchlaufen bei Temperaturerhöhung strukturelle Änderungen, in denen sie von relativ starren Molekülen, die nur Trans-Konformationen der Kohlenwasserstoffketten enthalten (energetisch günstiger), in einen Zustand mit vielen Gauche-Konformationen (hohe Entropie) übergehen. Bei höheren Temperaturen "schmelzen" die Lipidketten. Eine Membran, die ausschließlich aus dem Lipid Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) besteht, weist eine Breite der Schmelzumwandlung von nur ca. 0.07 grad (Albon & Sturtevant, 1978) auf, während die Enthalpie dieser Umwandlung $\Delta H = 8.7$ kcal/mol beträgt. Die Temperaturabhängigkeit einer nicht-kooperativen Umwandlung einzelner Moleküle ist im van't Hoffschen Gesetz eine Funktion der Enthalpie und ist gegeben durch

$$\frac{d \ln(K)}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2},$$

wobei die temperaturabhängige Konstante $K = \exp(-\Delta G/RT)$ das Gleichgewicht zwischen den zwei Konformationen des betrachteten Moleküls wiedergibt. Eine nicht-kooperative Umwandlung mit der Enthalpie von 8.7 kcal/mol weist demzufolge eine Halbwertsbreite von ca. 60 grd auf. Die Tatsache, daß die Membranutmung auf einen so engen Temperaturbereich beschränkt ist, läßt sich im wesentlichen auf die Kooperativität der Wechselwirkung von Tausenden von Lipidmolekülen in einer Membran zurückführen.

Die kooperative Veränderung des physikalischen Zustandes der Membran drückt sich in der Veränderung einer ganzen Reihe von Größen aus, so z.B. der Membranfläche, der Dicke oder der Kompressibilität. Die Wechselwirkungen zwischen individuellen Lipiden hat verschieden Ursachen. Eine wichtige Rolle spielt neben van der Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen der sogenannte hydrophobe Effekt (Tanford, 1980). Er besteht in der energetisch sehr unvorteilhaften Wechselwirkung von unpolaren Molekülen (meist Kohlenwasserstoffen) mit Wasser. Ein wesentlicher Beitrag der freien Energie dieser Wechselwirkung rührt aus der Unmöglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Kohlenwasserstoffen und H_2O her. Um diese Bindungen zu formen, müssen sich Wassermoleküle so orientieren, daß sie H-Brücken mit anderen Wassermolekülen formen können. Dies resultiert in einem signifikanten Verlust an Orientierungsentropie des Wassers an der Grenzfläche und führt durch die Erhöhung der freien Grenzflächenenergie dazu, daß sich Kohlenwasserstoffe mit Wasser schlecht mischen. Die amphiphilen Lipide ordnen sich so benachbart zueinander an, daß deren hydrophobe Kohlenwasserstoffketten nicht in Kontakt mit Wasser treten und sich die Lipide spontan zu Membranen zusammenlagern. Ähnlich ist die Wechselwirkung zwischen Lipiden und integralen Proteinen. Integrale Proteine besitzen in ihrem membrandurch-spannenden Teil einen hydrophoben Kern aus apolaren Aminosäuren. Die freie Grenzflächenenergie zwischen integralen Proteinen und der Lipidmembran ist dann minimal, wenn die Dicke der Membran mit der Ausdehnung des hydrophoben Kerns übereinstimmt ("hydrophobic matching condition", Mouritsen & Sperotto, 1992). Wenn eine Membran durch die Veränderung irgendeiner thermodynamischen Variablen ihren physikalischen Zustand ändert, verändert sich deshalb im allgemeinen auch die Energie der Grenzfläche der Membran mit dem Protein.

Die Proteinstruktur ergibt sich aus der Aminosäuresequenz und aus der Wechselwirkung der Aminosäureseitengruppen mit der Umgebung. Es ist bislang trotz vieler Versuche ein ungelöstes Problem, die dreidimensionale Struktur eines Proteins allein aufgrund seiner Aminosäuresequenz und der Kenntnis der physikalischen Randbedingungen vorherzusagen. Es ist jedoch klar, daß sich bei Veränderung der Randbedingungen die Struktur eines Proteins verändern kann. Das Beispiel des Hämoglobins wurde oben schon erwähnt. Es ist deshalb zu erwarten, daß sich die Struktur von integralen Proteinen als Folge einer Strukturveränderung der Membran verändern kann, zum Beispiel um die Ausdehnung des hydrophoben Kerns der

Membrandicke anzugleichen oder mit anderen Proteinen in dieser Membran Aggregate zu bilden, damit die Grenzfläche mit den Lipiden verkleinert wird.

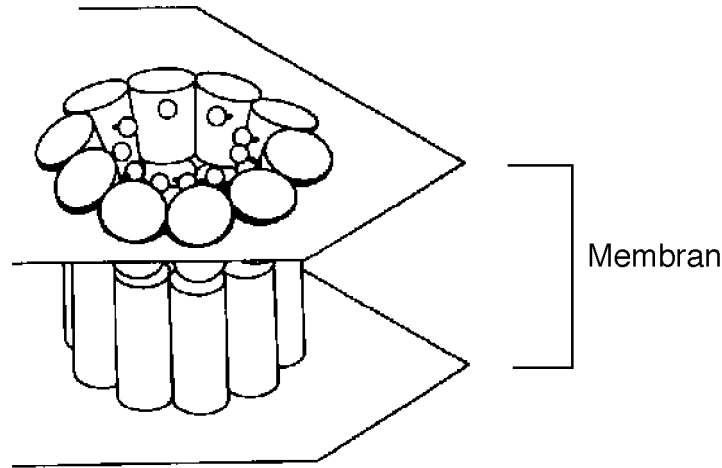


Abb.I-2

Vorgeschlagene Struktur der Alamethicinpore, in diesem Fall zusammengesetzt aus 10 Monomeren (nach Fox & Richards, 1982)

Als Beispiele für eine Funktionsveränderung integraler Proteine kann die integrale D- β -Hydroxybutyrate-Dehydrogenase, ein Protein der inneren Mitochondrien-membran, dienen, deren Aktivität sich im festen und fluiden Zustand der Lipidmembran unterscheidet (Cortese & Fleischer, 1987).

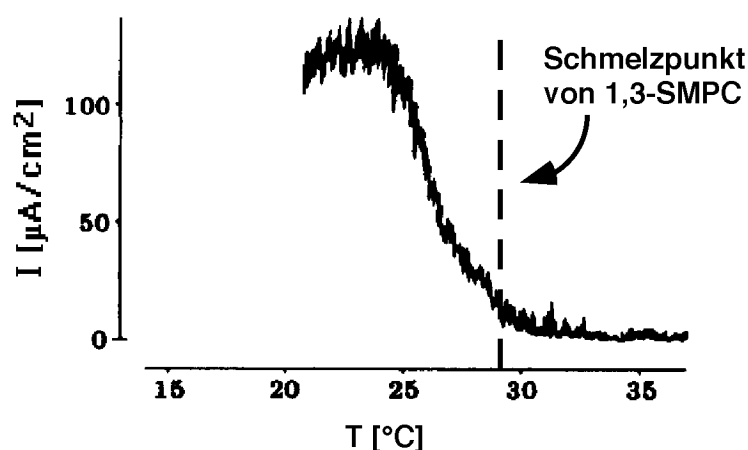


Abb.I-3

Leitfähigkeit der Alamethicinpore in 1-Stearyl-3-Myristoyl-Phosphatidylcholin (1,3,SMPC) nach Boheim et al. (1980). Der Schmelzpunkt des Lipides in Abwesenheit des Peptides ist als gestrichelte Linie markiert. Vergleiche mit den Aggregationsprofilen von integralen Proteinen in Kapitel V.

Ein weiteres Beispiel ist das Peptid Alamethicin (siehe Abb. I-2), das sich in Membranen zu Poren zusammenlagert, durch die hindurch der Transport von Ionen erfolgen kann. Es gibt Anzeichen dafür, daß diese Poren dissoziieren können (Gennis, 1990), sowie deutliche Hinweise für eine sehr unterschiedliche Leitfähigkeit bei verschiedenen physikalischen Zuständen der Lipidmembran. Man erkennt in Abb. I-3, daß die Alamethicin-Pore bei in einem synthetischen Lipid nur im festen (gelförmigen) Zustand Ionen transportieren kann (Boheim et al., 1980). Eine mögliche Begründung für diesen Effekt ist in Kap. V angegeben.

Einflüsse des physikalischen Zustandes auf die Funktion von integralen Proteinen sind neben anderen Beispielen auch für die lichtgetriebene Elektronenpumpe Bakteriorhodopsin (Lewis & Engelman, 1983) und für das Schlußglied der Atmungskette, Cytochrom c Oxydase (Fajer et al., 1989), bekannt.

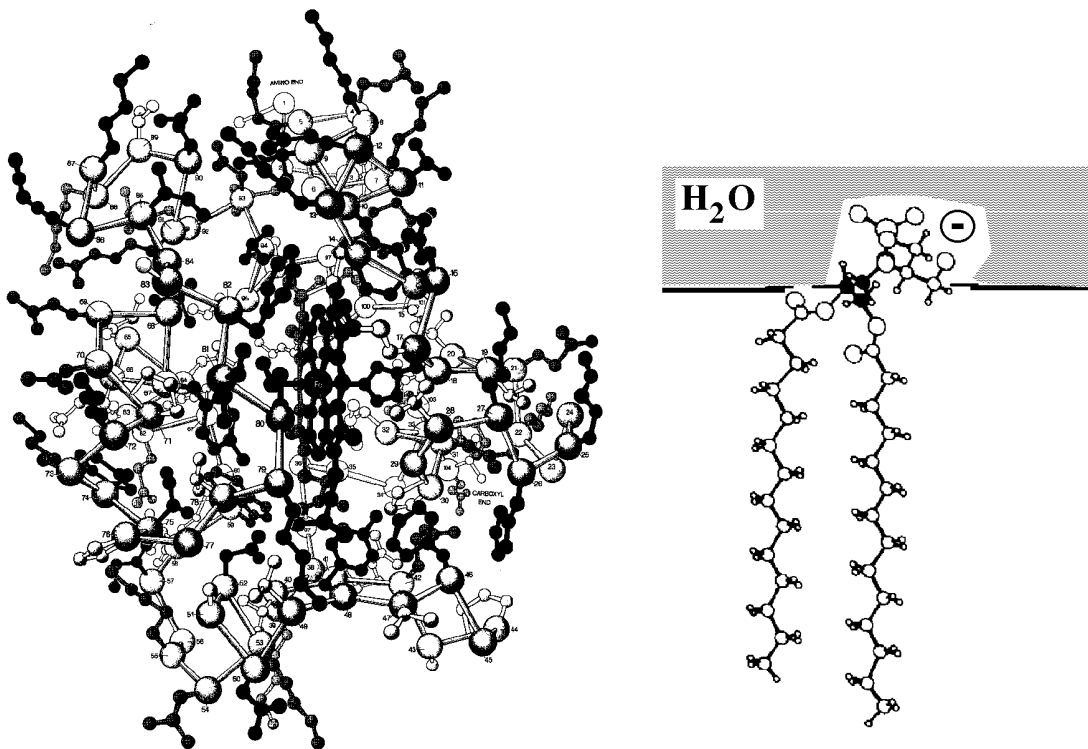


Abb. I-4

Links: Dreidimensionale Struktur von Cytochrom c, einem peripheren Protein der Atmungskette (Matthews & van Holde, 1990). Das Protein ist globulär und kann durch ein Prolat der Größe 30Å· 34Å·34Å angenähert werden. Rechts: Das einfach geladene Lipid Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) im ungefähren Größenvergleich mit dem Protein (nach Gennis, 1989)

Die Lipidumwandlungen sind, wie erwähnt, kooperativ. Proteine, die ihre Struktur abhängig von dem physikalischen Zustand der Membran verändern, werden daher eine sehr kooperative Steuerung ihrer Funktion erleben, die sich aus ihrer Wechselwirkung mit Lipiden ergibt. Dies weist der Lipidmembran eine aktive Rolle bei der Steuerung von biologischen Prozessen zu.

Auch die Struktur von peripheren Proteinen kann an den Zustand von Membranen gekoppelt sein.

Wie in Kap. V begründet wird, kann die Bindungskonstante eines Proteins an verschiedene Lipidphasen sehr unterschiedlich sein, mithin auch die Kräfte, die auf dieses Protein wirken. Für das Elektronentransportprotein Cytochrom c, dessen Struktur in Abb. I-4 wiedergegeben ist, wurde gezeigt, daß das Redoxpotential des Proteins sich abhängig vom Zustand der Membran verändern kann (Heimburg et al., 1991). Abb. I-5 gibt den Verlauf des Verhältnisses der relativen Häufigkeiten zweier verschiedener Konformationen des membrangebundenen Proteins Cytochrom c als Funktion der Temperatur wieder. Auch für andere periphere Protein kann eine Korrelation der Aktivität mit dem Zustand der Membran, an die sie binden, demonstriert werden. Phospholipase A₂ weist z.B. in der Gelphase nur eine geringe Aktivität auf und erreicht ein Aktivitätsmaximum an der Temperatur der Lipidschmelze (Bell & Biltonen, 1989).

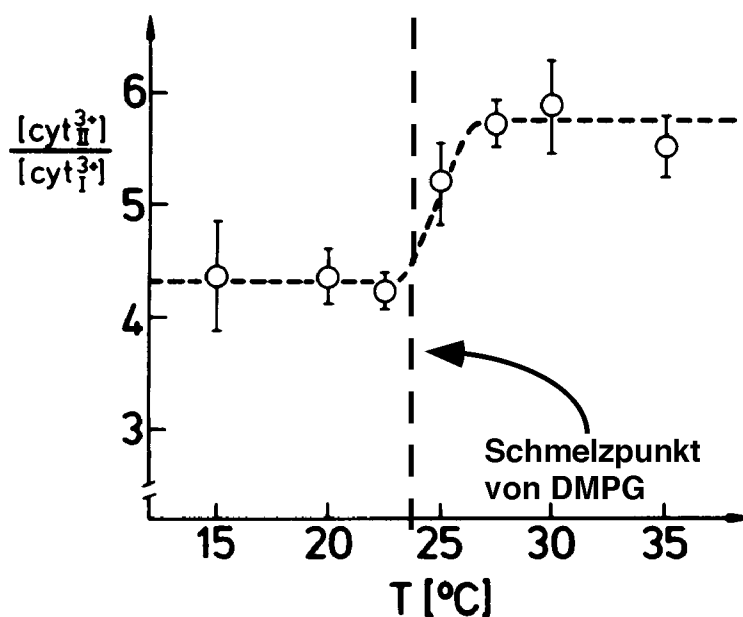


Abb I-5

Verhältnis der Konformationen II und I des peripheren Proteins Cytochrome C in Komplexen mit Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol (DMPG). Der Schmelzpunkt des Lipides in Abwesenheit von Cytochrom C ist als gestrichelte Linie dargestellt. Vergleiche mit den Schmelzprofilen in Gegenwart von Cytochrom C in Kapitel V und mit der Tertiärfaltung des Proteins in Kapitel III (nach Heimburg et al., 1990)

Die Wechselwirkung der Lipide mit Proteinen kann und muß umgekehrt natürlich auch einen Einfluß auf den physikalischen Zustand und die thermodynamischen Eigenschaften der Lipide haben. Es ist für einige Fälle gezeigt worden, daß die Bindung von peripheren Proteinen zu einer makroskopischen Strukturänderung der Lipide führen kann. Cytochrom c kann invers hexagonale Lipidphase in Cardiolipinmembranen erzeugen (de Kruijff & Cullis, 1980a). Auch für Polylysin und Gramicidin wurden ähnliche Effekte berichtet (de Kruijff & Cullis, 1980b). Derartige Einflüsse von Proteinen auf Lipidmembranen werden unter anderem als Ursache für die Fusion oder Fission von Lipidpartikeln diskutiert (Lindblom & Rilfors, 1989). Der Einfluß der Bindung von Proteinen auf die Lipidmembranen kann jedoch auch zu einer Kommunikation zwischen Proteinen führen, die für diese Veränderungen empfindlich sind.

Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hat die Kooperativität der Wechselwirkung zwischen Lipiden und Proteinen zum Gegenstand. Die Grundthese dieser Arbeit lautet, daß kooperative Wechselwirkungen von peripheren und integralen Membranproteinen mit Lipiden in biologischen Membranen vorkommen und für deren Funktion von großer Wichtigkeit sind. Am Beispiel von Cytochrom c und seiner Wechselwirkung mit geladenen Membranlipiden werden verschiedene Aspekte hiervon im Detail betrachtet. Kapitel II enthält eine thermodynamische Analyse des Einflusses der Bindung von Cytochrom c auf die Struktur der Lipidmembran. Es wird ein weitreichender Einfluß der Bindung auf die dreidimensionale Anordnung von Lipidnetzwerken demonstriert und durch eine statistisch-thermodynamisches Modell beschrieben. In Kapitel III wird umgekehrt der Einfluß der Bindung von Cytochrom c an Membranen auf die Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins mittels Infrarot-Spektroskopie untersucht und in Zusammenhang mit der Umwandlung in Lipiden gebracht. Dabei werden durch Bestimmung der Austauschraten der Amidprotonen gegen Deuterium insbesondere für die Tertiärstruktur des Proteins Veränderungen nachgewiesen, die in Zusammenhang mit der Funktion von Cytochrom c stehen. In Kapitel IV wird eine analytische Form der Bindungsisothermen von Liganden an geladene Oberflächen in elektrolytischer Umgebung statistisch-thermodynamisch hergeleitet und in Zusammenhang mit experimentell bestimmten Isothermen der Bindung von Cytochrom c an geladene Lipidmembranen diskutiert. Kapitel V betrachtet allgemein den Effekt der Lipid-Proteinwechselwirkung auf die Fluktuationen der Lipide und Proteine in Membranen. Ein Ising-Modell der Lipid-Proteinwechselwirkung dient als Grundlage für Monte-Carlo-Simulationen der thermotropen Umwandlung der Lipidmembran. Die laterale Verteilung von Proteinen in oder auf Lipidmatrizen ist dabei ein Schwerpunkt.

Während Kapitel II und III größtenteils experimenteller Art sind, sind die Kapitel IV und V in wichtigen Bestandteilen theoretischer, statistisch thermodynamischer Natur. Die Kapitel beschreiben jeweils unabhängige Forschungsarbeiten, die in Ansatz und Methodik sehr unterschiedlich sind und unabhängig voneinander gelesen werden können, alle aber die gleiche Problematik behandeln.

Am Ende dieser Schrift findet sich eine Zusammenfassung, die die Ergebnisse der Kapitel in kurzer, zum Teil graphischer, Form verknüpft.

LITERATUR:

- Albon, N., und Sturtevant, J.M. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 (1978), 2258
Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines
- Bell, J.D. und Biltonen, R.L. J.Biol.Chem., 264 (1989), 225 - 230
Thermodynamics and kinetic studies of the interaction of vesicular dipalmitoylphosphatidcholine with Agkistrodon piscivorus piscivorus phospholipase A₂
- Boheim, G., Hanke, W. und Eibl, H.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980), 3403 - 3407
Lipid phase transition in planar bilayer membranes and its effect on carrier- and pore-mediated transport
- Cortese, J.D. und Fleischer, S. Biochemistry 26 (1987), 5283 - 5293
Noncooperative vs. cooperative reactivation of D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase: Multiple equilibria for lecithin binding are determined by the physical state (soluble vs. bilayer) and composition of the phospholipids
- de Kruijff, B. und Cullis, P.R. B.B.A. 602 (1980a), 477 - 490
Cytochrome c specifically induces non bilayer structures in cardiolipin- containing model membranes
- de Kruijff, B. und Cullis, P.R. B.B.A. 601 (1980b), 235 - 240
The influence of poly(L-lysine) on phospholipid polymorphism Evidence that electrostatic polypeptide-phospholipid interactions can modulate bilayer/non-bilayer transitions
- Fajer, P., Knowles, P.F., und Marsh, D. Biochemistry 28 (1989), 5634 - 5643
Rotational Motion of yeast cytochrome oxidase in phosphatidylcholine complexes studied by saturation-transfer electron spin resonance
- Fox, R.O., und Richards, F.M. Nature 300 (1982), 325 - 330
A voltage -gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5 Å resolution
- Gennis, R.B. Biomembranes: Molecular structure and function
Springer, New York, 1989
- Heimburg, T., Hildebrandt, P. und Marsh, D. Biochemistry 30 (1991), 9084 - 9089
Cytochrome C-lipid interactions studied by resonance Raman and 31P-NMR spectroscopy. Correlation between the conformational changes of the protein and the lipid bilayer
- Lewis, B.A. und Engelman, D.M. J.Mol.Biol. 166 (1983), 203

Bacteriorhodopsin remains dispersed in fluid phospholipid bilayers over a wide range of bilayer thicknesses

Lindblom, G. und Rilfors, L. B.B.A. 988 (1989), 221 - 256

Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids - possible biological relevance

Mathews, C.K. und van Holde, K.E. Biochemistry, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Redwood City, Ca., 1990

Mouritsen, O.G., und Sperotto, M.M. Thermodynamics of lipid-protein interactions in lipid membranes:

The hydrophobic matching condition , in: Thermodynamics of cell surface receptors, Jackson, M. , Hrg., CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 1992, S.127 - 181

Singer, S.J., und Nicolson, G.L. Science 175 (1972), 720 - 731

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes

Tanford, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes , John Wiley&Sons, New York, 1980

Wyman, J. und Gill, S.J. Binding and Linkage, University Science Books, Mill Valley, Ca., 1990

Kapitel II

Kooperativität von Lipidumwandlungen in Lipid-Proteinkomplexen

DAS THERMOTROPE VERHALTEN VON DIMYRISTOYL- PHOSPHATIDYLGLYCEROL UND SEINE WECHSELWIRKUNG MIT CYTOCHROM C¹

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit dem Einfluß der Bindung eines basischen Proteins auf die strukturellen und thermodynamischen Eigenschaften von anionischen Lipidmembranen. Es konzentriert sich hauptsächlich auf die Untersuchung der am Lipid-Proteinkomplex beteiligten Lipide mit kalorimetrischen Mitteln (Differentialkalorimetrie und Titrationskalorimetrie) und eine statistisch thermodynamische Analyse der sich aus den Experimenten ergebenden strukturellen Umwandlungen.

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:
T.Heimburg and R.L.Biltonen. 1994. The thermotropic behavior of dimyristoyl phosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry* 33: 9477-9488.

II-1 ZUSAMMENFASSUNG

Das thermotrope Verhalten von Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol (DMPG) wurde in der Abwesenheit und in Gegenwart von Cytochrom c unter Bedingungen niedriger Ionenstärke mit Hilfe von Differentialkalorimetrie (DSC), Titrationskalorimetrie, Viskosimetrie, Lichtstreuung, Elektronenmikroskopie und Magnetischer Resonanz (Elektronenspinresonanz (ESR) und Kernspinresonanz (NMR)) untersucht. In Abwesenheit des Proteins weist das Lipid im Bereich von 7 - 40 °C ein komplexes Verhalten auf, das unter manchen Bedingungen zu bis zu vier Maxima in den DSC-Scans führt. Bei hohen Lipidkonzentrationen besitzt die Wärmekapazität (C_p) ein ausgeprägtes Maximum bei ungefähr 23 °C. Bei Verringerung der Konzentration auf 10 mM verbreitern sich die DSC-Kurven mit einem scharfen Maximum bei 20 °C und einem breiteren Maximum bei 27 °C. Die Lage des unteren der beiden Maxima ist abhängig von der Heizrate des Kalorimeters und weist eine Enthalpie von $\Delta H \approx 0.4$ kcal/mol auf. Diese kleine Enthalpie läßt vermuten, daß es sich hierbei um keine Kettenschmelzreaktion handelt. Die Enthalpie der gesamten Umwandlung beträgt 6.0 kcal/mol und ist konzentrationsunabhängig. Interessanterweise werden die Lipiddispersionen selbst bei den niedrigsten untersuchten Lipidkonzentrationen im Phasenumwandlungsbereich sehr viskos und isotrop in ihrer Lichtstreuung. Dies legt eine Fernordnung der Lipidphase nahe. Die Existenz einer großräumigen Phase wurde durch "Negative Stain"-Elektronenmikroskopie bestätigt.

Kalorimetrische Titrationsstudien der Bindung von Cytochrom c an DMPG belegen, daß die Bindung zu Veränderungen des Lipidzustandes führt. Die Bindungsisothermen wurden auf Basis eines Modells analysiert, das auf der Koexistenz von zwei verschiedenen vesikulären Phasen des Lipids bei konstanter Temperatur beruht. Die Analyse bekräftigt die Annahmen des Modells und führt zu Bindungskonstanten in der Größenordnung von 10^6 l/mol und einer Stöchiometrie von 9 Lipiden pro Protein. Das thermotrope Verhalten des Lipids in Gegenwart des Proteins ist konsistent mit dem thermodynamischen Modell. Teilweise Sättigung der Membran mit Protein verhinderte den starken Anstieg der Viskosität in der Umwandlungsregion. Daraus kann man schließen, daß bindende Proteinmoleküle die Ausbildung von großräumigen Phasen verhindern. Unter sättigenden Bedingungen stieg die Viskosität des Lipid-Proteinkomplexes jedoch insbesondere oberhalb der Lipidumwandlung an. Dieser Anstieg der Viskosität war jedoch kein Resultat der Ausbildung einer großräumigen Lipidphase, sondern war den elektronenmikroskopischen Bildern zufolge eine Aggregation von proteinhaltigen Lipidvesikeln.

II-2 EINLEITUNG

Lipidaggregate formen sich spontan in der Gegenwart von Wasser. Die sich vorwiegend ausbildenden Strukturen sind Lipiddoppelschichten, es existieren aber auch ganz andere Phasen wie z.B. Mizellen, zylindrische invers-hexagonale Phasen (H_{II}) und kubische Phasen. Die beiden letzteren Phasen werden im Zusammenhang mit Vesikel-Fusion, Fission und mit Transporteigenschaften von Zellmembranen in Zusammenhang gebracht (Lindblom & Rilfors, 1989; Mariani et al., 1988). Die meisten Lipide zeigen eine breite Mischungslücke zwischen Wasser und vollständig hydriertem Lipid (d.h., daß eine Phase von freiem Wasser in einem weiten Bereich der Lipidkonzentrationen existiert), aber dies ist nicht für alle Lipide notwendigerweise der Fall. Zum Beispiel sind zwitterionische Lipide bei molaren Verhältnissen von 20 H_2O -Molekülen pro Lipid vollständig hydriert (Seddon et al., 1984). Weitere Zugabe von Wasser führt zu keiner weiteren strukturellen Veränderungen in der Lipidanordnung. Andererseits sind die von meisten Detergenzien ausgebildeten Phasen im gesamten Phasendiagramm abhängig von der Wasserkonzentration. Welche Phasen in Lipiden vorherrschen, hängt von einer Reihe von Kriterien ab: der Temperatur, der Lipidzusammensetzung, der Ionenstärke des Mediums und schließlich von der Art der Proteine, die mit der Membran in Wechselwirkung treten.

Die Bindung von Proteinen kann einen beträchtlichen Einfluß auf die thermotropische Phasenumwandlung in Lipiden haben. Umgekehrt kann der Zustand der Lipide die Funktion gebundener Lipide beeinflussen, wie dies z.B. für Phospholipase A_2 (Bell & Biltonen, 1989; Jain & Berg, 1989), Protein-Kinase C (Nishizuka, 1984, 1986), β -D-Hydroxybutyrol Dehydrogenase (Cortese & Fleischer, 1987) und für Cytochrom c (Hildebrandt et al. 1990, Heimbürg et al., 1991) berichtet wurde. Hierzu sei insbesondere auf Kapitel III dieser Arbeit verwiesen, das sich mit diesem Punkt beschäftigt. In manchen Fällen kann die Wechselwirkung zwischen Lipidmembranen und Proteinen zu morphologischen Veränderungen in der Lipidmatrix hervorrufen. Als Beispiel sei hierfür wiederum Cytochrom c erwähnt, daß in Cardiolipin-Membranen invers hexagonale Phasen (De Kruijff & Cullis, 1980) und in Monoolein kubische Phasen induzieren kann (Mariani et al., 1988).

Die Wechselwirkung von Cytochrom mit geladenen Oberflächen wurde schon früher mit Resonanz-Raman Spektroskopie untersucht (Hildebrandt & Stockburger, 1989a,b; Hildebrandt et al., 1990; Heimbürg et al., 1991). In allen Fällen konnte eine Kopplung zwischen der Bindung des Proteins und der Verteilung zweier verschiedener Proteinzustände mit verschiedenem Redoxpotential nachgewiesen werden. Umgekehrt wurde ein Einfluß der Proteinbindung auf die Struktur von Dioleoyl- Phosphatidylglycerol(DOPG)-Membranen mittels von ^{31}P -NMR gezeigt werden (Heimbürg et al., 1991). Bei 20°C konnte ein, für

eine lamellare Lipidphase typisches, Spektrum beobachtet werden. Bei Zugabe von Cytochrom c erhält man ein isotropes NMR-Spektrum, was darauf hinweist, daß das Lipid-H₂O-System seine dreidimensionale Anordnung verändert.

Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol ist ein nicht besonders gut studiertes Lipid, obgleich es Erkenntnisse über ein ungewöhnliches Verhalten dieses Lipids gibt (Gershfeld et al.,1986; Gershfeld,1989). In diesem Kapitel werden die Lipid- und Proteinkonzentrationsabhängigkeit von DMPG-Dispersionen mit Hilfe von DSC, Viskosimetrie, Lichtstreuung, Elektronenmikroskopie und Magnetischer Resonanz untersucht. Die Resultate zeigen, daß bei niedrigen Ionenstärken die Struktur von DMPG bis zu Lipid/H₂O-Verhältnissen von 1:10⁵ hinab konzentrationsabhängig ist. Die durch Titrationskalorimetrie erhaltene Thermodynamik der Cytochrom c-Bindung an DMPG wurde mit Hilfe eines Modells erklärt, daß die morphologischen Veränderungen des DMPG mit der Temperatur und der Proteinbindung verbindet.

II-3 MATERIALIEN , METHODEN UND MODELLE

II-3.1 Materialien und Methoden

Das Natriumsalz von DMPG (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL) wurde mit Dünnschichtchromatographie auf Reinheit geprüft und ohne weitere Reinigung verwendet. Das Lipid wurde aus Chloroformlösung heraus getrocknet, in Puffer (2mM TRIS, Hepes oder Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7.5) gelöst und oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur geschüttelt. Bei Raumtemperatur entstand dabei eine klare, gallertartige Struktur. Bei Temperaturen unterhalb von 20 °C und oberhalb von 30 °C erschien die Lösung milchig und war von weit niedrigerer Viskosität. Cytochrom c (Sigma, Type III) wurde ohne weitere Reinigung benutzt.

Kalorimetrie: Wärmekapazitäten an Lipiden und Lipid-Proteinmischungen wurden mittels eines Differentialkalorimeters (DSC - "differential scanning calorimeter") der Firma Hart Scientific bei Heizraten von 20 °/Stunde und in einem selbstgebauten Kalorimeter der Gruppe von Prof.R.L.Biltonen in Charlottesville/Virginia (Suurkuusk et al.,1976) bei verschiedenen Heizraten durchgeführt. Die experimentellen Daten wurden korrigiert um den Effekt der Zeitkonstante des Kalorimeters zu eliminieren. Der pH-Wert der Dispersionen schwankte zwischen 7.5 und 7.8. Bei kleinen Proben-volumen war die Korrektur des pH-Werts nicht

immer möglich. Da aber der pK_a von DMPG bei ungefähr 3 liegt, haben kleine Veränderungen im pH nur eine geringe Wirkung auf den Ladungszustand der Lipide.

Titrationsskalorimetrie: Kalorimetrische Titrationsexperimente wurden auf einem Microcal MC-2 Mikrokalorimeter mit einer Omega-Meßzelle durchgeführt. Dieses Kalorimeter wird detailliert in Wiseman et al. (1989) beschrieben. Das Protein wurde zur Lipiddispersion mit Hilfe einer rotierenden Spritze (300 Umdrehungen pro Minute) hinzugegeben, die die Lösung in der Zelle rührt. Die Lipidkonzentration war 0.5 mg DMPG/Zellenvolumen (0.536 mM) und die Proteinkonzentration in der Spritze 20mg/ml Cytochrom c (1.61 mM). Zehn bis elf Titrationensschritte (Injektionen von Cytochrom-c-Lösung) wurden in jedem Experiment aufgenommen, um eine Enthalpie-Bindungsisotherme zu erhalten. Jede Injektion dauerte ca. 30 Sekunden. Die pH der Lipid- und der Proteinlösung wurden auf 0.01 Einheiten genau eingestellt, um die Entstehung von Wärme aus der Mischung von Puffern zu vermeiden. Die integrierte Bindungswärme eines Experimentes wies einen Fehler von kleiner als ± 0.2 kcal/mol auf.

Viskosimetrie: Relative Viskositäten wurden mit einem Cannon-K215-Viskosimeter erhalten, mit dem die Durchlaufzeiten einer 13 mM Lipiddispersion mit oder ohne Protein bestimmt wurden. Zur Normierung wurde durch die Viskosität von Wasser bei der gleichen Temperatur dividiert ($\equiv$ relative Viskosität).

Lichtstreuung: Die Lichtstreuung der Lipiddispersionen wurde in einem SLM 8000 Fluorimeter (SLM Instruments, Inc.) bei einer Wellenlänge von 280 nm unter einem Winkel von 90° zum einfallenden Licht aufgezeichnet.

Elektronenspinresonanz (ESR): ESR-Spektren wurden auf einem Varian 9GHz Spektrometer aufgezeichnet, das einen Stickstoffgasstrom zur Temperierung der Proben verwendete. Spinmarkierte Proben von Lipiddispersionen und Protein/Lipidkomplexen wurden in 1mm-ID-100-Glas-Kapillaren gefüllt, die ihrerseits zur thermischen Stabilisierung in mit Siliconöl gefüllten 4 mm Quarz-Kapillaren plaziert wurden.

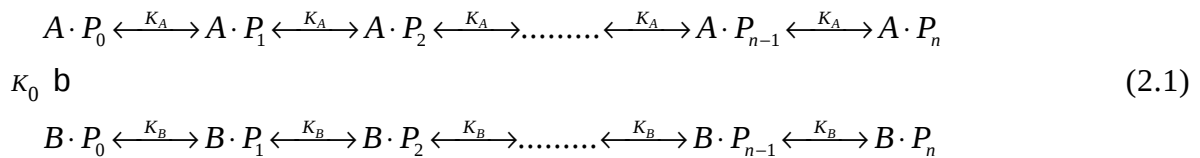
Als Spinlabel wurden Diacyl-Phosphatidylglycerole verwendet, die an der 14ten Kohlenstoffposition der zweiten Kohlenwasserstoffkette mit einem Nitroxylabel versehen waren (14-PGSL). Zuerst wurden dazu gelabeltes Diacyl-Phosphatidylcholin, folgend der Prozedur von Marsh und Watts (1982), synthetisiert, und anschließend durch enzymatischen Kopfgruppenaustausch mit Hilfe von Phospholipase D (Comfurius & Zwaal, 1977) zu 14-PGSL modifiziert.

³¹P-Phosphor-Kernresonanzspektroskopie (³¹P-NMR): Protonen-entkoppelte ³¹P-NMR-Spektren wurden bei einer Frequenz von 121.49 MHz auf einem Bruker MSL-300 Spektrometer (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Karlsruhe) unter Verwendung eines 11 µs Pulses aufgezeichnet. Die Entkopplungsleistung betrug ca. 8 W. Die Temperatur wurde mit einem Stickstoffgasstrom kontrolliert.

II-3.2 Modell für die Bindung von Proteinen an veränderliche Lipidoberflächen

Die kalorimetrischen Bindungsisothermen (siehe Abschnitt II-4.3) zeigten ein kooperatives und zweiphasiges Verhalten. Sie wurden deshalb im Rahmen eines Modells analysiert, welches den Zustand des Lipids mit der Bindung des Proteins koppelt. Dieses Modell ähnelt demjenigen von Monod, Changeux und Wyman für die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin (Monod et al., 1965). Eine komplette Beschreibung der Analyse gekoppelter Funktionen (linked function analysis) findet sich in Wyman und Gill (1991).

Folgendes Gleichgewicht sei betrachtet:



wobei A und B zwei unterschiedliche Formen eines Lipidvesikels sein mögen, die je n Bindungsplätze für Proteine aufweisen. A·P_i und B·P_i repräsentieren in diesem Modell die beiden Formen des Vesikels mit jeweils i gebundenen Proteinmolekülen. K₀ sei die Gleichgewichtskonstante zwischen den beiden Formen A und B in Abwesenheit von gebundenen Proteinmolekülen, sodaß gilt K₀ = [B]/[A]. K_A und K_B seien die Protein-Bindungskonstanten für jeden Bindungsplatz (intrinsische Bindungskonstanten). Wenn K_A ≠ K_B gilt, dann kann eine Umwandlung in der Lipidstruktur durch die Proteinbindung erzeugt werden. Aus diesen Annahmen ergibt sich für die Enthalpie in einem gegebenen Zustand:

$$\Delta H = \frac{\sum_{i=1}^n (\Delta H_A \cdot K_A^i + \Delta H_B \cdot K_0 \cdot K_B^i) \cdot i \cdot \Omega_i \cdot [P]^i}{\sum_{i=0}^n (K_A^i + K_0 \cdot K_B^i) \cdot \Omega_i \cdot [P]^i}, \quad (2.2)$$

wobei $\Omega_i = n!/(n-i)! \cdot i!$ die Entartung des i -ten Zustandes und ΔH_A und ΔH_B die Enthalpien der Bindung an Zustand A oder B sind. $[P]$ ist die Proteinkonzentration:

$$[P] = [P_t] - \frac{\sum_{i=1}^n (K_A^i + K_0 \cdot K_B^i) \cdot i \cdot \Omega_i \cdot [P]^i \cdot \frac{[L_t]}{m}}{\sum_{i=0}^n (K_A^i + K_0 \cdot K_B^i) \cdot \Omega_i \cdot [P]^i} \quad (2.3)$$

Hier ist $[P_t]$ die gesamte Proteinkonzentration (gelöstes plus gebundenes Protein) und m ist die Zahl der Lipide pro Bindungsplatz. ΔH_0 wurde der Einfachheit halber gleich Null gesetzt und taucht deshalb in Gl.(2.2) nicht auf. Wenn K_A , K_B und K_0 und $[P]$ gegeben sind, kann $[P_t]$ und auch das Gleichgewicht der Formen A und B und damit die proteininduzierte Umwandlung im Lipidvesikel in Abhängigkeit von der gesamten Proteinkonzentration berechnet werden:

$$\frac{[B]}{[A]} = \frac{\sum_{i=0}^n [B \cdot P_i]}{\sum_{i=0}^n [A \cdot P_i]} = \frac{K_0 \cdot \sum_{i=0}^n \Omega_i \cdot K_B^i [P]^i}{\sum_{i=0}^n \Omega_i \cdot K_A^i [P]^i} = K_0 \cdot \frac{Q_B}{Q_A} \quad (2.4)$$

In dieser Beschreibung sind Q_A und Q_B die Zustandsfunktionen der Lipid-Proteinkomplexe in Zustand A und B.

Die Bindungsisothermen (2.2) wurden für angenommene Werte für m , K_0 , K_A , K_B , ΔH_A und ΔH_B solange berechnet, bis gute Übereinstimmung mit dem Experiment erreicht wurde (siehe Resultate). Obwohl dieses Modell eine Vereinfachung des komplexen Systems darstellt und obwohl die Anpassungsparameter nicht notwendigerweise eindeutig sind, liefert es doch einen guten Ausgangspunkt für eine quantitative Diskussion der experimentellen Resultate. Die Ergebnisse der Anpassungen in Tabelle I sind pro Mol Lipid angegeben (d.h. als $\Delta H_A / m$ und $\Delta H_B / m$).

Die Temperatur wurde in allen Experimenten auf ± 0.1 grad genau kontrolliert.

II-4 RESULTATE

II-4.1 Differentialkalorimetrie

In Abb.II-1 sind die Wärmekapazitätsprofile von verschiedenen DMPG-Dispersionen abgebildet. Bei Konzentrationen oberhalb von 150mM sind die Umwandlungsprofile typisch für Lipidumwandlungen. Man erkennt zwei wohldefinierte Umwandlungen bei etwa 12 °C und

bei etwa 23 °C. Diese Temperaturen sind schon früher für thermotropische Vor- und Hauptumwandlung von DMPG berichtet worden (Gershfeld, 1986; Surewicz et al., 1987).

Die DSC-Kurven verändern sich jedoch bei abnehmenden Konzentrationen bis hinab zur untersten gemessenen Lipidkonzentration, wobei die Umwandlungsenthalpie ΔH unabhängig von der Konzentration blieb. Bei Verringerung der Lipidkonzentration von 150 mM nach 10 mM verbreitert sich das Profil der Hauptumwandlung bei 23 °C kontinuierlich, bis sie von ca. 20 °C bis 28 °C reicht, mit Maxima am Beginn und am Ende der Umwandlung. Die untere Grenze der Umwandlung verringert sich bei der Erniedrigung der Lipidkonzentration leicht um 1-2 grd nach unten, während die obere Grenze der Hauptumwandlung um mehrere grd bis auf 28 °C ansteigt.

Bei einer Konzentration von 10 mM wurde die Abhängigkeit der Wärme-kapazitätsprofile (C_p -

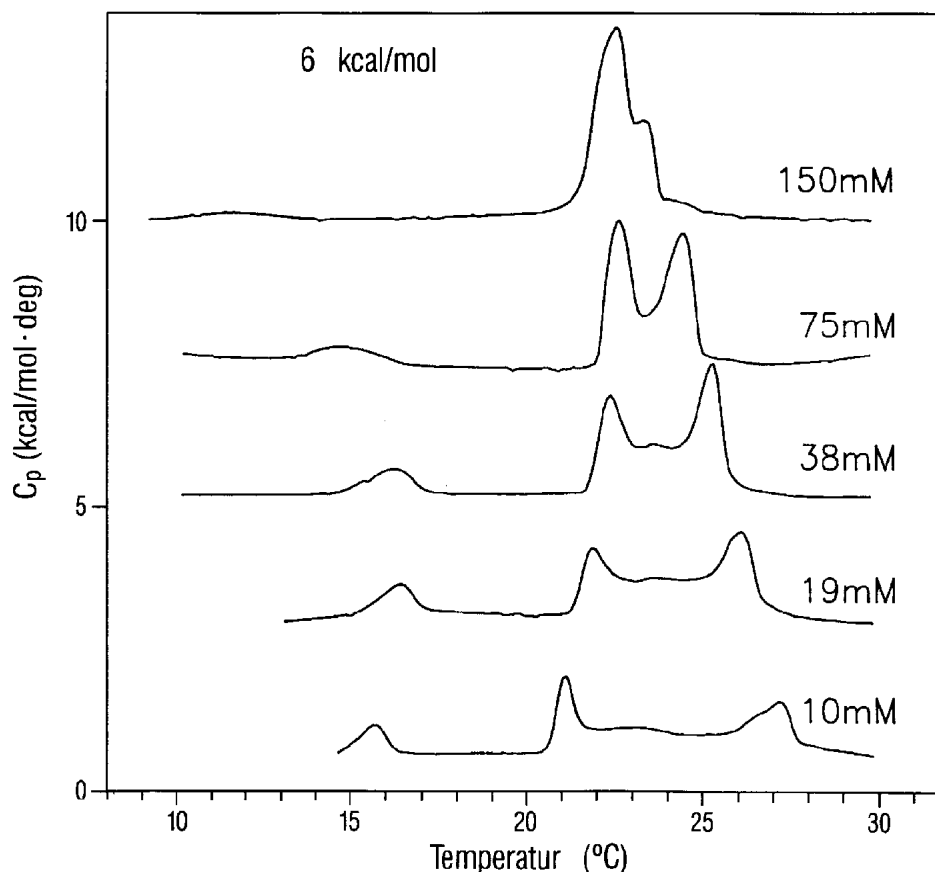


Abb. II-1

Wärmekapazitätskurven von DMPG-Dispersionen bei 150 mM, 75 mM, 38 mM, 19 mM und 10 mM, aufgenommen auf einem Hart Scientific Kalorimeter mit einer Heizrate von 20 grd/Stunde in 2 mM Phosphat, 1 mM EDTA bei pH 7.5. Zeitkonstanteneffekte wurden rechnerisch korrigiert.

Profile) bei verschiedenen Heizraten (20, 10, 3 und 1 grd/Stunde) aufgezeichnet (Abb.II-2). Das untere Ende der Hauptumwandlung zeigt einen Peak, der sich mit abnehmender Heizrate immer mehr verschmälert (bis hinunter zu einer Halbwertsbreite von 0.3 grd bei einer Heizrate von 1 grd/Stunde), während seine Enthalpie ungefähr konstant bleibt (0.38 ± 0.14 kcal/mol). Dieser Teil der Umwandlung ist wegen seiner kleinen Umwandlungs-enthalpie vermutlich nicht Teil der Kettenschmelze, sondern eine assoziierte Umwandlung.

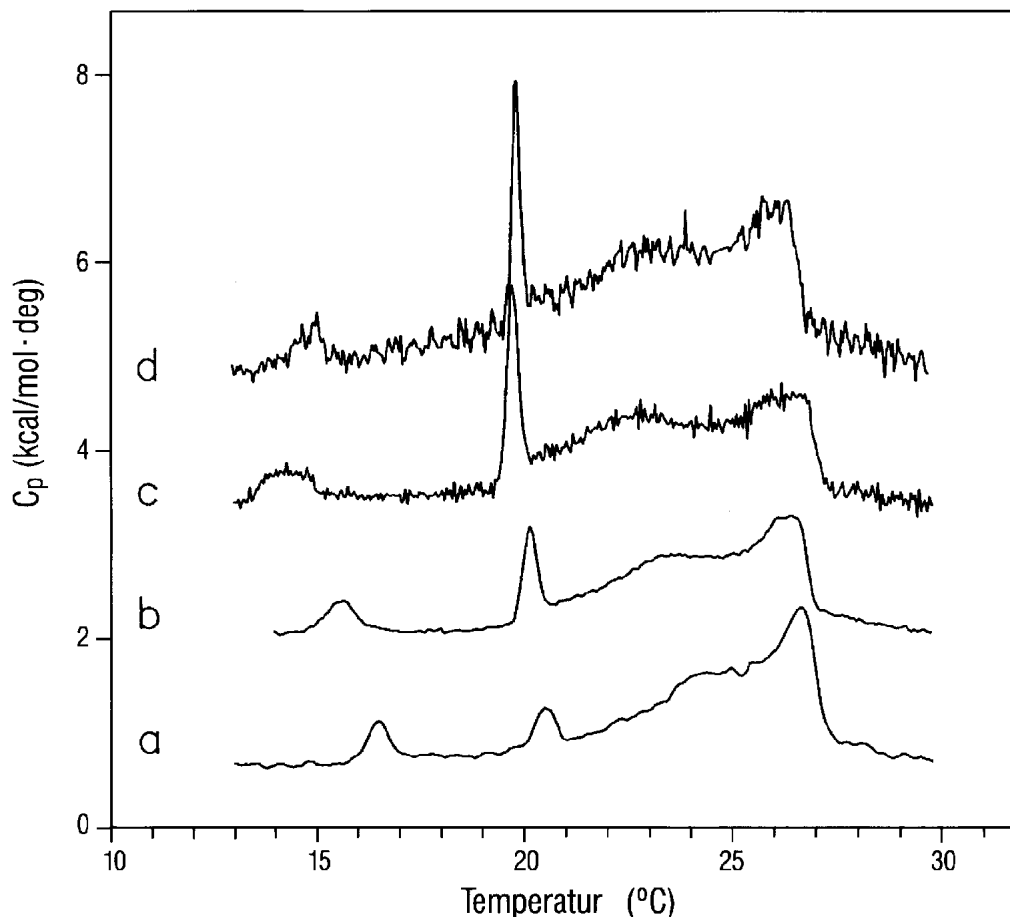


Abb.II-2

C_p-Profile von 10 mM DMPG-Dispersionen in 2 mM Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7.5 bei verschiedenen Heizraten: 20 grd/Stunde (a), 10 grd/Stunde (b), 3 grd/Stunde (c) und 1 grd/Stunde (d). Effekte der Zeitkonstante des Kalorimeters wurden in (a) und (b) rechnerisch korrigiert.

Die Form des verbleibenden Teils der Hauptumwandlung (von 20 - 28 °C) hängt nicht von der Heizrate ab und enthält den größten Teil der gesamten Umwandlungswärme (ca. 6 kcal/mol) und damit vermutlich wesentliche Teile des Schmelzens der Kohlenwasserstoffketten der Lipide.

Bei Zugabe von Cytochrom c zu den DMPG-Dispersionen verändert sich das Profil der Wärmekapazität beträchtlich (Abb. III-3a,b). Bei allen Lipidkonzentrationen resultiert die

Zugabe von einem Überschuß an Protein (Sättigung der Oberfläche) in einer Verbreiterung der Phasenumwandlung und einer Verschiebung hin zu etwas höheren Temperaturen. Obwohl die C_p -Profile des reinen Lipids sehr konzentrationsabhängig sind, sind sich die DSC-Kurven der Lipid-Proteinkomplexe bei verschiedenen Konzentrationen sehr ähnlich. In allen Fällen sind die Maxima der Wärmekapazität zu etwas höheren Temperaturen hin verschoben. Die Umwandlungsenthalpie ΔH verringert sich mit Erhöhung der Proteinkonzentration bis auf 1.7 kcal/mol Lipid bei einem Lipid-Proteinverhältnis von 10 : 1. Bei diesem Verhältnis wird die Sättigung der Lipidoberfläche mit Protein erreicht (Goerrissen et al., 1986).

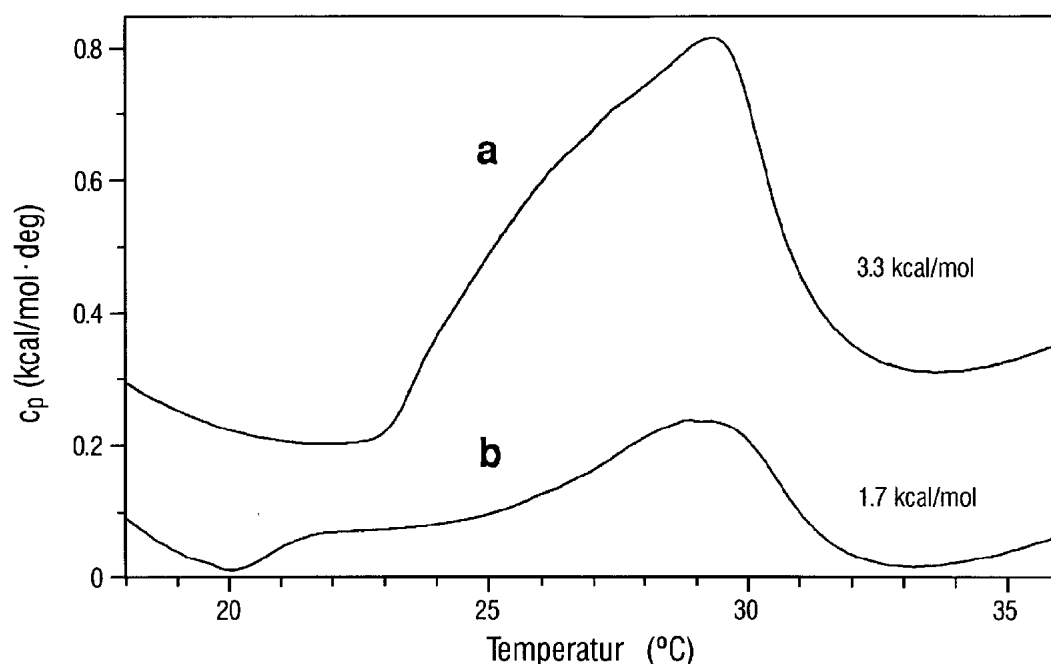


Abb. II-3

C_p -Kurven von Komplexen von 45 mM DMPG-Dispersionen mit Cytochrom c. (a) 2.25 mM Cyt.c, (b) 4.5 mM Cyt.c. Die Basislinie dieser Messungen wurde nicht korrigiert und ist nicht linear.

II-4.2 Viskosimetrie und Lichtstreuung

Eine interessante Beobachtung bei der Probenzubereitung von DMPG-Dispersionen war die deutlich erhöhte Viskosität der Proben.

Die Fließzeiten von 13 mM DMPG-Dispersionen in 2 mM Phosphatpuffer durch eine Kapillare wurden in einem Temperaturbereich von 5 - 40°C mit einem Cannon Viskosimeter aufgezeichnet und mit den Fließzeiten von destilliertem Wasser verglichen, um relative Viskositäten zu erhalten (Abb. II-4a). Bei Temperaturen unterhalb und oberhalb der Hauptumwandlung ($T < 20^\circ\text{C}$ und $T > 28^\circ\text{C}$) sind die Viskositäten denjenigen von Wasser

sehr ähnlich. Die relative Viskosität beginnt bei $\sim 20^\circ\text{C}$ anzusteigen, erreicht bei $\sim 26^\circ\text{C}$ ein Maximum, um daraufhin innerhalb von ungefähr einem Grad wieder auf einen niedrigen, mit der Wasserviskosität vergleichbaren Wert abzufallen.

In der Gegenwart von Cytochrom c verändern sich die Viskositätskurven vollständig. In Abb. II-4b werden die relativen Viskositäten von 13 mM DMPG-Dispersionen in Gegenwart von 325 μM , 650 μM , 975 μM und 1.3 mM Cytochrom c wiedergegeben. Bei Lipid-Proteinverhältnissen von mehr als 20 : 1 wurden keine Anomalie der Viskosität als Funktion der Temperatur mehr gefunden. Die relative Viskosität war unabhängig von der Temperatur und nahe derjenigen von Wasser. Bei weiterer Zugabe von Protein änderte sich dies. Bei 20°C beginnt die Viskosität beträchtlich anzuwachsen, simultan mit dem Einsetzen der Hauptumwandlung in den DSC-Experimenten (Abb. II-3a,b). Von $20 - 40^\circ\text{C}$ bleibt die Viskosität hoch.

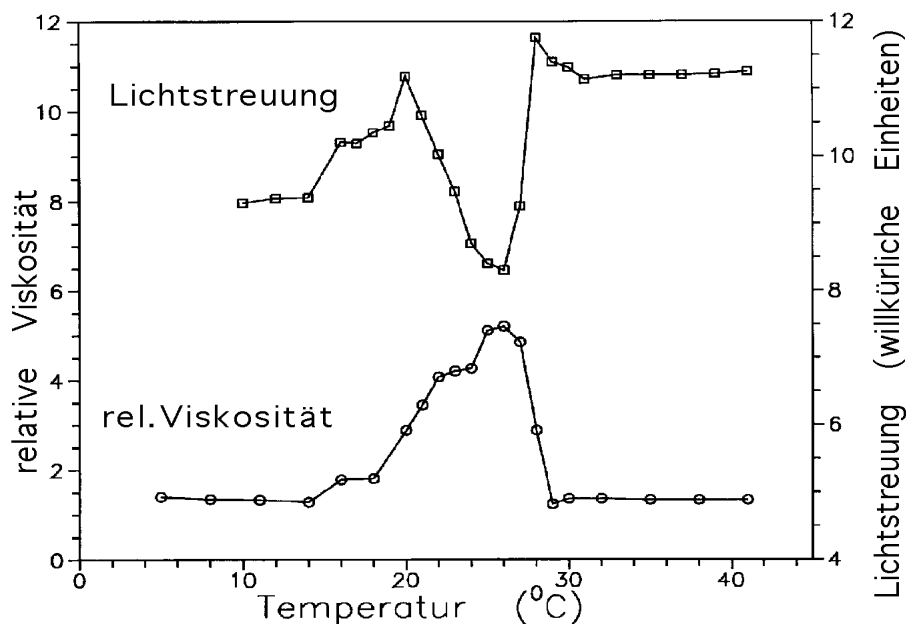


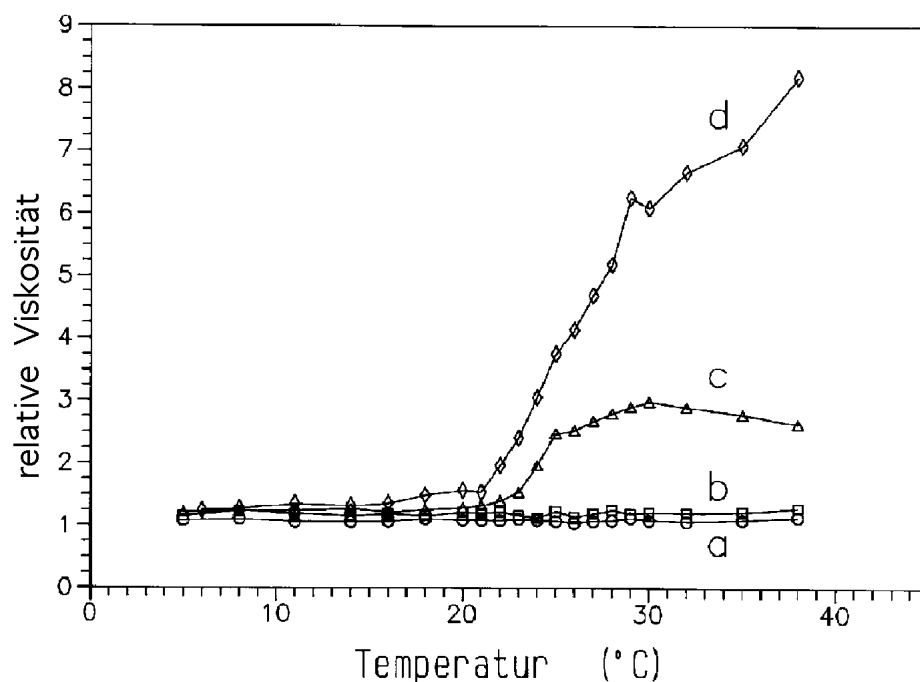
Abb. II-4a

Unten: Viskosität einer 13 mM DMPG-Dispersion relativ zu derjenigen von H_2O als Funktion der Temperatur.

Oben: Lichtstreuung einer 13 mM DMPG-Dispersion bei einem Winkel von 90° zur Einstrahlrichtung bei einer Wellenlänge von 280 nm als Funktion der Temperatur, jeweils in 2 mM Phosphatpuffer und 1 mM EDTA bei pH 7.5.

Bei einem Lipid-Proteinverhältnis von 10 : 1 erhöht sich die Viskosität bis auf den achtfachen Wert der Viskosität von Wasser. Diese Veränderungen der Viskosität sind reversibel.

In den Lipidzuständen niedriger Viskosität unterhalb und oberhalb der Hauptumwandlung erscheinen die Lipiddispersionen milchig. Dieser optische Eindruck wird experimentell durch Messung der Lichtstreuung zugänglich. In Abb. II-4a wird die Intensität der Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 280 nm bei einem Winkel senkrecht zur Einfallsrichtung des Lichtes als Funktion der Temperatur gezeigt. Am Maximum der Viskosität nimmt die Lichtstreuung ungefähr um den Faktor zwei ab. Das ungewöhnliche Verhalten von DMPG findet sich also sowohl in der Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität, der Viskosität als auch der Lichtstreuung wieder, und die Veränderungen korrelieren miteinander.

**Abb.II-4b**

Relative Viskositäten 13 mM DMPG-Dispersionen (2 mM Phosphatpuffer, 1 mM EDTA pH 7.5) in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Cytochrom c. (a) 0.325mM Cyt.c, (b) 0.65mM Cyt.c, (c) 0.975mM Cyt.c, und (d) 1.3mM Cyt.c, entsprechend 25 %, 50 %, 75 % und 100 % der vollständigen Sättigung der Lipidoberfläche.

II-4.3 Titrationskalorimetrie

Die Thermodynamik der Bindung von Cytochrom c an DMPG wurde mit einem Titrationskalorimeter bei einer Vielzahl von Temperaturen untersucht. Die bei jeder Injektion eines festgelegten Quantum einer Proteinlösung zu der Lipiddispersion freiwerdende Wärmemenge wurde aufgezeichnet. Alle Titrationsexperimente wurden in 2 mM TRIS-Puffer

mit 1 mM EDTA bei pH 7.5 aufgezeichnet. Typische Experimente, durchgeführt bei 7 °C, 19.8 °C und 41 °C sind in Abb. II-5a,b und c wiedergegeben.

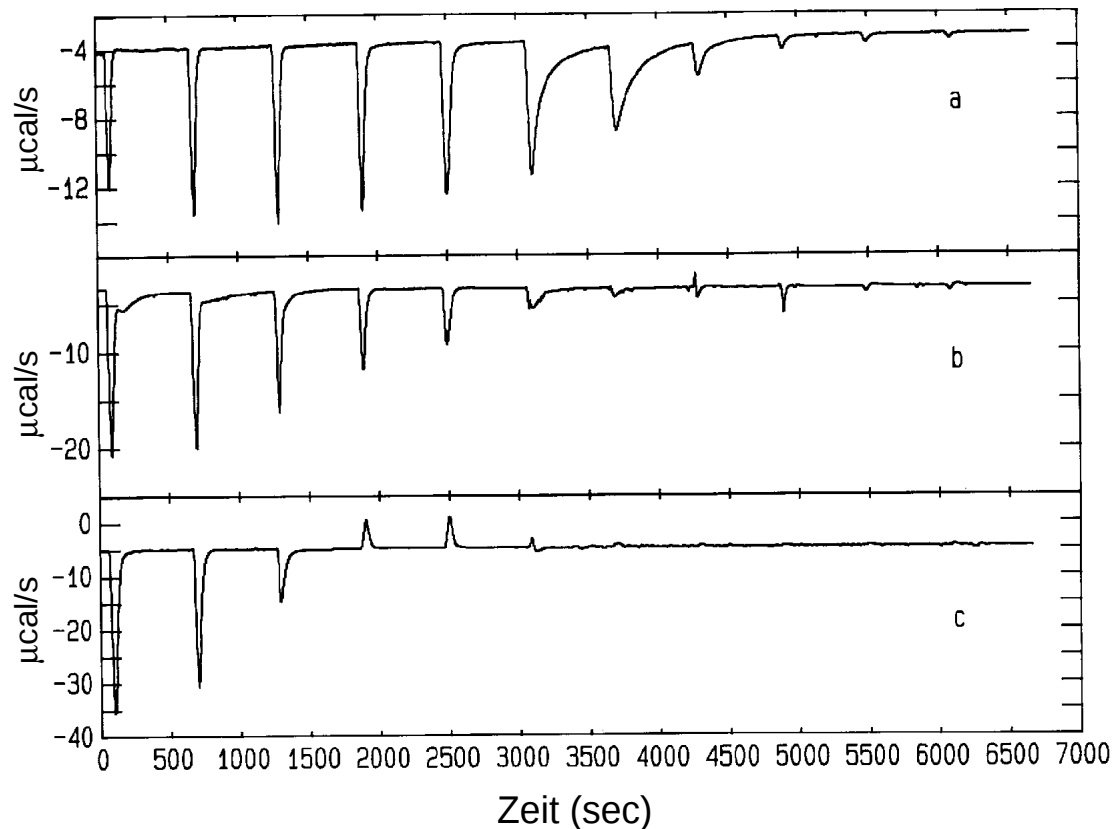


Abb. II-5a,b und c

Kalorimetrische Titrationsexperimente bei verschiedenen Temperaturen. (a) 7°C, (b) 19.5 °C und (c) 41 °C. Die Wärmefreisetzung wurde als Funktion der Zeit aufgetragen. Pro Injektion wurden jeweils 10 μ l einer 1.61 mM Cytochrom c-Lösung zu 1.4 ml einer 0.526 mM DMPG-Dispersion titriert. Lipid und Protein befanden sich in 2 mM Tris, 1 mM EDTA bei pH 7.5

Bei 7 °C resultiert die erste Injektion in einer raschen Absorption von Wärme. Die Zeitabhängigkeit der Absorption entsprach der typischen Zeitkonstante des Titrationskalorimeters. Mit jeder weiteren Injektion wuchs die absorbierte Wärme pro Injektion weiter an und die Zeitdauer der Wärmeabgabe der Probe vergrößerte sich, was darauf hindeutet, daß bei höheren Protein/Lipid Verhältnissen, folgend auf die Bildung des Lipid-Proteinkomplexes, ein weiterer, langsamerer Prozeß stattfindet. Das zweiphasige Verhalten der Bindungsreaktion bedeutet, daß der Protein/Lipidkomplex eine Zustandsveränderung durchläuft, die vom Grad der Sättigung des Lipids mit Proteinen abhängt.

Bei 19.8 °C verursachte die erste Injektion eine Antwort, in der man wiederum einen schnellen und einen langsamen Prozeß (mit Zeitkonstanten < 1 min und ~ 3 min) auflösen kann. Die absorbierte Wärme pro Injektion nimmt im Verlauf der Titration ab. Wenn man die Daten

zwischen 7 °C und 20 °C verfolgt, erkennt man einen Trend, der in der Verschiebung des langsamen Prozesses hin zu niedrigeren Protein-Lipidverhältnissen besteht. Oberhalb von 20 °C kann keine langsame Reaktion beobachtet werden. Es tritt jedoch ein anderer Prozeß ein, der sehr deutlich bei 41 °C in Abb. II-5c erkennbar ist. Bei dieser Temperatur war die Wärmeveränderung immer schnell, aber mit ansteigender Proteinkonzentration veränderte sich das Vorzeichen der Titrationswärmen pro Injektion von endotherm (Absorption) nach exotherm (Wärmefreisetzung), was wiederum ein eindeutiges Zeichen für einen mehrphasigen Prozeß ist. In Abb. II-6 kann werden die Wärmen pro Injektion als Funktion der zugegebenen Proteinmenge bei fünf ausgewählten Temperaturen wiedergegeben. Bei Temperaturen unterhalb 23 °C wird bei allen Proteinkonzentrationen in der Titrationszelle Wärme absorbiert. Bei der niedrigsten Temperatur läßt die Form der kalorimetrischen Bindungsisotherme (siehe unten in Abb. II-8) und ihr Differential (Abb. II-6) deutlich einen kooperativen Prozeß erkennen. Bei Temperaturen zwischen 19 °C und 22 °C scheint die Bindungs-isotherme (siehe unten in Abb. II-8) in Übereinstimmung mit einem einfachen Bindungsprozeß, in ihrem Differential jedoch erkennt man auch hier ein anomales Verhalten (Abb. II-6). Oberhalb von 23 °C wechseln die Injektionswärmen bei Erhöhung der Proteinkonzentration ihr Vorzeichen.

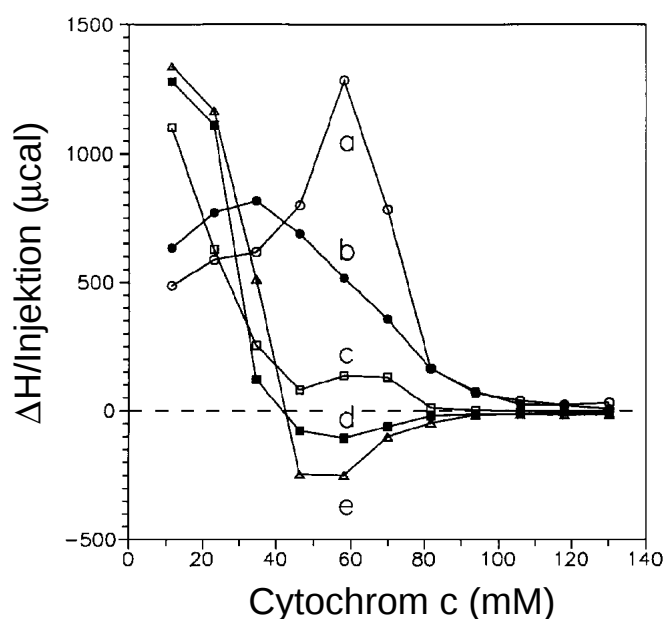


Abb. II-6

Wärmen pro Injektion als Funktion der Proteinkonzentration bei (a) 9.4°C, (b) 16.3°C, (c) 22.3°C, (d) 29.4°C und (e) 41°C. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. II-5

Dies ist ein klarer Hinweis darauf, daß auf die Bildung des Lipid-Proteinkomplexes eine weitere Reaktion erfolgt. Bei allen Temperaturen schien die Membran bei einem Lipid-Proteinverhältnis von ca. 9 : 1 bis 10 : 1 mit Protein gesättigt zu sein (mit der Ausnahme von 7 : 1 bei 7 °C).

Dieses Resultat für die Sättigung stimmt mit der Stoichiometrie überein, die von Goerrissen et al. (1986) gefunden wurde.

Die Gesamtwärme eines Titrationsexperiments (integriert über alle Injektionen bis zur vollständigen Sättigung der Membran), ist mit der Temperatur nicht konstant. Sie sinkt von ~ 7 kcal/mol Lipid bei niedrigen Temperaturen auf ~ 3 kcal/mol Lipid bei hohen Temperaturen ab (Abb. II-7). Diese Werte entsprechen 70 kcal/mol und 30 kcal/mol Protein unter der Annahme einer Stoichiometrie von 10 : 1. Die Differenz von ca. 4 kcal/mol Lipid ist fast identisch mit der Wärmeveränderung von 4.3 kcal/mol, die in den kalorimetrischen Scans (Abb. II-1 und II-3) bei Zugabe einer sättigenden Menge Cytochrom c zum Lipid gemessen wurden.

Die in den Titrationsexperimenten gefundenen Daten wurden mittels eines statistisch thermodynamischen Modells analysiert, das auf der Annahme einer proteininduzierten, kooperativen Umwandlung im Lipid-Proteinkomplex beruht (siehe Abschnitt. II-3.2). In Abb. II-8 sind mit diesem Modell gewonnene Anpassungen der Titrationsisothermen für drei ausgewählte Temperaturen wiedergegeben, unter Benutzung der Parameter in Tabelle II-1.

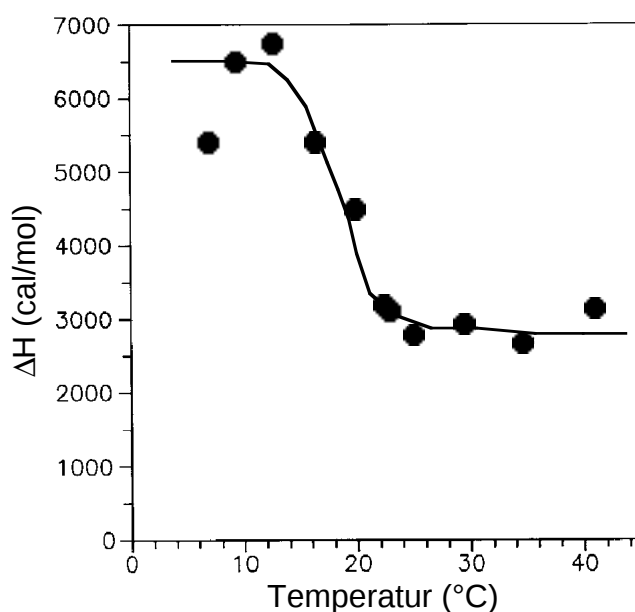


Abb. II-7

Integrierte Injektionswärmen der Experimente in Abb. II-6 als Funktion der Temperatur bei der Sättigung von DMPG mit Cytochrom c.

Die Simulationen führten zu ausgezeichneter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, die auch bei den nicht gezeigten Temperaturen ähnlich gut waren. Aus praktischen Gründen wurde dabei die Enthalpie der Lipidumwandlung (ΔH_0) gleich Null gesetzt. Das heißt jedoch nicht, daß in dieser Umwandlung keine Wärme frei wird. Sie ist jedoch nur schwer von der

Wärme ($\Delta H_b - \Delta H_a$) zu unterscheiden, die von der veränderten Bindung herrührt, und wurde deshalb willkürlich mit Null gleichgesetzt.

Die intrinsischen Bindungskonstanten K_a und K_b sind bei allen Temperaturen nahezu gleich, wobei K_b immer geringfügig größer ist als K_a . Dies führt zwar nur zu einer minimalen Verstärkung der Bindung des Proteins an Lipidzustand B verglichen mit der Bindung an Lipidzustand A, stellt aber genügend freie Energie zur Verfügung, um bei der Bindung von vielen Proteinen eine Umwandlung des Lipids hervorzurufen. In der Simulation wurde willkürlich die Vesikelgröße mit je $n = 25$ Proteinbindungs-plätzen (250 Lipide) als konstant angenommen.

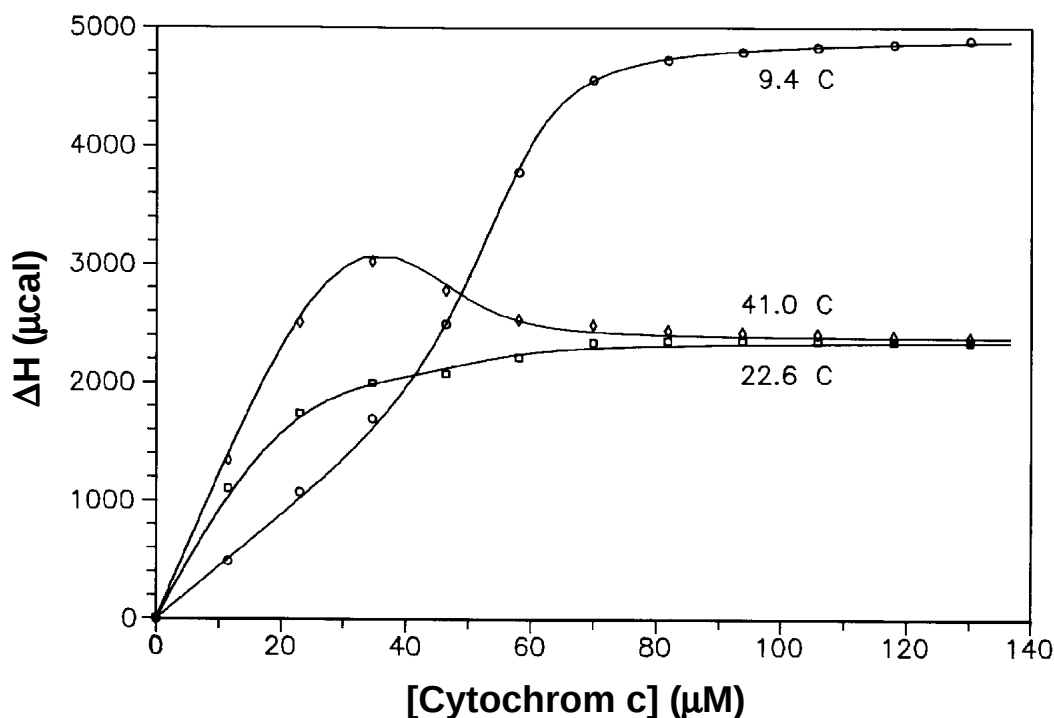


Abb.II-8

Computersimulationen der Enthalpie der Titrationsisothermen bei drei verschiedenen, repräsentativen Temperaturen unter Verwendung von integrierten Meßdaten aus Abb. II-6, angepaßt mit Hilfe des im Text beschriebenen statistisch-thermodynamischen Modells unter Benutzung der Parameter aus Tabelle II-1.

Wenn man die Zahl n der Bindungsplätze vergrößert, nimmt in den Simulationen der Unterschied zwischen den beiden Bindungskonstanten K_a und K_b ab, wobei aber bei die numerischen Größenordnung erhalten bleibt. Die Bindungskonstanten wurden immer mit ungefähr $5 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$ l/mol Protein angenommen. Dies ist in Übereinstimmung mit Werten, die von Heimburg (Dissertation, 1989) unter Benutzung einer Langmuir-Isotherme (die auch

hier die Grundlage des Modells bildet) für die Bindung von Cytochrom c an Dioleoyl-Phosphatidylglycerol (DOPG) gefunden wurde (vgl. aber auch Kap.IV).

T [°C]	K_a [l/mol]	K_b [l/mol]	K_o	ΔH_a [kcal/mol]	ΔH_b [kcal/mol]	m
7.0	2·10 ⁶	3.00·10 ⁶	2.4·10 ⁻⁴	2.71	5.96	7
9.4	2·10 ⁶	3.00·10 ⁶	1.0·10 ⁻⁴	3.56	7.78	9
12.8	5·10 ⁵	7.50·10 ⁵	1.0·10 ⁻⁴	7.00	6.78	9
16.3	1·10 ⁶	1.40·10 ⁶	2.0·10 ⁻³	4.78	5.56	9
19.8	1·10 ⁶	1.27·10 ⁶	6.0·10 ⁻²	6.90	4.45	10
22.6	1·10 ⁶	1.26·10 ⁶	6.0·10 ⁻²	7.60	2.95	10
25.1	2·10 ⁶	2.59·10 ⁶	3.0·10 ⁻²	8.00	2.55	10
29.4	2·10 ⁶	2.59·10 ⁶	1.7·10 ⁻²	9.00	2.43	10
34.9	1·10 ⁶	1.35·10 ⁶	5.7·10 ⁻³	8.00	2.16	10
41.0	1·10 ⁶	1.35·10 ⁶	2.6·10 ⁻³	9.20	2.48	10

Tabelle II-1

Parameter für die Anpassung der im Titrationskalorimeter erhaltenen Bindungsisothermen (vgl. Abb. II-8) unter Annahme von zwei Lipidzuständen A und B mit den zugehörigen intrinsischen Proteinbindungskonstanten K_a und K_b und Bindungsenthalpien ΔH_a und ΔH_b , der Gleichgewichtskonstanten K_o zwischen den Zuständen A und B. m ist die Lipid-Proteinstoichiometrie.

II-4.4 "Negative Stain"-Elektronenmikroskopie

Die Schlußfolgerung aus den bisherigen Messungen war, daß die Bindung von Cytochrom c an Membranen zu Umwandlungen der Lipidmatrix zwischen Phasen führen, die sich durch verschiedene Grade ihrer Ausdehnung unterscheiden. Um diesen Punkt weiter zu vertiefen und Information über die Morphologie der Lipidmatrix zu erhalten, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen mit der "Negative-Stain"-Technik an den Lipiden und den Lipid-Proteinkomplexen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Dazu wurden Lipidproben in Abwesenheit oder in Anwesenheit einer sättigenden Proteinmenge mit einem Kohlenstoff-Film in Kontakt gebracht und mit Uranylformiat markiert, das an die freibleibenden Stellen des Kohlenstoff-Filmes bindet. Dadurch werden die Umrisse der Lipidstruktur markiert und im Elektronenmikroskop erkennbar. Man erhält auf diese Weise eine zweidimensionale Abbildung der Lipidstruktur, da die Bindung an den Kohlenstoff-Film so stark ist, daß keine morphologischen Veränderungen in der Lipidmatrix im Anschluß an den

Kontakt mit dem Film mehr stattfinden. Die erhaltenen Filme wurden im Elektronenmikroskop untersucht. Die Aufnahmen des reinen Lipids bei 15, 24.5 und 35°C, d.h. bei Temperaturen unterhalb, inmitten und oberhalb der thermotropen Schmelzumwandlung der Lipide werden in Abb. II-9a-d gezeigt.

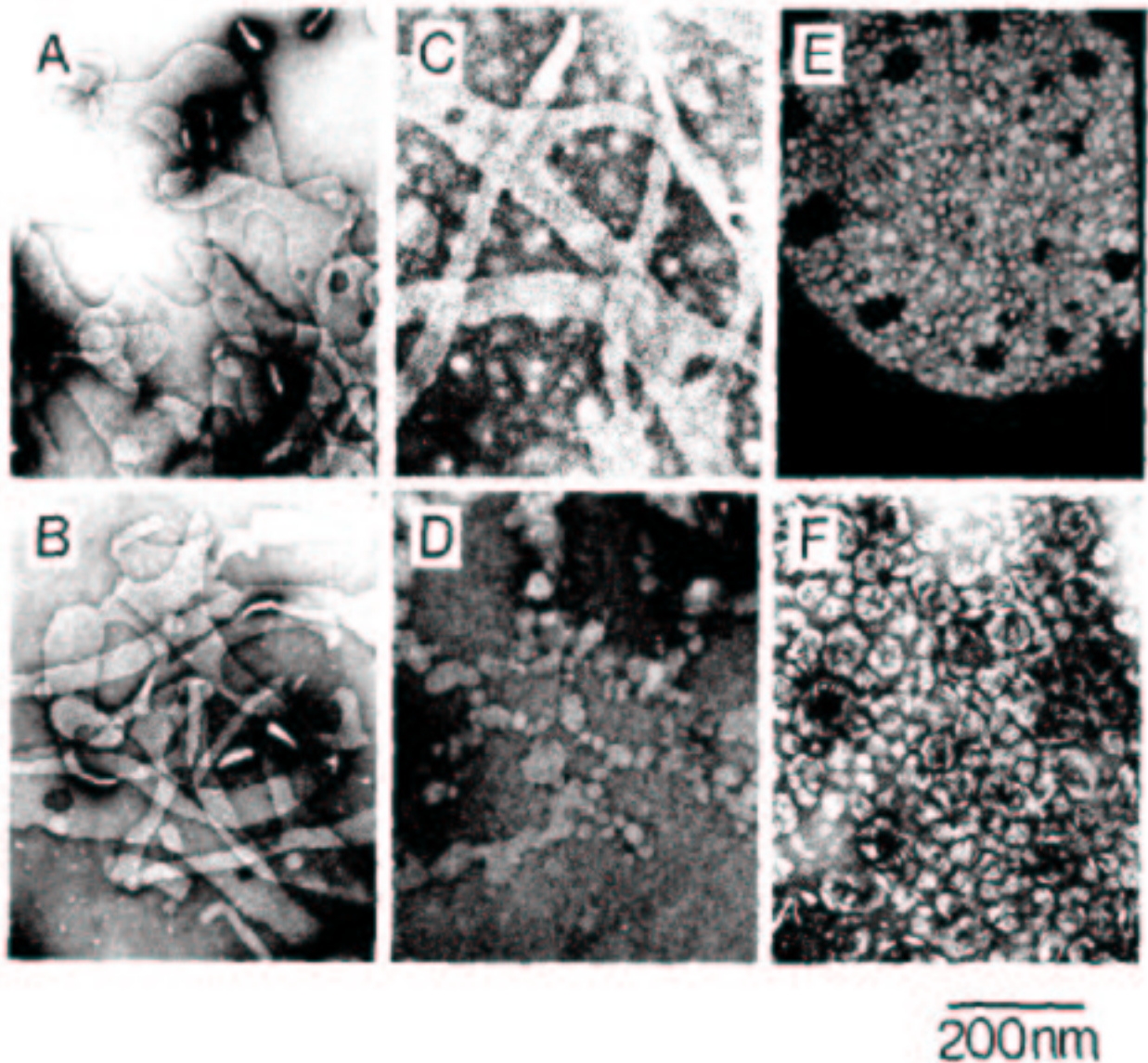


Abb. II-9

"negative-stain"-elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lipiddispersionen in 2 mM Hepes, 1 mM EDTA bei pH 7.5. in verschiedenen Regionen der thermotropen Schmelzumwandlung der Lipide und Lipid-Proteinkomplexe. (a) 10 mM DMPG bei 15 °C, (b) 0.2 mM DMPG bei 24.5 °C, (c, d) 10 mM DMPG bei 35 °C (zwei verschiedene Bildausschnitte), (e) 10 mM DMPG in Gegenwart eines Überschusses Cytochrom c bei 15 °C, (f) 10 mM DMPG in Gegenwart eines Überschusses Cytochrom c bei 35 °C. Die weißen Flecken in (c) sind ein Artefakt der Schattierung mit Uranyl-Formiat bei höheren Temperaturen.

Auf alle Bildern erkennt man ineinander verwebte Strukturen, die vermutlich Netzwerke von Röhren sind. Bei 15 °C, unterhalb der Lipidhauptumwandlung, scheint die Struktur an einigen Stellen in scheibenförmige Partikel auseinanderzubrechen (Abb. II-9a). Bei 24.5 °C hingegen, mitten in der Hauptumwandlung, ist das Netzwerk sehr ausgeprägt (Abb. II-9b).

Oberhalb der Hauptumwandlung werden die röhrenförmigen Strukturen sehr lang (Abb. II-9c) und brechen an manchen Stellen auseinander um Vesikel von 20-30 nm Durchmesser zu bilden (II-9d).

In der Gegenwart einer sättigenden Menge Cytochrom c (Lipid-Protein Verhältnis 10 : 1) erkennt man in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen deutliche Veränderungen der vesikulären Struktur. Bei 15 °C, unterhalb der Schmelzumwandlung, erkennt man kleinen, runde und kugelförmige Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 10 - 20 nm, die sich nicht berühren (Abb. II-9e). Bei 35 °C hingegen, oberhalb der Hauptumwandlung, kollabieren diese Vesikel, formen Scheiben ähnlichen Durchmessers, und beginnen, stapelförmige Aggregate zu bilden (Abb. II-9f).

Diese Ergebnisse deuten an, daß sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Cytochrom c eine Tendenz besteht, ausgedehnte Strukturen in den Temperaturregionen hoher Viskosität (siehe Kapitel II-4.2) zu formen. Diese Strukturen sind jedoch in Gegenwart von Cytochrom c (Aggregation von Vesikeln) von ganz anderer Natur als in Abwesenheit von Proteinen (Ausbildung eines Lipidnetzwerkes).

II-4.5 Magnetische Resonanz

Die bisher erhaltenen Informationen über die Lipid-Proteinkomplexe waren vorwiegend struktureller Art, insbesondere jene, die aus den optischen, viskosimetrischen und elektronenmikroskopischen Messungen folgten. Die Umwandlung mit dem größten Anteil der gesamten Enthalpie wurde als Hauptumwandlung bezeichnet, was impliziert, daß die Lipidketten von der idealen Trans-Konfiguration zu einer statistischen Anordnung von Trans- und Gauche-Elementen übergeht. Obwohl naheliegend, ist dies bisher noch nicht bewiesen worden. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit Hilfe von Elektronen-spinresonanz (ESR) und mit Nuklearer Spinresonanz (NMR) durchgeführt. Elektronenspinresonanz kann nur an radikalischen Gruppen durchgeführt werden. Aus diesem Grund wird bei der Spinlabel-ESR eine Nitroxidradikal an der sn-2 Kohlenwasserstoffkette der Lipide befestigt, das eine deutliche räumliche Anisotropie der Hyperfeinaufspaltung besitzt. Ob bei unterschiedlichen Orientierungen dieses Spinlabels im Magnetfeld die Spektren als Superposition der verschiedenen Orientierungen oder als zeitlich gemitteltes Spektrum auftreten, hängt von der typischen Zeitkonstante der Bewegungen des Labels ab, die für ein Nitroxid-Label in genau

demselben Zeitbereich liegt wie die typische Trans-gauche-Isomerisierungsrate ($\sim 10^{-9}$ s). Spektren einer flüssig-kristallinen Phase erscheinen deshalb isotrop gemittelt im Gegensatz zu gelförmigen Phasen, die als Superpositionen von Spektren mit verschiedener Aufspaltung erscheinen.

Phosphatidylglycerol wurde an der 14. Kohlenstoffposition der sn-2 Kette markiert, um die Mobilität der Kohlenwasserstoffketten als Funktion der Temperatur untersuchen zu können. In Abb. II-10 sind ESR-Spektren von 45 mM DMPG-Dispersionen in Abwesenheit und in Gegenwart von 4.5 mM Cytochrom c abgebildet, die bei verschiedenen Temperaturen unterhalb, inmitten und oberhalb der Hauptumwandlung (in Kapitel II-4.1 durch DSC-Experimente bestimmt aufge-zeichnet wurden).

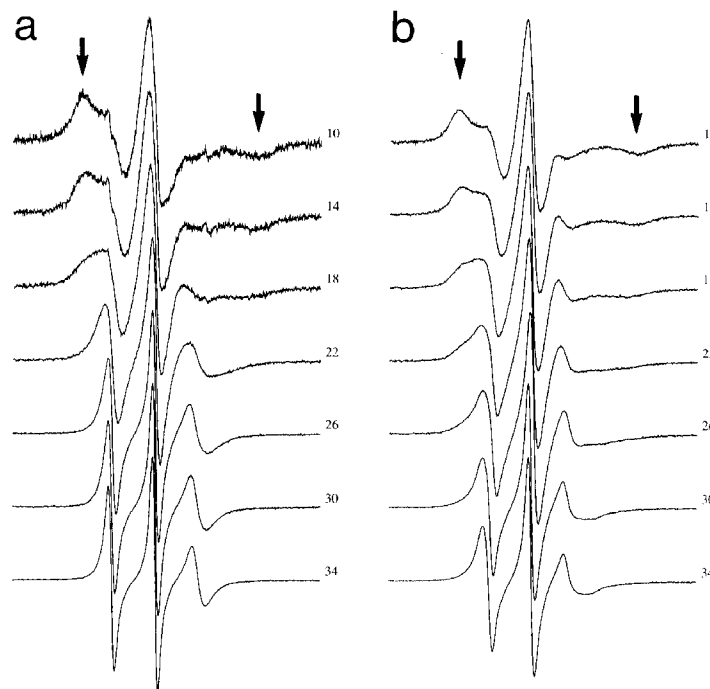


Abb.II-10

ESR-Spektren (100 Gauss Scan-Breite) von C-14 gelabeltem DMPG (45 mM) in Abwesenheit (a) und in Gegenwart von 4.5mM Cytochrom c (b) als Funktion der Temperatur (2 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7.5)

Die Spektren der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase unterscheiden sich durch unterschiedliche Grade von Mittelung der spektraler Anisotropie, die durch die maximale Hyperfeinaufspaltung der Spektren bestimmt werden kann (vergleiche Pfeile in Abb. II-10). In den reinen Lipidspektren (Abb.II-10a) erkennt man zwischen 10° und 18°C ein Spektrum, das typisch für eine Gelphase ist (Marsh & Watts, 1982). Im Bereich zwischen 18 und 26 °C findet die Kettenschmelze der Lipide statt, während oberhalb von 26°C nur noch Spektren eine

flüssigen Phase zu erkennen sind. Auch in den Lipid-Proteinkomplexen (Abb. II-10b) erkennt man eine Kettenschmelzumwandlung im Bereich von 18 - 30 °C. Die Spektren in diesem Bereich lassen eine Koexistenz von zwei Lipidzuständen unterschiedlichen Grades von Bewegungsfreiheit der Lipidketten erkennen.

Die Erkenntnisse aus den ESR-Spektren sind in Abb. II-11 zusammengefaßt, wo die äußere Aufspaltung der Spektren in Abwesenheit (●) und in Gegenwart von einer sättigenden Menge von Protein (○) als Funktion der Temperatur aufgetragen wurde. Die äußere Hyperfeinaufspaltung ist eine Funktion der Kettenbeweglichkeit an der C-14 Position der Lipidketten, nahe am Zentrum der Membran. Die Kurven in Abb. II-11 bedeuten, daß die Wärmekapazitätskurven in Abb.II-1 sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Cytochrom c tatsächlich mit der Schmelze der Lipidketten einhergehen, da eine Verringerung der maximalen Hyperfeinaufspaltung ein Maß für schnelle Bewegungen der Lipidketten ist, die beim Schmelzen der Ketten hauptsächlich durch rasche trans-gauche-Isomerisierungen zustande kommt. Dies war aufgrund der hohen Enthalpie dieser Umwandlung auch zu erwarten.

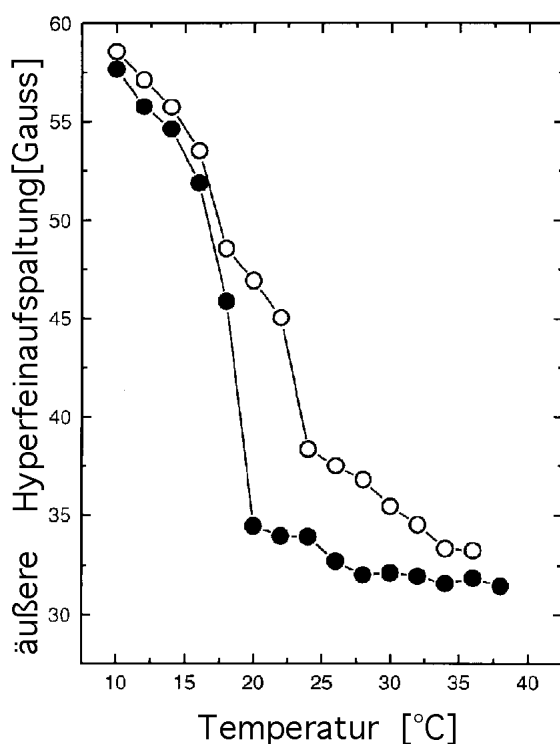


Abb.II-11

Hyperfeinaufspaltung aus den ESR-Spektren aus Abb.II-10 als Funktion der Temperatur für DMPG (●) und Cyt.C / DMPG-Komplexe (○)

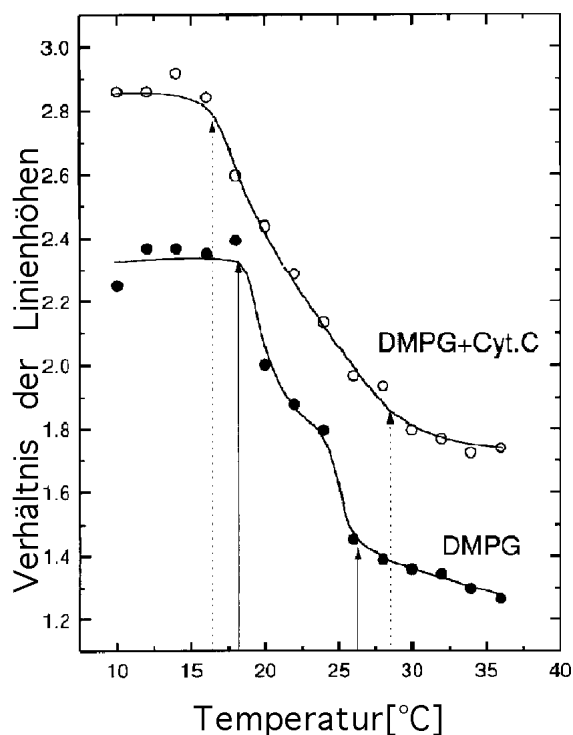


Abb.II-12

Verhältnis der Linienhöhen des zweiten und des ersten Maximums der ESR-Spektren in Abb.II-10 als Funktion der Temperatur (Symbole wie in Abb.II-11)

Daß sich die Spektren aus Abb. II-10 in denselben Temperaturgrenzen wie die DSC-Scans in Abb. II-1 verändern ist in der Auftragung der Hyperfeinaufspaltung nicht gut zu erkennen. Besser sieht man dies in der Auftragung des Verhältnisses der Linienhöhen des zweiten und des ersten Maximums aus denselben Spektren (Abb. II-12). Dies liegt darin begründet, daß sich Veränderungen in den Spektren nicht nur in der Verschiebung von Maxima, sondern auch in der Verschmälerung ihrer Linienbreiten zeigt, die sich auf die Amplitude auswirkt. Die beiden Auftragung sind deshalb nebeneinander aufgetragen.

Um Erkenntnisse über den morphologischen Zustand der DMPG- und der Cyt.C/DMPG-Phasen zu bekommen, wurden ^{31}P -NMR-Experimente durchgeführt. In Abb. II-13a und b sind Breitband-Protonen-entkoppelten Spektren von 45 mM DMPG Dispersionen in Abwesenheit (a) und in Gegenwart von 4.5 mM Cytochrom c (b) abgebildet. Die Spektren der reinen Lipide zeigen die typische Linienform für lamellare Phospholipidphasen (Smith & Ekiel, 1984), mit einer Anisotropie der chemischen Verschiebung von 70 ppm (parts per million) bei 11 °C und von 48 ppm bei 35 °C. Dies deutet auf eine Gelphase bei tiefen und eine flüssig-kristalline Phase bei hohen Temperaturen hin. In der Gegenwart von Cytochrom c sind alle Spektren isotrop, mit einer Halbwertsbreite des Peaks von ~2.2 ppm bei 11 °C und von ~1.4 ppm bei 35 °C. Eine isotrope Linienform erlaubt keine eindeutige Identifikation der Lipidphase. Sie können in Phosphor-NMR verschiedene Ursachen haben: Erstens eine durch Proteinbindung hervorgerufenen lokale Störung der Membranstruktur, zweitens ein Einfluß des gebundenen Proteins auf die Kopfgruppenorientierung der Lipide und drittens die Bildung kleiner Partikel wie in kleine Vesikeln, Mizellen oder Phasen mit kleinem Krümmungsradius wie in kubischen Lipidphasen.

Es ist nicht leicht, eine dieser Möglichkeiten auszuschließen. Wie jedoch die ESR-Messungen gezeigt haben, liegt bei den Lipid-Proteinkomplexen bei niedrigen Temperaturen eine Gelphase vor. Dies bedeutet aller Wahrscheinlichkeit nach, daß eine lamellare Phase vorliegt, da nicht-lamellare Phasen üblicherweise ausschließlich in flüssig-kristalline Phasen beobachtet werden. Deshalb liegen bei 11°C vermutlich lamellare kleine Vesikel vor, was in Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist. Für die flüssig-kristalline Phasen kann man aufgrund der NMR-Experimente keine solche Aussage treffen.

Eine isotrope Komponente in ^{31}P -NMR Messungen wurde schon früher in den Spektren von flüssig-kristallinen Dioleoyl-Phosphatidylglycerol in Komplexen mit Cytochrom c beobachtet (Heimburg et al., 1991). Die isotrope Komponente in den Spektren erschien neben einer lamellaren Komponente und war proportional zur Gesamtmenge des gebundenen Proteins (d.h. es gab keine offensichtliche Kooperativität im Auftauchen der einen oder der anderen Komponente). Es wurde deshalb darauf geschlossen, daß die isotrope Komponente vermutlich eher durch lokale Störungen oder Krümmung der Lipidstruktur am Bindungsplatz des Proteins

auf einer planaren Oberfläche entsteht, als durch makroskopische (in der Regel kooperative) Veränderungen der Lipidanordnung zu nicht-lamellare Phasen hin.

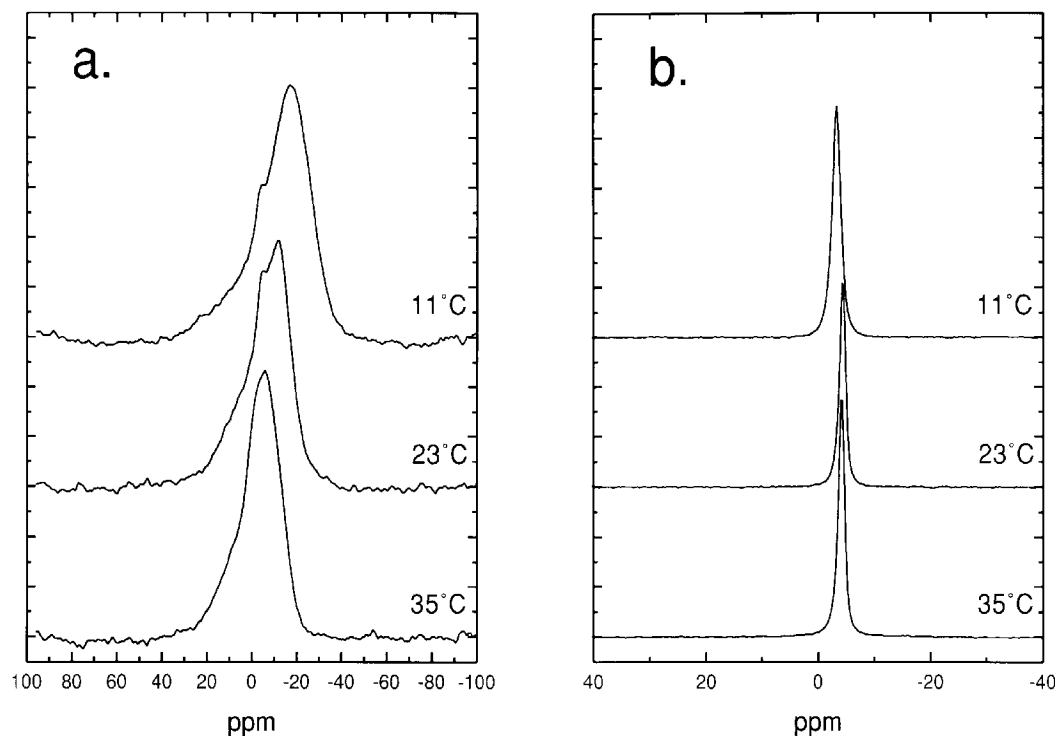


Abb. II-13

^{31}P -NMR-Experimente von **(a)** 45mM DMPG Dispersionen und von **(b)** Cytochrom c/DMPG Komplexen (4.5 mM Cyt.c, 45 mM DMPG) bei verschiedenen Temperaturen unterhalb, innerhalb und oberhalb der kalorimetrischen Hauptumwandlung.

II-5 DISKUSSION

DMPG-Dispersion zeigen ein komplexes thermotropisches Verhalten bei niedriger Ionenstärke. Die Umwandlungen wurden beschrieben durch Differentialkalorimetrie, Lichtstreuungsexperimente, Viskosimetrie und Elektronenspinresonanz (ESR). Die DSC-Experimente zeigen mehrere Maxima der spezifischen Wärme (C_p) im Temperaturbereich von 12 - 28 °C, abhängig von der Lipidkonzentration. Die unterste Umwandlung (12 -17 °C) ist sowohl konzentrationsabhängig als auch von der Heizrate des Kalorimeters abhängig. Bei konstanter Heizrate verschiebt sich die Umwandlung bei Verringerung der Lipidkonzentration zu höheren Temperaturen, wobei die Enthalpie der Umwandlung jedoch ungefähr konstant bleibt ($\Delta H_1 = 0.57 \pm 0.14$ kcal/mol). Bei konstanter Konzentration verschiebt sich das C_p -

Maximum bei Erhöhung der Heizrate zu höheren Temperaturen. Dies ist kein Effekt der typischen Zeitkonstante des Kalorimeters, sondern ein Hinweis darauf, daß diese Umwandlung eine langsame Kinetik aufweist. Diese Tatsache (Lentz et al., 1978) zusammen mit den kleinen Enthalpie-Änderung und der Abwesenheit von signifikanten Effekten in der Lichtstreuung und in der Viskosität legten nahe, daß es sich bei dieser Umwandlung um die sogenannte Vorwandlung handelt ($L_{\rightarrow} P_{\rightarrow}$), bei der sich aus einer Gelphase eine Gelphase mit einer regelmäßigen Wellenmodulation der Oberfläche ausbildet ('ripple phase').

Im Temperaturbereich von 20 - 28 °C erhält man ein komplexes Schmelzverhalten. Wie die ESR-Experimente zeigen, repräsentiert dieser gesamte Bereich die sogenannte Hauptumwandlung, in der die Kohlenwasserstoffketten von All-Trans-Zustand in einen fluiden Zustand übergehen. Das C_p -Profil zeichnet sich durch zwei wohldefinierte Maxima am Beginn und am Ende der Umwandlung aus. Die Position der beiden Maxima hängt von der Lipidkonzentration ab und befindet sich bei 21 °C und bei 27 °C bei niedrigen Lipidkonzentrationen (10 mM). Zwischen diesen beiden Maxima ist die Wärmekapazität immer größer als der Basislinienwert. Bei Erhöhung der Lipidkonzentration bewegen sich die beiden Maxima aufeinander zu, um bei hohen Konzentrationen (>150mM) ein einziges Maximum mit der Schmelztemperatur von ca. 24 °C zu bilden. Das ist der Literaturwert für den Schmelzpunkt von DMPG (Gershfeld et al., 1986, Surewicz et al., 1987).

Wenn man die DSC-Daten detaillierter untersucht, erhält man tiefere Einblicke in die mögliche Natur der Hauptumwandlung. Zum ersten ist die Gesamtenthalpie der Umwandlungen (inklusive Vorumwandlung) gleich

$$\Delta H_{\text{tot}} = \int_{T=9^{\circ}}^{30^{\circ}} C_p \cdot dT = 6.03 \pm 0.17 \text{ kcal / mol Lipid},$$

was innerhalb der experimentellen Genauigkeit unabhängig von der Lipidkonzentration ist. Dies bedeutet, daß die Gesamtfolge von Umwandlungen bei den verschiedenen Konzentrationen energetisch im wesentlichen gleich ist. Zum zweiten ist die Position der unteren Grenze der Hauptumwandlung nur wenig temperaturabhängig (22 ± 1 °C). Bei niedrigen Lipidkonzentrationen ist dieses Maximum relativ gut aufgelöst und besitzt eine Enthalpie von $\Delta H_2 = 0.38 \pm 0.17$ kcal/mol Lipid. Das Maximum wird bei langsamen Heizraten sehr ausgeprägt, was bedeutet, daß diese (Sub-)Umwandlung sehr kooperativ ist. Seine Halbwertsbreite von 0.3 grd liegt nahe an derjenigen von multilamellarem Dipalmitoyl Phosphatidyl-cholin ($\Delta T = 0.07$ grd, Albon & Sturtevant, 1978). Zum dritten ist das C_p -Profil bei hohen Konzentrationen schlechter aufgelöst. Das Auftreten eines scharfen Peaks am unteren Ende der Hauptumwandlung ist nicht mehr offensichtlich. Wenn man annimmt, daß die Folge von Umwandlungen bei allen Lipidkonzentrationen gleich ist, dann liegt es nahe anzunehmen, daß der erste, sehr kooperative Peak die Schmelzumwandlung einleitet, die konzentrationsabhängig ist. Das obere Ende der Hauptumwandlung sehr

konzentrationsabhängig und variiert von 24° bis 28°C. Nimmt man alle C_p -Daten unter der zusätzlichen Hypothese zusammen, daß man sich bei allen Experimente im thermodynamische Gleichgewicht befindet, sollte man annehmen, daß der Lipidzustand bei hohen Temperaturen ein aggregierter (bzw. ausgedehnter) Zustand ist (dessen Entropie bei hohen Konzentrationen weniger stark zur freien Energie der Phase beiträgt und deshalb bei diesen Konzentrationen erst bei höheren Temperaturen auftritt). Wie jedoch weiter unten diskutiert wird, ist allem Anschein nach der intermediäre Lipidzustand innerhalb der Hauptumwandlung ausgedehnter. Wenn dies wahr ist, könnte die Konzentrationsabhängigkeit der oberen Grenze der Hauptumwandlung darauf hindeuten, daß die beiden Lipidzustände innerhalb und oberhalb der Hauptumwandlung sich durch unterschiedlich Grade der Hydratation auszeichnen, und daß die Hydratation des intermediären Zustandes nicht vollständig ist. Dies wird dadurch deutlich, daß die Zugabe von mehr wässrigem Puffer zu einer weiteren Veränderung der DSC-Scans führt. An dieser Stelle sollte jedoch angemerkt werden, daß sich diese Argumentation auf niedrige Ionenstärken beschränkt, und daß bei hohen Ionenstärken (z.B. 100mM NaCl) die Umwandlungen viel weniger komplex sind (Daten werden hier nicht gezeigt).

Die relative Viskosität von DMPG steigt bei 20 °C stark an und erreicht ein Maximum bei ca. 26 °C. Oberhalb von 26 °C sinkt die Viskosität abrupt auf einen Wert ab der nahe an demjenigen des Lösungsmittels liegt. Dies deutet darauf hin, daß die Region großer Viskosität ungefähr mit Erreichen des stark kooperativen Peaks der DSC-Experimente beginnt und qualitativ dem Verlauf der C_p -Kurve folgt. Der plötzlich Abfall der Lichtstreuung bei $T > 20$ °C ist hiermit in Einklang. Die Korrelation von Viskosität und Lichtstreuung im Temperaturbereich von 20 - 28 °C kann bei allen Konzentrationen mit bloßem Auge beobachtet werden. Der starke Anstieg der Viskosität, einhergehend mit einer Verringerung der Lichtstreuung bedeutet, daß die intermediäre Lipidphase (innerhalb der Hauptumwandlung) vermutlich eher in einer ausgedehnten Lipidstruktur besteht als in aggregierten Vesikeln (die mit der erhöhten Viskosität konsistent wäre). Es ist bemerkenswert, daß diese isotrope, hochviskose Phase auch bei den niedrigsten untersuchten Konzentrationen beobachtet werden kann. Vermutlich ist diese ausgedehnte Struktur analog den sogenannten kubischen Strukturen (wie sie z.B. im Überschuß von H₂O für Monoolein beobachtet werden) oder zu den L₃-Phasen die für verschiedene Detergenz-Wasser-Systeme postuliert werden (Strey et al., 1990). Strey et al. beschreiben die L₃-Phase als eine bikontinuierliche Doppelschicht-Phase mit sehr hohem Wassergehalt. Im Gegensatz zu kubischen Lipidphasen sieht man in den L₃-Phasen jedoch keine regelmäßige Fernordnung.

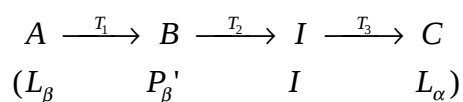
Zum Vertiefen dieses Punktes wurden unterhalb, inmitten und oberhalb der Hauptumwandlung elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Unterhalb der Hauptumwandlung (15 °C) besteht die Lipidphase aus mäßig ausgedehnten Partikeln, die mit scheibenförmigen Vesikeln von ca. 50 nm Durchmesser koexistieren (Abb. II-9a). Oberhalb der

Hauptumwandlung (35 °C) besteht das System aus verlängerten, ausgedehnten Partikeln mit Regionen von verbundenen kleinen Vesikeln (Abb. II-9c, d). Nur bei 24.5 °C wird das elektronen-mikroskopische Bild ausschließlich von einer ausgedehnten, vernetzten und homogenen Lipidphase ausgefüllt. Diese Bilder zeigen deutlich die Existenz einer ausgedehnten Phase bei niedrigen Lipidkonzentrationen. Andererseits scheinen die ausgedehnten Phasen nicht ausschließlich auf den isotropen Bereich sehr hoher Viskosität beschränkt zu sein.

In ^{31}P -NMR Messungen wurde deutlich, daß bei allen beschriebenen Temperaturen eine lamellare Lipidphase vorliegt, die die für die verschiedenen thermotropischen Zustände typische Anisotropie der chemischen Verschiebung aufweisen.

In der Gegenwart von Cytochrom c verändert sich das thermotrope Verhalten der Lipide. Das C_p -Profil hat nunmehr nur noch ein Maximum und verringert seine Enthalpie von 6 kcal/mol auf 1.7 kcal/mol Lipid unter sättigenden Bedingungen. Die Position der Hauptumwandlung verschiebt sich zu höheren Temperaturen und die Breite der Umwandlung nimmt zu (zu diesem Effekt siehe Kap.V). Die Bindung des Proteins hat einen interessanten Einfluß auf die Viskosität. Teilweise Sättigung des Lipids mit Protein (25 % - 50 %) brachte den temperaturabhängigen Anstieg der Viskosität zum Verschwinden. Bei 75 % - 100 %iger Sättigung beobachtet man wiederum einen temperaturabhängigen Viskositätsanstieg an der Umwandlung, der bei hohen Temperaturen oberhalb der Hauptumwandlung erhalten bleibt. Zusammen mit den elektronenmikroskopischen Bildern weist dies darauf hin, daß die Bindung des Proteins die Ausbildung einer ausgedehnten Lipidstruktur verhindert. Die Partikel in Gegenwart von Cytochrom c scheinen vesikulärer Struktur zu sein, wobei diese Vesikel einsetzend mit der Hauptumwandlung aggregieren und zu der erhöhten Viskosität der Lösung führen. Die ESR-Spektren bestätigen, daß auch die Lipid-Proteinkomplexe eine Schmelzumwandlung durchlaufen. Durch die NMR-Spektren ist jedoch nicht eindeutig zu klären, ob die Vesikel lamellarer Natur sind. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß zumindestens die gelförmigen Partikel lamellare Vesikel sind, die beim Schmelzen der Lipidketten eine Veränderung der Form erfahren.

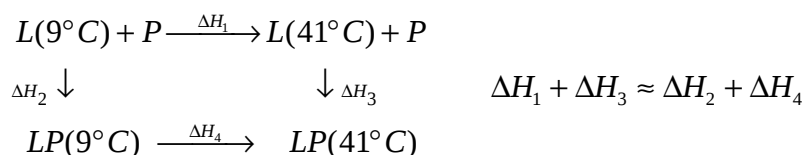
Man kann allem Anschein nach das Schmelzverhalten von DMPG in mindestens drei Schritte unterteilen:



Die Bindung von Proteinmolekülen verändert die thermodynamischen Gleichgewichte in diesem System, wobei die exakte Natur der Veränderung nicht klar ist. Die titrationskalorimetrischen Daten führen zu einem besseren Verständnis. Die Form der

Bindungsdaten zeigt bei allen Temperaturen, daß die Assoziation des Proteins mit dem Lipid zwar komplex ist, aber konsistent mit der Annahme einer an die Bindung gekoppelten strukturellen Umwandlung im Lipid ist. Alle kalorimetrischen Bindungskurven können mit Hilfe eines relativ einfachen statistisch thermodynamischen Modells erklärt werden, das von zwei verschiedenen Lipidzuständen mit geringfügig verschiedenen Bindungskonstanten für das Protein ausgeht (siehe Kap. II-3.2, vgl. hierzu auch das Modell für die Bindung peripherer Proteine in Kap. V). Die Analyse wurde für jede Temperatur getrennt durchgeführt, es wurde kein Versuch einer globalen Anpassung für alle Temperaturen gemacht. Trotzdem zeigt die Analyse bei allen Temperaturen zwei Dinge: Die Nettoenthalpie der Bindung ist positiv und die Bindung führt zu einer Umwandlung mit positiver Kooperativität. Einschränkend muß angemerkt werden, daß die Anpassungsparameter nicht unbedingt eindeutig sind und daß die Analyse des komplexen Verhaltens der Bindungsisothermen ausschließlich über die Annahme einer intrinsischen Bindungsenthalpie geschieht, die bei verschiedenen Temperaturen verschieden ist und hier nicht näher erklärt werden konnte. Es wäre Gegenstand weiterer Untersuchungen, wo die Temperaturabhängigkeit der intrinsischen Bindungsenthalpie herrührt. In allen Fällen muß kooperative Bindung angenommen werden, um die Bindungsisothermen qualitativ zu erklären. Das wird mit der Kopplung der Bindung des Proteins an das komplexe Verhalten des Lipids erklärt. Die Kooperativität spiegelt die Zahl von Lipidmolekülen wider, die mehr oder weniger in einer Alles-oder-Nichts Umwandlung beteiligt sind. Dies heißt, daß die Bindung nicht ausschließlich mit Prozessen innerhalb eines Bindungsplatzes erklärt werden kann sondern an globale Veränderungen der gesamten Lipidmatrix koppelt. Ähnliche Veränderungen sind von Ramsay et al., (1986) für die kalorimetrische Titration von Phosphatidylserin-Membranen mit "myelin basic protein" berichtet worden, und auch sie zogen den Schluß, daß eine kooperative Umwandlung im Lipid durch die Bindung des Proteins hervorgerufen wurde.

Die DSC-Daten und die titrationskalorimetrische Daten sind thermodynamisch selbstkonsistent. Das heißt, daß die Summe aus Titrationswärme bei tiefen Temperaturen plus der kalorimetrischen Umwandlungswärme der Lipid- Proteinkomplexe (im folgenden Diagramm LP genannt) im DSC identisch sind mit der Umwandlungswärme des Lipids alleine (L) plus der Titrationswärme bei hohen Temperaturen:



Dies muß gelten, da die Enthalpie eine Zustandsfunktion ist. Da sich die Bindungskonstante nur unwesentlich temperaturabhängig ist (d.h. die van't Hoff'sche Enthalpie der Bindung ist klein)

müssen die gemessenen Veränderungen der Enthalpie der Bindung ($\sim 50 - 70$ kcal/mol Protein) im wesentlichen mit strukturellen Veränderungen im Lipid zu tun haben. Auch wenn die detaillierte Erklärung der titrationskalorimetrischen Daten schwierig ist, ist doch deutlich, daß sie proteininduzierte Veränderungen der Lipidmatrix wiedergeben. Bei niedrigen Temperaturen ist ΔH_0 vermutlich mit der Vorumwandlung verknüpft, während es bei hohen Temperaturen vermutlich die Aggregation der Vesikel widerspiegelt, die mittels Elektronenmikroskopie beobachtet wurde. Im Temperaturbereich dazwischen ist die Interpretation nicht so einfach, auch wenn die Enthalpieveränderung mit dem Aufbrechen der viskosen und isotropen Lipidphase einhergeht.

Die in diesem Kapitel dargestellten Resultate zeigen, daß DMPG bei niedriger Ionenstärke im Temperaturbereich von $15 - 40$ °C eine komplexe Folge von strukturellen Umwandlungen durchläuft. Diese Umwandlungen beinhalten das Schmelzen der Lipidketten. Interessanterweise existiert eine Lipidphase mit Fernordnung innerhalb von klar umrissenen, kalorimetrisch bestimmbaren Grenzen. Dies ist vermutlich der erste Bericht über solche Phase in Phospholipiden, die auch bei sehr großen Verdünnungen noch Bestand haben. Es sollte jedoch angemerkt werden, daß Gershfeld et al. (1986) schon einmal vermutet haben, daß die hohe Viskosität des Lipids durch Fernordnung zustandekommt. Die exakte Natur dieser Phase muß durch weitere Untersuchungen noch bestimmt werden. Sie ist aller Voraussicht nach jedoch analog zu den L_3 -Phasen, die von Strey et al. (1990) für Detergentien-Wasser Systeme gefunden wurden. Diese Phasen gehören zu den bikontinuierlichen Doppelschichtphasen, zu denen auch die kubischen Lipidphasen zählen. Es wurde zudem gezeigt, daß die Bindung von Cytochrom c an DMPG auf eine Weise thermodynamisch mit den Lipidumwandlungen gekoppelt ist, daß selbst kleine Mengen gebundenen Lipids die Fernordnung zerstören.

Diese Resultate ergänzen frühere Studien der Bindung von Cytochrom c an Lipidmembranen, die gezeigt haben, daß Cytochrom c im lipidgebundenen Zustand zwei Konformationen annehmen kann, deren Gleichgewicht vom physikalischen Zustand der Membran abhängt. Ähnliche Verschiebungen von Konformationsgleichgewichten konnten durch Zugabe relativ kleiner Mengen Dioleoylglycerol und Dioleoyl-Phosphatidylcholin zu Dioleoyl-Phosphatidylglycerol induziert werden (Heimbürg et al., 1991). Es wurde in diesem Kapitel gezeigt, daß die Bindung von Cytochrom c langreichweitige Strukturen von DMPG zerstören kann und zur Ausbildung kleiner Vesikel führt, die im flüssig-kristallinen Zustand aggregieren. Immer wenn es eine thermodynamische Kopplung von Proteinbindung an strukturelle Umwandlungen des Lipides gibt, wird kooperative Bindung an das Lipid zu erwarten sein (vgl. auch Kap.V). Die Implikationen solch eines Phänomens sind interessant und könnten von biologischer Relevanz sein. In Lipidsystemen, in denen es zwei unterschiedliche Lipidspezies gibt (entweder verschiedenen Zustands oder chemisch verschieden), kann die Bindung des

Proteins die Lokalisierung derjenigen Lipidspezies begünstigen, die das Protein thermodynamisch bevorzugt (Heimburg & Biltonen, 1993; Kapitel V). Dies führt zu einer Aggregation von Proteinen auf der Lipidoberfläche, ohne daß Wechselwirkungen zwischen den Proteinen postuliert werden müssen. Diese Argumentation kann auch auf ungleiche Proteine ausgedehnt werden, wenn sie die gleiche Präferenz für eine der Lipidsorten oder -strukturen haben.

Die Ausbildung von Lipiddomänen wurde für biologische Membranen postuliert (z.B. Thompson et al., 1992). Die Aktivität von Phospholipase A₂ und von Protein Kinase C (PKC) kann auf kritische Weise von der Lipidzusammensetzung beeinflusst werden. Für den Fall der von Phospholipase A₂ katalysierten Hydrolyse von Lipidvesikeln ist der Beginn hoher Aktivität zeitlich mit der Phasenseparation der Reaktionsprodukte korreliert (Burack et al., 1993). Obwohl Bindung an Membranen notwendig für eine Aktivierung ist, können sowohl für Phospholipase A₂ (Burack, unveröffentlichte Daten, 1993) als auch für PKC (Orr & Newton, 1992) experimentelle Bedingungen geschaffen werden, bei denen die Proteine vollständig gebunden sind, aber trotzdem nur eine geringe Aktivität nachweisbar ist. Dies läßt vermuten, daß eine spezielle strukturelle Eigenschaft der Membran für die Aktivität notwendig ist. Es ist sowohl für Phospholipase A₂ als auch für PKC vorgeschlagen worden, daß diese Struktur der invers hexagonalen Phase (H_{II}) ähnelt (Dawson et al., 1984; De Boeck & Zidovetzki 1989, 1992; Epand & Lester, 1992) und daß Fluktuationen in dieser Struktur wichtig sind (Biltonen, 1990). Wenn dies richtig ist, dann ist die thermodynamische Kopplung zwischen Proteinbindung und Membranstruktur ein wichtiger Aspekt für die Funktion von Proteinen. Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente mit Cytochrom c sind dann ein prototypisches Beispiel für eine solche Kopplung.

II-6 LITERATUR

Albon, N., und Sturtevant, J.M. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 75 (1978), 2258

Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines

Bell, J.D. und Biltonen, R.L. J.Biol.Chem. 264 (1989), 225 - 230

Thermodynamics and kinetic studies of the interaction of vesicular dipalmitoylphosphatidylcholine with

Agkistrodon piscivorus piscivorus Phospholipase A₂

Biltonen, R.L. J.Chem.Thermodynamics 22 (1990), 1 - 19

- A statistical-thermodynamic view of cooperative structural changes in phospholipid bilayer membranes: their potential role in biological function
Burack, W.R., Yuan, Q., und Biltonen, R.L. Biochemistry 32 (1993), 583 - 589
Role of lateral phase separation in the modulation of phospholipase A₂ activity
- Comfurius, P., und Zwaal, R.F.A. B.B.A. 488 (1977), 36 - 42
The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography
- Dawson, R.M.C., Irvine, R.F., Bray, J., und Quinn, P. Biochem.Biophys.Res.Comm. 125 (1984), 836 - 842
Long-chain unsaturated diacylglycerols cause a perturbation in the structure of phospholipid bilayers rendering them susceptible to phospholipase attack
- De Boeck, H., und Zidovetzki, R. Biochemistry 28 (1989), 7439 - 7466
Effects of diacylglycerols on the structure of phosphatidylcholine bilayers: A ²H and ³¹P NMR study
- de Boeck, H., und Zidovetzki, R. Biochemistry 31 (1992), 623 - 630
Interactions of saturated diacylglycerols with phosphatidylcholine bilayers: A ²H-NMR study
- de Kruijff, B., und Cullis, P.R. B.B.A.602 (1980), 477 - 490
Cytochrome c specifically induces non bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes
- Epand, R.M., und Lester, D.S. TIPS 11 (1990), 317 - 320
The role of membrane biophysical properties in the regulation of protein kinase c activity
- Gershfeld, N.L. B.B.A. 988 (1989), 335 - 350
The critical unilamellar lipid state: a perspective for membrane bilayer assembly
- Gershfeld, N.L., Stevens, W.F. und Nossal, R.J. Faraday Discussions of the Chemical Society 81 (1986), 19 - 28
Equilibrium studies of phospholipid bilayer assembly
- Görrissen, H., und Marsh, D. Biochemistry 25 (1986), 2904 - 2910
Apocytochrome c binding to negatively charged lipid dispersions studied by spin-label electron spin resonance
- Heimburg, T., und Biltonen, R.L. 11th International Biophysics Congress, Budapest, Hungary C5.25
Two-state model of the thermotropic phase transition of lipids interacting with proteins
- Heimburg, T., Hildebrandt, P. und Marsh, D. Biochemistry 30 (1991), 9084 - 9089
Cytochrome c-lipid interactions studied by resonance Raman and ³¹P-NMR spectroscopy. Correlation between the conformational changes of the protein and the lipid bilayer
- Hildebrandt, P., Heimburg, T. und Marsh, D. European Biophysics Journal 18 (1990), 193 - 201
Quantitative conformational analysis of cytochrome c bound to phospholipid vesicles studied by resonance Raman spectroscopy
- Hildebrandt, P. und Stockburger, M. Biochemistry 28 (1989), 6710 - 6721
Cytochrome c at charged interfaces. 1. Conformational and redox equilibria at the electrode/electrolyte

- interface probed by surface enhanced resonance Raman spectroscopy
Hildebrandt, P. und Stockburger, M. Biochemistry 28 (1989), 6722 - 6728
Cytochrome C at charged interfaces. 2. Complexes with negatively charged macromolecular systems studied by resonance Raman spectroscopy
Jain, M.K., und Berg, O.G. B.B.A. 102 (1989), 127 - 156
The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting
Lentz, B.R., Freire, E. und Biltonen, R.L. Biochemistry 17 (1978), 4475 - 4480
Fluorescence and calorimetric studies of phase transitions in phosphatidylcholine multilayers: Kinetics of the pretransition
Lindblom, G. und Rilfors, L. B.B.A. 988 (1989), 221 - 256
Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids - possible biological relevance
Mariani, P., Luzzati, V. und Delacroix, H. J.Mol.Biol. 204 (1988), 165 - 189
Cubic phases of lipid- containing systems - structure analysis and biological implication
Marsh, D., und Watts, A. Spin-labeling and lipid-protein interactions in membranes. In: Lipid-Protein Interactions. Vol.2.P.C.Jost und O.H.Griffith, Ed., Wiley- Interscience, New York 1982, S. 53 - 126
Monod, J., Wyman, J., und Changeux, J-P. J.Mol.Biol. 12 (1965), 88 - 118
On the nature of allosteric transitions: A plausible model
Nishizuka, Y. Nature 308 (1984), 693 - 698
The role of protein kinase c in cell surface signal transduction and tumor promotion
Nishizuka, Y. Science 233 (1986), 305 - 312
Studies and perspectives of protein kinase c
Orr, J.W. und Newton, A. Biochemistry 31 (1992), 4661 - 4667
Interaction of protein kinase c with phosphatidylserine 1. cooperativity in lipid binding
Ramsay, G., Prabhu, R. und Freire, E. Biochemistry 25 (1986), 2265 - 2270
Direct measurement of the energetics of association between myelin basic protein and phosphatidylserine vesicles
Seddon, J.M., Cevc, G., Kaye, R.D. und Marsh, D. Biochemistry 23 (1984), 2634 - 2644
X-ray diffraction study of the polymorphism of hydrated diacyl- and dialkylphosphatidylethanolamines
Smith, I.C.P. und Ekiel, I.H. Phosphorus-31 NMR of phospholipids in membranes, in: Phosphorus-31 NMR - Principles and applications, Academic Press, 1984
Strey, R., Jahn, W., Porte, G., und Bassera, G. Langmuir 6 (1990), 1635 - 1639
Freeze fracture electron microscopy of dilute lamellar and anomalous isotropics (L3) phase
Suurkuusk, Y., Lentz, B., Barenholtz, Y., Biltonen, R.L., und Thompson, T.E. Biochemistry 15 (1976), 1343
A calorimetry and fluorescent probe study of the gel-liquid crystalline phase transition in small, single-lamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles
Thompson, T.E., Sankaram, M.B. und Biltonen, R.L.

Comments in Molecular and Cell Biophysics (1992)

Biological membrane domains: Functional significance

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. und Lin, L.N.

Analytical Biochemistry 179 (1989), 131 - 137

Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter

Wyman, J., und Gill, S.J. Binding and linkage, University Science Books, Mill Valley, Ca., 1990

Kapitel III

Kooperativität von Proteinumwandlungen in Lipid-Proteinkomplexen

UNTERSUCHUNG DER SEKUNDÄR- UND TERTIÄR-STRUKTUR VON CYTOCHROM C IN KOMPLEXEN MIT ANIONISCHEN LIPIDMEMBRANEN¹

Im folgenden Kapitel soll der Einfluß der Bindung des peripheren Proteins Cytochrom c an anionische Lipidmembranen auf die Proteinstruktur untersucht werden. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf einer möglichen Kopplung der thermotropen Phasenumwandlung an Struktur und Funktion des Proteins. Dieses Kapitel ist komplementär zum ersten Kapitel, das die Auswirkung der Proteinbindung auf die Struktur der Lipidmembran zum Thema hatte.

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in :
T.Heimburg & D.Marsh. 1993. Investigation of the secondary and tertiary structure of cytochrome c using amid hydrogen exchange measurements. Biophys.J.65: 2408 - 2417

III-1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Struktur von Cytochrom c in Komplexen mit Lipidmembranen aus Dimyristoyl-, Dipalmitoyl- und Dioleoyl-Phosphatidylglycerol (DMPG, DPPG und DOPG) oder Cardiolipin wurde mit Hilfe von "Fourier transform"-Infrarot-Spektroskopie (FTIR), insbesondere durch Analyse der Amid-I-Bande, untersucht. Nur kleine Veränderungen der Sekundärstruktur wurden im Temperaturbereich unterhalb der Denaturierungstemperatur des Proteins gefunden, die nicht an die Phasenumwandlung der Lipide gekoppelt waren. Die Denaturierungstemperatur von Cytochrom c wurde durch die Bindung an Lipidmembranen um ungefähr 25-30 °C reduziert. Dabei bestand eine Korrelation mit der Phasenumwandlungstemperatur insofern, als daß die Denaturierungstemperatur des Proteins in Komplexen mit Lipiden mit niedrigerer Umwandlungstemperatur auch bei tieferen Temperaturen lag, z.B. in Komplexen mit DOPG um 7 °C niedriger als in Komplexen mit DPPG.

Die Bindung von Cytochrom c an Lipidmembranen führte hingegen zu großen Veränderungen der Amidprotonen-Austauschrate, die durch spektrale Verschiebungen der Amid I -Bande in Gegenwart von D₂O nachgewiesen wurde. Im ungebundenen Protein war die Austauschrate der langsam austauschenden Amidprotonen nahezu unabhängig von der Temperatur, während sie im gebundenen Protein im Temperaturbereich von 10 - 40 °C um bis zu zwei Größenordnungen anstieg. Zudem war die Zahl der ausgetauschten Amidprotonen im ungebundenen Protein kleiner als im gebundenen Protein. Eine strukturelle Umwandlung im gebundenen Protein wurde durch eine Diskontinuität im Arrhenius-Plot der Austauschraten nachgewiesen. Sie trat abhängig vom Lipid im Bereich zwischen 22 und 29 °C auf, weit unterhalb der Denaturierungstemperatur. Diese Temperatur wurde durch den physikalischen Zustand der Lipidmembran bestimmt, wobei sie für Lipide im flüssig kristallinen Zustand ungefähr 7 °C niedriger als für Lipide im gelförmigen Zustand. Für Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol, das in diesem Temperaturbereich seine Schmelztemperatur hat, koppelte die Proteinumwandlung an die Lipidumwandlung im Bereich von 27-28 °C. Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis auf eine Kopplung zwischen Tertiärstruktur des membrangebundenen Proteins und physikalischem Zustand der Lipidmembran.

III-2 EINLEITUNG

Viele periphere Proteine und Enzyme interagieren mit Lipidmembranen. Ihre Aktivität kann dabei von den physikalischen Eigenschaften der Membranen abhängen, wie dies zum Beispiel für verschiedene Formen von Phospholipase A₂ nachgewiesen wurde (Bell & Biltonen, 1989). Es ist deshalb von beträchtlichem Interesse, die Kopplung zwischen den physikalischen Zuständen in Lipiden und Proteinen zu untersuchen. In diesem Kapitel wird dies für die Wechselwirkung zwischen Cytochrom c und verschiedenen anionischen Lipiden getan. Um durch Bindung an Membranen hervorgerufene strukturelle Änderungen in Cytochrom c untersuchen zu können, wurden die Sekundärstruktur und die Proton-Deuterium-Austauschraten des Proteins aus den FTIR-Spektren der Lipid-Proteinkomplexe bestimmt.

Von Lipiden abhängige strukturelle Veränderungen in membrangebundenem Cytochrom c sind schon in einer früheren Arbeit mit Hilfe von Resonanz-Raman Messungen nachgewiesen worden (Heimburg et al., 1991). Die Veränderungen in den Resonanz-Raman Spektren konnten mit Unterschieden in Spinzustand und Redox-Potential von Cytochrom C korreliert werden (Hildebrandt & Stockburger, 1989a,b) und haben deshalb vermutlich funktionale Bedeutung. Diese Messungen waren jedoch aufgrund der gewählten Meßtechnik auf die Untersuchung der Häm-Gruppe (ein in das Protein eingebettetes eisenhaltiges Chromophors) beschränkt und konnten keine direkte Information über die konformationellen Änderungen des Proteins geben, die für die Veränderung der Resonanz-Raman-Spektren des Häms verantwortlich sein könnten.

FTIR-Untersuchungen von Lipid-gebundenem Cytochrom c sind kürzlich von Muga et al. (1991) durchgeführt worden. In dieser Arbeit wurde geschlossen, daß die Sekundärstruktur von Cytochrom c bei der Bindung an Lipidmembranen im wesentlichen unverändert bleibt, obwohl man eine Destabilisierung des gebundenen Proteins an Hand einer großen Verringerung der Denaturierungstemperatur und einer erhöhten Amid-Protonen Austauschrate in D₂O nachweisen konnte. Gleichmaßen haben Festkörper-²H-NMR Messungen von an Cardiolipin gebundenem Cytochrom c (Spooner & Watts, 1991) und hochauflösenden ¹H-NMR Untersuchungen von an Detergenzien-Mizellen gebundenem Cytochrom c erwiesen, daß die Proton-Deuteriumaustauschraten des gebundenen Proteins beträchtlich schneller sind als diejenigen des ungebundenen Proteins. Diese und andere Ergebnisse wurden entweder als reversible Entfaltung (bzw. Denaturierung) oder als Existenz einer dynamischen, gefalteten Struktur des Proteins in der Lipid-Wasser Grenzschicht interpretiert.

In diesem Kapitel wird die Kinetik des Proton-Deuteriumaustausches genauer untersucht. Es wird gezeigt, daß das Verhalten der langsam austauschenden Amid-Protonen in Cytochrom c verschieden ist, abhängig davon, ob es an negativ geladene Lipid-Doppelschichten gebundenen ist oder sich frei in Lösung befindet. Dies wird durch Veränderungen der Sekundärstruktur des

Proteins erklärt, hervorgerufen durch die Bindung. Desweiteren findet man eine strukturelle Umwandlung im Arrhenius-Plot der Austauschkinetik. Die Temperatur dieser Umwandlung liegt im Bereich von 22 - 29 °C, und hängt vom physikalischen Zustand der Membran (flüssig-kristallin oder gelförmig) ab. Für an Dimyristoyl Phosphatidylglycerol gebundenes Protein ist diese Umwandlung durch die Lipid-Phasenumwandlung kontrolliert, die beim Lipid-Proteinkomplex im Bereich von 27 - 28 °C liegt. Diese Resultate zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Zustand des Proteins und der Lipidmembran, an die es bindet.

III-3 MATERIALIEN UND METHODEN

III-3.1 Materialien

Cytochrom c aus Pferdeherz (Typ VI, Sigma, St.Louis, MO) wurde in der oxidierten Form und ohne weitere Reinigung benutzt. Der Anteil der deamidierten Form, der in kommerziellem Cytochrom c enthalten ist (Brautigan et al., 1978) beeinflusst die Bindung des Proteins an negativ geladene Membranen nicht nennenswert, da er als konstanter Faktor im Experiment verbleibt und deshalb die Differenz-Spektren der Amid I Bande nicht stört. Dimyristoyl Phosphatidylglycerol (DMPG), und Dioleoyl Phosphatidylglycerol (DOPG) wurden von Avanti (Birmingham, AL.) , Rinderherz-Cardiolipin (BHCL) und Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) wurden von Sigma (St.Louis, MO) bezogen. Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerol (DPPG) wurde aus DPPC gemäß der Vorschrift von Comfurius & Zwaal (1977) synthetisiert. Anionische Lipide wurde jeweils als Natrium-Salze verwendet. D₂O kam von Merck (Darmstadt).

III-3.2 Probenzubereitung

Zu 50 mM Lipid-Dispersionen (bei DMPG,DOPG und DPPG) bzw. zu 25 mM Cardiolipin-Dispersionen (da BHCL in Dispersionen zwei Ladungen trägt) wurde Cytochrom c in trockener Form hinzugegeben. Die Lipiddispersionen befanden sich in einem D₂O-Puffer (2 mM Hepes, 1 mM EDTA, pD 7.5). Das Lipid-Protein-verhältniss (10:1) wurde so gewählt, daß die Membran vollständig mit Protein gesättigt war (Waltham et al.,1986; Heimbürg, 1989). Während des Mischens von Protein und Lipid-Dispersionen stieg der pD auf ungefähr 9.2 an. Für die zeitabhängige Messungen wurde der pD nicht weiter korrigiert. Für temperaturabhängige Messungen wurde der pD mit Hilfe einer Standardelektrode auf 9.0 eingestellt. Es wurde nur eine geringe Pufferkonzentration verwendet, um die Salzkonzentration

so niedrig wie möglich zu halten (da die Ionenstärke die Bindung beeinflusst, vgl. Kap.IV). Bei Experimenten mit ungesättigten Lipiden (DOPG und BHCL) wurden die Proben entweder unter Stickstoff oder Argon zubereitet, um eine Oxidation der Lipidketten zu verhindern.

III-3.3 "Fourier-Transform"-Infrarot (FTIR) Spektroskopie

FTIR-Spektren wurden auf einem Bruker IFS25-Spektrometer unter Verwendung einer CaF_2 -Meßzelle und einem 50 μm Teflon-Spacer im Bereich von 400 - 4000 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} aufgezeichnet. Vor der Fourier-Transformation wurden die Interferogramme mit einer Dreiecksfunktion apodisiert. Bei zeitunabhängigen Experimenten wurde das Spektrometer mindestens 30 Minuten lang mit Stickstoff gespült, um spektrale Artefakte durch die Rotations-Spektren des Wasserdampfes so gering wie möglich zu halten. Es wurden jeweils 100 Interferogramme pro Spektrum aufgenommen. Bei zeitabhängigen Messungen wurde aus Zeitgründen auf das Spülen des Spektrometers verzichtet, da die Probenzubereitung und damit die Einleitung des Protonen-Austausches außerhalb des Spektrometers stattfand. Dies führte zu geringfügigen Störungen durch das Rotationsspektrum von H_2O -Dampf in den ersten Minuten der Spektrenaufnahme. Pro Experiment wurden zehn Interferogramme aufgezeichnet und die Experimente wurden so schnell wie möglich hintereinander ausgeführt. Die Temperatur wurde auf 0.1 $^\circ\text{C}$ genau durch zirkulierendes Wasser durch die Metall-Halterung des CaF_2 -Fensters hindurch reguliert. Für zeitunabhängige Messungen wurden entweder 5 mM Cytochrom c Lösungen oder Cytochrom-c- Komplexe mit Lipiden für mehrere Tage bei Raumtemperatur und anschließend eine Stunde bei 40 $^\circ\text{C}$ in D_2O -Puffer inkubiert, um den Protonenaustausch zu maximieren (vgl. Deuterierungsexperimente weiter unten) und um Reversibilität der Experimente im Temperaturbereich zwischen 4 $^\circ$ und 40 $^\circ\text{C}$ zu gewährleisten. Für zeitabhängige Messungen wurden Lipid-Dispersionen zu trockenem Protein hinzugegeben, ungefähr 10 Sekunden geschüttelt und dann in die vorgeheizte CaF_2 -Zelle injiziert. Der Zeit-Nullpunkt wurde als Zeitpunkt der Zugabe der Lipid-Dispersion zum Protein angenommen.

Fourier-Transformations-Selbstdekonvolution (Bandenverschmalerung) wurde mit Hilfe von Software durchgeführt, die teilweise auf Routinen von der Gruppe von H.H.Mantsch in Ottawa/Canada (Kauppinen et al., 1981) beruhte. Banden-verschmalerung von ungeglätteten Spektren wurde unter Verwendung einer Dreiecks-Apodisationsfunktion unter Annahme von Lorentzischen Linien einer Breite von 17 cm^{-1} und einem Linienverschmalerungsfaktor von $K = 2$ durchgeführt. Die spektralen Komponenten des Spektrums wurden mit Gauss-förmigen Linien an die bandenverschmalerten Spektren im Wellenzahlenbereich von 1605 - 1693 cm^{-1}

durchgeführt (Byler & Susi, 1986). Als einschränkende Randbedingung für die Anpassungen wurde vorausgesetzt, daß alle Bänder vergleichbare Breite haben sollen (ansonsten ist die Dekonvolutionprozedur inkonsistent). Dies bedeutet, daß Strukturen im Protein klar definiert sind. Die Bandenform wurde in drei Schritten angepaßt, indem zuerst die Linienbreite konstant gehalten wurde. Mit den resultierenden Bandenfrequenzen wurde die Anpassung unter Variation der Linienbreiten wiederholt. Abschließend wurden sowohl Bandenlage als auch Linienbreite frei variiert. Differenzspektren wurden aus normalisierten Spektren errechnet, deren integrierten Fläche auf 100 cm^{-1} normalisiert wurde. Die Normalisierung wurde durch Festlegen einer geraden Basislinie zwischen den äußeren Punkten des definierten spektralen Bereiches durchgeführt. Aus den Differenzspektren wurde ein Parameter deduziert, der Fläche des positiven Bereiches über der Basislinie des Differenzspektrums wiedergibt. Die Gesamtfläche eines Differenzspektrum von normalisierten Spektren ist definitionsgemäß gleich Null. Die Spektren wurden als Absorptionsspektren abgebildet, deren Ordinate die sich aus der Normalisierung des Spektrums auf 100cm^{-1} Fläche ergab.

III-4 ERGEBNISSE

III-4.1 FTIR-Spektren von Cytochrom c Komplexen mit anionischen Lipiden

Die dekonvoluierten FTIR-Spektren von Cytochrom c in Lösung bzw. in Komplexen mit DMPG bei 20 °C werden in Abb. III-1 miteinander verglichen (oben und Mitte). Man kann kleine, aber reproduzierbare Unterschiede in den Spektren beobachten, die auf eine leichte Veränderung der Sekundärstruktur hindeuten. Die durch Bindung hervorgerufene Veränderung in den Spektren entsprechen quantitativ ungefähr 2 % der Gesamtfläche des Spektrums (das ergibt sich aus der Fläche des Differenzspektrums oberhalb der Basislinie, Abb. III-1 unten). Im bandenverschmalerten Spektrum kann man fünf Komponenten erkennen. Die Beschränkung auf Komponenten ungefähr gleicher Breite macht jedoch eine Anpassung der Amid-I Bande durch sieben Linien notwendig. Von den zwei zusätzlichen Banden ist diejenige bei 1660 cm^{-1} notwendig um die Bandenform des Proteins in Lösung anzupassen. Die Notwendigkeit für diese Bande erkennt man in einer Schulter bei dieser Wellenzahl (Abb. III-1 Mitte). Die beiden Banden bei 1671 cm^{-1} und 1675 cm^{-1} könnten jedoch durch eine einzige, breitere, Bande ersetzt werden. Die Bandenanpassung der linienverschmalerten Spektren (siehe Tabelle III-1) zeigt, daß die Sekundärstruktur des Proteins bei der Bindung im wesentlichen erhalten bleibt. Der wesentliche Unterschied ist eine leichte Abnahme des α -helikalen Anteils um ca. 7.5

Sekundär- struktur- element	Cyt. c in Lösung		Cyt. c / DMPG	
	Position [cm-1]	Fläche [%]	Position [cm-1]	Fläche [%]
_ -Helix	1651.2	36.1	1650.7	33.5
___/ext.chain	1615.3	1.6	1614.8	1.4
"	1630.1	14.6	1629.5	14.1
"	1640.5	19.9	1640.2	21.0
"	1670.9	6.2	1670.8	5.0
"	1676.2	6.3	1674.3	8.9
_ -turn	1660.2	15.3	1659.5	16.0

Tabelle III-1

Parameter für die Bandenanpassungen der FTIR-Spektren von Cytochrom c in Lösung und in Komplexen mit DMPG aus Abb. III-1 bei 20 °C

Der α -Helix-Anteil von 36 % beim gelösten Protein stimmt mit "Circular Dicroism"-Messungen (Provencher & Glockner, 1981) und der Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Proteins (Takano & Dickerson, 1981; Dickerson et al., 1971) überein. Die Temperaturabhängigkeit der Amid I Region der dekonvoluierten FTIR- Spektren von Cytochrom c und die dazugehörigen Differenzspektren, die man durch Subtraktion des bei 4 °C aufgenommenen Spektrums erhält, werden in Abb. III-2 gezeigt. Mit ansteigender Temperatur wachsen die Differenzspektren in ihrer Amplitude aber ihre Form bleibt im wesentlichen erhalten, bis das Protein bei ca. 50 °C denaturiert.

Wenn man die positiven Flächen über der Basislinie der Differenzspektren in Abb. III-2 für Komplexe von Cytochrom c mit DMPG, DPPG, DOPG und BHCL und für Cytochrom c in Lösung als eine Funktion der Temperatur aufträgt, findet man in allen Fällen einen ungefähr linearen Anstieg, gefolgt von einer scharfen Diskontinuität an der Denaturierungstemperatur. Sie beträgt für die verschiedenen Lipid-Proteinkomplexe: 49, 51, 54 und 55.5 °C für DOPG, BHCL, DMPG und DPPG. Obwohl die Denaturierung von Cytochrom c bei erheblich höheren Temperaturen erfolgt als die Kettenschmelze der Lipide im Komplex und obwohl die Abstände zwischen den Umwandlungs-temperaturen des Proteins kleiner sind als die des Lipids, an das sie binden, so erscheinen sie doch in derselben systematischen Reihenfolge wie die thermotropen Schmelzpunkte der Lipide.

Wie schon Muga et al. (1991a) für Cyto-chrom-c-Komplexe mit DMPG und DOPG gefunden hatten, wird die Denaturierungs-temperatur von Cytochrom c in Komplexen mit den Lipiden DMPG und DOPG im Ver-gleich zum nativen Protein stark reduziert.

Die temperaturabhängigen Veränderungen in den Differenzspektren der Amid I-Bande unterhalb der Denaturierungstemperatur (Abb. III-2) werden im wesentlichen durch kleine Verschiebungen der individuellen Bänder zu höheren Wellenzahlen hin bestimmt, die von leichten Veränderungen der mittleren Länge der Wasserstoffbrückenbindungen herrühren (Tonge & Carey, 1992). Diese Veränderungen geschehen gleichermaßen im ungebundenen und im gebundenen Protein, da die Differenzspektren zwischen gebundenem und ungebundenem Protein im wesentlichen temperaturunabhängig sind (Daten hier nicht abgebildet). Während der Denaturierung erscheinen zusätzliche Banden im FTIR-Spektrum bei 1616 und 1685 cm^{-1} in den äußeren Bereichen der Amid-I-Region. Das Verhältnis der Flächen dieser beiden Banden bleibt während der Denaturierung unverändert, was andeutet, daß beide Banden von derselben strukturellen Veränderung im Protein herrühren. Muga et al. (1991a) mutmaßten, daß diese zusätzlichen Banden von intermolekularen, "aus-gedehnten" Faltblattstrukturen ("extended chain") herrühren, die sich durch Aggregation der Proteine bilden (vgl. Kap. IV). Sie könnten jedoch auch von Rändern von Betastrukturen herrühren, die keine Wasserstoffbrücken ausbilden können, wie z.B. bei Concanavalin A (vgl. Byler & Susi, 1986). Man findet diese Bänder auch in den FTIR-Spektren von ApoCytochrom c als Reaktion auf die Bindung an anionische Lipide (Muga et al., 1991b).

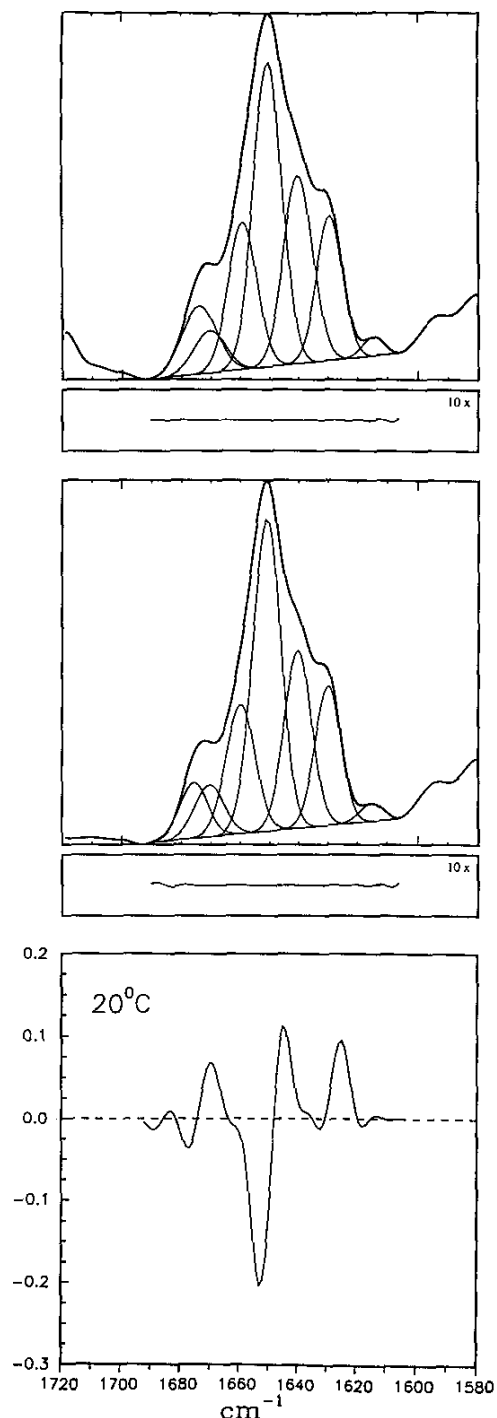


Abb. III-1

Bandenverschmalerte FTIR-Spektren der Amid- I Region von Cytochrom c gebunden an DMPG (oben), gelöstem Cytochrom c (Mitte). Die Banden wurden mit Gauss-Kurven angepaßt (Parameter siehe Tabelle III-1). Das Differenzspektrum der auf 100 cm^{-1} normierten Spektren (oben und Mitte) ist im unteren Kasten abgebildet.

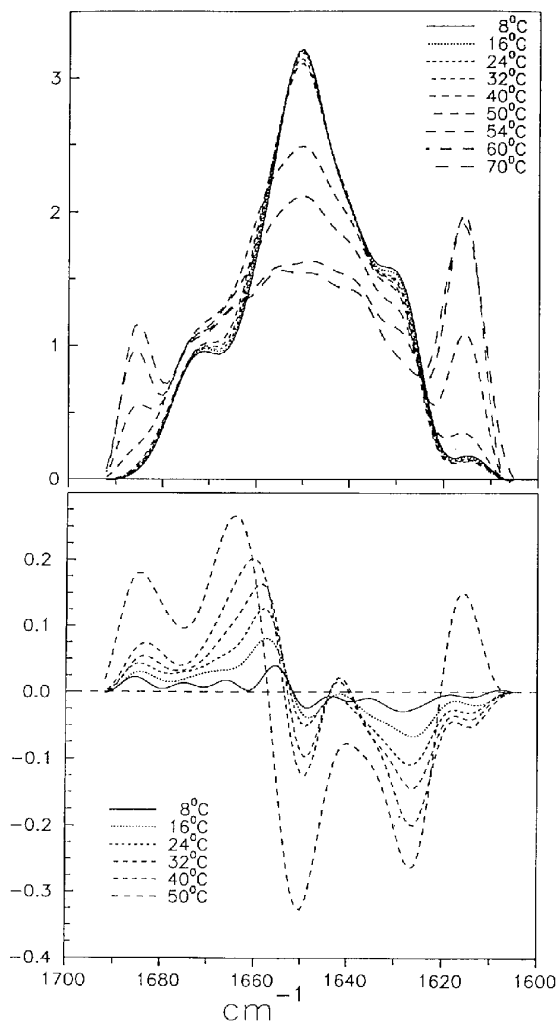


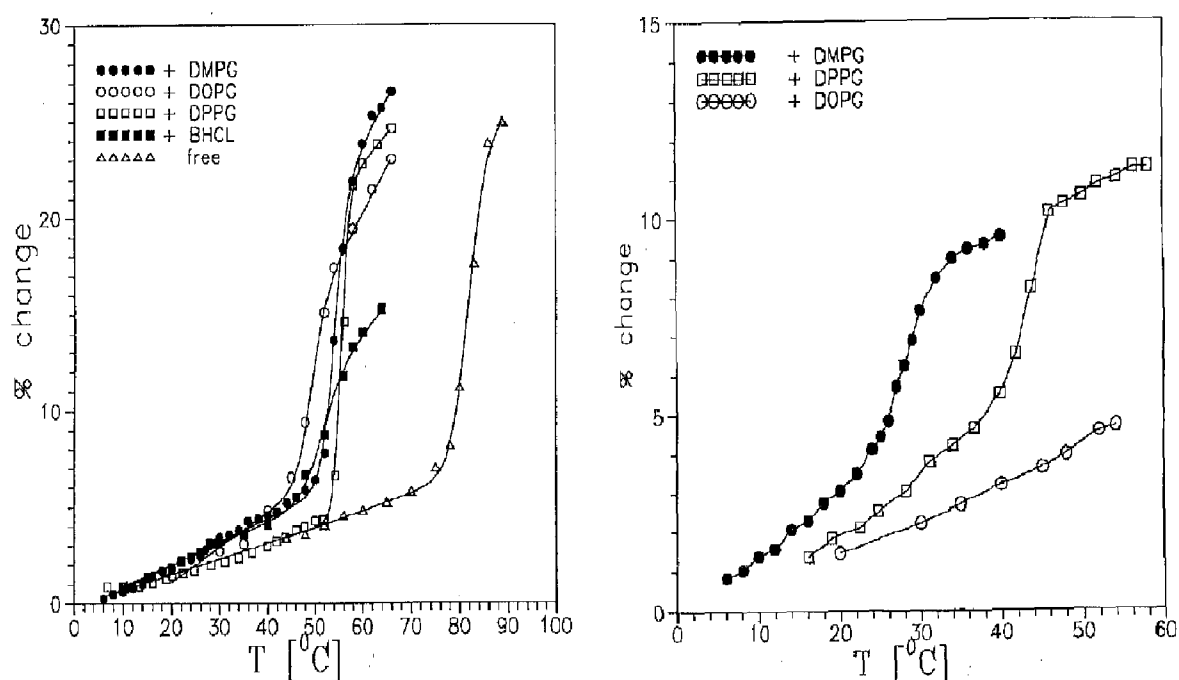
Abb. III-2

Oben: Bandenverschmalerte FTIR-Spektren der Amid I-Region von Cytochrom c/DMPG-Komplexen bei den angegebenen Temperaturen. Die Bandenfläche wurde auf $100 \cdot \text{cm}^{-1}$ normiert.

Unten: Differenzspektren, erzeugt durch Subtraktion des normierten Spektrums bei 4°C von den Spektren oben.

Die thermotrope Kettenschmelzumwandlung von Lipiden in Lipid-Cytochrom c Komplexen wurde mittels der Carbonylbande ($1710 - 1760 \text{ cm}^{-1}$) der Lipidesterbindungen untersucht. Man erhält identische Resultate wenn man die Verschiebung der C-H-Streckschwingungen der Lipidketten ($2750 - 3050 \text{ cm}^{-1}$) untersucht. In Abb. III-4 sieht man die Temperaturabhängigkeit der Differenzspektrenfläche der Carbonylbande (mit Referenzspektrum bei 4°C) für drei verschiedene Lipidkomplexe (DOPG, DMPG und DPPG mit Cytochrom c). Die Temperaturabhängigkeit in Abb. III-4 kann durch eine Umwandlung zwischen zwei Zuständen beschrieben werden, wenn man ein lineares Verhalten der Kurven unterhalb und oberhalb der Hauptschmelzumwandlung annimmt. Als Schmelztemperaturen erhält man 28°C für den Proteinkomplex mit DMPG und 44°C für den Proteinkomplex mit DPPG mit effektiven van't Hoff'schen Enthalpien von ca. 100 kcal/mol und 180 kcal/mol . Diese Umwandlungstemperaturen sind beträchtlich höher und weniger kooperativ als die Umwandlungen der Lipide ohne

gebundenes Protein (Watts et al., 1978). Bei DOPG und BHCL beobachtet man keine Umwandlungen, da man sie bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser erwartet.

**Abb. III-3**

Temperaturabhängigkeit der Fläche über der Basislinie der FTIR-Differenzspektren der Amid I-Banden von Cytochrom c in Lösung (Δ), und in Komplexen mit DMPG($\bullet$), DOPG($\circ$), DPPG($\square$) und BHCL($\blacksquare$). Die Differenzspektren wurden durch Subtraktion eines bandenverschmalerten, auf eine Fläche von 100 cm^{-1} normierten, Referenzspektrums berechnet.

Abb. III-4

Temperaturabhängigkeit der Fläche über der Basislinie der FTIR-Differenzspektren der Lipid-Carbonylbanden von Komplexen von Cytochrom c mit DMPG($\bullet$), DOPG($\circ$), und DPPG($\square$). Die Differenzspektren wurden durch Subtraktion eines bandenverschmalerten, auf eine Fläche von 100 cm^{-1} normierten Referenzspektrums berechnet.

III-4.2 Austausch von Amidprotonen gegen Deuteronen in Cytochrom-c-Lipid-Komplexen :

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluß der Bindung von Cytochrom c an anionische Lipide auf Protonen-Deuteriumaustauschraten untersucht, um Einblicke in mögliche Veränderungen der tertiären Struktur des Proteins zu erhalten. Man muß annehmen, daß unterschiedliche tertiäre Faltungen eines Proteins nach Zugabe von D_2O zu unterschiedlichen Austauschraten der Amidprotonen gegen Deuteronen führt. Um den Effekt dieses Austausches (in der Gegenwart von D_2O) in den FTIR-Spektren zu verdeutlichen, wird in Abb. III-5 das vollständig protonierte Protein (trockener Film) mit Cytochrom c verglichen, das für verschiedene Zeiten in D_2O inkubiert wurde. Wie aus den qualitativ verschiedenen Verläufen der Spektren ersichtlich ist, sind die Proteine auch nach längeren Zeiten nicht vollständig deuteriert. Die Deuterierungsraten können durch Analyse der Bandenverschiebung sowohl der Amid-I-Bande

(1600 - 1700 cm^{-1}) als auch der Amid-II-Bande (mit Zentrum um 1550 cm^{-1} im protonierten und um 1450 cm^{-1} im deuterierten Zustand) bestimmt werden. Aus praktischen Gründen wurde hier die Amid-I-Bande untersucht, in der Veränderungen (die im wesentlichen aus dem Einfluß der Deuterierung auf die Wasserstoffbrücken herrührt) zwar schwächer sind als in der Amid-II-Bande, die aber freier von Artefakten ist, die durch Überlagerung von Banden aus der Bildung von einfach deuteriertem Wasser (HDO) sind, das beim Austausch und der leichten Adsorption von H_2O entsteht.

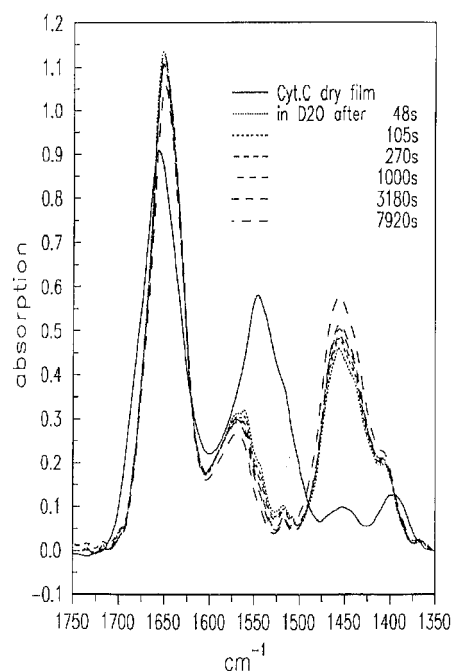
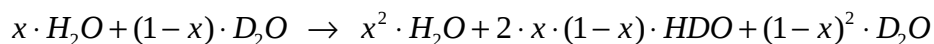


Abb. III-5

FTIR-Spektren der Amid-I- und Amid-II-Regionen von Cytochrom *c* im vollständig protonierten Zustand (trockener Film - durchgezogene Linie) und von Cytochrom *c* in D_2O nach unterschiedlichen Inkubationszeiten von 48 s bis 7920 s Sowohl Amid-I als auch Amid-II Bande verschieben sich zu tieferen Wellenzahlen hin.

Da in Wasser der Austausch von Protonen sehr schnell vor sich geht, entsteht bei der Mischung von H_2O mit D_2O einfach deuteriertes Wasser nach folgendem Schema:



Diese Gleichung macht klar, daß der Anteil x von adsorbiertem H_2O durch Austausch auf x^2 absinkt und daß die H_2O -Biegeschwingung, die bei ungefähr 1650 cm^{-1} ihr Maximum hat, nur einen vernachlässigbaren Beitrag zum Spektrum liefert, während die HDO Biegeschwingung bei ca. 1450 cm^{-1} (überlappend mit der deuterierten Amid II-Bande) eine bedeutende Störung darstellt. Der Anteil x aus Protonenaustausch mit den Proteinen liegt bei den verwendeten

Proteinkonzentrationen bei $\approx 2 - 5 \cdot 10^{-3}$. Zusätzlich kann die Amid-II-Bande bei sehr langen Messzeiten durch Eindringen von Wasserdampf aus der Luft gestört werden. Nichtsdestoweniger sind Analyse von Amid-I- und Amid-II-Bande bei kürzeren Meßzeiten konsistent miteinander. Die Analyse der Amid-I-Bande hat jedoch den zusätzlichen Vorteil (abgesehen von der Abwesenheit von Artefakten durch Wasseraufnahme), daß man den

Protonenaustausch der verschiedenen Komponenten der Sekundärstruktur der Proteine gleichzeitig beobachten kann.

Um den Protonenaustausch beobachten zu können, wurden Lipiddispersionen (50 mM bei DOPG, DMPG und DPPG, 25 mM bei BHCL (BHCL trägt 2 Ladungen)) mit trockenem Cytochrom c gemischt, resultierend in einer 5 mM Proteinkonzentration. Dieses Lipid-Proteinverhältnis entspricht der vollständigen Sättigung der Membran mit Proteinmolekülen. Die Proben wurden sofort in eine vorgeheizte Meßzelle injiziert und Spektren in wechselnden Abständen aufgenommen. Differenzspektren wurden aufgenommen, indem ein Referenzspektrum subtrahiert wurde, welches nach langen Inkubationszeiten aufgenommen wurde (nach ~ 6 Stunden), nach denen der Protonenaustausch nahezu abgeschlossen ist. Um Verfälschungen des Spektrum durch Wasserdampf herauszufiltern, wurde eine Fouriertransformationsglättung mit einem Glättungsfaktor von 0.3 durchgeführt (Kauppinen et al., 1981), ohne gleichzeitig die Banden zu verschmalern.

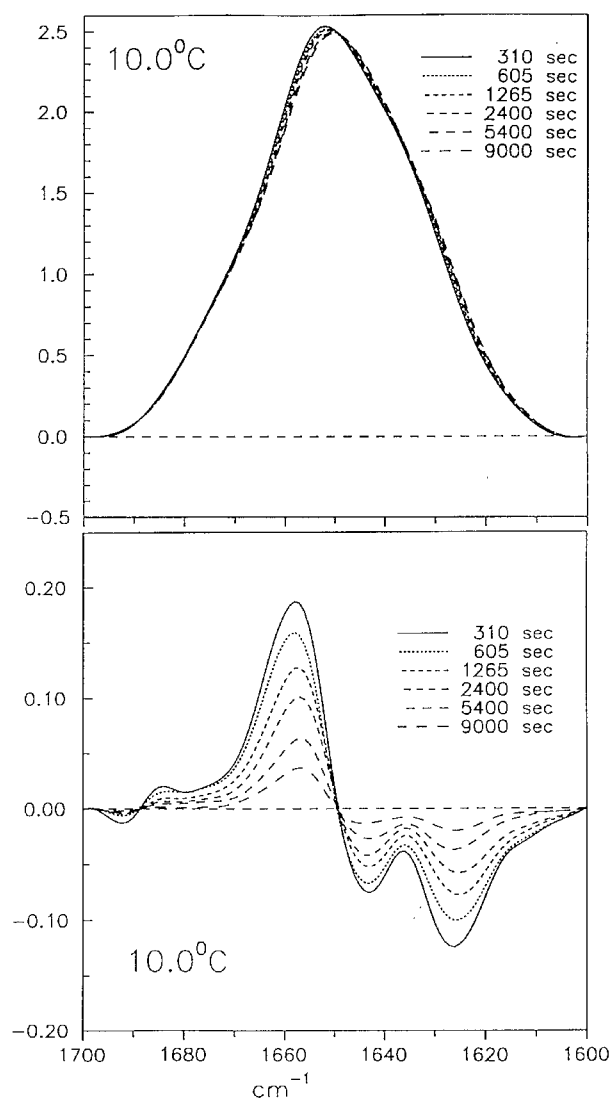


Abb. III-6

oben: FTIR-Spektren (Amid-I Region) von Cytochrom c in Komplexen mit DMPG nach Zugabe von D_2O . **unten:** Differenzspektren, erhalten durch Subtraktion eines Referenzspektrums, welches nach langen Zeiten und nahezu vollständiger Deuterierung aufgenommen wurde

Die fortschreitende zeitliche Veränderung der FTIR-Spektren nach der Zugabe von D_2O kann in Abb. III-6 verfolgt werden.

Die zugehörigen Differenzspektren bleiben während der Deuterierung in ihrer Form unverändert, was andeutet, daß dieselben Elemente der Sekundärstruktur während allen untersuchten Zeiten am Austausch beteiligt sind. Die Unveränderlichkeit der Form der Differenzspektren zeigt zudem an, daß während der Meßzeit keine strukturellen Veränderungen durch eine Hydrierung des Proteins erfolgt ist. Die meisten Sekundärstrukturelemente scheinen am langsamen Austausch der Protonen beteiligt zu sein. Insbesondere aber scheinen die α -Helix-Bande bei 1651 cm^{-1} und die "extended-chain"-Banden im Bereich von $1630 - 1640\text{ cm}^{-1}$ mit vergleichbaren Raten auszutauschen.

Den Verlauf der Deuterierung als Funktion der Zeit erhält man aus den Flächen der Differenzspektren, für deren Bestimmung wiederum Spektrum und Referenzspektrum auf eine konstante Fläche von 100 cm^{-1} normiert wurden. Die Daten für gelöstes Cytochrom c (in Abwesenheit von Lipid) und Protein in Komplexen mit DMPG werden in Abb. III-7 für verschiedene Temperaturen gezeigt. Die Deuterierungsraten des an DMPG gebundenen Proteins nehmen bei zunehmenden Temperaturen sehr schnell zu. Dahingegen sind die Deuterierungsraten des in D_2O gelösten Proteins mehr oder weniger temperaturunabhängig (sie sind bei 40°C tatsächlich sogar noch leicht niedriger als bei $10 - 30^\circ\text{C}$). Zusätzlich ist zu beobachten, daß die Anzahl der langsam austauschenden Protonen in beiden Fällen verschieden ist, jeweils aber beim gebundenen und beim ungebundenen Protein temperaturunabhängig ist.

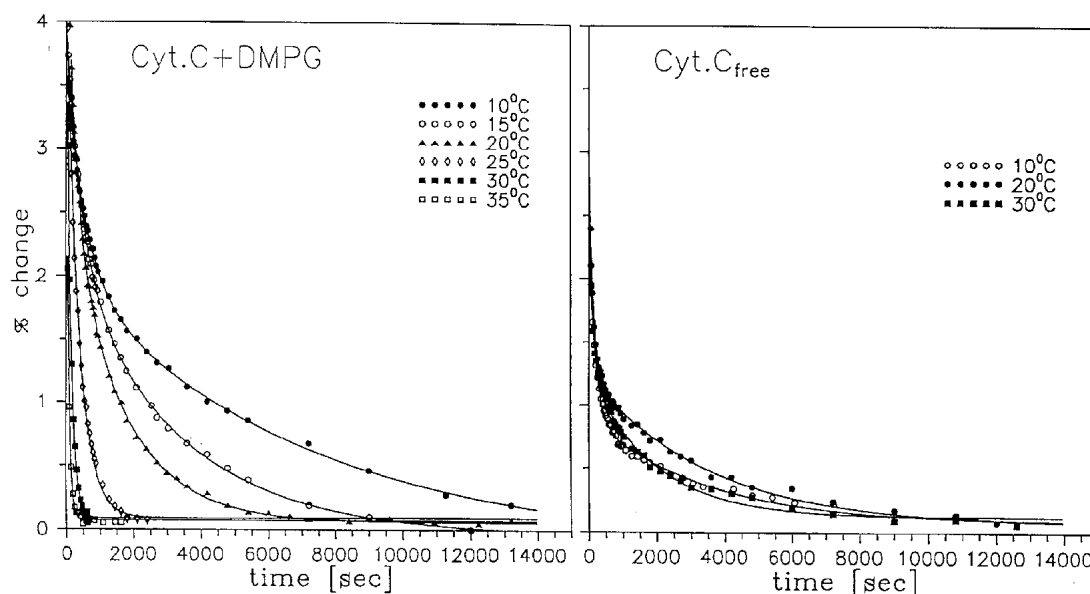


Abb. III-7

Zeitabhängigkeit der Fläche der Differenzspektren (vgl. Abb. III-6) nach der Zugabe von D_2O . **Links:** Cytochrom c in Komplexen mit DMPG, **Rechts:** Cytochrom c in Lösung. Die Differenzspektren wurden durch Subtraktion eines Spektrums bestimmt, welches nach langen Zeiten und nahezu vollständiger Deuterierung aufgenommen wurde.

Ausgehend von der Fläche des Differenzspektrums des vollständig protonierten Proteins aus Abb. III-5 und einer vollständig deuterierten Probe (entspricht ca. 20% der gesamten Amid-I-Bandenfläche) kann man davon ausgehen, daß im gelösten Protein ca. 13 % der Protonen (max. Differenzspektrumsfläche bei der Zeit $t = 0$ entspricht ca. 2.5 % der Amid-I-Bandenfläche), im gebundenen Protein dagegen ca. 20 % der Protonen (max. Differenzspektrumsfläche bei $t=0$ entspricht ca. 4 % der Amid-I-Bandenfläche) langsam austauschen. Alle anderen Protonen tauschen schnell aus und sind bei Aufzeichnung des ersten Spektrums schon durch Deuteronen ersetzt. Die relative Menge der langsam ausgetauschten Protonen blieb in jeder der verschiedenen Proben unabhängig von der Temperatur.

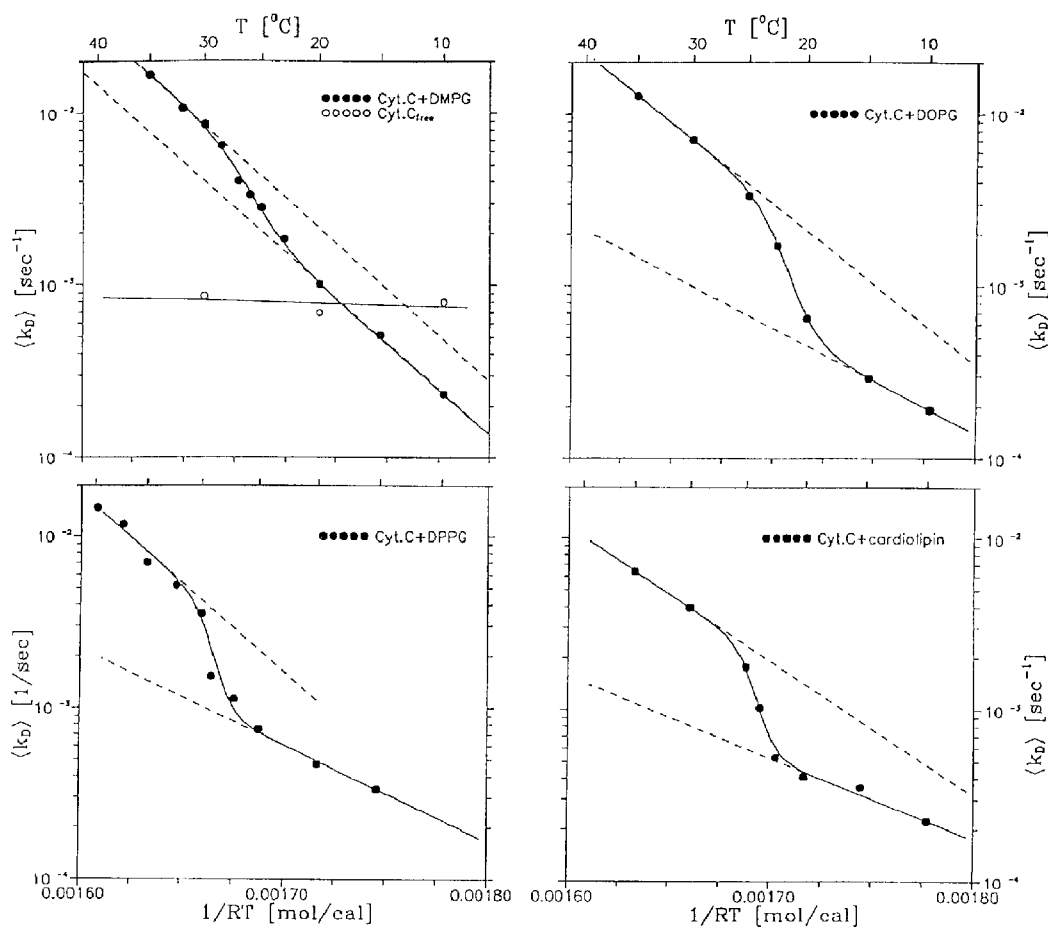


Abb. III-8

Arrheniusauftragung der Temperaturabhängigkeiten der mittleren Ratenkonstante, $\langle k \rangle$, für die Deuterierung von Cytochrom c in Lösung und gebunden an Lipide:

oben links: Cytochrom c in Lösung (—) und gebunden an DMPG (●), **oben rechts:** Cyt.c gebunden an DOPG, **unten links:** Cyt.c gebunden an DPPG und **unten rechts:** Cyt.c gebunden an BHCL (Cardiolipin)

Es ist nicht vollständig klar, ob tatsächlich insgesamt verschieden viele Protonen beim löslichen und beim gebundenen Protein austauschen, oder ob die Austauschrate im löslichen Protein soviel langsamer ist, daß man keine vollständige Deuterierung während der (auf ca. 6 Stunden) begrenzten Meßzeit beobachtet. Eine unabhängige Abschätzung aus der Veränderung der Amid-II-Bande ist wegen der komplizierten spektralen Beiträge von Seitengruppen der Aminosäuren und von Kohlenwasserstoff-Schwingungen nicht leicht möglich. Vergleiche mit NMR-Resultaten zeigen jedoch, daß beim gelösten Protein einige Protonen vermutlich unausgetauscht bleiben, während beim gebundenen Protein vermutlich alle Protonen im hier gesetzten Zeitrahmen austauschen (Wand et al., 1986; Spooner & Watts, 1991; De Jongh et al., 1992). Der verbleibende Grad von Deuterierung, $P(t)$, zeigt aller Voraussicht nach einen multiexponentiellen Abfall, mit einer eigenen Abklingrate für jedes der $i = 104$ verschiedenen Amidprotonen:

$$P(t) = \sum_i A_i \cdot \exp(-k_i \cdot t) \quad (3.1)$$

wobei die k_i die Abklingkonstanten für die verschiedenen Amidprotonen sind. Aus diesen Ratenkonstanten kann man eine mittlere Abklingkonstante $\langle k \rangle$ definiert werden:

$$\langle k \rangle^{-1} = \frac{\int_{t=0}^{\infty} \left[\sum_i A_i \cdot \exp(-k_i \cdot t) dt \right]}{\sum_i A_i} = \frac{\sum_i \frac{A_i}{k_i}}{\sum_i A_i} \quad (3.2)$$

Dieser Wert für $\langle k \rangle^{-1}$ entspricht der Fläche unter den Deuterierungskurven. Man findet experimentell, daß alle Abklingkurven in Abb. III-7 gut durch einen biexponentiellen Abfall beschrieben werden (durchgezogene Linien in Abb. III-7). Die Parameter von den biexponentiellen Anpassungen wurden benutzt, um die mittleren Ratenkonstante, $\langle k \rangle$, zu bestimmen, deren Temperaturabhängigkeit für das lösliche Protein und für die verschiedenen Lipid-Proteinkomplexe in Abb. III-8 gezeigt wird.

Wie schon erwähnt, besteht nur eine geringe Temperaturabhängigkeit für das gelöste Protein. Es ist aber offensichtlich, daß in den Lipid-Proteinkomplexen der Protonenaustausch ein aktivierter Prozeß ist. Die mittlere Rate des Austausches verändert sich um bis zu zwei Größenordnungen zwischen 10 und 40 °C (von ca. 10^{-4} s^{-1} bis 10^{-2} s^{-1}). Zusätzlich zu dieser Beobachtung erkennt man bei den verschiedenen Lipid-Proteinkomplexen im Gegensatz zum gelösten Protein eine Diskontinuität im Arrhenius-Plot, die auf eine Umwandlung im gebundenen Protein schließen läßt. Die Temperatur dieser Umwandlung hängt vom jeweiligen

Lipid in einer Art und Weise ab, die in Korrelation zum physikalischen Zustand der Membran zu sein scheint, d.h. davon, ob die Membran im flüssig-kristallinen Zustand oder im gelförmigen Zustand ist (vgl. Abb. III-4). Diese interessante Tatsache wird weiter unten detaillierter betrachtet.

III-5 DISKUSSION

In den vorangegangenen Abschnitten der vorliegenden Arbeit wurden strukturelle Veränderungen in Cytochrom c bei der Bindung an negativ geladenen Lipidmembranen sowohl in Hinblick auf Veränderungen in der Sekundärstruktur (durch Analyse der Amid-I Bande des Proteins) als auch der Tertiärstruktur (durch Untersuchung des Protonenaustauschs der Amidgruppen des Proteins) untersucht. Die Zielsetzung war, mögliche Kopplungen zwischen dem physikalischen Zustand der Membran und der Struktur des Proteins zu bestätigen. Dazu wurden Komplexe von Cytochrom c mit verschiedenen Lipiden über einen großen Temperaturbereich hinweg untersucht. Die Veränderungen von Sekundärstruktur und Tertiärstruktur, hervorgerufen durch Bindung an geladenen Lipide, werden im folgenden getrennt voneinander diskutiert.

III-5.1 Veränderungen der Sekundärstruktur in Cytochrom-c-Lipid-Komplexen

Die Resultate aus Abb. III-1 und Tab.III-1 deuten darauf hin, daß durch Bindung an Lipide hervorgerufene Veränderungen der Sekundärstruktur von Cytochrom c klein sind. Die gleiche Schlußfolgerung zogen Muga et al. (1991a), obwohl sie diese Effekte nicht quantifizierten. Diese Schlußfolgerung wird durch das völlige Fehlen eines Unterschiedes der Temperaturabhängigkeit der Differenzspektren von gebundenem und ungebundenem Protein bestätigt, die bei allen hier untersuchten Lipid-Proteinkomplexen beobachtet wurde. Die Destabilisierung der Cytochrom c Struktur, die in ^2H -NMR Experimenten bei der Bindung an Cardiolipin beobachtet wurde (Spooner & Watts, 1991) ist deshalb vermutlich weniger durch Veränderungen der Sekundärstruktur als vielmehr durch dynamische Veränderungen in der Tertiärstruktur des Proteins hervorgerufen. Zu diesem Ergebnis kamen kürzlich auch de Jongh et al. (1992) hinsichtlich der Bindung von Cytochrom c an Detergentien.

Die Temperaturabhängigkeit der FTIR-Spektren der Amid I-Bande von Cytochrom c (Abb. III-2 und III-3) zeigt keine Diskontinuität an der Umwandlung von DMPG und DPPG von

gelförmig → flüssig-kristallin. Dies bedeutet, daß es keine Veränderungen der Sekundärstruktur des Proteins als Folge der Kettenschmelze der Lipide gibt. Es gibt jedoch einen lipidabhängigen Einfluß auf die Denaturierungstemperatur. Dies deutet an, daß die Destabilisierung von Cytochrom c durch Bindung an Membranen, wie sie von Muga et al. (1991a) gefunden und in dieser Arbeit bestätigt wurde, durch die Natur des Lipids moduliert werden kann, auch wenn die Lipide vollständig geladen sind (d.h. der Effekt nicht ausschließlich elektrostatischer Natur ist). Interessanterweise wird auch die Denaturierung durch Harnstoff in Gegenwart von Detergenzien erleichtert (De Jongh et al., 1992). Zusätzlich ist zu vermerken, daß die dekonvoluierten (bandenverschmalerten) Spektren der Amid-I-Region des denaturierten Proteins im gebundenen Protein (Abb. III-2) sich deutlich vom denaturierten Protein in Lösung (Daten nicht gezeigt) unterscheidet. Der relative Anteil von Random-Coil Banden um 1645 cm^{-1} scheint im gebundenen Protein größer zu sein. Dies deutet an, daß der lipidgebundenen denaturierte Zustand ungeordneter als der des gelösten Proteins ist.

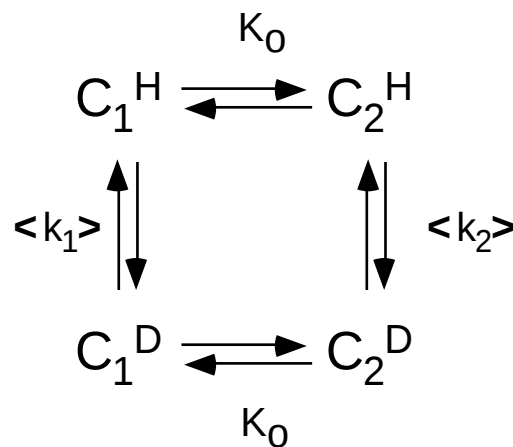
Ein deutlicheres Bild des Einflusses der Bindung auf die Stabilität des Proteins gewinnt man aus der Temperaturabhängigkeit der Austauschraten von Amidprotonen des Proteins in D_2O .

III-5.2 Veränderungen der Tertiärstruktur in Cytochrom c/ Lipid-Komplexen

Da die Analyse der Amid-I-Bande ergab, daß sich beim native Cytochrom c höchstens sehr kleine, durch Bindung an negativ geladene Lipide hervorgerufene Veränderungen der Sekundärstruktur ergaben, ist es wahrscheinlich, daß die starke Veränderung in der Charakteristik des Protonenaustauschs durch Veränderungen der Tertiärstruktur ergeben. Es ist naheliegend, das gebundene Protein als einen sogenannten "molten globule"-Zustand zu betrachten, der auch bei niedrigem pH und hoher Ionenstärke gefunden wurde (Jeng et al., 1990). "Molten globules" werden als Zwischenzustände der Proteinfaltung diskutiert und haben die Eigenschaft, bei einer beträchtlichen Verringerung der Stabilität der tertiären Faltung gleichzeitig nahezu unveränderte Sekundärstruktur zu besitzen. Diese Veränderung mag mit der Verringerung der Stabilität von Helizes einhergehen (Spooner & Watts), obwohl die Frequenzen der wesentlichen Bänder der Amid-I-Region des FTIR-Spektrums, die die Stabilität der Wasserstoffbrücken widerspiegeln, nahezu unverändert bleiben. Die Amidprotonen der Mehrzahl von Aminosäuren tauschen in D_2O schnell aus, was nahelegt, daß der langsame Austausch der verbleibenden Amidprotonen weniger durch die Stabilität der Wasserstoffbrücken als vielmehr durch die Zugänglichkeit der entsprechenden strukturellen

Elemente für Wasser gekennzeichnet ist. In diesem Zusammenhang muß man anmerken, daß einer der beiden (funktional verschiedenen) Konformationen des Cytochrom c, die durch Resonanz-Raman-Spektroskopie nachgewiesen wurde, einer Veränderung des Koordinationszustands des Eisens entspricht, die von einer Öffnung der Häm-Tasche begleitet wird (Heimburg et al., 1991; Hildebrandt & Stockburger, 1989a,b). Ein erhöhter Protonenaustausch in Cytochrom c in Komplexen mit Lipiden oder Detergenzien ist in letzter Zeit in mehreren Veröffentlichungen unter Verwendung verschiedener Techniken beobachtet worden (Spooner & Watts, 1991; Muga et al., 1991a; De Jongh et al., 1992).

Die Diskontinuitäten, die sich in den Arrhenius-Plots der Deuterierungsraten der Amidgruppen in den Cytochrom-c-Lipid-Komplexen ergab (Abb. III-8), legen nahe, daß eine temperaturabhängige Umwandlung zwischen zwei Zuständen C_1 und C_2 des Proteins stattfindet. Wenn man annimmt, daß die Einstellung des strukturellen Gleichgewichts schnell gegenüber den Deuterierungsraten ist, erhält man folgendes Schema für die Deuterierung:



wobei $K_0 = [C_2]/[C_1]$ die Gleichgewichtskonstante der Proteinumwandlung ist, und $\langle k_1 \rangle$ und $\langle k_2 \rangle$ die mittleren Deuterierungsraten der beiden Zustände sind, die in Gleichung (3.2) definiert wurden. Die Indizes H und D stehen für die protonierte bzw. die deuterierte Form des Proteins. Die gesamte Austauschrate, die im Experiment beobachtet wird, ist dann gegeben durch:

$$\langle k \rangle = \frac{(\langle k_1 \rangle + K_0 \cdot \langle k_2 \rangle)}{(1 + K_0)} \quad (3.3)$$

Die Temperaturabhängigkeit von $\langle k \rangle$ ist deshalb durch die Aktivierungsenergien $E_{a,1}$ und $E_{a,2}$ der Deuterierungskonstanten $\langle k_1 \rangle$ und $\langle k_2 \rangle$, der van't Hoff'schen Enthalpie, ΔH_0 des konformationellen Gleichgewichtes und dem Mittelpunkt T_t der Proteinumwandlung gegeben. Die durchgezogenen Linien in Abb. III-8 entsprechen den Anpassungen durch Gleichung

(3.3), deren Parameter in Tab.III-2 wiedergegeben werden. Die Umwandlungstemperatur ist in den beiden Komplexen am niedrigsten, die flüssig-kristalline Lipidkomponenten besitzen (d.h. mit DOPG und BHCL), wohingegen sie in dem Komplex mit gelförmigen Lipiden (d.h. mit DPPG) am höchsten liegt. Der physikalische Zustand der Lipide scheint demzufolge einen Einfluß auf das konformationelle Gleichgewicht der Zustände C_1 und C_2 des gebundenen Cytochrom c zu haben. Dies ähnelt der Abhängigkeit der Denaturierungstemperatur des gebundenen Proteins, die auch für die Lipide mit der niedrigeren Umwandlungstemperatur niedriger war (vgl. Abb. III-3).

Der Komplex von Cytochrom c mit DMPG ist bezüglich der Umwandlung im Protein besonders interessant, da die Lipidumwandlung im Komplex bei genau der gleichen Temperatur stattfindet wie die konformationelle Umwandlung. Der Grad der Umwandlung, $K_0/(1+K_0)$, für Komplexe mit verschiedenen Diacylphosphoglycerolen ist in Abb. III-9 wiedergegeben. Mit erkennt hier nicht nur, daß die Umwandlung im DMPG-Komplex bei einer Zwischentemperatur zwischen derjenigen für die flüssig-kristallinen Komplexe (mit DOPG oder BHCL) und derjenigen für den gelförmigen Komplexe (mit DPPG) liegt, sondern daß die Umwandlung auch beträchtlich breiter ist als die der anderen Lipide ($\Delta H_0 \approx 100$ kcal/mol anstelle von $\Delta H_0 \approx 200$ kcal/mol). Dies läßt vermuten, daß in diesem Falle die Proteinumwandlung von der Lipidumwandlung gesteuert wird (und umgekehrt).

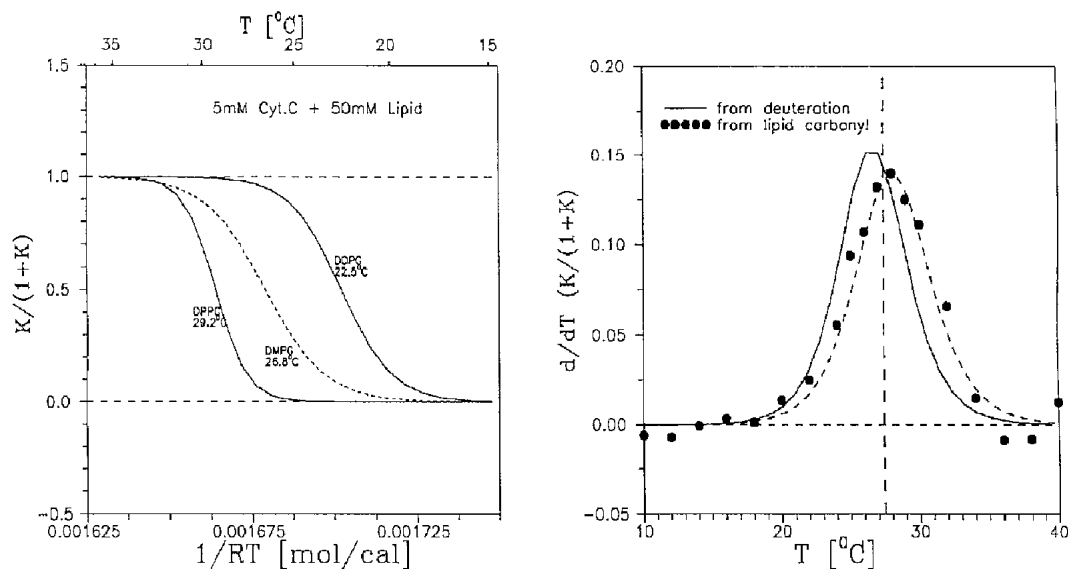


Abb. III-9

Links: Temperaturabhängigkeit des Umwandlungsgrades der Proteinstruktur, $K_0/(1+K_0)$, bestimmt aus den Daten in Abb. III-8 für die Cytochrom-c-Komplexe mit DPPG, DMPG und DOPG (von links nach rechts).

Rechts: Erste Ableitung der Umwandlungskurven, $d(K_0/(1+K_0))/dT$, bestimmt für das Protein aus den Daten links (—) und für das Lipid aus den Daten in Abb. III-4 (●)

Diese Annahme wird noch plausibler wenn man Umwandlung im Lipid (gemessen durch die

Probe	ΔH_0 [kcal/mol]	T_t [°C]	$E_{a,1}$ [kcal/mol]	$E_{a,2}$ [kcal/mol]
Cyt.c	0	-	-	-
Cyt.c/DMPG	110	26.8	24	24
Cyt.c/DOPG	130	22.5	14	22
Cyt.c/DPPG	210	29.3	14	22
Cyt.c/BHCL	210	24.5	12	18

Tabelle III-2

Anpassungsparameter für die Temperaturabhängigkeit der mittleren Deuterierungsrate $\langle k \rangle$ in den Arrhenius-Plots in Abb. III-8

Umwandlung in den Ester-Carbonylen der Lipidketten) und die Proteinumwandlung miteinander vergleicht. Man sieht dies auf der rechten Seite von Abb. III-9. Innerhalb der experimentellen Genauigkeit sind die beiden Umwandlungen gleich.

Der Grund hierfür ist naheliegend. Unmittelbar unterhalb der Lipidketten-Schmelzreaktion des Cyt.c-DMPG-Komplexes ist die Probe unterhalb der Umwandlungstemperatur des Proteins für die gelförmigen Komplexe, aber oberhalb der Umwandlungstemperatur für die flüssig-kristallinen Komplexe. Dem-zufolge ist nun die Umwandlung des Proteins mit derjenigen des Lipids in einer Art und Weise verknüpft, die proportional zum Anteil der flüssigen Lipidphase ist, so daß in diesem speziellen Falle die Proteinumwandlung vollständig durch die Lipidumwandlung kontrolliert wird.

Zusammenfassend kann man aus den in diesem Kapitel gezeigten Daten schließen, daß sowohl bei der Denaturierungstemperatur als auch in Hinblick auf bindingsinduzierte tertiäre Umwandlungen Korrelationen zur Natur und zum physikalischen Zustand der Lipide, an die das Protein bindet, bestehen. In dem speziellen Fall von Cytochrom-c-Komplexen mit DMPG kann sogar gezeigt werden, daß die Lipidumwandlung eine strukturelle Umwandlung in Cytochrom c kontrollieren kann. Diese Kopplung birgt interessante und weiterreichende Möglichkeiten für die Kontrolle der Aktivität von Enzymen im allgemeinen in sich.

III-6 LITERATUR

- Bell, J.D. und Biltonen, R.L. J.Biol.Chem. 264 (1989), 12194 - 12200
The temporal sequence of events in the activation of phospholipase A₂ by lipid vesicles. Studies with the monomeric enzyme from *Agkistrodon piscivorus piscivorus*
- Brautigan, D.L., Ferguson-Miller, S., und Margoliash, E.
Meth.Enzymology 53 (1978), 128 - 165
Mitochondrial cytochrome c: preparation and activity of native and chemically modified cytochromes c
- Byler, D.M. und Susi, H. Biopolymers 25 (1986), 469 - 487
Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra
- Comfurius, P., und Zwaal, R.F.A. B.B.A. 488 (1977), 36 - 42
The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography
- de Jongh, H.H.J., Killian, J.A., und de Kruijff, B.
Biochemistry 31 (1992), 1636-1643
A water-lipid interface induces a highly dynamic folded state in apocytochrome c and cytochrome c, which may represent a common folding intermediate
- Dickerson, R.E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, O.B., Samson, L., Cooper, A. und Margoliash, E.
J.Biol.Chem. 246 (1971), 1511 - 1535
Ferricytochrome c 1. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution
- Heimburg, T. Dissertation Universität Göttingen (1989)
Untersuchungen der physikalischen Eigenschaften von Biologischen- und Modellmembranen
- Heimburg, T., Hildebrandt, P. und Marsh, D. Biochemistry 30 (1991), 9084 - 9089
Cytochrome C-lipid interactions studied by resonance Raman and 31P-NMR spectroscopy. Correlation between the conformational changes of the protein and the lipid bilayer
- Hildebrandt, P. und Stockburger, M. Biochemistry 28 (1989), 6710 - 6721
Cytochrome c at charged interfaces. 1. Conformational and redox equilibria at the electrode/electrolyte interface probed by surface enhanced resonance Raman spectroscopy
- Hildebrandt, P. und Stockburger, M. Biochemistry 28 (1989), 6722 - 6728
Cytochrome C at charged interfaces. 2. Complexes with negatively charged macromolecular systems studied by resonance Raman spectroscopy
- Jeng, M-F., Englander, S.W., Elöve, G.A., Wand, A.J., und Roder, H.
Biochemistry 29 (1990), 10433 - 10437
Structural description of acid-denaturated Cytochrome c by hydrogen exchange and 2D-NMR
- Kauppinen, J.K., Moffat, D.J. und Mantsch, H.H.
Applied Spectroscopy 35 (1981), 271 - 276
Fourier self- deconvolution: A method for resolving intrinsically overlapping bands
- Muga, A., Mantsch, H.H. und Surewicz, W.K.
Biochemistry 30 (1991), 7219 - 7224

- Membrane binding induces destabilization of cytochrome c structure
Muga, A., Mantsch, H.H. und Surewicz, W.K. Biochemistry 30 (1991), 2629 - 2635
Apocytochrome c interaction with phospholipid membranes studied by Fourier-transform infrared spectroscopy
- Provencher, S.W., und Glockner, J. Biochemistry 20 (1981), 33 - 37
Estimation of globular protein secondary structure from circular-dichroism
- Spooner, P.J.R. und Watts, A. Biochemistry 30 (1991), 3871 - 3879
Reversible unfolding of Cytochrome c upon interaction with cardiolipin bilayers. 1.Evidence from deuterium NMR measurements
- Takano, T. und Dickerson, R.E. J.Mol.Biol. 153 (1981), 95 - 115
Conformation change of cytochrome c II.Ferricytochrome c refinement at 1.8Å and comparison with the ferrocyanochrome structure
- Tonge, P.J., Pusztai, M., White, A.J., Wharton, C.W. und Carey, P.R.
Biochemistry 30 (1991), 4790 - 4795
Resonance Raman and Fourier transform infrared spectroscopy studies of the acyl carbonyl group in [3-(5-Methyl-2-thienyl) acryloyl]chymotrypsin: evidence for artifacts in the spectra obtained by both techniques
- Waltham, M.C., Cornell, B.A. und Smith, R. B.B.A. 862 (1986), 451 - 456
Association of ferri- and ferro-cytochrome c with lipid multilayers: a ³¹P solid- state NMR study
- Wand, A.J., Roder, H. und Englander, S.W. Biochemistry 25 (1986), 1107 - 1114
Two-dimensional ¹H-NMR studies of cytochrome c: Hydrogen exchange in the N-terminal helix
- Watts, A., Harlos, K., Maschke, W., und Marsh, D. B.B.A. 510 (1978), 63 - 74
Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration

Kapitel IV

Kooperative Bindung

ÜBER DIE BINDUNG PERIPHERER PROTEINE AN LIPIDMEMBRANEN²

In diesem Kapitel wird eine analytische Form für die Bindungsisothermen von Liganden an geladene Oberflächen mit Hilfe eines statistisch thermodynamischen Modells hergeleitet. Die Isothermen werden benutzt, um die Bindung des peripheren Proteins Cytochrom c an Lipidmembranen zu beschreiben und um Aussagen über strukturelle Veränderungen der Lipidmembran zu gewinnen. Das Modell vertieft die Beschreibung der Bindung, die in Kap.II zur Analyse der titrationskalorimetrischen Daten verwendet wurde.

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

T.Heimburg and D.Marsh. 1995. Protein surface-distribution and protein-protein interactions in the binding of peripheral proteins to charged lipid membranes *Biophys.J.*68: 536-546

IV-1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindung von Liganden an geladene Oberflächen wird von der elektrostatischen freien Energie der Elektrode und der freien Energie der Ligandenverteilung auf der Oberfläche bestimmt. Dieses Problem wird im folgenden Kapitel unter Benutzung eines statistisch thermodynamischen Modells behandelt, das auf der Beschreibung der elektrostatischen Doppelschicht von Gouy und Chapman unter Annahme nichtlokalisierter Bindungsplätze beruht. Dieses Modell wurde verwendet, um die experimentell bestimmte Bindung von nativem und von denaturiertem Cytochrom c an Dioleoyl-Phosphatidylglycerol-Membranen in einem weiten Bereich der Ionenstärke zu analysieren. Aus den Experimenten kann die effektive Ladung der Liganden bestimmt werden. Das gebundene, denaturierte Protein besitzt eine ähnliche Lipid/Proteinstoichiometrie und effektive Ladung wie das native Cytochrom c. Die intrinsische Bindungskonstante des denaturierten Proteins ist jedoch signifikant höher als die des nativen Proteins. Daraus kann geschlossen werden, daß denaturiertes Cytochrom c zwar im wesentlichen globular bleibt, aber zumindest teilweise in den hydrophoben Kern der Lipidmembran integrieren muß. Bei hohen Ionenstärken und hohen Ligandenkonzentrationen erhält man für die Bindungsisothermen einen augenscheinlichen Sättigungsgrad der Oberflächen mit Liganden, der weit unterhalb der kompletten Bedeckung der Membranoberfläche liegt. Dieser augenscheinliche Sättigungsgrad ist in hohem Maße abhängig von der Ionenstärke und konnte in selbstkonsistenter Weise von dem statistisch thermodynamischen Modell erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, daß bei niedrigen Sättigungsgraden die Lipid/Proteinstoichiometrie nicht mehr konstant bleibt. Dies deutet darauf hin, daß das Protein in mehr als einer Schicht auf der Membran binden kann und /oder die gesamte Membranfläche durch Auseinanderbringen der individuellen Lipidmoleküle vergrößert wird. Beide Effekte konnten erfolgreich mit Hilfe von Elektronenspinresonanz-Experimenten demonstriert werden.

IV-2 EINLEITUNG

Die Wechselwirkung zwischen Liganden mit Oberflächen oder Makromolekülen spielt eine wichtige Rolle in biologischen Systemen (Cevc, 1990). Diese Wechselwirkungen werden von hydrophoben und elektrostatischen ebenso wie von sterischen Effekten kontrolliert. In diesem Kapitel wird die Bindung von Liganden an Oberflächen, insbesondere mit der Bindung von Proteinen an Lipidmembranen, behandelt. Das Verständnis dieses Prozesses ist nicht nur zum Verständnis enzymatischer Aktivität von membrangebundenen Proteinen wichtig, sondern auch

zum Verstehen und Analysieren der Struktur von Lipid-Protein-komplexen. Protein Kinase C bindet und funktioniert nur in Wechselwirkung mit Diacyl-Phosphatidylserin-haltigen Membranen (Nishizuka, 1986; Orr & Newton, 1992). Phospholipase A₂ wird instantan auf geladenen Lipiden aktiviert, bleibt aber auf Membranen neutraler Lipide für lange Latenzzeiten inaktiv (Bell & Biltonen, 1989). Die strukturelle Kontrolle von Cytochrom c auf geladenen Membranen wurde von Heimbürg et al. (1991) und Heimbürg & Marsh (1993) demonstriert (siehe Kap.III).

Es gibt eine große Zahl von Publikationen, die Bindung von geladenen Liganden an geladenen und ungeladenen Lipidoberflächen in Elektrolyten beschreibt. Einer der am meisten verbreiteten Ansätze ist die Gouy-Chapman Theorie, die recht erfolgreich die Bindung von geladenen Liganden an Lipidmembranen beschreiben konnte (McLaughlin et al., 1989; Kim et al., 1991; siehe hierfür auch den Übersichtsartikel von McLaughlin, 1989). Dieser Theorie liegen eine Reihe von Vereinfachungen zugrunde, die zum Beispiel darin bestehen, daß die Lokalisierung von Ladungen und die endliche Größe der Ionenradien vernachlässigt werden. Es wird angenommen, daß die Oberfläche eine homogene Ladungsdichte aufweist. Diese Annahme ist augenscheinlich eine grobe Vereinfachung insbesondere dann, wenn eine kleine Zahl großer Ionen (wie periphere Proteine) oder Mischungen geladener und ungeladener Lipide (wo Ladungen auf individuellen Lipiden lokalisiert sind) betrachtet werden. In einer Reihe von Veröffentlichungen wurde der sogenannte "Discreteness - of - charge" - Effekt untersucht, der sich auf Inhomogenitäten der Ladungsdichte bezieht (Nelson & Quarrie, 1975; Winiski et al., 1986). Experimentell wurde gefunden, daß dieser Effekt nicht zu ernsthaften Abweichungen des elektrostatischen Potentials von dem, durch das einfache Gouy-Chapman-Modell vorhergesagten, Wert führt. Wie Mathias et al. (1988), Vorotyntsev & Ivanov (1988) und von Stankowski (1991) argumentieren, führt das Mitteln über lokalisierte Ladungen unter Verwendung der Debye-Hückel-Theorie zu den selben Gleichungen für das Potential wie die Annahme verschmierter, nicht lokalisierter Ladungen in der Gouy-Chapman-Theorie, wenn der Abstand der Ladungen größer als die Debyelänge ist.

In der Regel wird die Bindung zudem in der Art der Langmuir-Isotherme beschrieben, deren Herleitung die Annahme unabhängiger Bindungsplätze zugrunde liegt. Dies ist auf nahezu kontinuierlichen Oberflächen wie Lipidmembranen eine falsche Annahme, weil die Entropie der Verteilung und die Kooperativität der Bindung unvollständig berücksichtigt wird. Bei sehr niedrigen Bedeckungsgraden liefert die Langmuir-Isotherme eine hinreichend gute Beschreibung. Bei hohen Bedeckungsgraden überschätzt die Bindungsisotherme jedoch den Grad der Bindung von Liganden in beträchtlichem Maße. Darauf wurde schon 1946 von T.Hill für den Fall der Adsorption von Gasmolekülen auf Metalloberflächen hingewiesen.

Ein anderer wichtiger, aber fast immer vernachlässigter Teil des Bindungsproblems betrifft den Liganden selber. Es gibt einige Hinweise darauf, daß die Bindung von Liganden einen direkten

Einfluß auf das Phasenverhalten von Lipiden und auf ihre thermodynamischen Eigenschaften hat (Ramsay et al., 1986; Heimbürg & Biltonen, 1993; siehe auch Kapitel II und V). Nicht nur werden die Umwandlungspunkte der Lipidschmelze verschoben, sondern es werden auch die Umwandlungsenthalpien zum Teil beträchtlich verringert. Dies ist vermutlich eine Folge von Veränderungen im Ordnungsgrad der Lipide, hervorgerufen durch gebundene Liganden. Aus diesem Grunde könne Lipidmembranen nicht als starre Elektroden betrachtet werden, sondern es ergeben sich aus der Wechselwirkung mit Proteinen strukturelle Umwandlungen in Lipidmembranen. Von denselben Autoren wurden zweiphasigen Bindungsisothermen bei der Bindung von "myelin basic protein" an Dimyristoyl-Phosphatidylserin-Membranen und bei der Bindung von Cytochrom c an Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol (Kap.II) beobachtet, was in beiden Fällen als Folge von kooperativen Veränderungen in der Lipidmatrix interpretiert wurde. Desweiteren hängen Dimension und Phasenverhalten von Lipiden in starkem Maße von der Ladung der Oberfläche ab (Träuble et al., 1976; Jähnig, 1976). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß man Lipidmembranen keine konstante Oberfläche zuschreiben kann.

Die Bindung von Cytochrom c an Oberflächen ist von vielen Seiten untersucht worden, hauptsächlich in Hinblick auf die Veränderung der Proteinkonformation auf Elektroden (Hildebrandt & Stockburger, 1989 a, 1989 b) und an Mizellen oder Lipidmembranen (Spoonier & Watts, 1991; de Jongh et al., 1992; Heimbürg et al., 1991; Heimbürg & Marsh, 1993; vgl. Kap.III). Die Sekundärstruktur des Proteins bleibt bei Bindung im wesentlichen erhalten, aber der dynamische Zustand der tertiären Struktur verändert sich beträchtlich (Kap.III). In diesem Kapitel wird aufgrund der Erhaltung der Sekundärstruktur angenommen, daß Cytochrom c bei Bindung im wesentlichen globular und in seiner Größe unverändert bleibt.

Es ist über die Struktur des Lipids in Komplexen mit Cytochrom c nicht viel bekannt. Es ist jedoch deutlich, daß Cytochrom c in der Lage ist, in Cardiolipin eine Strukturumwandlung durch das Induzieren einer invers hexagonalen Lipidphase (de Kruijff & Cullis, 1980) oder durch Veränderung des makroskopischen Aggregationszustands der Lipidvesikel (Heimbürg et al., 1991; Heimbürg & Biltonen, 1993; siehe Kap.II) hervorzurufen.

In diesem Kapitel wird die Bindung von Liganden an Oberflächen durch eine statistisch thermodynamische Formulierung beschrieben, die zur Herleitung einer ganz allgemeinen Form von Bindungsisothermen dient, in die keine Modellannahmen eingehen. Diese Formulierung wurde verwendet, um eine Bindungsisotherme herzuleiten, die unter Berücksichtigung der freien Energie eines zweidimensionalen van der Waals-Gases von Liganden auf einer Oberfläche und der freien Energie der elektrostatischen Doppelschicht aus der Gouy-Chapman Theorie bestimmt wurde. Der Herleitung lagen die Annahmen zugrunde, daß die Liganden globular sind und die gesamte Ausdehnung der Oberfläche bei zunehmender Bedeckung mit Liganden sich nicht verändert. Das Modell wurde dann an Komplexen aus Dioleoyl-

Phosphatidylglycerol (DOPG) mit Cytochrom c getestet. Die Anpassung der theoretisch vorhergesagten Kurven an die experimentellen Bindungsisothermen wurde im Zusammenhang mit möglichen Veränderungen der Lipidstruktur diskutiert, unterstützt durch Elektronenspinresonanz(ESR)- Experimente an den Lipid-Proteinkomplexen.

IV-3 MATERIALEN UND METHODEN

Cytochrom c (Typ VI, oxydierte Form, SIGMA, St.Louis) wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Dioleoyl-Phosphatidylglycerol (DOPG, Avanti Polar Lipids, Birmingham, Al.) war dünnschichtchromatographisch rein und wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Lipiddispersionen (10 mg/ml) und Proteinlösungen (20 mg/ml) wurden in destilliertem Wasser angesetzt. Verschiedene Mengen der Proteinlösung wurden zu 1 mg Lipid in der Abwesenheit von monovalenten Ionen hinzugegeben (d.h. bei maximaler Assoziationskonstante). Die Lipid-Proteinmischungen wurden dann auf ein totales Volumen von 6.1 ml (238 μ M Lipid) verdünnt, wobei ein Puffer (2 mM Hepes, 1 mM EDTA) bei pH 7.5 mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen zwischen 0 und 250 mM verwendet wurde. Die Zugabe von Kochsalz dient im wesentlichen der Veränderung des elektrostatischen Potentials der Membran. NaCl wurde erst zugegeben, nachdem Cytochrom c und DOPG in Kontakt gebracht wurden. Dies stellte sicher, daß zum Zeitpunkt des Kontakts zwischen Protein und Lipid unabhängig von der späteren Salzkonzentration immer dieselben Bedingungen herrschten und immer die gleiche Gesamtoberfläche der Lipide für die Proteine zugänglich war. Die Lipid-Proteinmischungen wurden bei Raumtemperatur zwei Tage lang inkubiert, um eine Equilibrierung bei langsamen Dissoziationsraten zu erlauben. Alle Präparationen wurden unter Argon oder unter Stickstoff durchgeführt, um eine Oxidation der ungesättigten Lipidketten zu verhindern.

Die Gesamtionenstärke wurde unter Berücksichtigung der Gegenionen des Hepes-Puffers und des EDTA (zusammen 4 mM Na^+ -Ionen) bestimmt. Die Lipid-Proteinkomplexe wurden vom gelösten Protein in einer Ultrazentrifuge (Beckman L7-55) in einem TI-50 Rotor bei 50000 Umdrehungen/min. getrennt, wobei bei hohen Ionenstärken eine Stunde und bei niedrigen Ionenstärken zwei Stunden lang zentrifugiert wurde.

ESR-Spektren wurden auf einem 9 GHz Spektrometer (E-line, Varian associates, instrument division, Palo Alto, Ca.) aufgezeichnet, das einen Stickstoffgasstrom zur Temperaturregulierung benutzte. Die pelletierten Lipid-Proteinkomplexe wurden in 1mm-ID-100- μ l Quarzkapillaren versiegelt. Spinmarkiertes Diacyl-Phosphatidyl-glycerol (1- acyl-2-

[14- (4,4- dimethyloxazolidine- N- oxyl)] stearoyl-sn-glycerol) wurde aus markiertem Ei-Phosphatidylcholin (Marsh & Watts, 1982) unter Einsatz von Phospholipase D synthetisiert (Comfurius & Zwaal, 1977).

IV-4 THEORIE

IV-4.1 Bindungsisothermen an Oberflächen mit nichtlokalisierten Bindungsplätzen

Betrachtet werde die Bindung von Liganden an eine kontinuierliche Oberfläche mit nicht-lokalen Bindungsplätzen. Jeder Ligand binde an ein Oberflächenelement ΔA . Die Gesamtoberfläche sei definiert als $n \cdot \Delta A = A_0$, was einer Zahl von n Liganden bei kompletter Bedeckung der Oberfläche entspricht.

Die intrinsische Bindungskonstante der Ligandenmoleküle hängt von elektrostatischen und nicht-elektrostatischen Wechselwirkungen der Liganden mit der Oberfläche ab und kann durch eine Bindungskonstante $K(i) = K^0 \cdot \exp(-\Delta F_{el}(i)/k \cdot T)$ ausgedrückt werden. Der Index i zeigt hierbei an, daß sich die elektrostatische, Helmholtzsche freie Energie ΔF_{el} der Oberfläche abhängig von der Zahl der gebundenen Liganden verändert, wenn die Liganden eine Ladung tragen.

Zusätzlich trägt die Verteilung der Liganden auf der Oberfläche selbst zur freien Energie durch einen Beitrag ΔF_D bei. Er kann durch die Arbeit ΔW beschrieben werden, die nötig ist, um ein zweidimensionales Gas von Liganden auf der Oberfläche von einer Referenzfläche A_r auf die Fläche A_0 zu komprimieren :

$$\Delta F_D = \Delta W(i) = - \int_{A_r}^{A_0} \Pi(i) \cdot dA \quad . \quad (4.1)$$

Hierfür wurde der Oberflächendruck des zweidimensionalen Ligandengases, $\Pi(i)$, eingeführt. Die Arbeit $\Delta W(i)$ muß gegen ∞ gehen, wenn die Zahl der gebundenen Liganden i sich der Zahl n bei vollständiger Bedeckung nähert. Die mittlere Zahl an die Oberfläche gebundener Moleküle, $\bar{v}$, kann nun geschrieben werden als

$$\nu \equiv \langle i \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot \frac{1}{i!} \cdot [L]^i \cdot K(i)^i \cdot \exp\left(-\frac{\Delta W(i)}{k \cdot T}\right)}{\sum_{i=0}^n \frac{1}{i!} \cdot [L]^i \cdot K(i)^i \cdot \exp\left(-\frac{\Delta W(i)}{k \cdot T}\right)} = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot P_i}{Q}, \quad (4.2)$$

in Analogie zum Formalismus zur Herleitung der Bindungsisothermen der Bindung von Liganden an ein Makromolekül mit unabhängigen, wohldefinierten Bindungsplätzen (Cantor & Schimmel, 1980). $[L]$ ist die freie Ligandenkonzentration, und die Zustandskoeffizienten P_i/Q definieren die Verteilung der Wahrscheinlichkeiten, eine Oberfläche mit i gebundenen Liganden zu finden. Diese Verteilung kann im Fall von Aggregationsgleichgewichten auf der Oberfläche mehr als ein Maximum haben. In den meisten Fällen jedoch hat die Verteilung aus (4.2) nur ein ausgeprägtes Maximum. In diesem Fall kann Gleichung (4.2) zu

$$\nu = [L] \cdot K^0 \cdot \exp\left(-\frac{d}{di} \left[\frac{\Delta F_{el}(i)}{k \cdot T} \right]\right) \cdot \exp\left(-\frac{d}{di} \left[\frac{\Delta W(i)}{k \cdot T} \right]\right) \quad (4.3)$$

vereinfacht werden (siehe Anhang I). Dies ist die allgemeinste Formulierung einer Bindungsisotherme, die in dieser Form keine Modellannahmen enthält. Um analytische Formen für Bindungsisothermen klar umrissener Probleme zu erhalten, müssen nun Modelle für die elektrostatische Wechselwirkung, die $\Delta F_{el}(i)$ beschreibt, und für die freie Energie der Verteilung, $\Delta W(i)$, gemacht werden. Dies geschieht in den folgenden Abschnitten.

IV-4.2 Die freie Energie der Ligandenverteilung

Die allgemeinste Formulierung eines Oberflächendrucks ist eine Reihenentwicklung mit Virialkoeffizienten, wie sie z.B. von Stankowski (1991) benutzt wurde, um elektrostatische Wechselwirkungen auf der Oberfläche zu beschreiben. Es sind jedoch nicht alle Wechselwirkungen zwischen Liganden elektrostatischer Natur. Neben Hydratationseffekten (Cevc, 1990) können auch indirekt Wechselwirkungen über die Lipidmembran propagiert werden (Mouritsen & Biltonen, 1992; siehe insbesondere auch Kap.V), zudem kommen auch sterische Wechselwirkungen vor. Diese Wechselwirkungen sind entweder nur indirekt elektrostatischen Ursprungs, oder sie sind nicht-elektrostatisch.

In diesem Abschnitt wird deshalb als eine Näherung erster Ordnung der Oberflächendruck durch eine van der Waals-Gleichung eines realen Gases beschrieben, ein Ansatz, den schon zuvor T.Hill (1946) machte. Dies führt die Annahme ein, daß die Liganden nur in einer

einigen, planaren Schicht auf der Oberfläche binden, wie dies auch in Langmuir-ähnlichen Isothermen vorausgesetzt wird. Wenn die Reichweite der Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Liganden eine charakteristische Länge von weniger als dem Durchmesser eines Liganden aufweist, ist dies eine sinnvolle Annahme. Man erhält

$$\left(\Pi(i) + b \cdot \left(\frac{i}{n} \right)^2 \right) \cdot (n-i) \cdot \Delta A = i \cdot k \cdot T \quad , \quad (4.4)$$

wobei b ein anpaßbarer Parameter mit den Einheiten [N/cm] ist, der in allgemeiner Weise attraktive oder repulsive Wechselwirkungen zwischen den Liganden umschreibt. Der Parameter b soll jedoch nicht die elektrostatischen Wechselwirkungen enthalten, die im nächsten Abschnitt durch die freie elektrostatische Energie $\Delta F_{el}(i)$ ausgedrückt werden. ΔA ist der Querschnitt des Liganden, dessen Form als kreisförmig angenommen wird. Die Arbeit $\Delta W(i)$ hat nun folgende Form:

$$\begin{aligned} \Delta W(i) &= \left[i \cdot k \cdot T \cdot \ln(n' - i) - b \cdot \Delta A \cdot \left(\frac{i^2}{n} \right) \right]_{n_r}^n \\ &\approx i \cdot k \cdot T \cdot \ln(n-i) - b \cdot \Delta A \cdot \left(\frac{i^2}{n} \right) - i \cdot k \cdot T \cdot \ln(n_r) \end{aligned} \quad (4.5)$$

Hierbei wurde das Differential dA beschrieben durch $dA = \Delta A \cdot dn'$, und für den Referenzzustand wurde angenommen, daß er durch ein ideales Gas beschreibbar ist ($n_r \gg i$). In Gleichung (4.2) kann der Term $i \cdot k \cdot T \cdot \ln(n_r)$ mit in die Bindungskonstante K hineingenommen werden, wenn man ersetzt $K^0 \rightarrow n_r \cdot K^0$. Er wird deshalb im folgenden nicht mehr betrachtet.

Im Falle nicht-elektrostatischer Wechselwirkungen der Liganden mit der Oberfläche ($K(i) = K^0$) erhält man mittels der Gleichungen (4.3) und (4.5)

$$v = [L] \cdot K^0 \cdot (n-i) \cdot \exp \left(-\frac{i}{n-i} + 2 \cdot \frac{b \cdot \Delta A}{k \cdot T} \cdot \frac{i}{n} \right) \quad ,$$

oder durch die Verwendung des dimensionslosen Parameters $b' = b \cdot \Delta A / k \cdot T$ und des Bedeckungsgrads $\theta = i/n$:

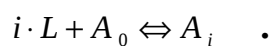
$$[L] = \frac{1}{K^o} \cdot \frac{\theta}{(1-\theta)} \cdot \exp\left(\frac{\theta}{(1-\theta)} - 2 \cdot b' \cdot \theta\right) \quad . \quad (4.6)$$

Diese Form der Bindungsisotherme wurde von T.Hill (1946) schon einmal durch einen statistisch mechanischen Ansatz hergeleitet, um die Adsorption kleiner Moleküle eines Gases an eine Metalloberfläche zu beschreiben. Im Prinzip können jedoch mit Hilfe von Gl.(4.3) Bindungsisothermen für alle möglichen Wechselwirkungen ΔW zwischen Liganden hergeleitet werden. Setzt man $\Delta W(i) = k \cdot T \cdot \ln(n! / (n - i)!)$, erhält man beispielsweise die Langmuir-Isotherme (mit einem ausschließlich entropischen Beitrag zur freien Energie der Verteilung), deren Form äquivalent zu Gl.(4.6) unter Vernachlässigung des exponentiellen Terms ist. Aus diesem Grunde sind die Langmuir-Isotherme und die Isotherme aus Gl.(4.6) bei niedrigen Bedeckungsgraden äquivalent.

An diesem Punkt ist es interessant, Gl.(4.6) mit Rechnungen von McGhee und von Hippel (1974) zu vergleichen, die die Bindung von Liganden an ein eindimensionales Gitter (z.B. Bindung von Proteinen an DNA) in einer analytisch exakten Weise gelöst haben. Es wurde dort angenommen, daß jeder Ligand an m Plätze des Gitters bindet. Im Grenzfall $m \rightarrow \infty$ (das ist der Grenzfall einer eindimensionalen, kontinuierlichen Oberfläche) ist das Resultat identisch mit Gl.(4.6) (siehe Anhang II).

IV-4.3 Bindung von Liganden an geladene Oberflächen in Elektrolyten

Um die Bindung von peripheren Proteinen an Lipidmembranen beschreiben zu können, soll ein Ausdruck für $\Delta F_{el}(i)$ hergeleitet werden, der die Wechselwirkung zwischen geladenen Liganden und einer geladenen Oberfläche beschreibt. Betrachtet werde folgende Bindungsreaktion:



Dabei sei A_0 die gesamte Oberfläche in Abwesenheit von Liganden und A_i sei eine Oberfläche in Gegenwart von i gebundenen Liganden (L). Die freie Energie ΔF_{el} ist nun definiert durch

$$\Delta F_{el}(i) = F_{el}(i) - i \cdot F_{el}^L - F_{el}(0) \quad ,$$

wobei $\Delta F_{el}(i)$ der Gewinn an freier elektrostatischer Energie beim Binden von i Liganden an eine geladene Oberfläche ist, während $F_{el}(i)$ die freie elektrostatische Energie einer Oberfläche mit i gebundenen Liganden, $F_{el}(0)$ diejenige der freien Oberfläche und F_{el}^L die freie elektrostatische Energie eines ungebundenen Liganden ist.

$\Delta F_{el}(i)$ ist eine Funktion der Ionenstärke des wäßrigen Mediums, in dem die Bindungsreaktion stattfindet.

IV-4.3.1 Elektrostatische freie Energie von Liganden in Lösung

Um das Problem zu vereinfachen, soll angenommen werden, daß der Ligand eine sphärische Geometrie aufweist und daß die Ladung gleichmäßig über seine Oberfläche verteilt ist.

Die elektrostatische Selbstenergie F_{el}^L eines solchen freien Liganden in einer Elektrolytlösung ist

$$F_{el}(L) = \frac{Z^2 \cdot e^2}{2 \cdot \varepsilon \cdot r_0 \cdot (1 + \kappa \cdot r_0)} \quad , \quad (4.7)$$

unter Annahme des Radius r_0 eines Liganden, der von Lösungsmittel nicht durchdrungen werden kann und eine Ladung von $Z \cdot e^+$ (oder $Z \cdot e^-$) gleichmäßig über seine Oberfläche verteilt hat (Tanford, 1955, Rice & Nagasawa, 1961). κ ist das Inverse der Debye-Länge λ , definiert durch

$$\kappa \left[\frac{1}{cm} \right] = \frac{1}{\lambda} = \sqrt{\frac{8 \cdot \pi \cdot e^2 \cdot N_A}{\varepsilon \cdot k \cdot 10^3}} \cdot \sqrt{\frac{c}{T}} = 5.624 \cdot 10^8 \cdot \sqrt{\frac{c}{T}} \quad ,$$

wobei $e = 4.803 \cdot 10^{-10}$ (esu) die Elementarladung, N_A die Avogadro'sche Zahl und $\varepsilon = 80$ die Dielektrizitätskonstante von Wasser ist. T gibt die Temperatur in Kelvin, c die molare Konzentration monovalenter Ionen und $k = 1.38 \cdot 10^{-16}$ erg/deg die Boltzmannkonstante wieder (Träuble et al., 1976).

Es ist unter Verwendung einer Taylorschen Reihenentwicklung leicht zu zeigen, daß zwischen einer Konzentration monovalenter Ionen von $c = 1$ mM und $c = 250$ mM (bei einem Radius des

Liganden von $r_0 = 15\text{\AA}$ (wie Cytochrom c) entspricht dies der Bedingungen $2.5 \geq \kappa \cdot r_0 \geq 0.16$), Gleichung (4.7) durch

$$F_{el}(L) = \frac{Z^2 \cdot e^2}{4 \cdot \epsilon \cdot r_0} \cdot \left(1 - \frac{1}{2} \cdot \ln(\kappa \cdot r_0)\right) \equiv k \cdot T \cdot Z^2 \cdot \Lambda_2 \cdot (1 - \ln(\kappa \cdot r_0)) \quad (4.8)$$

angenähert werden kann, mit $\Lambda_2 = e^2/4 \cdot \epsilon \cdot r_0 \cdot k \cdot T = 34.826/T = 0.126$ bei $T = 277\text{K}$.

IV-4.3.2 Elektrostatische freie Energie von geladenen Oberflächen

In Analogie zum einzelnen Liganden soll nun angenommen werden, daß die Ladungen auf der Oberfläche gleichmäßig verteilt sind. Die Wirkung der Bindung von geladenen Liganden an die Oberfläche soll darin bestehen, die Gesamtladung der Oberfläche zu verringern.

Um die freie elektrostatische Energie zu bestimmen, soll angenommen werden, daß die Oberfläche eine Ladungsdichte aufweist, die α Ladungen pro Liganden-Querschnitt ΔA entspricht, d.h. $\alpha \cdot n$ Ladungen pro gesamter Oberfläche A_0 . Jeder Ligand trage eine Ladung $Z \cdot e$ entgegengesetzten Vorzeichens. Bei der Bindung von i Liganden an die Oberfläche A_0 wird die Ladungsdichte reduziert zu

$$\sigma = \frac{q}{A_0} = -\frac{(n \cdot \alpha - i \cdot Z)}{A_0} \cdot e \quad , \quad (4.9)$$

wobei $q = -(n \cdot \alpha - i \cdot Z) \cdot e$ die Gesamtladung der Oberfläche unter der Annahme ist, daß Ligand und freie Oberfläche Ladungen unterschiedlichen Vorzeichens tragen.

F.Jähnig (1976) leitete für die freie Helmholtzsche Energie einer Oberfläche in einer elektrolytischen Umgebung mit monovalenten Ionen unter Benutzung der Gouy - Chapman Theorie (siehe z.B. Aveyard & Haydon, 1973; Träuble et al., 1976) folgenden Ausdruck in der sogenannten Hochpotential-Näherung ($\sinh^{-1}(x) \approx \ln(2x)$) her:

$$F_{el} = -2 \cdot q \cdot \left(\frac{k \cdot T}{e}\right) \cdot \ln\left(-\frac{\Lambda_0 \cdot \sigma}{\sqrt{c}}\right) \quad . \quad (4.10)$$

Dabei wurde die Gesamtladung der Oberfläche, q , die Konzentration monovalenter Ionen, c , und die Konstante $\Lambda_0 = (2 \cdot \epsilon \cdot k \cdot T / \pi)^{-0.5} \cdot (N_A / 1000)^{-0.5} = 4.86 \cdot 10^{-4} \cdot T^{-0.5} = 2.92 \cdot 10^{-5}$ bei $T = 277\text{K}$ (Träuble et al., 1976) verwendet.

Aus den Gleichungen (4.9) und (4.10) erhält man

$$\mathbf{F}_{el}(i) = 2 \cdot (n \cdot \alpha - i \cdot Z) \cdot k \cdot T \cdot \ln \left(\frac{(n \cdot \alpha - i \cdot Z)}{n \cdot \alpha} \cdot \frac{\Lambda_1}{\sqrt{c}} \right) \quad , \quad (4.11)$$

wobei $\Lambda_1 = \Lambda_0 \cdot e / f_0 = 1.71$ bei einer Fläche von $f_0 = 82 \text{ \AA}^2$ pro Oberflächenladung (dies entspricht einem Lipidquerschnitt in einer flüssig kristallinen Membran, siehe unten). Die Hochpotential-Näherung ist immer dann anwendbar, wenn gilt $\sinh^{-1}(x) (= \ln(2 \cdot x) + 1/4x^2 - 3/32x^4 + \dots) \approx \ln(2 \cdot x)$ (Abramowitz & Stegun, 1965). Dies ist in Gl.(4.11) immer dann eine gute Näherung, wenn $x > 2$, und deshalb dann, wenn gilt

$$x = \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{(n \cdot \alpha - i \cdot Z)}{n \cdot \alpha} \cdot \frac{\Lambda_1}{\sqrt{c}} \right) > 2 \quad .$$

In den hier berichteten Experimenten war die Salzkonzentration immer kleiner als $c = 250 \text{ mM}$. Wenn $Z = 4.232$ und $\alpha = 12$ (siehe Resultate, unten) muß deshalb für die ganze Isotherme die Bedingung $\theta < 0.16$ gelten. Bei $c = 4 \text{ mM}$ muß entsprechend gelten $\theta < 2.4$. Wie im Resultate-Teil gezeigt wird, sind diese Bedingungen für die hier vorgestellten Experimente immer erfüllt.

IV-4.3.3 Elektrostatische freie Energie der Bindung von Liganden an Oberflächen

Aus den Gleichungen (4.8) und (4.11) folgt, daß die gesamte Änderung der freien Energie, $\Delta F_{el}(i)$ durch

$$\Delta \mathbf{F}_{el}(i) = kT \cdot \left[2(n\alpha - iZ) \cdot \ln \left(\frac{(n\alpha - iZ)}{n\alpha} \right) - 2iZ \cdot \ln \left(\frac{\Lambda_1}{\sqrt{c}} \right) - i\Lambda_2 Z^2 - i\Lambda_2 Z^2 \cdot \ln \left(\frac{\Lambda_3}{\sqrt{c}} \right) \right] \quad (4.12)$$

gegeben ist, wobei die Konstante Λ_3 bei Wahl eines Ligandenradius' $r_0 = 15\text{\AA}$ (dem Radius des Proteins Cytochrom c) und $T = 277\text{K}$ durch $\Lambda_3 = c^{0.5}/\kappa \cdot r_0 = 0.197$ gegeben ist. Die Bindung des ersten Liganden ist mit der freien Energieänderung

$$\Delta F_{el}(1) = k \cdot T \cdot \left(-2 \cdot Z - 2 \cdot Z \cdot \ln\left(\frac{\Lambda_1}{\sqrt{c}}\right) - \Lambda_2 \cdot Z^2 - \frac{\Lambda_2}{2} \cdot Z^2 \cdot \ln\left(\frac{\Lambda_3}{\sqrt{c}}\right) \right) \quad (4.13)$$

verbunden, mit deren Hilfe man die intrinsische Bindungskonstante $K_0 \equiv K(1)$ des ersten bindenden Liganden bestimmen kann:

$$K_0 = K^0 \cdot \exp\left(-\frac{\Delta F_{el}(A_1)}{k \cdot T}\right) = K^0 \cdot \left(\frac{\Lambda_1}{\sqrt{c}}\right)^{2 \cdot Z} \cdot e^{2 \cdot Z} \cdot e^{\Lambda_2 \cdot Z^2} \cdot \left(\frac{\Lambda_3}{\sqrt{c}}\right)^{\frac{\Lambda_2 \cdot Z^2}{2}}. \quad (4.14)$$

Entsprechend lässt sich für die Bindung von i Liganden eine (pro Ligand definierte) Bindungskonstante $K(i)$ errechnen:

$$K(i) = K_0 \cdot \left(\frac{(n \cdot \alpha - i \cdot Z)}{n \cdot \alpha}\right)^{-2 \cdot \frac{(n \cdot \alpha - i \cdot Z)}{i}} \cdot e^{-2 \cdot Z} \equiv K_0 \cdot \left(1 - \theta \cdot \frac{Z}{\alpha}\right)^{-2 \cdot \left(\frac{\alpha}{\theta} - Z\right)} \cdot e^{-2 \cdot Z}. \quad (4.15)$$

Dabei ist $K_0 = K_0(c)$ von der Ionenstärke der Elektrolytlösung und von der effektiven Ladung des Liganden abhängig. Die Ausdrücke in Gl.(4.14) und (4.15) beschreiben dabei nicht nur die freie Energie einer Ladung in einem gegebenen Potential, sondern zudem die Veränderung dieses Potentials durch die Bindung des Liganden und die damit verknüpfte Veränderung der freien Energie der elektrischen Doppelschicht. Es ist offensichtlich, daß aus (4.14)

$$\begin{aligned} \ln(K_0) &= \ln(K^0) + 2 \cdot Z \cdot (\ln \Lambda_1 + 1) + \Lambda_2 \cdot Z^2 \cdot \left(1 + \frac{\ln(\Lambda_3)}{2}\right) - \left(Z + \frac{\Lambda_2 \cdot Z^2}{4}\right) \cdot \ln(c) \\ &= \text{const.} - \left(Z + 0.0315 \cdot Z^2\right) \cdot \ln(c) \quad (\text{bei } T = 277\text{K}) \end{aligned} \quad (4.16)$$

folgt, d.h. ein linearer Zusammenhang zwischen der intrinsischen Bindungskonstante K_0 und der Ionenstärke c in einer doppelt logarithmischen Auftragung, aus deren Steigung sich die effektive Ladung des Liganden experimentell bestimmen läßt.

Mit Hilfe von Gl.(4.3), (4.6) und (4.15) kann man nun sofort die Form der Bindungsisotherme der Wechselwirkung von geladenen Liganden mit einer geladenen Oberfläche entgegengesetzter Ladung bestimmen:

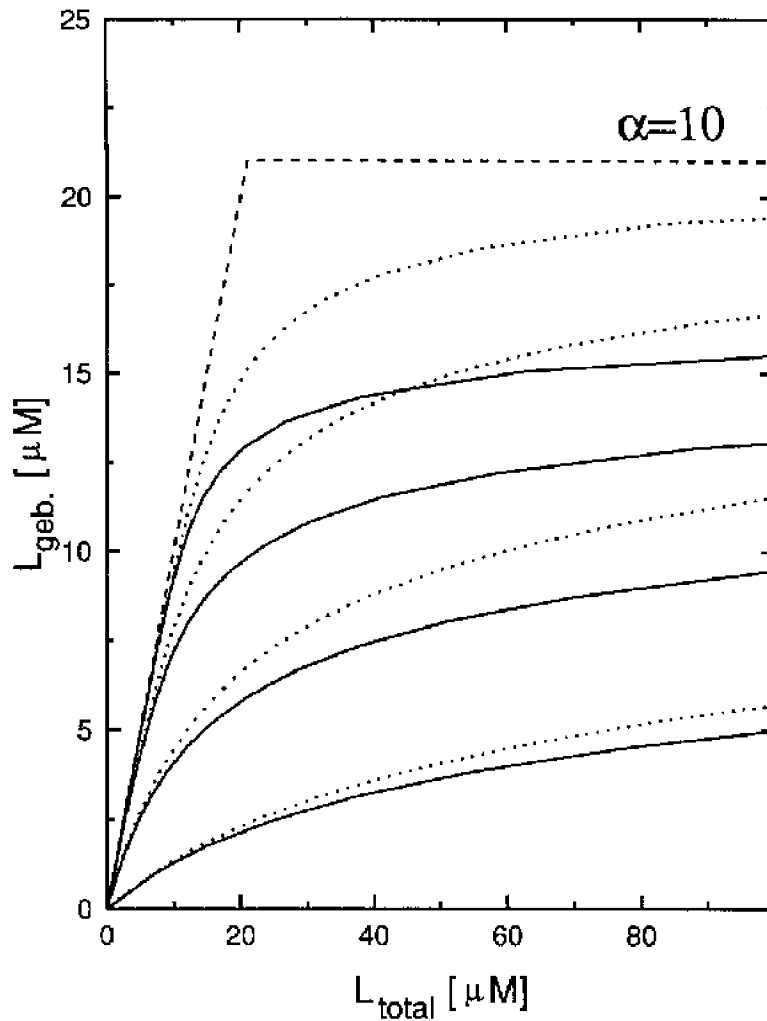


Abb. IV-1

Errechnete Isothermen von Liganden an geladene Lipidoberflächen bei verschiedenen intrinsischen Bindungskonstanten (durchgezogene Kurven, in aufsteigender Ordnung: $K_0=10^3$ l/ml, $K_0=10^4$ l/ml, $K_0=10^5$ l/ml und $K_0=10^6$ l/ml monovalentes Lipid), bestimmt für eine kontinuierliche Oberfläche aus Gl. (4.17). Die gestrichelten Kurven stellen die Isothermen unter Verwendung lokalisierter Bindungsplätze (Langmuir-Typ) dar. Die Zahl der Lipide pro Ligandenquerschnitt wurde als $\alpha=10$ angenommen und die effektive Ladung als $Z=4$. Die gesamte Lipidkonzentration war $238 \mu\text{M}$. Die Betrachtung der kontinuierlichen Oberfläche berücksichtigt die Entropie der Ligandenverteilung in adäquater Weise.

$$[L] = \frac{1}{K_0} \cdot \frac{\theta}{1-\theta} \cdot \exp\left(\frac{\theta}{1-\theta} - 2 \cdot b' \cdot \theta\right) \cdot \left(1 - \theta \cdot \frac{Z}{\alpha}\right)^{-2 \cdot Z} \quad (4.17)$$

Diese einfache Form der Isotherme wird im anschließenden experimentellen Teil zum Beschreiben der gemessenen Bindungsisothermen verwendet. Sie enthält vier Parameter, K_0 , Z , α und b' . Gemäß Gl.(4.16) können K_0 und Z experimentell bestimmt werden. α ist die

Zahl der Ladungen auf der Fläche des Bindungsplatzes eines Liganden. Untersucht man Komplexe aus Lipiden und Proteinen, ergibt sich diese Zahl aus der Größe der betrachteten Moleküle, die sich für Proteine aus kristallographischen Daten und für Lipide errechnen läßt (für Dioleoyl-Phosphatidylcholin im lamellaren, flüssig kristallinen Zustand sind dies 70 - 82Å pro Lipid (Gruner et al., 1988; Lis et al., 1982)). Nur der Parameter b' kann nicht unabhängig experimentell bestimmt werden. Im Fall von Liganden, die nicht direkt durch nicht-elektrostatische Wechselwirkungen miteinander wechselwirken kann $b' = 0$ gesetzt werden.

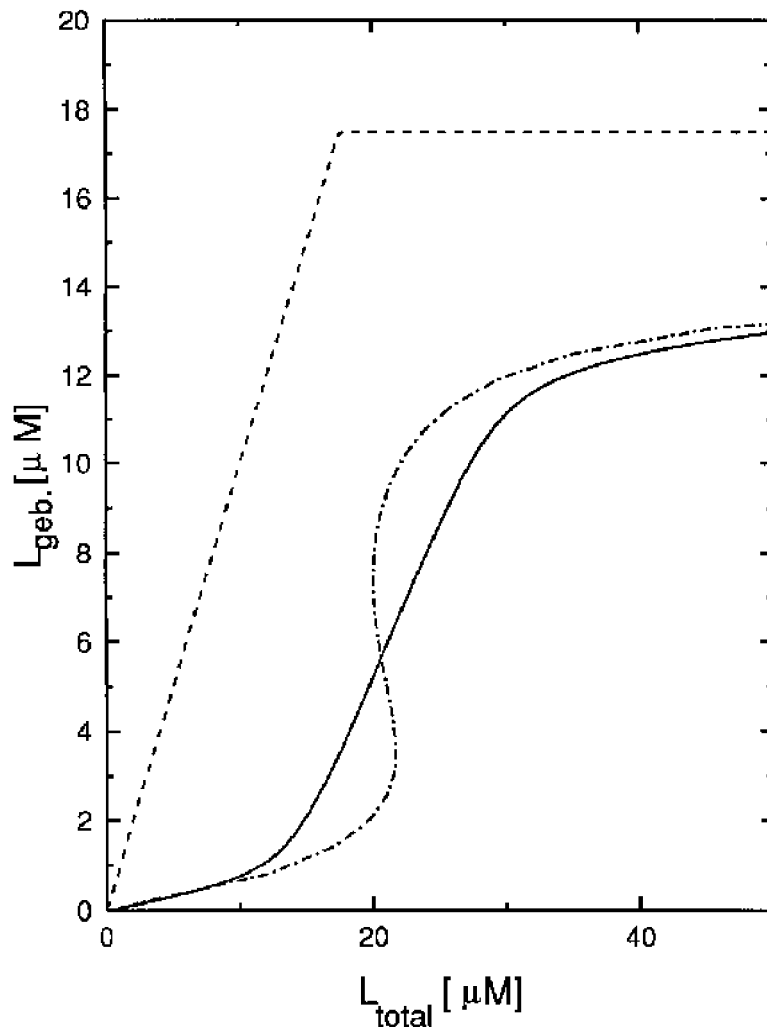


Abb. IV-2

Errechnete Bindungsisothermen von Liganden an einer Membran geladener Lipide in Gegenwart einer attraktiven Wechselwirkung zwischen den gebundenen Liganden gemäß Gl.(4.17) (gestrichelte Kurve). Diese Beschreibung führt nicht im ganzen Bereich der Ligandenkonzentration zu eindeutigen Lösungen. Einsetzen von (4.5) und (4.15) in (4.2) ergibt die richtige Beschreibung (durchgezogene Kurve), da eine Koexistenz von aggregierten und monomeren Liganden auf der Oberfläche mitberücksichtigt wird. Verwendet wurden folgende Parameter: $K_0 = 250$ l/mol, $b' = -6$, $Z = 4.232$ und eine Lipidkonzentration von $238 \mu\text{M}$.

Ein wichtiges Resultat ist an diesem Punkt, daß der entropische Teil der freien Energie der Ligandenverteilung,

$$S = - \left. \frac{d(F_D)}{dT} \right|_{n=\text{const}} \equiv - \left. \frac{d(\Delta W(i))}{dT} \right|_{n=\text{const}} = i \cdot k \cdot \ln(n-i), \quad ,$$

nicht vernachlässigt werden kann (vgl. Gl.(4.5)). In Abb. IV-1 wurde das Verhalten von den in Gl.(4.17) definierten Bindungsisothermen bei verschiedenen intrinsischen Bindungskonstanten K_0 dargestellt (durchgezogene Linien), und mit den entsprechenden Isothermen eines Systems mit wohldefinierten, unabhängigen Bindungsplätzen (Langmuir-Isothermen, gestrichelte Linie) verglichen, die sich aus Gl.(4.17) unter Vernachlässigung des exponentiellen Terms ergeben. Es ist offensichtlich, daß das Erreichen der Sättigung der Oberfläche in beiden Fällen einen sehr unterschiedlichen funktionalen Verlauf nimmt. Insbesondere bei hohen Graden der Sättigung wird das weitere Binden von Liganden stark unterdrückt, was zu einer vermeintlichen Sättigung weit unterhalb der vollständigen Bedeckung der Oberfläche führt, die stark von der intrinsischen Bindungskonstante abhängt. Wenn man experimentell erhaltene Bindungsisothermen untersucht, muß man deshalb vorsichtig sein, die vermeintliche Sättigung mit der vollständigen Bedeckung der Oberfläche nicht zu verwechseln.

Es muß an diesem Punkt unterstrichen werden, daß in der Abwesenheit von direkten Wechselwirkungen zwischen den Liganden der Beitrag $\Delta W(i)$ ein rein entropischer Term ist, der nicht von der Temperatur abhängt und deshalb auch nicht von der Fähigkeit der Liganden, sich frei auf der Oberfläche zu bewegen (d.h. unabhängig von der Diffusionskonstanten). Die einzige Annahme ist, daß die Verteilung der Liganden statistisch ist.

Ein zusätzlicher enthalpischer Term, hervorgerufen durch repulsive Kräfte zwischen individuellen Liganden (zum Beispiel durch Kontakt der Hydratationshüllen von Liganden) und einen positiven Wert für b' würde die Abhängigkeit der vermeintlichen Sättigung von der intrinsischen Bindungskonstante noch erhöhen. Attraktive Kräfte, die zu einer Dimerisierung oder Aggregation von Liganden auf der Oberfläche führen, setzten einen negativen Wert für b' voraus und resultieren in einem zweiphasigen Verhalten der Bindungsisothermen. Wie schon in Abschnitt IV-4.1 erwähnt wurde, kann die Bindungsisotherme im Fall von Aggregationsgleichgewichten nicht auf die einfache Form (4.3) gebracht werden.

Die gestrichelte Linie in Abb. IV-2 zeigt die Isotherme, die mit Gl.(4.17) erhalten wurde, während die durchgezogene Linie durch Einsetzen von Gl.(4.5) und Gl.(4.15) in Gl.(4.2) erhalten wurde, was die offensichtlich adäquate Behandlung im Falle von Aggregationsgleichgewichten ist. Aus praktischen Gründen wurde über $n = 30$ verschiedene Zustände summiert. Eine größere Zahl würde zu geringfügig genaueren Werten und zur vollständigen Überlappung der beiden Beschreibungen in den extremen Bereichen geringer und

hoher Bedeckung der Oberfläche führen. In diesen Bereichen existiert jeweils nur ein Aggregatzustand der Liganden auf der Oberfläche (monomer oder aggregiert). Im dazwischenliegenden Bereich führt Gl.(4.17) jedoch nicht zu einer eindeutigen Lösung.

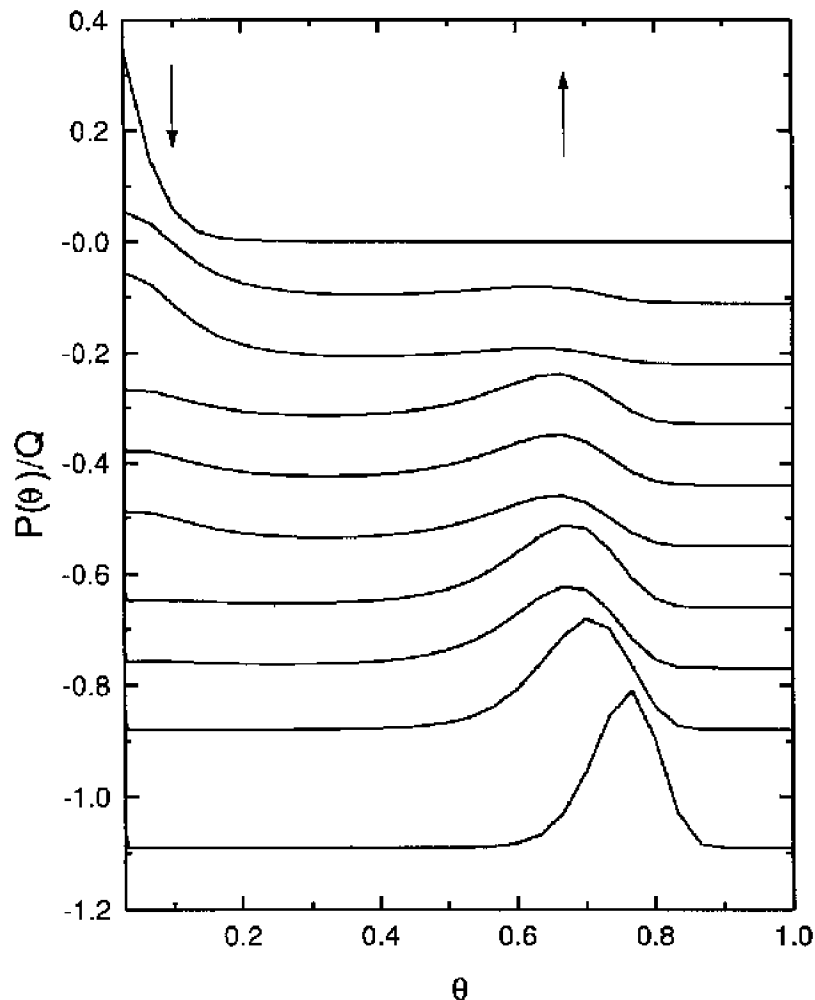


Abb.IV-3

Verteilung der Zustandskoeffizienten $P(\theta)/Q$ der Isotherme aus Abb. IV-2 bei zunehmender totaler Ligandenkonzentration (von oben nach unten), errechnet unter Verwendung der in Abb.IV-2 gegebenen Parameter. Während bei niedrigen und hohen Konzentrationen des Liganden nur ein Maximum der Verteilung existiert, erkennt man zwei Maxima in intermediären Bereich, was der Koexistenz einer monomeren und einer aggregierten Ligandenphase auf der Oberfläche entspricht.

In Abb. IV-3 sind die Verteilungskoeffizienten P_i/Q als Funktion des Bedeckungsgrades der Oberfläche und der freien Ligandenkonzentration wiedergegeben, die unter Verwendung der Parameter aus Fig.IV-2 bestimmt wurden und in denen die Koexistenz zweier Zustände auf der Oberfläche deutlich zu erkennen ist.

IV-5 RESULTATE UND DISKUSSION

IV-5.1 Bindungsisothermen aus Ultrazentrifugation

Die Bindung des peripheren Proteins Cytochrom c an Dioleoyl-Phosphatidyl-glycerol(DOPG)-Membranen wurde in weiten Bereichen der Ionenstärke untersucht und durch die Gleichungen (4.16) und (4.17) beschrieben. Die Resultate wurden mit denjenigen von DOPG-Komplexen mit denaturiertem Cytochrom c verglichen. Cytochrom c weist die Eigenschaft auf, in Kontakt mit geladenen Oberflächen seine Denaturierungstemperatur beträchtlich, von 83 °C auf ca. 50 - 55 °C, zu erniedrigen (Muga et al.,1991; siehe auch Kap. III). Bei der Denaturierung von Cytochrom c auf Oberflächen erscheinen bei 1616 und 1685 cm⁻¹ zusätzliche Banden in der Amid-I-Region des Infrarotspektrums. Sie wurden von Muga et al. (1991) intermolekularen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinmolekülen zugeordnet, die durch Aggregation hervorgerufen werden (siehe Kap.III). Man erwartet deshalb einen negativen Wert für den Parameter b' in Gl.(4.17). In dieser Arbeit wurde auf der Lipidoberfläche denaturiertes Cytochrom c erzeugt, indem die Lipid-Proteinkomplexe bei 65 °C inkubiert wurden. Das ungebundene Protein verbleibt dabei in seiner nativen Form. In diesem System kann die Gültigkeit der oben hergeleiteten Isothermen im Fall attraktiver Wechselwirkungen zwischen gebundenen Liganden studiert werden. Die Bindungskonstanten K₀ wurden durch Veränderung der Ionenstärke variiert. Die Werte der intrinsischen Bindungskonstanten K₀ können aus der Steigung der Isothermen bei sehr kleinen Sättigungsgraden bestimmt werden, da die Isotherme aus Gl.(4.17) in diesem Bereich die einfache Form K₀ = θ/[L] annimmt (θ<<1).

Wegen Gl.(4.16) gilt, daß die intrinsische Bindungskonstante von der Ionenstärke abhängt. Eine niedrigere Ionenstärke resultiert in einer stärkeren Bindung. Intrinsische Bindungskonstanten wurden experimentell bei Lipidkonzentrationen von 238 µM bei hohen Ionenstärken und bei 23.8 µM bei niedrigeren Ionenstärken bestimmt. In Abb. IV-4 werden die intrinsischen Bindungskonstanten von nativem (○) und denaturiertem Cytochrom c (●) in Einheiten der Lipidkonzentration in einem doppelt logarithmischen Plot gegen die Ionenstärke aufgetragen. Innerhalb der Meßfehler erhält man jeweils lineare Kurven, wie von Gl.(4.16) gefordert, die für das native Protein zu der numerischen Beziehung

$$K_0 = \alpha \cdot 0.273 \cdot \left(\frac{c}{c_0} \right)^{-4.232} \frac{l}{mol} \quad (4.18a)$$

führt. Der Beitrag des gelösten Liganden ist bei diesen Werten klein und wurde in den folgenden Rechnungen vernachlässigt. Es folgt gemäß Gl.(4.16) für die effektive Ladung des Proteins $Z \approx 4.232$.

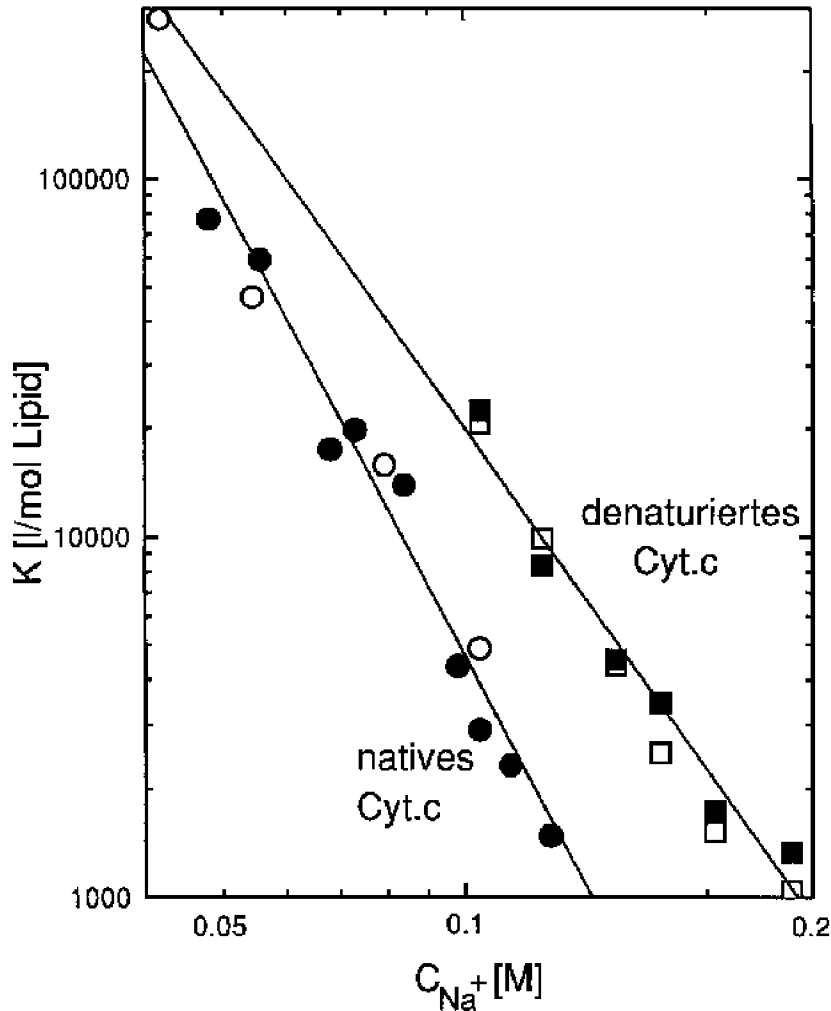


Abb.IV-4

Doppelt logarithmische Auftragung der intrinsischen Bindungskonstanten K_0 der Bindung von Cytochrom c an DOPG-Membranen als Funktion der Salzkonzentration c . Sie wurden aus den Anfangssteigungen der Isothermen bei Konzentrationen von $c > 40 \text{ mM Na}^+$ (●,■) und aus den besten Anpassungen in Abb. IV-5a,b (○,□) bestimmt. Kreise symbolisieren die Bindung von nativen Cytochrom C, Rechtecke die Bindung von denaturiertem Cytochrom C an $238 \mu\text{M}$ DOPG-Membranen. Diese Kurve verdeutlicht die lineare Beziehung aus Gl. (4.16) Die Steigung dieser Kurve steht in direkter Beziehung zur effektiven Ladung Z .

Entsprechend erhält man für das denaturierte Protein:

$$K_0 = \alpha \cdot 14.216 \cdot \left(\frac{c}{c_0} \right)^{-3.165} \frac{l}{mol}, \quad (4.18b)$$

woraus $Z \approx 3.165$ folgt. Der Faktor α in (4.18a) und (4.18b) reskaliert die Bindungskonstante relativ auf einen Bindungsplatz mit α Lipiden, so wie dies in Gl.(4.17) verwendet wird. c ist die Na^+ - Konzentration und $c_0 = 1 \text{ mol/l}$.

Die effektive Ladung des denaturierten Proteins scheint etwas niedriger zu sein als diejenige des nativen Proteins. Nichtsdestotrotz ist K_0 für das oberflächen-denaturierte Protein in dem untersuchten Intervall der Ionenstärke wesentlich größer. Dies bedeutet, daß zusätzliche, nichtelektrostatische Effekte zur Bindungskonstante beitragen, die zu unterschiedlichen K^0 - Werten führen, möglicherweise hervorgerufen durch einen Kontakt des denaturierten Proteins mit dem hydrophoben Kern der Lipidmembran. Aus Gl.(4.18a, b) folgt $K^0 = 1.06 \cdot 10^{-4} \text{ l/mol}$ für das native und $K^0 = 4.79 \cdot 10^{-2} \text{ l/mol}$ für das denaturierte Protein. Daraus kann man schließen, daß der nichtelektrostatische Beitrag zur freien Energie der Bindungskonstante für das denaturierte Cytochrom c um ca. -3.67 kcal/mol günstiger ist als für den Lipidkomplex mit dem nativen Protein.

Die Primärstruktur von Pferdeherz-Cytochrom c (Sober, 1986) enthält 19 Lysin-, 1 Arginin-, 12 Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Seitengruppen. Das ergibt ohne Berücksichtigung der Hämgruppe des Proteins eine Nettoladung von 9 positiven Ladungen. Dies ist eine wesentlich größerer Wert als die aus Gl.(4.18a,b) erhaltenen Werte für die effektive Ladung Z von 3.1 - 4.2. Ähnliche Beobachtungen sind schon früher von Kuchinka und Seelig (1989) und Schwarz und Beschiaschvili (1989) für das Bienengiftprotein Mellitin gemacht worden, bei dem die aus der Aminosäuresequenz erwartete Ladung $+6$ beträgt, während die experimentell bestimmte effektive Ladung $Z = 1.8 - 2.2$ ist. Stankowski versuchte 1991 unter Verwendung eines Modells mit nicht-lokalen Bindungsplätzen, die zu niedrige effektive Ladung auf elektrostatische Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen. Seine Vorhersagen für die "effektive" Ladung von Mellitin waren in derselben Größenordnung wie die experimentell gefundenen Werte. Andererseits muß ein geladener Ligand in Lösung nicht notwendigerweise vollständig dissoziieren. Manning (1978) fand für eindimensionale Systeme (DNA), daß die Dissoziation von Ladungen nicht vollständig erfolgt, wenn die dissoziierbaren Gruppen näher als $7 \text{ \AA}$ auf der linearen Achse voneinander entfernt sind. Auf Cytochrom c beträgt die mittlere Entfernung zwischen Ladungen $19 \text{ \AA}$. Im Gegensatz zu DNA weisen sie aber Nachbarladungen in zwei (oder drei) Dimensionen auf, und sind zudem zumindest teilweise durch den hydrophoben Kern des Proteins voneinander getrennt, der eine niedrige Dielektrizitätskonstante aufweist, was dazu führt, daß elektrostatische Felder über größere Entfernungen propagieren. Dasselbe Argument trifft auch auf die geladene Lipidmembran zu, in der der mittlere (eindimensionale) Abstand zwischen Ladungen ca. $4.5 \text{ \AA}$ beträgt. Tatsächlich ist bei niedrigen Ionenstärken die Dissoziation der Gegenionen der Lipide geladener Membranen nicht vollständig (Lindblom et al., 1991).

Eine weitere Erklärung für die niedrige effektive Ladung kann sein, daß die Debye-Länge bei Ionenstärken von über 40 mM immer kleiner als 15Å ist, was weniger als der halbe Radius von Cytochrom c ist (Dickerson et al, 1971). Dies kann bedeuten, daß die Membranoberfläche nur mit Ladungen auf der dem Lipid zugewandten Seite des Proteins interagiert. In diesem Falle sollte die effektive Ladung bei niedrigen Ionenstärken jedoch größer als 4.232 sein.

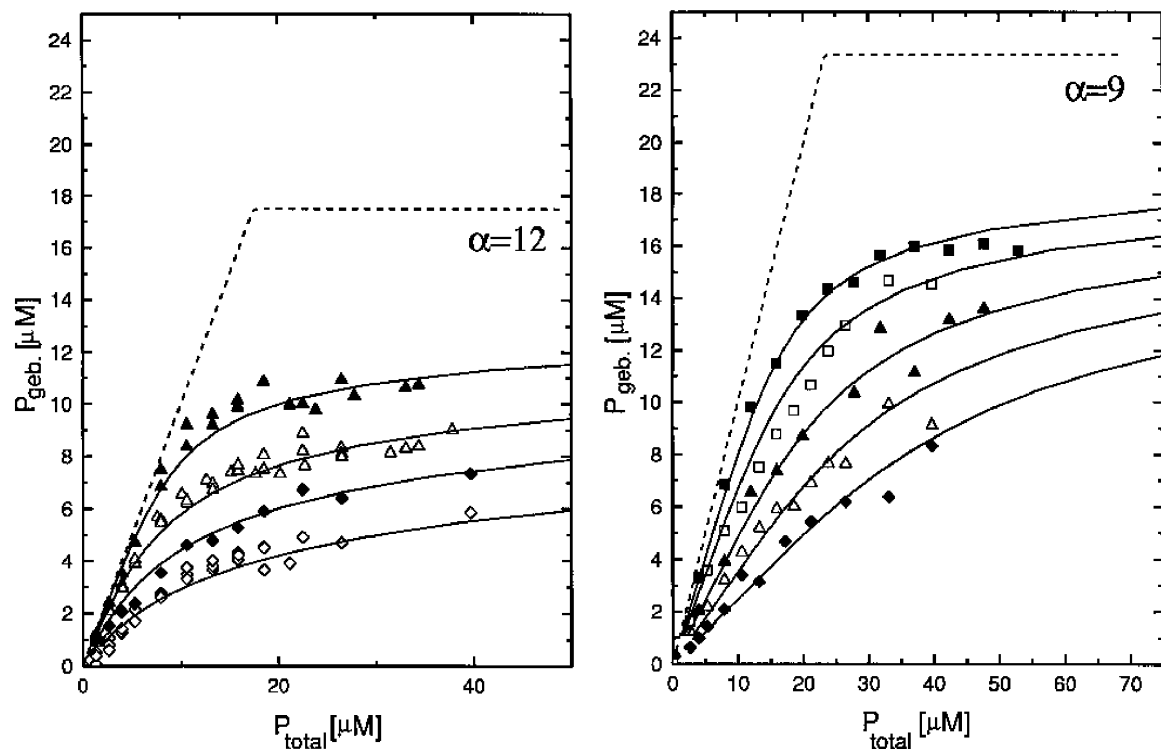


Abb. IV-5

a: Bindungsisothermen von nativen Cytochrome c an 238μM DOPG-Dispersionen bei hohen Ionenstärken: 42mM Na⁺ (▲), 54.4mM Na⁺ (Δ), 79.4 mM Na⁺ (◆), 104.4mM Na⁺ (◻). Anpassungen (durchgezogene Kurven) wurden mithilfe von Gl.(4.17) unter der Verwendung der effektiven Ladung $Z=4.232$ (bestimmt aus Abb. IV-4), der Lipidstoichiometrie $\alpha=12$ und $b'=0$ durchgeführt. Die verwendeten intrinsischen Bindungskonstanten K_0 sind in Einklang mit Gl.(4.18) und sind in Abb. IV-4 wiedergegeben. Die gestrichelte Linie gibt den Grenzfall vollständiger Bindung alles zugegebenen Proteins wieder.

b. Bindungsisothermen von oberflächendenaturiertem Cytochrom c an 238μM DOPG-Dispersionen bei hohen Ionenstärken: 104.4mM Na⁺ (■), 125mM Na⁺ (◻), 154.4mM Na⁺ (▲), 175mM Na⁺ (Δ) und 204.4mM Na⁺ (◆). Anpassungen (durchgezogene Kurven) wurden mithilfe von Gl.(4.17) unter der Verwendung der effektiven Ladung $Z=3.165$ (bestimmt aus Abb. IV-4), der Lipidstoichiometrie $\alpha=9$ und $b'=-2.4$ durchgeführt. Die verwendeten intrinsischen Bindungskonstanten K_0 sind in Einklang mit Gl.(4.18) und sind in Abb. IV-4 wiedergegeben. Die gestrichelte Linie gibt den Grenzfall vollständiger Bindung alles zugegebenen wieder.

Abb. IV-5a zeigt die experimentell bestimmten Isothermen der Bindung von nativem Cytochrom c an DOPG bei vier verschiedenen Na⁺-Konzentrationen (41.9 mM, 54.4 mM,

79.4 und 104.4) in dem Bereich, in dem auch die intrinsischen Bindungskonstanten K_0 direkt bestimmt wurden. Gemäß Dickerson et al. (1971) kann die Form von Cytochrom c in guter Näherung durch ein Prolat mit den Dimensionen (30 x 34 x 34 [Å]) beschrieben werden. Dies entspricht bei planar dichtester Packung einer Fläche von 890 - 1000 Å² pro Cytochrom c-Molekül. Die Fläche pro Lipid wird mit 70 - 82 Å² angenommen, was die Fläche eines flüssig-kristallinen Dioleoyl-Phosphatidylcholin (DOPC)-Moleküls in einer Membran ist (Gruner et al., 1988; Lis et al., 1982). DOPG trägt eine Ladung pro Lipid. Deshalb ist der Parameter α identisch mit der Lipid/Proteinstoichiometrie und beträgt $\alpha = 11 - 14$ Lipide pro Protein, in ungefähre Übereinstimmung mit Werten von Görrissen & Marsh (1986), die für die Bindung von Cytochrom c an DMPG $\alpha = 9$ erhielten, und mit Kapitel II ($\alpha = 10$).

Unter Verwendung der in Gl.(4.18a) gewonnenen Werte für die effektive Ladung, und einer Stoichiometrie von $\alpha = 12$ (in Übereinstimmung mit den Dimensionen von Lipiden und Proteinen) und einem Wechselwirkungsterm $b' = 0$ (in Abwesenheit von Wechselwirkungen zwischen den Liganden) wurden die Isothermen in Abb. IV-5a unter Variation der intrinsischen Bindungskonstante K_0 errechnet (durchgezogene Linien). Gute Anpassungen können erreicht werden. Die verwendeten Werte für K_0 wurden in Abb. IV-4 eingefügt (○) und sind in guter Übereinstimmung mit dem linearen Verhalten der aus den Steigungen unabhängig gewonnenen Werte (Gl.(4.18a)). Die Anpassungen sind somit selbstkonsistent und enthalten keinen (!) Parameter mehr, der nicht unabhängig bestimmbar wäre.

Im Falle des oberflächen-denaturierten Cytochrom c sollte der Wechselwirkungsparameter $b' < 0$ sein, da mit einiger Wahrscheinlichkeit Aggregation auf der Oberfläche stattfindet. Abb. IV-5b gibt die experimentell gewonnenen Isothermen bei Na⁺-Konzentrationen von c = 104.4 mM, 125 mM, 154.4 mM und 204.4 mM wieder. Sie unterscheiden sich in ihrer Form im Verlauf von den Isothermen des nativen Proteins (Abb. IV-5a). Im Gegensatz zum nativen Protein, wo bei hinreichend hohen Graden von Bedeckung der Membran weitere Bindung stark behindert wird, wächst der Grad der Membranbedeckung auch bei höheren Konzentrationen der gesamten Proteinkonzentration weiter an. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine Aggregation der Proteine auf der Oberfläche. Die besten Anpassungen (durchgezogene Linien in Abb. IV-5b) wurden unter Annahme einer Lipid/Protein-stoichiometrie von $\alpha = 9$ gewonnen, was leicht unterhalb der Stoichiometrie des nativen Proteins liegt. Dies ist plausibel, wenn man annimmt, dass das Protein globular bleibt, aber teilweise in die Membran integriert, wie dies weiter oben schon aus den hohen Werten für die intrinsische Bindungskonstante geschlossen wurde. Der Interaktionsparameter wurde $b' = -2.4$ gesetzt, was die Tendenz des Proteins widerspiegelt, Aggregate auf der Oberfläche zu bilden. Die für die Anpassung verwendeten intrinsischen Bindungskonstanten K_0 sind in Abb. IV-4 (□) eingefügt und sind wiederum in Übereinstimmung mit den unabhängig bestimmten Werten, die durch Gl.(4.18b) beschrieben

werden. Auch die Beschreibung der Isothermen des denaturierten Cytochrom c ist deshalb selbstkonsistent.

Die analytische Form der Bindungsisothermen in Gl.(4.17) macht deutlich, daß bei vollständiger Bedeckung der Membran bei $\theta = 1$ nicht notwendigerweise auch die Ladung der Membran vollständig abgesättigt ist. Dies geschieht bei einem Bedeckungsgrad von $\theta = \alpha/Z$. Gl.(4.17) wurde unter der Annahme hergeleitet, daß nur eine Schicht des Proteins binden kann. Die Bindung einer weiteren Schicht wird wesentlich behindert sein, wenn die Korrelationslänge des Membranpotentials (die von der Ionenstärke abhängt) wesentlich kleiner ist, als der Proteindurchmesser (30 - 34Å bei Cytochrom c). Die charakteristische Länge des Membranpotentials, λ , ist gemäß Träuble et al. (1976) gegeben durch

$$\lambda[cm] \equiv \frac{1}{\kappa} = 1.78 \cdot 10^{-9} \sqrt{\left(\frac{T}{c}\right)} \quad .$$

Dies ist die Näherung für kleine Potentiale und legt eine obere Abschätzung für λ fest, das für große Potentiale immer kleiner ist. T ist hierin die Temperatur in Kelvin und c die Konzentration monovalenter Ionen in mol/l.

Bei einer niedrigen Ionenstärke in der Größenordnung von 10 mM wird die charakteristische Länge λ größer als der Durchmesser von Cytochrom c. In dieser Größenordnung der Ionenstärke wäre eine zweite Schicht (oder mehr) bindenden Proteins zu erwarten. Bei der niedrigsten Ionenstärke, in destilliertem Wasser muß die Bedeckung der Membran in der Nähe eines Wertes von $\theta = \alpha/Z$ liegen. Dies entspricht einem Lipid/Proteinverhältnis von 4.232 bei vollständiger Sättigung. Wir nehmen dabei an, daß die effektive Ladung eine inherente Eigenschaft des Proteins ist, was im Gegensatz zu den Annahmen von Stankowski (1991) steht, der die effektive Ladung durch elektrostatische Abstoßungen zwischen den Liganden in der Membranebene erklärte. Stankowski's Annahme würde zu einer maximalen Bedeckung der Oberfläche führen, die den 9 physikalischen Ladungen des Proteins entspricht. Es wird im folgenden jedoch gezeigt, daß in dem hier behandelten experimentellen System wesentlich mehr Proteinmoleküle an die Membran binden können.

Um zusätzliche Information über das Cyt.C/DOPG-System zu erhalten, wurden die Bindungsisothermen auch bei niedrigen Ionenstärken bestimmt. In Abb. IV-6a sind Bindungsisothermen im ganzen Bereich der Ionenstärke von $c = 104.4$ bis 0.21 mM abgebildet, einschließlich der Isothermen aus Abb. IV-5a. Die niedrigste Ionenstärke wurde in destilliertem Wasser erhalten und entspricht der Konzentration der Gegenionen des Cytochrom c bei sättigender Bindung. Es ist deutlich, daß bei niedrigen Ionenstärken wesentlich mehr Cytochrom c an die Membran bindet, als dies in einer Schicht aufgrund der geometrischen Dimensionen der Moleküle überhaupt möglich ist. In destilliertem Wasser entspricht die

maximale gebundene Proteinmenge einer Lipid/Proteinstoichiometrie von 5.2. Sie ist deutlich niedriger als der Wert von $\alpha = 12$, der sich aus den Dimensionen ergibt. Sie liegt hingegen nahe an der effektive Ladung von $Z = 4.232$, was darauf hindeutet, daß bei niedrigen Ionenstärken Liganden solange binden können, bis die Ladung der Membran nahezu neutralisiert ist. Dies ist nur in mehreren Schichten möglich.

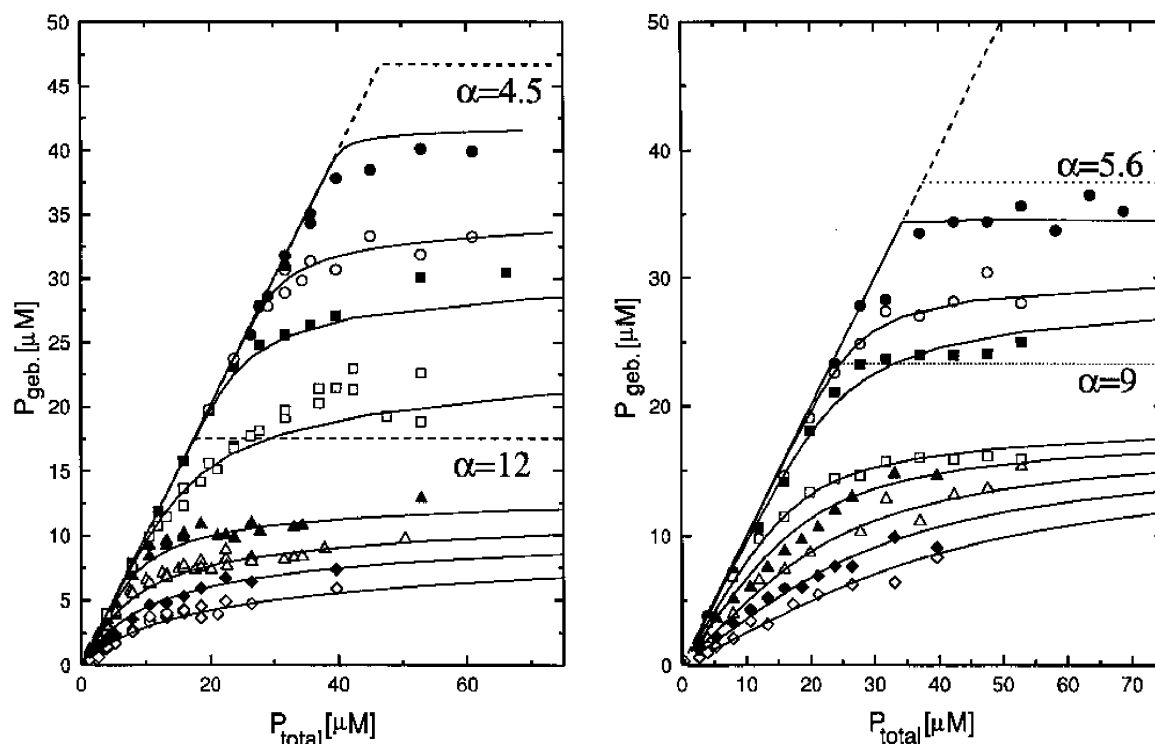


Abb. IV-6

a: Bindungsisothermen von nativen Cytochrome c an $238\mu\text{M}$ DOPG-Dispersionen bei niedrigen Ionenstärken: 0.21mM Na^+ (●), 4.35mM Na^+ (○), 16.9mM Na^+ (■), 29.4mM Na^+ (□) und bei hohen Ionenstärken (Symbole wie in Abb.5a). Anpassungen (durchgezogene Kurven) wurden mithilfe von Gl.(4.17) unter der Verwendung der effektiven Ladung $Z=4.232$ (bestimmt aus Abb. IV-4), der Lipidstoichiometrie $\alpha=4.5$ ($\alpha=12$ bei hohen Ionenstärken) und $b'=0$ durchgeführt. Die verwendeten intrinsischen Bindungskonstanten K_0 wurden mithilfe von Gl.(4.18 extrapoliert. Die gestrichelte Linie gibt den Grenzfall vollständiger Bindung alles zugegebenen Proteins bei den zwei angenommenen Stoichiometrien wieder.

b: Bindungsisothermen von oberflächendenaturiertem Cytochrome c an $238\mu\text{M}$ DOPG-Dispersionen bei niedrigen Ionenstärken: 0.21mM Na^+ (●), 29.4mM Na^+ (○), und 54.4mM Na^+ (■), und bei hohen Ionenstärken (Symbole wie in Abb.5b). Anpassungen (durchgezogene Kurven) wurden mithilfe von Gl.(4.17) unter der Verwendung der effektiven Ladung $Z=3.165$ (bestimmt aus Abb. IV-4), der Lipidstoichiometrie $\alpha=5.6$ ($\alpha=9$ bei hohen Ionenstärken) und $b'=-2.4$ durchgeführt. Die verwendeten intrinsischen Bindungskonstanten K_0 wurden mithilfe von Gl.(4.18 extrapoliert. Die gestrichelte Linie gibt den Grenzfall vollständiger Bindung alles zugegebenen Proteins bei den zwei angenommenen Stoichiometrien wieder.

Bei niedrigen Ionenstärken ist der Verlauf der Bindungsisothermen verschieden von denjenigen in Abb. IV-5a. Im letzteren Falle zeigen die Isothermen eine vermeintliche Sättigung bei hohen Proteinkonzentrationen. Bei niedrigeren Ionenstärken steigt die Konzentration des gebundenen Proteins über einen weiten Bereich der gesamten Proteinkonzentration an, was besonders deutlich bei 16.9 und 29.4 mM Na⁺ ist.

Es wurde für die Anpassungen deshalb bei niedrigen Ionenstärken auf die Restriktion $\alpha=12$ verzichtet, was die Ausbildung von mehreren Schichten des Proteins erlaubt.

Abb. IV-6a zeigt die theoretischen Kurven bei niedrigeren Ionenstärken an, wobei $\alpha = 4.5$ gesetzt wurde. Die Bindungskonstanten K_0 wurden aus Gl.(4.18a) extrapoliert. Bei hohen Ionenstärken (> 40 mM) wurde die Restriktion aufrechterhalten, daß nur eine bindenden Schicht ($\alpha = 12$) möglich ist.

Die theoretischen Kurven folgen deutlich dem Trend der experimentellen Kurven. Die vollständige Übereinstimmung ist im wesentlichen deshalb nicht gegeben, weil die Werte für Abb. IV-6a nicht frei variiert, sondern in Übereinstimmung mit Gl.(4.18a) bestimmt wurden. Durch geringfügige Variation der K_0 -Wert sind noch bessere Übereinstimmungen möglich.

Für das denaturierte Protein wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Die Aufgabe der konstanten Stoichiometrie ($\alpha=9$) bei niedrigen Ionenstärken ist ausreichend, um die experimentellen Isothermen zu erklären (Abb. IV-6b). Dabei wurden wie in Abb. IV-6a die Werte der intrinsischen Bindungskonstante K_0 aus Gl.(4.18b) extrapoliert und der Wert für die attraktive Wechselwirkung, $b' = -2.4$, beibehalten. Die theoretischen Voraussagen sind als durchgezogene Linien dargestellt. Sie wurden mit einer Stoichiometrie $\alpha = 5.6$ bei niedrigen Ionenstärken gewonnen.

Es sei hier ausdrücklich angemerkt, daß es keinen konstanten Wert für α gibt, für den Anpassungen bei hohen und bei niedrigen Ionenstärken konsistent durchgeführt werden können, auch nicht unter Variation des Interaktionsparameters b' (Daten nicht gezeigt). Nur bei hohen Ionenstärken sind die experimentellen Bindungsisothermen eindeutig mit Gl.(4.17) in Übereinstimmung. Unter diesen Bedingungen kommt die theoretische Beschreibung ohne anpassbare Parameter aus.

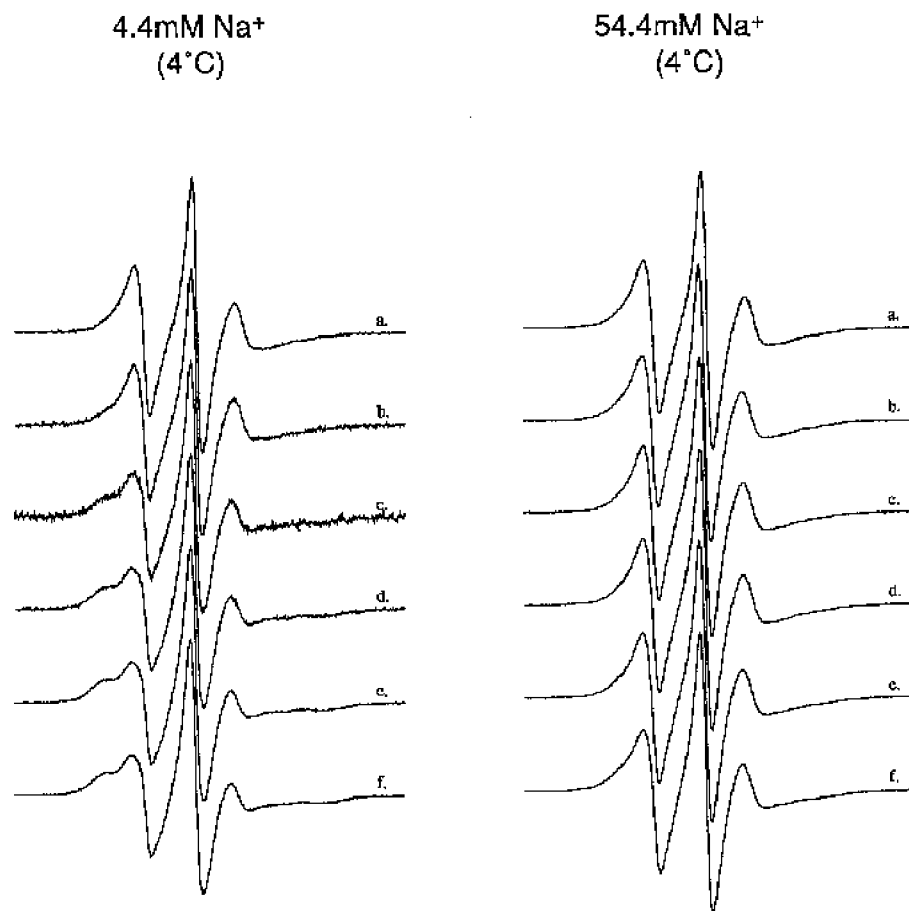
IV-5.2 Bindungsisothermen aus Elektronenspinresonanz-Experimenten

Im vorangegangenen Abschnitt wurde geschlossen, daß bei niedrigen Ionenstärken Bindung in mehreren Schichten erfolgen muß, damit die Bindungsisothermen sowohl mit den räumlichen Dimensionen der Lipide und der Proteine als auch mit der gemessenen effektiven Ladung der Proteine in Übereinstimmung sind.

Um dafür einen unabhängigen experimentellen Beweis zu erhalten, wurden ESR-Experimente mit den Lipid-Proteinkomplexen durchgeführt. Der Lipidmatrix wurden dafür Phosphatidylglycerol-Lipid-Spinlabel zugegeben (1 mol%), die an der 14ten Kohlenstoffposition der sn-2 Kette der Lipide mit einem Nitroxyl-Radikal markiert waren. Bei der Bindung tritt das Protein in Wechselwirkung mit dem Lipid, was zu einem Einfluß der Proteine auf das ESR-Spektrum führt.

Als eine Näherung erster Ordnung sei angenommen, daß das ESR-Spektrum des Lipid-Proteinkomplexes aus zwei spektralen Komponenten besteht, wovon eine aus dem freien Lipid und die andere aus dem Lipid herrührt, welches direkt mit dem Protein in Kontakt steht. Die spektrale Form dieser beiden Komponenten ist verschieden, insbesondere weisen erfahrungsgemäß Lipide, welche mit dem Protein wechselwirken, eine stärkere Intensität in den äußeren Flügeln des Spektrums auf (Marsh & Watts, 1982). Dies geschieht, da Rotation und Trans-Gauche-Isomerisierung der Lipidketten nur dann zur Mittelung der Komponenten des Hyperfeinaufspaltungstensors führt, wenn ihre Korrelationszeit kleiner als die typische Zeitkonstante des Spinlabel-ESR ($\tau \sim 10^{-9}$ s) ist. Für die Korrelationszeiten in flüssig-kristallinen Lipiden ist dies erfüllt, während die Korrelationszeiten von gelförmigen Lipiden sowie auch von Lipiden in Wechselwirkung mit Proteinen in der Regel darunter liegt. Diese Tatsache resultiert zu unterschiedlichen ESR-Spektren darin, daß die Lipid-Proteingrenzschicht im ESR-Spektrum sichtbar wird.

Der relative Anteil der beiden Komponenten weist einen funktionalen, monotonen Zusammenhang mit der Menge des Proteins auf, welches mit dem Lipid wechselwirkt. Dies ist in erster Linie die erste gebundene Schicht des Proteins. Weitere Schichten treten nicht, oder nur in geringem Maße mit dem Lipid in Wechselwirkung. Bei Titration der Lipiddispersionen mit Proteinlösungen, ist zu erwarten, daß die ESR-Spektren den Verlauf der Bedeckung der Membran durch die erste Schicht des Proteins in Übereinstimmung mit den Dimensionen des Proteins und der Lipidmembran wiedergeben.

**Abb. IV-7**

Elektronenspinresonanzspektren von $238\mu\text{M}$ DOPG-Dispersionen mit ansteigenden Konzentrationen Cytochrom *c* bei niedrigen und bei hohen Na^+ -Konzentrationen.

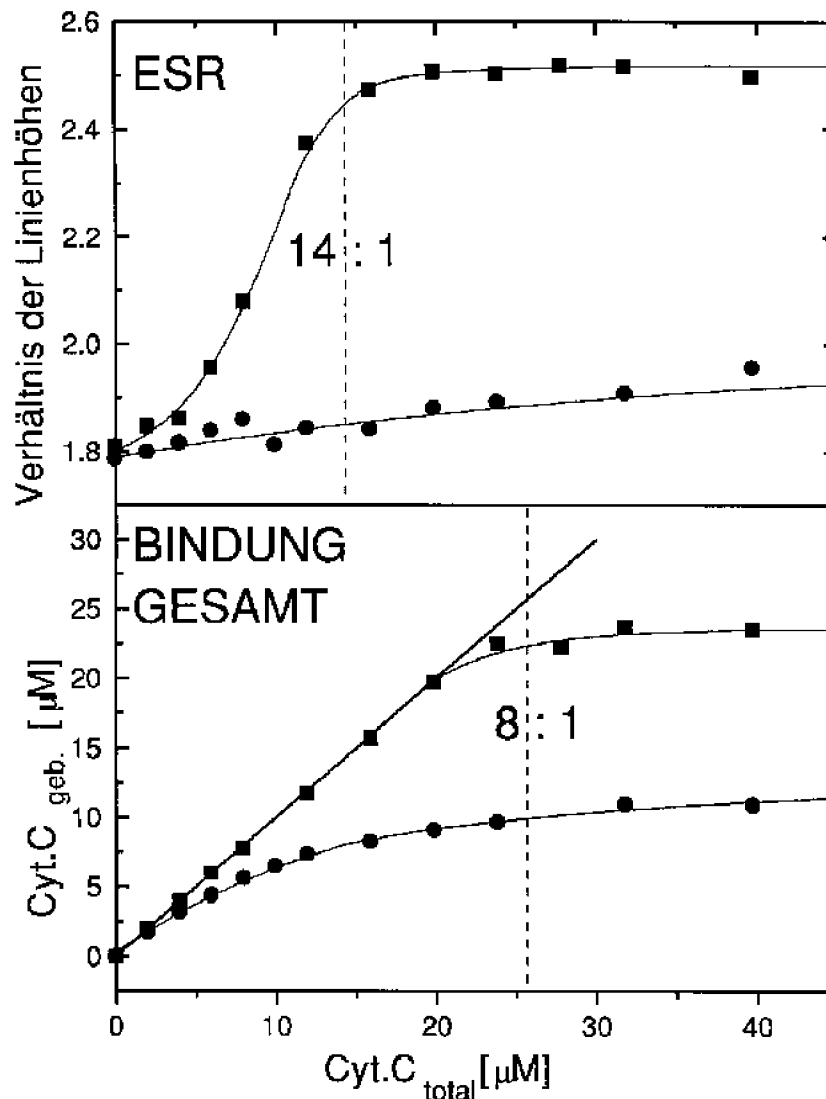
Links: 4.35mM Na^+ und Lipid/Protein Verhältnisse von (a) 106 : 1, (b) 35 : 1, (c) 17.6 : 1, (d) 10.6 : 1, (e) 7.6 : 1 und (f) 5.3 : 1

Rechts: 54.4mM Na^+ und Lipid/Protein Verhältnisse von (a) 106 : 1, (b) 35 : 1, (c) 17.6 : 1, (d) 10.6 : 1, (e) 7.6 : 1 und (f) 5.3 : 1. 1% der Lipide wurde an der C-14 Position der sn-2 Kette spinmarkiert

Die Ultrazentrifugations-Assays, die zu den im vorangegangenen Abschnitt gezeigten Bindungsisothermen führten, zeigen hingegen alles gebundene Protein. Eine klare Verschiedenheit der Isothermen aus ESR-Isothermen und Ultrazentrifugations-Isothermen ist ein klarer Hinweis auf die Richtigkeit der oben getroffenen Feststellung über die Bedeckung der Membran mit mehreren Schichten des Proteins bei niedrigen Ionenstärken.

Abb. IV-8

Oben: Linienhöhenverhältnis der ESR-Spektren von Cyt.C-DOPG-Komplexen aus Abb. IV-7 bei Ionenstärken von 4.35mM Na⁺ (■) und 54.4mM Na⁺ (●). Unten: Gesamte Bindung von Cyt.C an DOPG-Membranen, gewonnen aus photospektrometrischer Absorptionsmessung der wässrigen Phase derselben Proben.



Von den in den Ultrazentrifugationsassays gewonnen Lipid-Proteinkomplexen von DOPG-Membranen wurden bei einer Na⁺-Konzentration von 4.35 mM und 54.4 mM bei zunehmender Proteinkonzentration ESR-Spektren aufgezeichnet (Abb. IV-7 links und rechts). Die Überstände aus denselben Proben wurden verwendet, um die Konzentration des ungebundenen Proteins zu bestimmen und damit die Gesamtmenge des gebundenen Cytochrom c. Bei niedriger Salzkonzentration (Abb. IV-7 links) kann als Folge zunehmender Proteinkonzentration die Ausbildung einer spektralen Komponente mit hoher Intensität in den äußeren Flügeln des Spektrums beobachtet werden, die einer zunehmenden Beschränkung der Mobilität eines Teils der Lipidketten zugeschrieben werden kann (immobilisierte Komponente).

Bei hoher Salzkonzentration (Abb. IV-7 rechts) ist keine immobilisierte Komponente bei zunehmender Proteinkonzentration zu beobachten.

Um die spektralen Veränderungen quantifizieren zu können, wurde das Verhältnis der Höhe des zentralen Maximums des Spektrums und des ersten Maximums auf der linken Seite des Spektrums bestimmt (vgl. auch Kap. II). Eine zunehmende Intensität der Spektren in den äußeren Flügeln führt zu einer Zunahme des Wertes dieses Parameters. Im oberen Teil von Abb. IV-8 ist der Linienhöhenparameter, gewonnen aus den Spektren in Abb. IV-7, als Funktion der zunehmenden Proteinkonzentration aufgetragen. Im unteren Teil von Abb. IV-8 ist die Konzentration des gesamten gebundenen Proteins, gewonnen unter Verwendung derselben Proben, wiedergegeben. Bei einer Salzstärke von 54.4 mM (●) nimmt das ESR-Linienhöhenverhältnis bei zunehmender Proteinkonzentration im selben Maße monoton zu wie die Konzentration gebundenen Proteins, was darauf hindeutet, daß vermutlich nur eine Schicht des Proteins an die Membran bindet. Im Gegensatz dazu gibt es bei einer niedrigen Salzstärke von 4.35 mM (■) einen offensichtlichen Widerspruch zwischen der aus den ESR-Spektren gewonnenen Isotherme zu derjenigen, die aus der Gesamtmenge des gebundenen Proteins bestimmt wurde. Während die Bindungsisotherme (unten) eine Sättigung der Bindung nahe eines Lipid/Proteinverhältnisses von 8:1 zeigt, weist die ESR-Isotherme (oben) eine Sättigung bei einem Verhältnis von ungefähr 14:1 auf. Dies deutet an, daß darüber hinaus gebundenes Protein keinen Kontakt mehr zu den Lipiden aufweist. Dies ist ein direkter Hinweis auf die Ausbildung einer weiteren, zweiten Protein-Schicht auf der Membranoberfläche, die weiter oben unter Betrachtung der Debyelänge bei diesen Salzstärken vorausgesagt wurde. Die Stöchiometrie von 14:1 der ersten Schicht ist zudem ungefähr in Einklang mit der Analyse der Bindungsisothermen in Abb. IV-5.1 und den kristallographischen Dimensionen von Lipid und Protein.

Eine weitere Eigenschaft des Linienhöheverhältnisses bei niedriger Ionenstärke kann man bei niedrigem Sättigungsgrad beobachten. Der gesamte Verlauf der Kurve zeigt ein sigmoidales Verhalten. Der Einfluß der Bindung auf das Linienhöheverhältnis bei niedrigen Mengen gebundenen Proteins (oberhalb eines Lipid/Proteinverhältnisses von 40:1) ist klein und bei niedriger wie bei hoher Salzstärke fast gleich. Unterhalb eines Lipid/Proteinverhältnisses von 40:1 taucht bei den Spektren in Abb. 7 (links) eine immobilisierte Komponente auf. Ganz offensichtlich ist die Wechselwirkung der Proteine mit dem Lipid ein kooperativer Effekt. Eine immobilisierte Komponente von Lipiden an der C-14-Position der Kohlenwasserstoffketten ist in der Regel nur dann zu beobachten, wenn das gebundene Protein Kontakt zu den Lipidketten hat (Watts & Marsh, 1982). Dies scheint nur bei einem Grad der Sättigung der Membran unterhalb eines Lipid/Proteinverhältnisses von 40:1 zu geschehen. Wie im theoretischen Teil in Abschnitt IV-4.1 beschrieben, muß zur Kompression der Proteine auf der Oberfläche eine Arbeit ΔW geleistet werden, die von der Freisetzung freier Energie durch die Bindung der

Proteine aufgebracht wird. Das Binden in einer zweiten Schicht ist jedoch aufgrund der Distanzabhängigkeit des elektrostatischen Potentials gegenüber der Bindung in der ersten Schicht energetisch deutlich benachteiligt. Die Oberfläche einer Membran ergibt sich aus einem komplexen Wechselspiel der sterischen, elektrostatischen und hydrophoben Beiträge zur freien Energie der Membran. Sie ist keinesfalls allgemein als konstant anzunehmen, sondern hängt vom Minimum der freien Energie ab, das unter anderem auch von der Bindung von Proteinen beeinflusst wird. Zusätzlich zur Bindung in einer zweiten Schicht gibt es also die Möglichkeit, daß die Membranoberfläche nicht konstant bleibt. Die Expansion der Oberfläche ist mit einer Veränderung der freien Energie verbunden, die sich ebenfalls als eine Arbeit $\Delta W_{\text{surf}} = - \Pi \cdot \Delta A_{\text{surf}}$ ausdrücken läßt. Wenn der Gewinn an freier Energie bei der zusätzlichen Bindung eines Proteins in der ersten Schicht auf der Membran größer als derjenige ist, der benötigt wird, um die Membrandimensionen zu verändern, ist es möglich, daß die Membranoberfläche zunimmt. Dies hängt natürlich von der Größe der Bindungsenergie ab, die bei niedrigen Ionenstärken in der Wechselwirkung geladener Partikel um Größenordnungen höher liegt als bei hohen Ionenstärken. Wenn dies geschieht, bekommen bindende Proteine auf natürliche Weise einen größeren Kontakt zu den Kohlenwasserstoffketten der Membran, da die Lipid-Lipidabstände zunehmen. Dies wiederum führt zur Ausbildung einer immobilisierten Komponente im ESR-Spektrum. Das sigmoidale Verhalten der ESR-Isotherme ist ein indirekter Hinweis darauf, daß auch die Fläche des Lipides bei niedrigen Ionenstärken nicht konstant bleibt, sondern zunimmt. Dies ist ein wichtiges Resultat, denn es demonstriert die Flexibilität der Membran und unterscheidet sie von starren Oberflächen wie etwa Metallelektroden (Hildebrandt, 1989a, b).

Ein hoher Grad von Proteinbindung kann einen bedeutenden Einfluß auf Membraneigenschaften und Lipidpackung haben. Diese Beobachtung ist in differentialkalorimetrischen Messungen gemacht worden (siehe Kap. II und V). In Komplexen aus Dimyristoyl-Phosphatidylserin (DMPS) mit "myelin basic protein" kann die Bindung des Proteins nicht nur die Schmelztemperatur verändern, sondern auch in bedeutendem Maße die Schmelzenthalpie verringern (Ramsay et al., 1986). Dieselbe Beobachtung wurde auch in Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol (DMPG)-Membranen in Komplexen mit Cytochrom c gemacht (Heimburg & Biltonen, 1993, vgl. Kap. II). Dies weist auf den starken Einfluß der Bindung auf die Lipideigenschaften hin. Eine Abnahme der Schmelzenthalpie ist konsistent mit der Annahme, daß die Packungsdichte der Lipide in Gelphase und/oder der flüssig kristallinen Phase sich auf eine Art und Weise verändert, die darin resultiert, daß die beiden Phasen weniger verschieden sind. Zusätzlich wurde in beiden genannten Publikationen ein zweiphasiges Verhalten der Bindungsisothermen im Titrationskalorimeter festgestellt. In den Cytochrom-c-DMPG-Komplexen konnte gezeigt werden, daß die Bindung der Proteinmoleküle zu einer kooperativen Umwandlung in der Lipidmatrix führt (siehe Kapitel II). Dies ist in

Übereinstimmung mit den Aussagen, die in diesem Kapitel insbesondere auf der Basis der ESR-Messungen gemacht werden.

Bei hohen Ionenstärken ist jedoch weder eine Bedeckung der Membran in mehreren Schichten noch eine Veränderung der Membranoberfläche evident. In diesem Fall deckt sich das Experiment mit der Analyse aus Abschnitt IV-5.1 (vgl. Gl.(4.17)), bei der die Membranoberfläche bei hohen Ionenstärken als konstant angesehen und die Bedeckung in mehr als einer Schicht ausgeschlossen wurde.

IV-6 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Um die Bindung von Liganden an Oberflächen zu bestimmen, wurde ein statistisch thermodynamischer Ansatz unter Verwendung nichtlokalisierter Bindungsplätze gemacht. Es wurde eine Funktion hergeleitet, die zur allgemeinen Ableitung von Bindungsisothermen verwendet werden kann. Unter Berücksichtigung der Beiträge der Bindung zur elektrostatischen freien Energie, die von der Gouy-Chapman Theorie abgeleitet wurden, und einer Van der Waals-Gas Beschreibung der gebundenen Liganden wurde eine analytische Form für die Bindungskonstanten gefunden, die die Bindung als Funktion der Salzkonzentration beschreibt.

Das Modell wurde zur Beschreibung der Bindung von Cytochrom c in seiner nativen und in seiner denaturierten Form in einem weiten Bereich der Ionenstärke getestet. Für Bindung bei hohen Ionenstärken ($c > 40 \text{ mM Na}^+$) konnten die Isothermen selbstkonsistent gut beschrieben werden. Für das denaturierte Cytochrom c war ein negativer Wert des Wechselwirkungs-Parameters b' für eine gute Anpassung notwendig. Dies deutet darauf hin, daß Aggregationsgleichgewichte des denaturierten Proteins auf der Lipidoberfläche bestehen, in Übereinstimmung mit Analysen von Muga et al. (1991). Bei niedrigen Salzkonzentrationen konnten gute Anpassungen an die Isothermen nur dann erhalten werden, wenn die gesamte Oberfläche der Membran nicht konstant gehalten wurde. Dies läßt sich vermutlich auf zwei Ursachen zurückführen:

1.: In den hier vorgestellten Untersuchungen war die bestimmte effektive Ladung des Proteins kleiner als die Ladungen (entgegengesetzten Vorzeichens) der Lipide auf der Fläche eines Bindungsplatzes. Das bedeutet, daß bei vollständiger Bedeckung der Oberfläche mit Proteinmolekülen die Ladungen der Lipide nicht neutralisiert sind. Unter Bedingungen, in denen die Debye-Länge des elektrostatischen Potentials größer als der Durchmesser der Liganden ist und die Ladung des Liganden die Ladungen der Oberfläche auf der Fläche eines

Bindungsplatzes nicht neutralisieren, kommt es zur Ausbildung von mehr als einer Schicht von gebundenen Liganden.

2.: Bei einer vorgegebenen Zahl gebundener Proteine führt die Zufügung weiterer Proteine zu einer Erhöhung der freien Energie des Ensembles der gebundenen Liganden, im wesentlichen durch die Verringerung der Entropie der Proteinverteilung. Wenn die Bindungskonstante sehr stark ist (bei niedrigen Salzkonzentrationen), gibt es einen Bedeckungsgrad, bei dem es energetisch günstiger ist, die Packungsdichte der Lipide der Oberfläche zu verringern als die Bedeckungsdichte mit Liganden zu erhöhen. Dies führt (gemäß den ESR-Resultaten) zur teilweisen Inkorporation der Proteine in die Lipid-Matrix.

Diese beiden Effekte können zu einem komplexen Verhalten der Bindungsisothermen führen. Eine Veränderung der Packungsdichte der Lipide muß einen Einfluß auf die Umwandlungstemperatur und insbesondere der Umwandlungsenthalpien der Lipide haben. Beide Effekte sind experimentell in Komplexen peripherer Proteine mit Lipidmembranen nachgewiesen worden. Die Bindung von Cytochrom c in mehreren Schichten scheint wegen der offensichtlichen Unterschiede des experimentell bestimmten Grades der Bindung aus ESR- und Bindungsexperimenten evident zu sein.

Bei hohen Ionenstärken ist das Verhalten der Isothermen wenig komplex. Die in diesem Kapitel hergeleiteten Gleichungen sind ausreichend, um die Bindung von Cytochrom c and DOPG-Membranen ohne Parameter zu bestimmen, die nicht auf unabhängige Weise experimentell bestimmbar sind. Dies sind die Fälle, die unter physiologischen Bedingungen Gültigkeit haben. Bei niedrigen Ionenstärken kann die Untersuchung der Bindungsisothermen jedoch interessante Aufschlüsse über komplexe Phasenumwandlungen in Lipiden und über die Stabilität von Lipid-Proteinkomplexen geben. Die in diesem Kapitel hergeleitete theoretische Behandlung legt eine Basis für weitergehende Beschreibungen dieser komplexen Phänomene, die die Umwandlung in der Lipidmatrix in adäquater Weise berücksichtigt.

ANHANG I: Herleitung von Gl.(4.3)

Die intrinsische Bindungskonstante ist definiert durch

$$K(i)^i = K_0^i \cdot \exp\left(-\frac{\Delta F_{el}(i)}{k \cdot T}\right),$$

wobei $\Delta F_{el}(i)$ die Helmholtzsche freie Energie der Oberfläche ist, wenn i Liganden gebunden sind. Gleichung (4.2) kann umformuliert werden zu

$$\begin{aligned}
 v &= [L] \cdot K_0 \cdot \rightarrow \\
 &\rightarrow \frac{\sum_{i=1}^n \frac{1}{(1-i)!} \cdot [L]^{i-1} \cdot K_0^{i-1} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta F_{el}(i-1)}{k \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta W(i-1)}{k \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta F_{el}(i) - \Delta F_{el}(i-1)}{k \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta W(i) - \Delta W(i-1)}{k \cdot T}\right)}{\sum_{i=0}^n \frac{1}{i!} \cdot [L]^i \cdot K_0^i \cdot \exp\left(-\frac{\Delta F_{el}(i)}{k \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta W(i)}{k \cdot T}\right)} = \\
 &= [L] \cdot K_0 \cdot \frac{\sum_{i=0}^{n-1} \frac{1}{i!} \cdot [L]^i \cdot K_0^i \cdot \exp\left(-\frac{\Delta F_{el}(i)}{k \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta W(i)}{k \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{d}{d i} \left(\frac{\Delta F_{el}(i)}{k \cdot T}\right)\right) \cdot \exp\left(-\frac{d}{d i} \left(\frac{\Delta W(i)}{k \cdot T}\right)\right)}{\sum_{i=0}^n \frac{1}{i!} \cdot [L]^i \cdot K_0^i \cdot \exp\left(-\frac{\Delta F_{el}(i)}{k \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta W(i)}{k \cdot T}\right)}
 \end{aligned}$$

Wenn die Verteilung ein einziges Maximum hat und $n \rightarrow \infty$ gilt (das Maximum wird unendlich scharf (T.Hill, 1960)), kann die Gleichung zu

$$v = [L] \cdot K_0 \cdot \exp\left(-\frac{d}{d i} \left(\frac{\Delta F_{el}(i)}{k \cdot T}\right)\right) \cdot \exp\left(-\frac{d}{d i} \left(\frac{\Delta W(i)}{k \cdot T}\right)\right)$$

vereinfacht werden, da die Glieder der Summen nur noch für einen Wert von i wesentlich verschieden von Null sind, und die Summation fallengelassen werden kann.

Unter einigen speziellen Bedingungen kann die Verteilung mehr als ein Maximum aufweisen und die obige Näherung kann nicht gemacht werden (siehe Text).

ANHANG II: Bindung an eindimensionale Oberflächen (McGhee/von Hippel 1974)

McGhee und von Hippel leiteten eine analytische Formulierung für die Bindungsisothermen von Liganden an eindimensionale Gitter, insbesondere von Proteinen an DNA, her. Sie nahmen an, daß die Matrix n unterscheidbare Mikrobindungsplätze hat und jeder Ligand m von diesen Mikroplätzen mit einer durch die intrinsische Bindungskonstante K bestimmten Wahrscheinlichkeit besetzt. In der Abwesenheit von Wechselwirkungen zwischen den Liganden fanden sie folgende Isotherme:

$$[L] = \frac{1}{m \cdot K} \cdot \left(\frac{\theta}{1-\theta} \right) \cdot \left(\frac{1-\theta}{1-\theta + \frac{\theta}{m}} \right)^{1-m}.$$

Der Grenzwert einer kontinuierlichen Oberfläche wird erreicht, wenn $m \rightarrow \infty$ gilt. Die intrinsische Bindungskonstante in diesem Modell setzt voraus, daß es $n \cdot m$ verschiedene Plätze für die Bindung des ersten Liganden gibt. In einem Modell, in dem die Bindungskonstante pro Bindungsfläche definiert ist, kann $m \cdot K$ durch eine Konstante K_0 ersetzt werden. Wenn man die Beziehung

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \left(1 + \frac{1}{n} \right)^n = e \quad \rightarrow \quad \lim_{m \rightarrow \infty} \left(\frac{1-\theta}{1-\theta + \frac{\theta}{m}} \right)^{1-m} \approx \lim_{n \rightarrow \infty} \left(\frac{1-\theta}{1-\theta + \frac{\theta}{m}} \right)^{-m} = \exp\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)$$

verwendet, erhält man für die Bindungsisotherme

$$[L] = \frac{1}{K_0} \cdot \left(\frac{\theta}{1-\theta} \right) \cdot \exp\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right),$$

was mit Gleichung (4.6) übereinstimmt, wenn der Interaktionsparameter $b' = 0$ gesetzt wird. Das bedeutet, daß Gl.(4.6) eine exakte Lösung in eindimensionalen Systemen darstellt.

IV-7 LITERATUR

Abramowitz, M. und Stegun, I.A. Handbook of mathematical functions, Dover Publications, Inc., New York, 1972

Aveyard, R. und Haydon, D.A. An introduction to the principles of surface chemistry. University Press, Cambridge 1973

Bell, J.D. und Biltonen, R.L.

J.Biol. Chem. 64 (1989), 12194 - 12200

The temporal sequence of events in the activation of phospholipase A₂ by lipid vesicles. Studies with

- the monomeric enzyme from agkistrodon piscivorus piscivorus
- Cantor, C.R. und Schimmel, P.R. Biophysical chemistry Teil III, W.H.Freeman und Co., N.Y., 1980
- Cevc, G. B.B.A. 1031 (1990), 311 - 382 Membrane electrostatics
- Comfurius, P. und Zwaal, R.F.A. B.B.A. 488 (1977), 36 - 42
The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography
- Dickerson, R.E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, O.B., Samson, L., Cooper, A. und Margoliash, E. J.Biol.Chem. 246 (1971), 1511
Ferricytochrome c 1.General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution
- Görrissen, H. und Marsh, D. Biochemistry 25 (1986), 2904 - 2910
Apocytochrome c binding to negatively charged lipid dispersions studied by spin-label electron spin resonance
- Gruner, S.M., Tate, M.W., Kirk, G.L., So, P.T.C., Turner, D.C. , Keane, D.T., Tilcock, C.P.S. und Cullis, P.R. Biochemistry 27 (1988), 2853 - 2866
X-ray diffraction study of the polymorphic behavior of n-methylated dioleoyl phosphatidylethanolamine
- Heimburg, T., Hildebrandt, P. und Marsh, D. Biochemistry 30 (1991), 9084 - 9089
Cytochrome C-lipid interactions studied by resonance Raman and 31P-NMR spectroscopy. Correlation between the conformational changes of the protein and the lipid bilayer
- Heimburg, T. und Biltonen, R.L. Biochemistry 33 (1994), 9477-9488
The thermotropic behavior of dimyristoyl phosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c
- Heimburg, T. und Marsh, D. Biophys.J. 65 (1993), 2408 - 2417
Investigation of secondary and tertiary structural changes of cytochrome c in complexes with anionic lipids using amide hydrogen exchange measurements: An FTIR study
- Hildebrandt, P. und Stockburger, M. Biochemistry 28 (1989 a.), 6710 - 6721
Cytochrome c at charged interfaces. 1. Conformational and redox equilibria at the electrode/electrolyte interface probed by surface enhanced resonance Raman spectroscopy
- Hildebrandt, P. und Stockburger, M. Biochemistry 28 (1989 b.), 6722 - 6728
Cytochrome C at charged interfaces. 2. Complexes with negatively charged macromolecular systems studied by resonance Raman spectroscopy
- Hill, T.L. An introduction to statistical mechanics Dover Publications, N.Y.1960
- Hill, T.L. J.Chem.Phys. 14 (1946), 441 - 453
Statistical mechanics of multimolecular absorption II.Localized and mobile adsorption and absorption
- Jähnig, F. Biophys.Chem. 4 (1976), 309 - 318
Electrostatic free energy and shift of the phase transition for charged lipid membranes
- de Jongh, H.H.J., Killian, J.A. und de Kruijff, B. Biochemistry 31 (1992), 1636 - 1643
A water-lipid interface induces a highly dynamic folded state in apocytochrome c and cytochrome c, which may represent a common folding intermediate

- Kim, J., Mosior, M., Chung, H.W. und McLaughlin, S.
Biophys.J. 60 (1991), 135 - 148
Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids
- de Kruijff, B. und Cullis, P.R. B.B.A. 602 (1980), 477 - 490
Cytochrome c specifically induces non bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes
- Kuchinka, E. und Seelig, J. Biochemistry 28 (1989), 4216 - 4221
Interaction of melittin with phosphatidylcholine membranes. Binding isotherm and lipid head-group conformation
- Lindblom, G., Rilfors, L., Hauksson, J.B., Brentel, I., Sjölund, M. und Bergenstahl, B. Biochemistry 30 (1991), 10938 - 10948
Effects of head-group structure and counterion condensation on phase equilibria in anionic phospholipid-water systems studied by ^2H , ^{23}Na , and ^{31}P NMR and X-ray diffraction
- Lis, L.J., McAlister, M., Fuller, N. und Rand, R.P. Biophys.J. 37 (1982), 657
X-ray diffraction study of the polymorphic behavior of n-methylated dioleoyl phosphatidylethanolamine
- Manning, G.S. Quart.Rev.Biophys. 11 (1978), 179 - 246
The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides
- Marsh, D. und Watts, A. Spin-labeling and lipid-protein interactions in membranes.
In: Lipid-protein interactions. Vol.2., P.C.Jost und O.H.Griffith, Hrg., Wiley-Interscience, New York 1982, 53 - 126
- Mathias, R.T., McLaughlin, S., Baldo, G. und Manivannan, K.
Biophys.J. 53 (1988), 128a
The electrostatic potential due to a single fixed charge at a membrane solution-interface
- McGhee, J.D. und von Hippel, P.H. J.Mol.Biol. 86 (1974), 469 - 489
Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice
- McLaughlin, S. Annu.Rev.Biophys.Chem.18 (1989), 113 - 136
The electrostatic properties of membranes
- McLaughlin, S., Langner, M. und McDaniel, R.
Electrochimica acta, 34 (1989), 1903 - 1904
Experimental tests of the Gouy-Chapman theory using phospholipid bilayers
- Mouritsen, O.G. und Biltonen, R.L. in: New Comprehensive Biochemistry, Protein Lipid Interactions, A.Watts (Hrg.), Elsevier 1992
Protein-lipid interactions and membrane heterogeneity
- Muga, A., Mantsch, H.H. und Surewicz, W.K. Biochemistry 30 (1991), 7219 - 7224
Membrane binding induces destabilization of cytochrome c structure
- Nelson, A.P. und McQuarrie, D.A. J.Theor.Biol. 55 (1975), 13 - 27
The effect of discrete charges on the electrical properties of a membrane

Nishizuka, Y. Science 233 (1986), 305 - 312

Studies and perspectives of protein kinase c

Orr, J.W. und Newton, A. Biochemistry 31 (1992), 4661 - 4667

Interaction of protein kinase c with phosphatidylserine 1. cooperativity in lipid binding

Ramsay, G., Prabhu, R. und Freire, E. Biochemistry 25 (1986), 2265

Direct measurement of the energetics of association between myelin basic protein and phosphatidylserine vesicles

Rice, S.A. und Nagasawa, M. Polyelectrolyte solutions - A theoretical introduction.

Academic press, London und New York , 1961

Sober, H.A., Hrg., Handbook of biochemistry(1968), Chemical Rubber Company,

Cleveland, S. C156 ff.

Schwarz, G. und Beschiaschvili, G. B.B.A. 979 (1989), 82 - 90

The thermodynamic and kinetic studies on the association of melittin with a phospholipid bilayer.

Spooner, P.J.R. und Watts, A. Biochemistry 30 (1991), 3871 - 3879

Reversible unfolding of cytochrome c upon interaction with cardiolipin bilayers. 1.Evidence from deuterium NMR measurements

Stankowski, S. Biophys.J.60 (1991), 341 - 351

Surface charging by large multivalent molecules. Extending the standard Gouy-Chapman treatment

Tanford, C. J.Phys.Chem. 59 (1955), 788 - 793

The electrostatic free energy of globular protein ions in aqueous solution

Träuble, H., Teubner, M., Woolley, P. und Eibl, H.

Biophys.Chem.4 (1976), 319 - 342

Electrostatic interaction at charged lipid membranes. I.Effects of pH and univalent cations on membrane structure

Vorotyntsev, M.A. und Ivanov, S.N. Elektrokhimiya 25 (1988), 805 - 807

Potential drop at the insulator/electrolyte interface

Winiski, P.A., McLaughlin, A.C., McDaniel, R.V., Eisenberg, M. und McLaughlin, S.

Biochemistry 25 (1986), 8206 - 8214

An experimental test of the discreteness-of-charge effect in positive and negative lipid bilayers

Kapitel V

Modell der kalorimetrischen Umwandlung

MONTE-CARLO-SIMULATIONEN VON LIPID-PROTEIN WECHSELWIRKUNGEN³

In diesem Kapitel wird ein einfaches Modell für die Lipid-Proteinwechselwirkung entwickelt, das auf Wechselwirkungen zwischen benachbarten Lipiden und von Lipiden in Kontakt mit Proteinen beruht. Mit dem Modell werden kalorimetrischen Verläufe der Wärmekapazität berechnet und in Zusammenhang mit Fluktuationen der Lipidmatrix und der Proteinverteilung auf oder in der Membran gebracht. Die berechneten Kurven werden mit experimentellen DSC-Kurven von Cytochrom-c-DMPG-Komplexen verglichen. Dies steht insbesondere mit dem zweiten Kapitel in Verbindung, in dem der Effekt der Proteinbindung auf die kalorimetrische Schmelzkurve untersucht wurde. Ein weiterer Schwerpunkt dieses Kapitels ist die Bildung von Proteinaggregaten auf der Lipidoberfläche als Funktion des physikalischen Zustandes der Lipidmembran, die in Zusammenhang mit der Aktivität peripherer und integraler Proteine diskutiert wird.

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in :
T.Heimburg, and R.L.Biltonen. 1996. A Monte-Carlo simulation study of protein-induced heat capacity changes and lipid-induced protein clustering. *Biophys.J.* 70: 84-96

V-1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Lipiden wurde auf der Basis eines Zwei-Zustands-Modells für die Lipidmatrix beschrieben, in dem Lipide entweder gelförmig oder flüssig-kristallin sein können. In diesem Kapitel wird die Wechselwirkung zwischen benachbarten Lipiden durch einen freien Energieterm ϵ berücksichtigt, dessen Größe die Kooperativität der Umwandlung bestimmt. Es ist eine experimentelle Beobachtung, daß bei der Bindung von Proteinen an Lipide die Temperaturmittelpunkte der Umwandlungskurven verschoben werden können. Dies läßt darauf schließen, daß die Bindungskonstanten des Proteins an Gel- bzw. flüssig-kristalline Phase verschieden sind. Die Differenz der freien Bindungsenergie wurde als Parameter für die Lipid-Proteinwechselwirkung verwendet. Die Wärmekapazitätsprofile der Lipid-Proteinkomplexe wurden mit einer Monte-Carlo-Simulation berechnet. Im Bereich der thermotropen Umwandlung koexistieren gelförmige und flüssig-kristalline Lipiddomänen. Dies führt zu Aggregation von Proteinen auf der Oberfläche im Temperaturbereich der Koexistenz von gelförmigen und flüssig-kristallinen Lipiden. Eine direkte Folge der Proteinbindung ist eine Verschiebung und Verbreiterung der Lipidschmelzkurven. Die Gegenwart von integralen Proteinen führte zu Umwandlungen der Lipide, deren Schmelzprofile sich qualitativ von denen der peripheren Proteine unterscheiden. Im Gegensatz zu den peripheren Proteinen aggregieren integrale Proteine vorwiegend in Gegenwart eines der beiden Zustände der Lipide.

V-2 EINLEITUNG

Biomembranen sind dynamische Systeme mit vielen Komponenten. Ihre Bestandteile, im wesentlichen Lipide und Proteine, sind keine starren Strukturen, sondern bewegliche Moleküle mit einer großen Zahl von möglichen Konformationen und Anordnungen. Die physikalischen Eigenschaften einer Membran sind im allgemeinen eher die Eigenschaften eines makroskopischen Ensembles als diejenigen von individuellen Molekülen.

Das Verhalten der Lipide einer Membran ist mit demjenigen der Proteine über Wechselwirkungen verschiedenster Natur verknüpft und es ist anzunehmen, daß die Eigenschaften der einen Komponente gar nicht unabhängig von denjenigen der anderen betrachtet werden können. Es ist über eine Reihe von Fällen berichtet worden, in denen die Funktion der Lipid-Proteinkomplexe in deutlichem Zusammenhang mit dem physikalischen Zustand und/oder dem Schmelzen der Lipidketten steht, so für Cytochrom c (Heimburg et al., 1991), D- β -Hydroxybutyrate-Dehydrogenase (Cortese & Fleischer, 1987), Gramicidin A (O'Connell et al., 1990; Cornell et al., 1989; Huang, 1986; Elliott et al., 1986) oder

Alamethicin (Boheim et al., 1980). Über Cytochrom wurde in Kapitel III berichtet. Die thermotrope Schmelzreaktion wird von der Gegenwart peripherer oder integraler Proteine mehr oder weniger stark beeinflusst. In der Regel resultiert dies in Verschiebung und Verbreiterung des Umwandlungspeaks und unter Umständen in der Veränderung der Schmelzenthalpie, speziell z.B. bei der Bindung von Cytochrom c (Heimburg & Biltonen, 1993; de Kruijff & Cullis, 1980) und der Bindung von Myelin Basic Protein an geladene Membranen (Ramsay et al., 1986), der Wechselwirkung des integralen Band 3 Proteins aus den Erythrozyten (Morrow et al., 1986) und des Transferrin Rezeptors mit Lipiden (Kurrle et al., 1990). In manchen Membranen scheinen Proteine als Reaktion auf Veränderungen des thermotropen Zustandes der Lipide oder der Lipidzusammensetzung Aggregate zu bilden (Mouritsen & Sperotto, 1992), insbesondere wurde dies bestätigt für Membranen, die das integrale Rezeptorprotein Bacteriorhodopsin (Lewis & Engelman, 1983), oder Rhodopsin (Mouritsen & Sperotto, 1992) enthalten. Gramicidin A (O'Connell et al., 1990; Cornell et al., 1989; Huang, 1986; Elliott et al., 1986) und das Peptid Alamethicin (Gennis, 1989) formen Kanäle oder Poren, die sich aus Dimeren oder Aggregaten der Proteine aufbauen. Die Kontrolle der Bildung solcher Aggregate könnte in wichtigem Maße von dem Gleichgewicht zwischen Monomeren und Aggregaten abhängen und so wiederum vom Lipidzustand bestimmt werden.

In einer kürzlich verfaßten Arbeit untersuchten Sugar et al. (1993) die Dynamik der thermotropen Schmelzreaktion von Lipidmembranen mit Hilfe von Monte-Carlo-Simulationen, ausgehend von einem Zwei-Zustands-Modell für die kooperative Umwandlung in Lipidmembranen. Diese Formulierung geht zurück auf die Beschreibung der Helix-Coil-Umwandlung in Polypeptiden von Zimm und Bragg (1959) und die Anwendung dieses Konzeptes auf Membranen (zuerst vorgeschlagen von Marsh et al., 1977). Membranen werden darin nicht als statisches sondern eher als dynamisches Ensemble von Molekülen zu betrachten, deren physikalischen Eigenschaften sich erst durch eine statistische Mittelung über die Zeit definieren lassen. Der Lipidmembran wird in einer solchen Simulation erlaubt, einen statistischen Weg durch eine Mannigfaltigkeit von möglichen Verteilungen unterschiedlicher Zustände der Lipide zu nehmen. Die Observablen sind dabei Gegenstand von statistischen Schwankungen (Fluktuationen), die in direktem Zusammenhang zum Beispiel zur Wärmekapazität der Membran stehen.

Die aus diesem Konzept folgende Koexistenz von Lipiddomänen unterschiedlichen physikalischen Zustandes wird in den letzten Jahren in einer Vielzahl von Veröffentlichungen diskutiert (Mouritsen & Biltonen, 1992; Fraser et al., 1991; Mouritsen, 1989, 1991; Mouritsen et al., 1992). Da die Form und statistische Häufigkeit von Lipiddomänen ein komplexes Problem darstellen, das analytisch schwer oder gar nicht handhabbar ist, wurden in der Mehrzahl Monte-Carlo-Rechnungen durchgeführt, die auf dem sogenannten Pink-Modell (Pink

& Chapman, 1979; Pink et al, 1980) beruhen. Das Pink-Modell beinhaltet die Beschreibung der Eigenschaften von zehn verschiedenen Zuständen eines individuellen Lipids. Sowohl Größe und Länge als auch Ladung und andere Eigenschaften der Lipide werden. Auch wenn die physikalische Wirklichkeit in diesen Modellen vermutlich richtig wiedergegeben wird ist, sind die Rechnungen jedoch nicht leicht in ihren Details nachzuvollziehen. Das Konzept von Marsh et al. (1977) und Sugar et al. (1992, 1993) beschränkt hingegen die Berechnung auf einen einzigen Parameter, der über die Kooperativität der Umwandlung entscheidet, und stellvertretend für die Summe aller mikroskopischen Wechselwirkungen von benachbarten Molekülen steht. Sugar et al. (1992, 1993) konnten zeigen, daß dieses einfache Modell zu gleichen Vorhersagen über die Form der kalorimetrischen Schmelzumwandlung der Lipide führen wie das viel komplexere Pinkmodell.

Monte-Carlo-Rechnungen von Membranen in der Gegenwart von integralen Protein verwenden zusätzliche Parameter für die Wechselwirkung von Lipiden mit dem Protein. Ein wesentlicher Parameter scheint dabei der Unterschied der Ausdehnung des hydrophoben Teils des integralen Proteins und der Membrandicke zu sein, das sogenannte "hydrophobic matching" (Mouritsen & Sperotto, 1992; Mouritsen & Biltonen, 1992; Fattal & Ben-Shaul, 1993; Sperotto & Mouritsen, 1991; Sperotto et al., 1989, 1993), das die Grenzflächenenergie zwischen Lipiden und Proteinen bestimmt und zum Teil zu weitreichenden Wechselwirkungen führt, die unter anderem in der Aggregation von integralen Proteinmolekülen mündet.

In diesem Kapitel wird basierend auf dem Zwei-Zustands-Modell von Sugar et al. (1992, 1993) die Wechselwirkung zwischen Lipiden und Proteinen untersucht. Das Lipid-Proteinsystem wird dabei von nur zwei freien Parametern für Kooperativität und Lipid-Proteinwechselwirkung (zusätzlich zu den experimentellen Größen Schmelztemperatur und -Enthalpie) beschrieben. Dabei wird sowohl die C_p -Kurve als auch die statistische Anordnung der Lipide und Proteine untersucht.

V-3 MATERIALIEN UND METHODEN

Cytochrom c (Type VI, Sigma, St.Louis, Mo.) wurde in seine oxydierten Form ohne weitere Reinigung verwendet. Dimyristoyl Phosphatidylglycerol (DMPG, Avanti Polar Lipids, Birmingham, Al.) wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Da das reine Lipid nur bei hohen Konzentrationen eine kooperative Umwandlung aufweist (vgl.Kap.II), wurden 300 mM Lipiddispersionen in der Abwesenheit, und 150 mM bzw. 50 mM Dispersionen in Gegenwart ansteigender Mengen Cytochrom C verwendet. Als Lipid/Proteinstoichiometrie in einem Bindungsplatz wurde 10 angenommen (Görrissen et al., 1986; Heimbürg & Biltonen, 1993, vgl. Kap.II).

Kalorimetrische Messungen wurden mit einem Hart Scientific Scanning Calorimeter bei Heizraten von 10 grd/Stunde und mehr, unter Verwendung einer Zeitkonstanten-Korrektur, durchgeführt.

Der integrale Teil des langsamen Kalium-Kanals (I_{SK}) beginnt an der 42ten Aminosäureposition und hat die Sequenz lys-leu-glu-ala-leu-tyr-ile-leu-met-val-leu-gly-phe-phe-gly-phe-phe-thr-leu-gly-ile-met-leu-ser-tyr-ile. Er wurde synthetisch hergestellt und in Dimyristoyl Phosphatidylcholin (DMPC, Sigma, St.Louis, Mo.) gelöst. Eine Probe dieser Lipid-Proteinkomplexe wurde freundlicherweise von Prof.Dr.L.I.Horváth, Szeged, Ungarn, zur Verfügung gestellt.

V-4 MODELL FÜR LIPID-PROTEIN WECHSELWIRKUNG

V-4.1 Zwei-Zustandsmodell für die Gel → Flüssig Umwandlung in Lipiden

Die Lipidumwandlung soll, folgend Sugar et al. (1993), beschrieben werden durch die Annahme, daß es nur zwei Zustände eines jeden Lipids gibt, gelförmig und fluid. Diese Lipide befinden sich in einer planaren Matrix deren Symmetrie als hexagonal angenommen wird (dichteste Packung) und treten mit anderen Lipiden ausschließlich über Nächstnachbar-Wechselwirkungen in Beziehung.

Die freie Energie eines jeden Lipids besteht nunmehr aus zwei Beträgen: Aus der intrinsischen freien Energie G_i (wobei der Index i für g = gel oder l = liquid (flüssig) steht) jeder Lipidkette, deren Größe sich durch die Zahl der CH_2 -Gruppen und der mittleren Zahl von Trans-Gauche-Isomerisierungen ergibt, und in dem Beitrag der Nächstnachbar-Lipid-Lipid-Wechselwirkung ϵ_{ij} , der von der Art der individuellen Nachbarschaft eines jeden Lipids bestimmt wird. Solange die Breite einer betrachteten Schmelzumwandlung nur ein sehr kleines Temperaturintervall überstreicht (d.h. ϵ ist klein gegenüber der Schmelzenthalpie der Lipide, begeht man nur kleine Fehler bei quantitativen Berechnungen, wenn man annimmt, daß der Beitrag ϵ ausschließlich enthalpischer Natur ist.

Die gesamte freie Energie der Lipidmatrix ist die Summe über alle n Lipide, wobei n_g die Zahl der gelförmigen und n_l die Zahl der fluiden Lipide ist. Man erhält für die freie Energie der gesamten Lipidmatrix:

$$G = n_g \cdot G_g + n_l \cdot G_l + n_{gg} \cdot \epsilon_{gg} + n_{ll} \cdot \epsilon_{ll} + n_{gl} \cdot \epsilon_{gl} \quad (5.1)$$

mit den Beiträgen ε_{ij} von Nächstnachbar-Wechselwirkungen zwischen gleichen (ε_{gg} , ε_{ll}) und ungleichen Lipiden (ε_{gl}), wobei n_{ij} die jeweilige Häufigkeit des Auftretens dieser Wechselwirkung ist. (5.1) kann reduziert werden auf

$$G = N \cdot G_g + n_l \cdot (\Delta H - T \cdot \Delta S) + n_{gl} \cdot \Delta \omega_{gl} \quad (5.2)$$

mit $\Delta H = (H_l + z \cdot \varepsilon_{ll}/2) - (H_g + z \cdot \varepsilon_{gg}/2)$ und $\Delta S = (S_l - S_g)$ bei einer Koordinationszahl $z = 6$ in einem hexagonalen Gitter. Der Parameter $\Delta \omega_{gl} = \varepsilon_{gl} - (\varepsilon_{gg} + \varepsilon_{ll})/2$ ist in Gleichung (5.2) nur dann von Wichtigkeit, wenn die Zahl der ungleichen Nächstnachbar-wechselwirkungen ungleich Null ist, d.h. innerhalb der Koexistenzgegend von gelförmig und von flüssig-kristallin. Er beschreibt deshalb durch seine Größe die Kooperativität der Umwandlung (Huang 1963, Sugar et al., 1993). Die freie Energieänderung ΔG zwischen flüssig kristalliner und gelförmiger Membran ist definiert durch

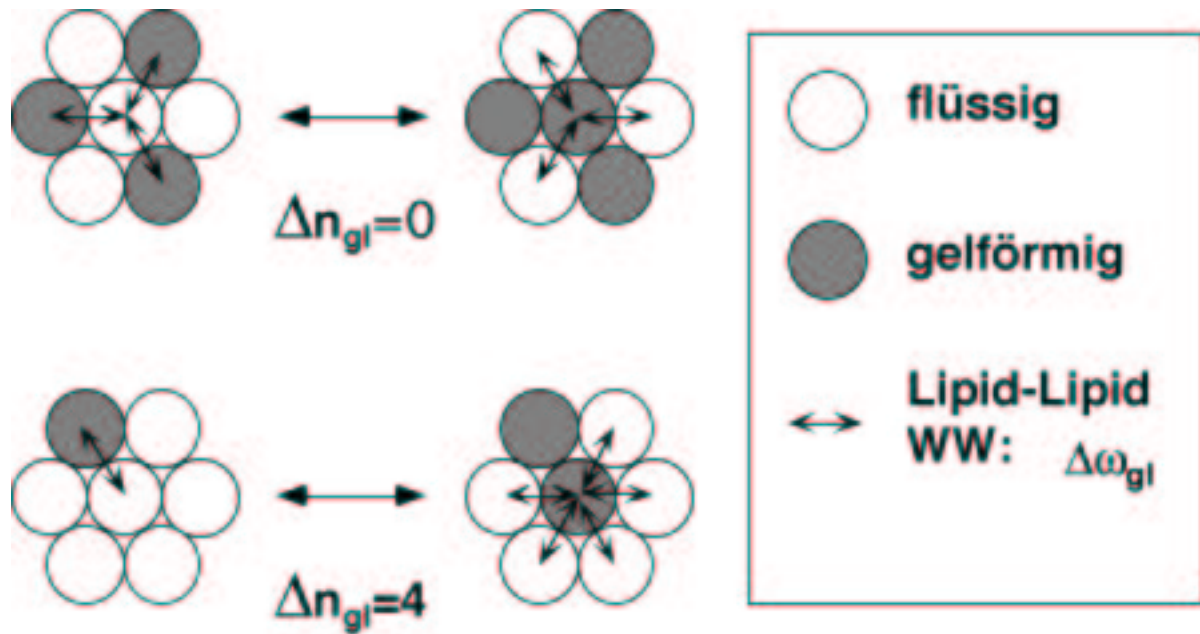
$$\Delta G = n \cdot (\Delta H - T \cdot \Delta S) \quad (5.3)$$

was es erlaubt, mittels der Bestimmung von ΔH und der Umwandlungstemperatur T_m im Differentialkalorimeter auch ΔS zu bestimmen:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (5.4)$$

Der Kooperativitätsparameter $\Delta \omega_{gl}$ kann im durch das Anpassen der theoretischen Schmelzkurven an das Experiment gewonnen werden. Es konnte von Sugar et al. (1992, 1993) gezeigt werden, daß der qualitative und quantitative Verlauf der C_p -Kurve durch diese einfache Betrachtungsweise ebenso gut angepaßt werden kann wie durch das wesentlich komplexeren Pinkmodell (s. Mouritsen & Biltonen, 1992).

Bei einer Simulation besteht das Hauptproblem darin, die Zahl n_{gl} ungleicher Nächstnachbar-Wechselwirkungen für eine Lipidmatrix bei einer festen Temperatur T zu bestimmen. Im eindimensionalen Fall läßt sich eine exakte Formulierung eines statistischen Ensembles von Zuständen angeben (Zimm & Bragg, 1959), die durch der Zahl der geschmolzenen Lipide und der Zahl der ungleichen Nächstnachbar-Wechselwirkungen beschrieben wird.

**Abb. V-1**

Umwandlung eines Lipidmoleküls in einem hexagonalen Gitter von flüssig nach gelförmig (betrachtet wird das zentrale Lipid mit seinen 6 nächsten Nachbarn)

Für den zweidimensionalen Fall ist bisher keine Beschreibung bekannt. Um diese Schwierigkeit zu umgehen wurden Monte-Carlo-Simulationen durchgeführt, in denen eine Lipidmatrix mit diskreten Werten für den Zustand jedes Lipids erzeugt wird. Für jedes Lipid ist in dieser Matrix die Art der Lipide in der direkten Umgebung bekannt und man kann für jedes Lipid individuell die Wahrscheinlichkeit einer Umwandlung von Gel nach Fluid oder umgekehrt angeben. Die Umgebung jedes Lipids wird durch Berücksichtigung der für jedes Lipid individuell zu bestimmenden Veränderung Δn_{gl} der ungleichen Nächstnachbar-Wechselwirkungen berücksichtigt (siehe Abb. V-1). Für jedes Lipid ist die Gleichgewichtskonstante gegeben ist durch

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta H - T \cdot \Delta S + \Delta n_{gl} \cdot \Delta\omega_{gl}}{RT}\right). \quad (5.5)$$

Nach statistischer Wahl eines Lipids in der Matrix kann man durch Wichtung mit der Gleichgewichtskonstante in (5.5) einen (von der Temperatur abhängigen) neuen Zustand bestimmen. Man nennt dieses Vorgehen Metropolis-Verfahren. Dieser Prozeß muß für alle Lipide für eine hinreichend große Zahl von Malen wiederholt werden, sodaß die gesamte Matrix auf eine zufällige Art und Weise durch den gesamten Phasenraum wandert, wobei jede statistische Anordnung von gelförmigen und flüssigen Lipiden mit der ihr eigenen statistischen Wichtung an der Bestimmung der gemittelten thermodynamischen Größen teilnimmt. Weder die

Verteilung noch die gesamte Anzahl von gelförmigen oder fluiden Lipiden (und damit die Enthalpie der Matrix) bleibt dabei konstant.

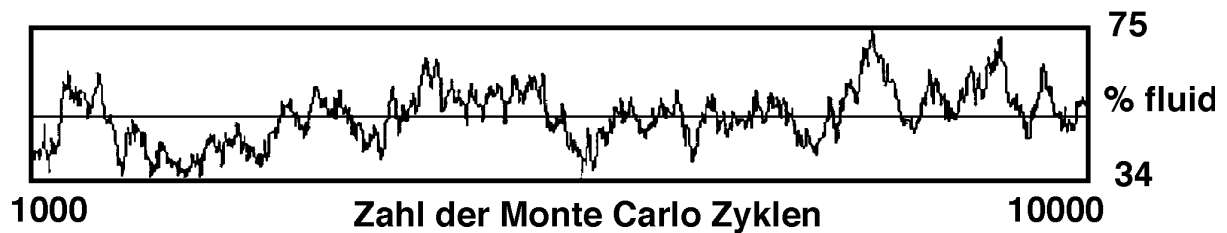


Abb. V-2

Fluktuationen des mittleren prozentualen Anteils von fluiden Lipiden um einen mittleren Wert von 50% über 9000 Monte-Carlo-Zyklen. Verwendete Parameter waren: $\Delta H = 8700$ cal/mol, $T_m = 310.3$ K, $\Delta\omega_{gl} = 310.3$ cal/mol bei $T = 310.3$ K

Nach einer bekannten Beziehung der statistischen Mechanik können die Fluktuationen in der Enthalpie der gesamten Matrix durch folgende Beziehung zur Bestimmung der Wärmekapazität benutzt werden (Hill, 1960):

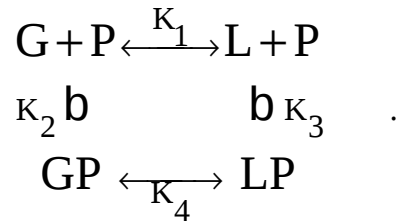
$$C_p = \frac{1}{k \cdot T^2} \cdot \overline{(H - \bar{H})^2} \quad . \quad (5.6)$$

Die mittlere quadratische Abweichung der Enthalpie der Lipidmembran ($H = N \cdot H_g + N_l \cdot H + \langle n_{gl} \rangle \cdot \Delta\omega_{gl}$) vom Mittelwert, die man in einer genügend langen Monte-Carlo-Simulation bestimmen kann (siehe Abb. V-2) ist proportional zur Wärmekapazität C_p

V-4.2 Wechselwirkung von Lipiden mit Proteinen

Es ist eine experimentell beobachtbare Tatsache, daß die Bindung von Proteinen an Lipide die thermotropen Eigenschaften von Membranen beträchtlich verändern können (siehe z.B. Kap.II). Gemeinhin sind die Schmelzumwandlungen der Lipide verbreitert und auch in ihrem Mittelpunkt verschoben. Bei integralen Proteinen weiß man, daß um jedes Proteinmolekül herum eine Lipidgrenzschicht existiert, die in ihrer Kettenflexibilität behindert ist und in Elektronenspinresonanz-Untersuchungen eine gelähnliche spektrale Komponente hervorruft (Marsh & Watts, 1982).

Wenn man die komplexen Details der Umwandlung für einen Moment beiseite läßt, kann man den Effekt des Proteins auf Lipide mit folgendem einfachen Schema demonstrieren:



Es enthält das Gleichgewicht zwischen Gel und Fluid ($G \leftrightarrow L$), die Bindungsgleichgewichte $G + P \leftrightarrow GP$ und $L + P \leftrightarrow LP$ und das Schmelzgleichgewicht des Lipid-Proteinkomplexes $GP \leftrightarrow LP$ mit den Gleichgewichtskonstanten K_1 , K_2 , K_3 und K_4 . P ist das freie, ungebundene Protein. Da die freie Energie eine Zustandsfunktion ist, muß gelten

$$\begin{aligned}
 K_1 \cdot K_3 &= K_2 \cdot K_4 \quad , \\
 K_1 \neq K_4 &\Rightarrow K_2 \neq K_3 \quad .
 \end{aligned}
 \tag{5.7}$$

Das bedeutet, wenn durch die Proteinbindung die thermotrope Lipidumwandlung verschoben wird, muß als direkte Konsequenz die Bindungskonstante des Proteins an die gelförmige Membran von der Bindungskonstante an die fluide Membran verschieden sein. In anderen Worten heißt das, daß die Bindungsreaktion die Verschiebung der Umwandlungstemperatur verursacht. Sie verursacht unter Umständen auch eine Veränderung der Schmelzenthalpie. Diese Betrachtung ist auch dann gültig, wenn sowohl die Umwandlungen als die Bindungsreaktionen in mehrerer Schritten erfolgen (vgl. mit den Bindungsmodellen in Kap.II und IV).

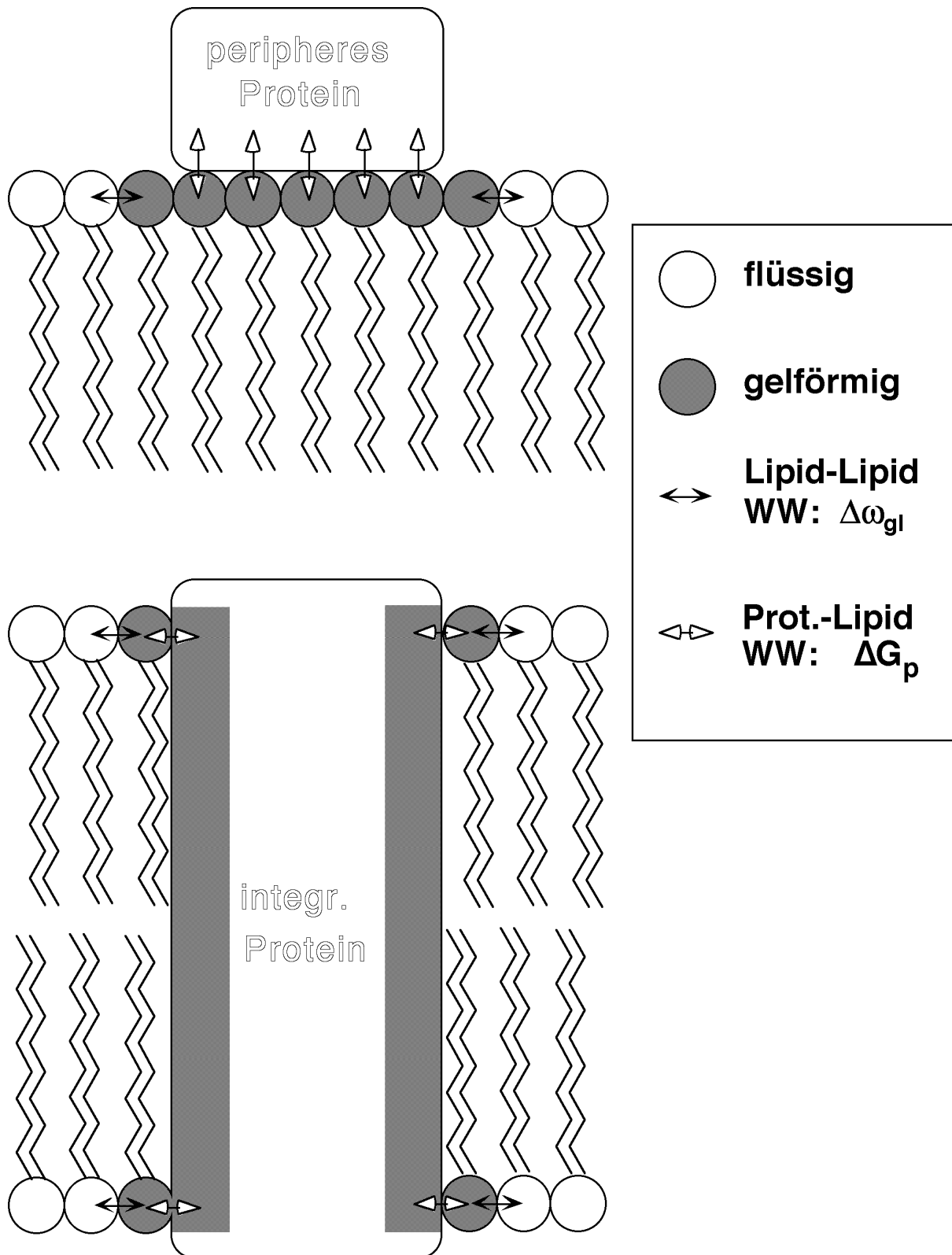
Im folgenden wird die Wechselwirkung eines Proteins mit einem Lipid durch die freien Energien G_p^g und G_p^l der Bindung des Proteins an Gel- und fluide Phase des Lipids, und mittels der differentiellen Bindungsenergie $\Delta G_p = G_p^l - G_p^g = \Delta H_p - T \cdot \Delta S_p$ beschrieben.

Die Verschiebung der Lipidumwandlung bei vollständiger Sättigung der Membran mit Proteinmolekülen kann ausgedrückt durch:

$$\Delta T_m = \frac{\Delta H + \Delta H_p}{\Delta S + \Delta S_p} - \frac{\Delta H}{\Delta S} \quad ,
 \tag{5.8}$$

wobei ΔH und ΔS definiert sind wie in (5.4).

Für den Fall daß $\Delta S_p = 0$ ist, reduziert sich Gleichung (5.8) auf $\Delta T_m = \Delta H_p / \Delta S$.

**Abb. V-3**

Wechselwirkung zwischen peripheren oder integralen Proteinen mit Lipiden, beschrieben durch die Wechselwirkungsenergien $\Delta\omega_{gl}$ und ΔG_p .

Sowohl die Veränderungen der Schmelzenthalpie als auch der Entropie können experimentell bestimmt werden. Im Beispiel von Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol (DMPG) in Komplexen mit Cytochrom c (vgl. Kapitel II und III) beträgt die Enthalpie $\Delta H = 6$ kcal/mol und $\Delta S = 20.2$ cal/mol·deg, die Veränderung der Schmelz-enthalpie bei Bindung des Proteins $\Delta H_p = -4.3$ kcal/mol und $\Delta S_p = -14.6$ cal/mol·deg (bestimmt aus der Veränderung der Schmelzenthalpie und der Schmelztemperatur in Kapitel II). Dies ist äquivalent einer differentiellen freien Bindungsenergie von $\Delta G_p = 101$ cal/mol am Schmelzpunkt der Lipide (ΔG_p ist temperaturabhängig), einer Umwandlungstemperatur des Lipids von $T_m = 24$ °C und einer Verschiebung bei Bindung von Cytochrom c von $\Delta T_m = 5$ grd (siehe Abb. V-16). In diesem Fall ist augenscheinlich die Bindung des Proteins an die Gelphase energetisch begünstigt.

V-4.3 Monte Carlo Simulationen

Monte Carlo Simulationen wurden unter Annahme einer hexagonalen Lipidmatrix mit 61×61 Lipiden (3721 Lipide) durchgeführt. Zwischen den Koordinatenachsen x und y liegt ein Winkel von 60° . Die Matrix ist definiert als

$$M(x,y), \quad -30 \leq x,y \leq 30$$

mit periodischen Randbedingungen, sodaß gilt: $M(31,y) = M(-30,y)$, $M(-31,y) = M(30,y)$, $M(x,31) = M(x,-31)$ und $M(x,-31) = M(x,30)$. Diese Randbedingungen führen zu einem Vesikel mit ringförmiger Geometrie.

Jedes Lipid hat in einer hexagonalen Matrix 6 Nachbarn. Für jedes individuelle Lipid gibt es bei einer gegebenen Nachbarschaft eine Wahrscheinlichkeit P_f im flüssig kristallinen Zustand zu sein, die durch

$$P_f = \frac{K}{1+K}, \quad K = \exp\left(-\frac{\Delta H - T \cdot \Delta S + \Delta n_{gl} \cdot \Delta \omega_{gl} + \Delta E_p}{R \cdot T}\right) \quad (5.9)$$

gegeben ist, wobei $\Delta \omega_{gl}$ und ΔE_p ($\equiv \Delta G_p$, hier zur Vereinfachung als temperaturunabhängig definiert) die beiden Parameter sind, die die Form der Umwandlung bestimmen ($\Delta E_p \neq 0$, wenn ein Lipid von einem Proteinmolekül bedeckt ist und es gleichzeitig flüssig-kristallin ist). Dabei sei Δn_{gl} die Veränderung der Zahl der ungleichen Nächstnachbar-Wechselwirkungen bei einer Veränderung eines einzelnen Lipids von gelförmig nach flüssig kristallin ist ($-6 \leq \Delta n_{gl} \leq 6$ im hexagonalen Gitter).

Eine zweite Matrix $P(x,y)$ mit 61×61 Plätzen wird verwendet, die die möglichen Mittelpunkte der Positionen einer Zahl von n_p Proteinmolekülen enthält, die mit der Lipidmembran wechselwirken, und die mit denjenigen der Lipidmatrix $M(x,y)$ aufeinanderfallen sollen. Jedes Protein habe einen Radius r_0 und bedecke eine Fläche, die der Oberfläche von n Lipiden, mit denen es wechselwirkt, entspricht. Bei jedem Monte-Carlo-Schritt muß neben der Zahl Δn_{gl} überprüft werden, ob das gewählte Lipid von einem Proteinmolekül bedeckt ist oder nicht. Es ist offensichtlich, daß dies einen Einfluß auf die Wahrscheinlichkeit hat, ein gelförmiges oder flüssig kristallines Lipid zu finden.

Monte-Carlo-Zyklen werden durch zufällige Wahl von Lipiden und durch eine statistischen Einstellung des Lipidzustandes entsprechend der Wahrscheinlichkeit aus Gl.(5.9) ausgeführt. Die Auswahl geschieht mit Hilfe eines Zufallszahlengenerators, für den als generierender Keim die Computerzeit benutzt wurde. Dieses Verfahren stellt sicher, daß sich Zufallszahlenfolgen nicht wiederholen.

Zu Beginn werden die Proteinmoleküle auf eine statistische Art und Weise auf der Lipidoberfläche verteilt. Es gibt jedoch keinen Anlaß, ihren Ort auf einer nahezu kontinuierlichen Oberfläche als unveränderlich zu betrachten. Läßt man die Moleküle sich frei bewegen, bewegen sie sich durch Diffusion auf eine Weise, die von der Natur der Lipide in der Umgebung des Proteins abhängt. Es ist offensichtlich, daß die Proteine in unterschiedlichen Lipidumgebungen verschieden stark gebunden sind, solange gilt $\Delta E_p \neq 0$. Die Wahrscheinlichkeit P_m , daß ein Protein in eine bestimmte Richtung um eine Lipidposition diffundiert, hängt davon ab, wie sich die Zahl n_l der geschmolzenen Lipide unter dem Protein dabei verändert. Sie ist gegeben durch:

$$P_m(i) = \frac{K_m(i)}{1 + K_m(i)} \quad , \quad K_m(i) = \exp\left(-\frac{\Delta n_l(i) \cdot \Delta E_p}{R \cdot T}\right) \quad (5.10)$$

$$i = 0, 1, 2, \dots, 6$$

Der Index i steht für die sechs verschiedenen Richtungen in einer hexagonalen Matrix, in die die Proteine diffundieren können. $i = 0$ beschreibt den Fall, in dem sich das Proteinmolekül nicht bewegt. Die Entscheidung, in welche Richtung ein Proteinmolekül diffundiert, wird wiederum mittels einer Zufallszahl und der Wichtung aus Gl. (5.10) getroffen. Es wurde angenommen, daß die Diffusionsrate der Proteine langsamer als die Umklappraten der Lipide zwischen Gel und Fluid ist. Dies bedeutet, daß genügend Zeit besteht, in der sich die Verteilung der gelförmigen und fluiden Lipide an jede Veränderung der Proteinanordnung anpassen kann. Es ist ganz klar, daß nunmehr die Lipidverteilung und die Proteinverteilung aneinander gekoppelt

sind und die Lipidverteilung von der Proteinverteilung (und umgekehrt) abhängt. Dies führt weiter unten zu wichtigen Voraussagen bezüglich der räumlichen Anordnung von Proteinen.

Die Zahl der Monte-Carlo-Zyklen, die notwendig ist, um einen repräsentativen Pfad durch den Phasenraum zu gehen, hängt von der Größe der Matrix und den Eingabeparametern der Simulation ab. Ein Monte-Carlo-Zyklus sei hier definiert als eine Neubestimmung des Zustands von 61*61 statistisch gewählten Lipiden. Ein guter Test, ob die Simulation lange genug andauerte, besteht im Vergleich der spezifischen Wärme C_p , die in Gl. (5.5) definiert wurde mit ihrer eigentlichen Definition:

$$C_p = \frac{d\bar{H}}{dT} \quad . \quad (5.11)$$

Im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Simulationen stellte es sich als ausreichend heraus, für einen gegebenen Parametersatz 10000 Monte-Carlo-Zyklen durchzuführen. Dabei wurde nach jedem Zyklus die Position jedes 10ten Proteinmoleküls neu bestimmt.

V-5 RESULTATE

V-5.1 Lipidmembranen

Eine ausführliche Analyse der thermotropen Schmelzumwandlung von reinen Lipidmembranen wurde von Sugar et al. (1992,1993) unter Verwendung des in Abschnitt V-4.1 beschriebenen Modells durchgeführt. Es gelang den Autoren dabei, die Umwandlung kleiner, unilamellarer Vesikeln (SUV = small unilamellar vesicles) des Lipids Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) zu beschreiben. In Abb. V-4 sind errechneten C_p -Kurven einer Lipidmembran abgebildet, berechnet mit Hilfe der von Sugar et al. bestimmten Werte für die Schmelztemperatur T_m (= 310.3 K) und die Schmelzenthalpie (ΔH = 8.7 kcal/mol) für DPPC-SUV. Zwei verschiedene Werte für den Kooperativitätsparameter wurden verwendet: $\Delta\omega_{gl}$ = 282.4 cal/mol und $\Delta\omega_{gl}$ = 310.3 cal/mol. Der erste Zahlenwert dieses Parameters entspricht dem von Sugar et al. bestimmten Wert für die DPPC-SUV.

Die Wärmekapazität wurde aus den Fluktuationen der Monte Carlo Simulationen errechnet. Gleichzeitig mit der Wärmekapazität wurden auch andere mittlere Größen bestimmt, darunter die mittlere Fraktion f des geschmolzenen Lipids und die mittlere Zahl ungleicher

Nächstnachbar-Wechselwirkungen, $\langle n_{gl} \rangle$, die die Herleitung von Aussagen über die Verteilung von Lipiden unterschiedlichen Zustandes erlaubt.

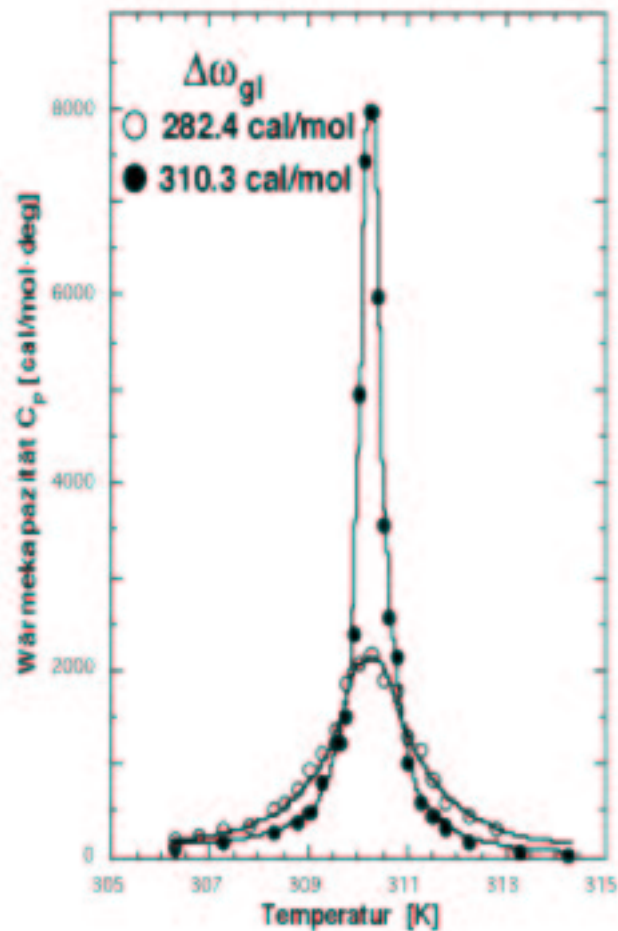
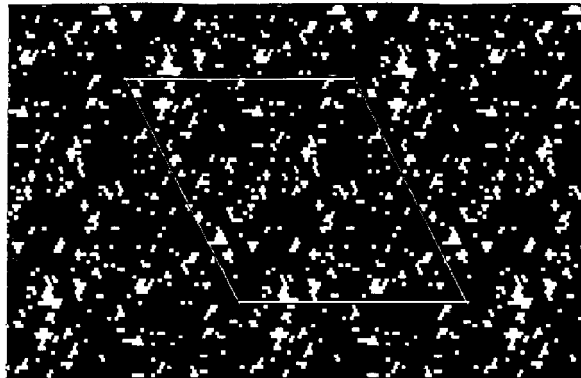
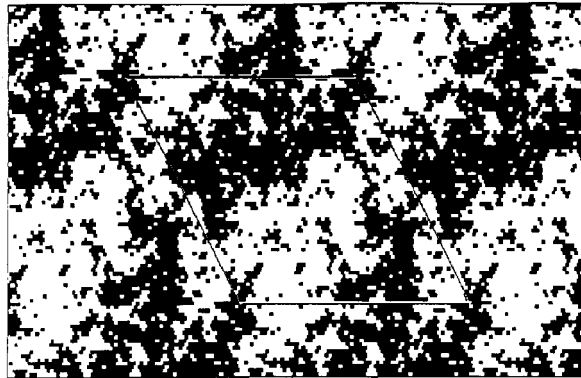
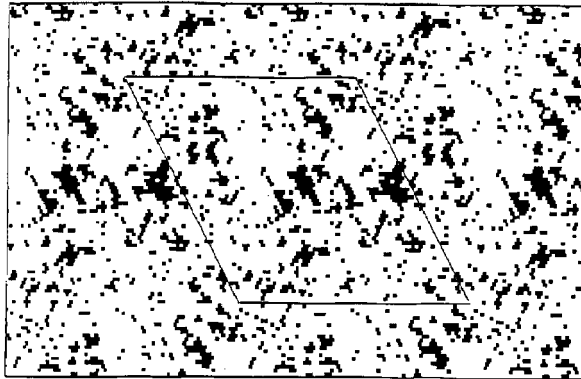


Abb.V-4

Monte-Carlo Simulationen des Verlaufes der spezifischen Wärme C_p für eine Lipidmembran mit $\Delta H = 8.7$ kcal/mol, $T_m = 310.3$ K und $\Delta\omega_{gl} = 282.4$ cal/mol (○) bzw. $\Delta\omega_{gl} = 310.3$ cal/mol (●).

Bei Vergrößerung des Parameters $\Delta\omega_{gl}$ nimmt die Kooperativität zu. Dies muß intuitiv so sein, da die Koexistenz von flüssigen und gelförmigen Lipiden energetisch ungünstiger wird. Diese Tatsache führt zur Ausbildung von Domänen flüssiger und gelförmiger Lipide, die abhängig von der Größe von $\Delta\omega_{gl}$ immer größer werden, bis sie im Grenzfall eines unendlichen Wertes nur noch eine einzige Domäne einer Sorte zulassen, die je nach Temperatur entweder gelförmig oder flüssig kristallin ist. Dies ist der Grenzfall unendlicher Kooperativität beziehungsweise der Grenzfall einer Umwandlung erster Ordnung. In den hier beschriebenen Fällen hat die spezifische Wärme immer endliche Werte, sodaß man die Lipidumwandlung als Umwandlung zweiter Ordnung betrachten muß.

Unterhalb des C_p -Maximums ($T=308.3$ K)Am C_p -Maximum ($T=310.3$ K)Oberhalb des C_p -Maximums ($T=311.3$ K)**Abb. V-5**

Lipidmatrix bei 3 verschiedenen Temperaturen unterhalb, auf und oberhalb des Maximums der Wärmekapazität für DPPC, berechnet unter Verwendung folgender Parameter: $\Delta H=8.7$ kcal/mol, $T_m=310.3$ K, $\Delta\omega_{gl}=310.3$ cal/mol. Gelförmige Lipide sind als schwarze, fluide Lipide als weiße Punkte dargestellt. Die berechnete Matrix hat eine Größe von 61×61 Lipiden und ist innerhalb der Raute dargestellt. Der Rest der Darstellung ergab sich unter Verwendung von periodischen Randbedingungen.

In Abb. V-5 sind repräsentative Lipidverteilungen von DPPC-Vesikeln mit $\Delta\omega_{gl} = 310.3$ cal/mol bei drei Temperaturen abgebildet, die die Ausbildung von Domänen der Lipide verschiedenen Zustandes verdeutlichen. Die Dömanengröße ist notwendigerweise abhängig

von Temperatur und von der Kooperativität der Umwandlung. Wie Abb. V-5 zu entnehmen ist, ist die Form der Domänen komplex. Die Vielzahl möglicher Anordnungen der Oberflächen der Domänen trägt zur Entropie des Systems bei. Um qualitative Aussagen zu machen, soll hier ein Parameter definiert werden, der die Größe der Domänen nicht als Funktion der Zahl der in ihr enthaltenen Lipide beschreibt, sondern als Funktion des Verhältnisses zwischen Domänenfläche und Domänenoberfläche. In der Regel ist der Umfang proportional zum mittleren Radius einer Domäne, während die Fläche quadratisch davon abhängt. Ein Äquivalent zum Domänenradius (der fluiden Lipide) ergibt sich deshalb aus der Beziehung

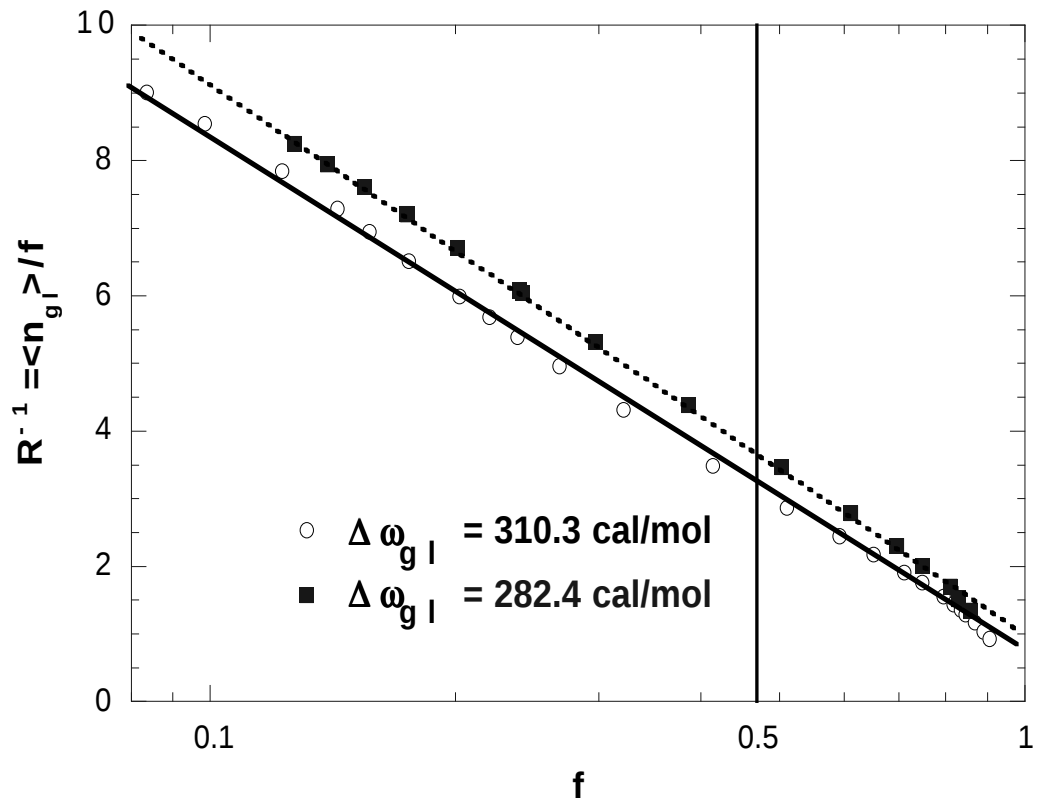
$$R = \frac{f}{\langle n_{gl} \rangle}$$

wobei f der Anteil fluiden Lipids in der Matrix und $\langle n_{gl} \rangle$ die mittlere Anzahl von Gel-Fluid-Wechselwirkungen pro Lipid ist. Die Größe R ist jedoch nur in sehr abstrakter Weise äquivalent zu einem mittleren Radius. In dieser Darstellung ist die Domänengröße nicht mehr davon abhängig, ob sich zwei benachbarte Domänen an einem Punkt berühren oder nicht. R ist vielmehr ein Maß für die Komplexität der Oberfläche der Domänen, was eine wesentlich bedeutungsvollere Größe ist als das reine Volumen jeder Domäne.

In Abb. V-6 ist wurde R^{-1} als Funktion des Logarithmus' der Fraktion fluiden Lipids dargestellt. Es ergibt sich in der ganzen Breite der Umwandlungen, die in Abb. V-4 dargestellt wurden, ein in guter Näherung lineares Verhalten:

$$\frac{\langle n_{gl} \rangle}{f} = -a \cdot \ln(f) + b \quad (5.12)$$

Dabei sind sowohl a als auch b monotone Funktionen von $\Delta\omega_{gl}$, was bedeutet, daß für alle Fraktionen f die Gesamtoberfläche der Domänen kleiner wird, wenn $\Delta\omega_{gl}$ größer wird. Die Grenzfläche der Domänen ist also nicht zur Wurzel aus der Gesamtfläche proportional und entspricht deshalb keinem Umfang im klassischen Sinne. Dies deutet auf ein fraktale Dimension der Oberfläche hin (Stauffer, 1985). Obwohl in dieser Arbeit von Beziehung (5.12) kein weiterer Gebrauch gemacht wird, sollte sie in für zukünftige Behandlungen wichtige Hinweise für die Herleitung einer analytischen Form der C_p -Kurve von Lipidumwandlungen geben.

**Abb. V-6**

Halblogarithmische Auftragung der inversen Clustergröße $1/R$ gegen die Fraktion fluiden Lipids für $\Delta H = 8.7$ kcal, $T_m = 310.3$ K und die beiden angegebenen Werte für $\Delta \omega_{gl}$

V-5.2 Wechselwirkung von Lipidmembranen mit peripheren Proteinen

An die Membranen, die im letzten Abschnitt behandelt wurden, sollen jetzt periphere Proteine gebunden werden. Die Simulationen dienen dem Ziel, beispielhaft die Wirkung peripherer Proteine auf Membranen zu beschreiben und auch Voraussagen allgemeiner Natur zu treffen. Dabei wurde (willkürlich) ein Proteindurchmesser mit fünf Lipiddurchmessern angenommen, was einer Bedeckung von 19 Lipiden pro Proteinmolekül entspricht. Auf die Membran mit 61×61 Lipiden passen deshalb ungefähr 190 Proteinmoleküle bei hexagonal dichtester Packung. Die gewählte Größe des Proteins liegt in der Größenordnung der Querschnitte der peripheren Proteine Cytochrom c (ca. 10 - 12 Lipide/Protein; Kap. II und IV) oder Phospholipase A₂ (ca. 20 Lipide/Protein).

Die Wechselwirkungsenergie wurde als $\Delta E_p = 200$ cal/mol Lipid angenommen. Dies liegt wiederum in derselben Größenordnung wie bei der Bindung von Cytochrom c an Dimyristoyl

Phosphatidylglycerol (siehe Methodenteil und Kap.II), wo $\Delta E_p \approx 100$ cal/mol Lipid beträgt. Auf 19 Lipide umgerechnet, beträgt der Gesamtunterschied der Bindungsenergie an Gel- und fluide Phase 3800 cal/mol Protein. Bei Cytochrom c wäre dies ein 1200 cal/mol Protein.

Es wurden Simulationen mit 30, 60, 90 und 120 Proteinen pro Oberfläche durchgeführt, was einem Bedeckungsgrad von ca. 16%, 31%, 47% und 63% entspricht. Auf höhere Bedeckungsgrade wurde verzichtet, da sie aufgrund der entropischen Beiträge einer Verteilung nur unter extremen Bedingungen (bei extrem starken Bindungskonstanten) angenommen werden (vgl.Kap.IV).

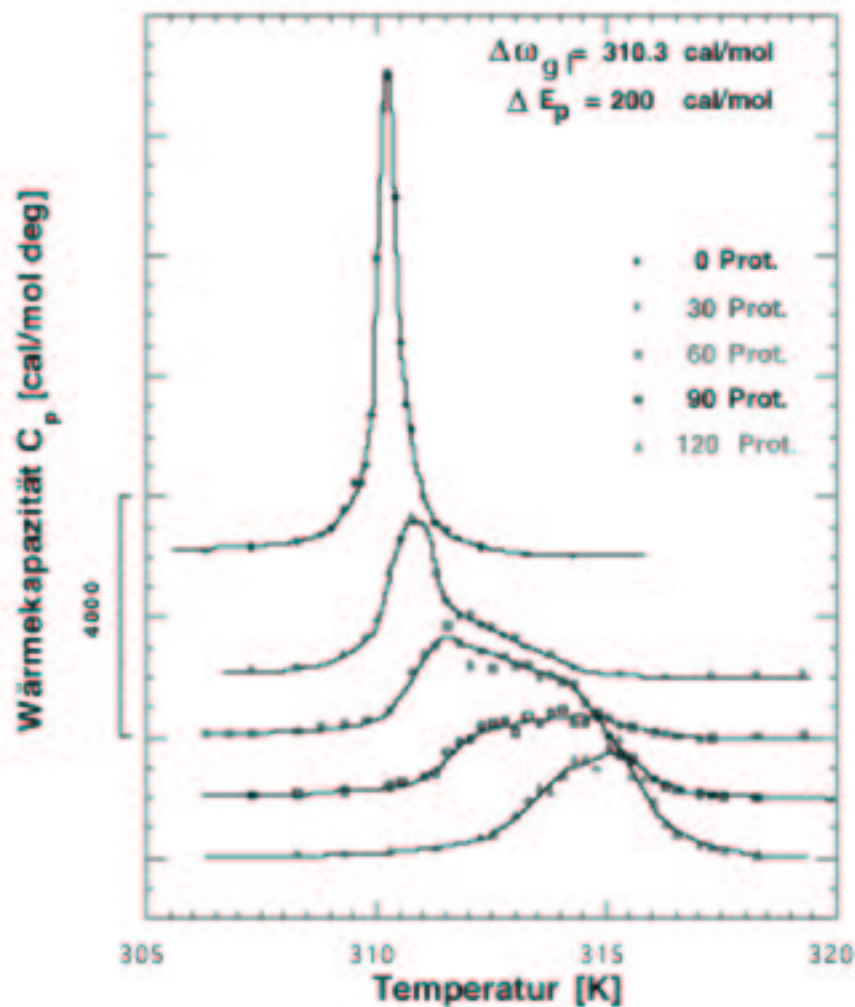
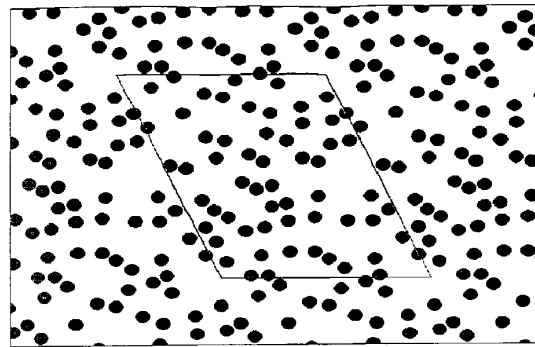
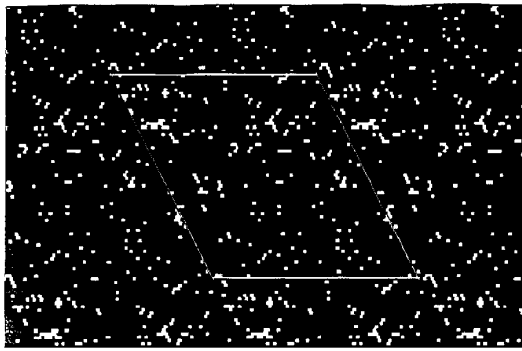
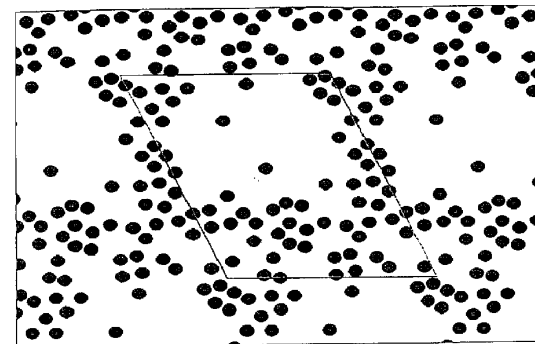
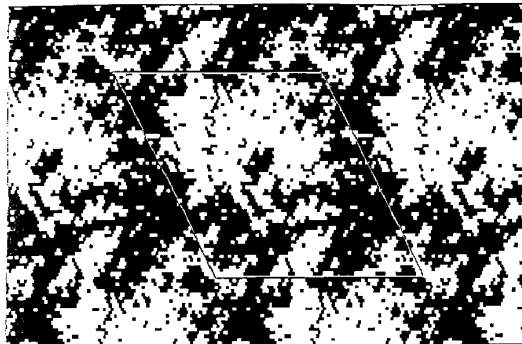


Abb. V-7

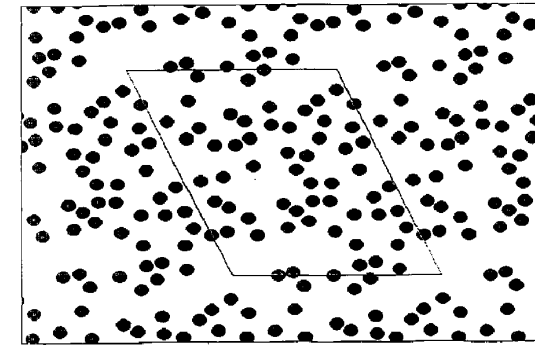
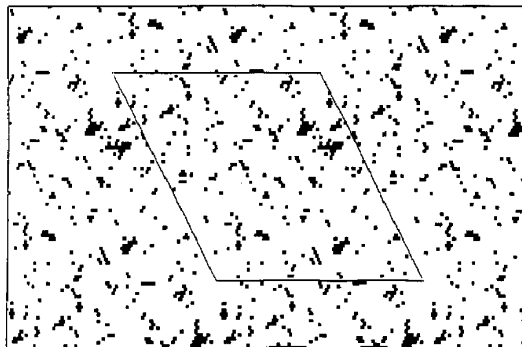
Monte-Carlo Simulationen der Wärmekapazitätsprofile von Lipid-Proteinkomplexen mit unterschiedlichen Bedeckungsgraden der Lipidmatrix mit peripheren Proteinen: (von oben nach unten) 0%, 16%, 31%, 47% und 63% Bedeckung. Verwendete Parameter waren: mit $\Delta H = 8.7$ kcal/mol, $T_m = 310.3$ K und $\Delta\omega_g = 310.3$ cal/mol und $\Delta E_p = 200$ cal/mol mit einer Proteingröße entsprechend 19 Lipidquerschnitten und einer Lipidmatrix mit 61-61 Lipiden.



Unterhalb des C_p -Maximums ($T=306.3$ K)



Am C_p -Maximum ($T=312.3$ K)



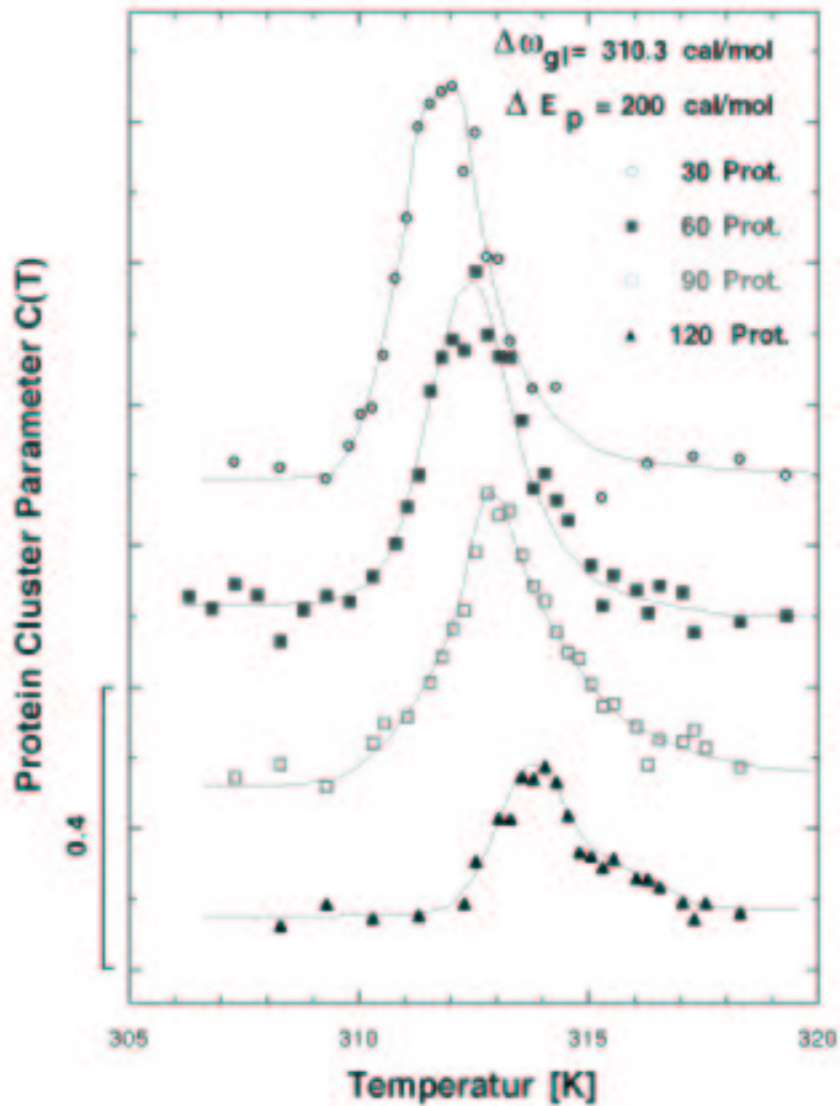
Oberhalb des C_p -Maximums ($T=318.3$ K)

Abb. V-8

Lipidmatrix (61·61-Matrix, links) und Proteinmatrix (60 Proteine, rechts) für Komplexe aus Lipiden und peripheren Proteinen, bei Temperaturen unterhalb (oben), am (Mitte) und oberhalb (unten) des Maximums der Wärmekapazität. Bei 312.3 K erkennt man eine Aggregation der gebundenen Proteinmoleküle auf den Geldomänen des Lipides (gelförmige Lipide sind als schwarze Pixel, fluide Lipide als weiße Pixel dargestellt). Verwendete Parameter waren: mit $\Delta H=8.7$ kcal/mol, $T_m=310.3$ K und $\Delta\omega_{gl}=310.3$ cal/mol und $\Delta E_p=200$ cal/mol (entsprechend $\Delta T_m=7.1^\circ$) mit einer Proteingröße entsprechend 19 Lipidquerschnitten.

In Abb. V-7 werden die, in den Monte-Carlo-Simulationen bestimmten, Verläufe der Wärmekapazität bei den angegebenen Proteinbedeckungsgraden beschrieben. Die Parameter wurden in Analogie zu der Bindung von Cytochrom c an DMPG so gewählt, daß die Bindung

eines gelförmigen Lipids an ein Proteinmolekül energetisch begünstigt ist. Qualitativ ergibt Abb. V-7 folgendes Verhalten der Schmelzkurven: Mit zunehmendem Bedeckungsgrad der Membran (streng-genommen einer Monolayer der Membran) mit Proteinmolekülen werden die C_p -Maxima zu höheren Temperaturen hin verschoben. Die Form der Umwandlung wird asymmetrisch und verbreitert. Im Grenzfall vollständiger Bedeckung der Membran (nicht gezeigt) ist die Umwandlung wieder ähnlich kooperativ wie die Umwandlung des reinen Lipids. Im vorangegangenen Abschnitt wurde beschrieben, wie der Kooperativitätsparameter zur Ausbildung von Domänen von Lipiden gleichen Zustands führt. Die Randbedingung differentieller Bindung von Proteinmolekülen an Membranen und das Zulassen einer Diffusion der Proteine auf der Lipidoberfläche führt deshalb zu einer Anreicherung von Proteinmolekülen auf den gelförmigen Lipiddomänen. Umgekehrt heißt das auch, daß sich an den Orten der Proteine sich bevorzugt Gel-Domänen ausbilden. In Abb. V-8 wird die Verteilung der Lipide bei drei repräsentativen Temperaturen unterhalb, innerhalb und oberhalb der Umwandlung mit der Verteilung peripher gebundener Lipide für das Beispiel eines Bedeckungsgrades von 31% verglichen. Es ist augenscheinlich, daß, ähnlich wie in dem Fall der reinen Lipidmembran, in angemessenem Abstand der Temperatur unterhalb und oberhalb des C_p -Maximums keine Ausbildung von Domänen signifikanter Größe stattfindet. Die Verteilung der Proteinmoleküle auf der Oberfläche ist allem Anschein nach statistisch. In der Nähe des Maximums der Wärmekapazität hingegen ist die Ausbildung von koexistierenden Domänen ausgeprägt und die Verteilung von Proteinmolekülen auf der Oberfläche wird von der Anordnung der Domänen entscheidend mitbeeinflusst. Es findet eine Aggregation von Proteinmolekülen statt, die ohne eine direkte Wechselwirkung von Proteinen miteinander stattfindet. Die Wechselwirkung propagiert ausschließlich über die Lipidmembran. Um diesen Effekt genauer zu beschreiben, wurde ein Parameter bestimmt, der die Aggregation quantifizierbar macht. Dieser Parameter wurde aus dem mittleren Abstand zwischen direkt benachbarten Proteinen berechnet. Der minimale Wert $d_{\min}$ dieses Abstands wird in einem vollständig aggregierten, gitterförmig angeordneten Proteincluster angenommen und wird ausschließlich vom Durchmesser der Proteinmoleküle bestimmt. Der statistische Wert d_{random} ist im Computereperiment bestimmbar, wenn $\Delta E_p = 0$ gesetzt wird, d.h. wenn keine Kopplung zwischen Lipidmembran und Proteinen besteht.

**Abb. V-9**

Protein Cluster Parameter $C(T)$ für die Monte Carlo Experimente aus Abb. V-7 bei vier verschiedenen Bedeckungsgraden der Membran mit peripheren Proteinen. Es zeigt sich ein ausgeprägtes Maximum, das bei höheren Bedeckungsgrad wie die C_p -Kurven aus Abb. V-7 zu höheren Temperaturen hin verschoben ist.

Mit diesen beiden Größen und dem erhaltenen (über alle Monte Carlo Zyklen gemittelten) mittleren Abstand $d(T)$ läßt sich bei einer gegebenen Temperatur (im Fall, daß gilt $\Delta E_p \neq 0$) ein Clusterparameter $C(T)$ bestimmen, der wie folgt definiert sei :

$$C(T) = \frac{d_{\text{random}} - d(T)}{d_{\text{random}} - d_{\text{min}}} \quad (5.13)$$

Der Clusterparameter $C(T)$ hängt vom mittleren Abstand d_{random} in Abwesenheit von differentieller Bindung ($\Delta E_p=0$), dem minimalen Abstand d_{min} und dem gemessenen mittleren Abstand $d(T)$ ab. Er nimmt Werte zwischen Null (keine Aggregation) und eins (vollständige Aggregation) an.

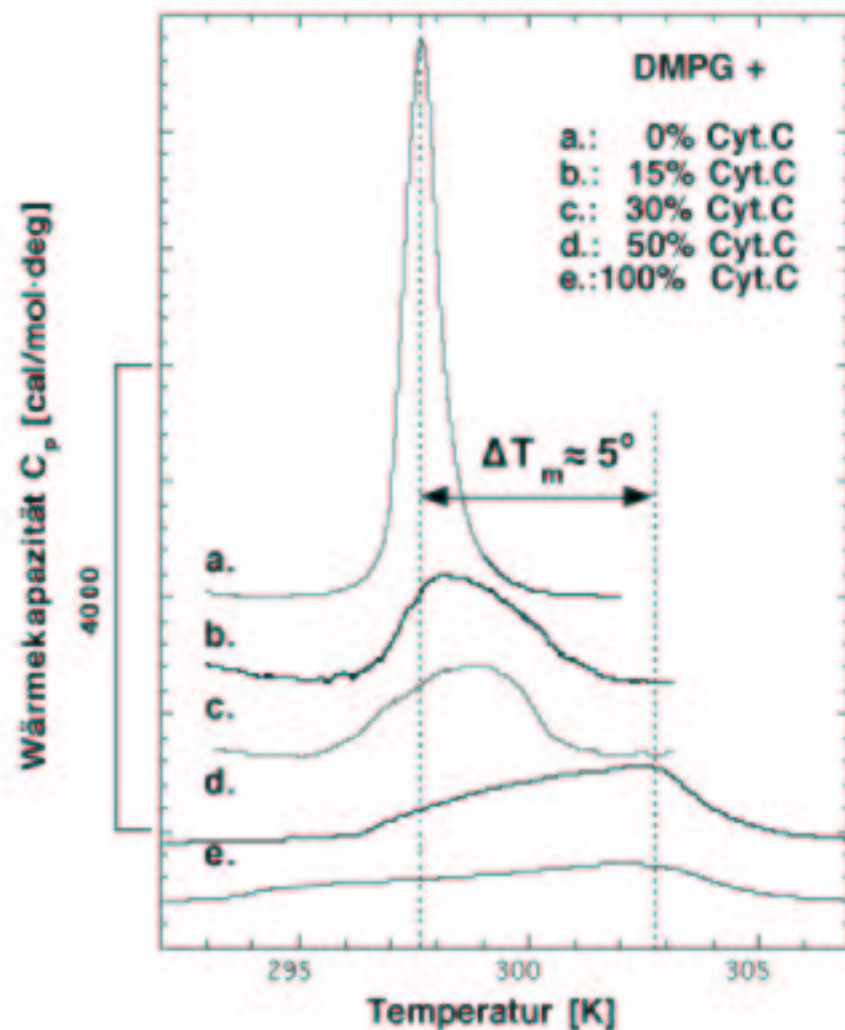


Abb. V-10

Kalorimetrisch bestimmte Verläufe der Wärmekapazität von DMPG-Dispersionen in Abwesenheit von Cyt.C und in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen von Cyt.C, entsprechend einer Bedeckung der Membranoberfläche von 15%, 30%, 50% und 100%. Verwendet wurde ein Puffer mit 2mM Hepes, 1mM EDTA, pH 7.5-9. Die DSC-Kurven wurden bei $2^\circ/\text{Stunde}$ (a,b,c) bzw. $20^\circ/\text{Stunde}$ (d und e) aufgezeichnet und bezüglich der Kalorimeterzeitkonstante nicht korrigiert.

Für die vier in Gegenwart von peripheren Proteinen beschriebenen C_p -Kurven (Abb. V-7) wurden die Profile des Clusterparameters $C(T)$ bestimmt und in Abb. V-9 dargestellt. Die Aggregation der Proteine besitzt ein Maximum in der Nähe des Punktes, an dem Domänen fluider und gelförmiger Lipide zu ungefähr gleichen Anteilen koexistieren. Mit höherem

Bedeckungsgrad der Lipidoberfläche mit Proteinmolekülen verschiebt sich dieses Maximum zu höheren Temperaturen, wie das auch für den funktionalen Verlauf der Wärmekapazität in Abb. V-7 der Fall ist. Die Aggregation der Proteine ist eine zwangsläufige Folge der differentiellen Bindung, die wiederum eine direkte Konsequenz der experimentell beobachteten, durch Proteine induzierten Verschiebung des C_p -Maximums ist.

Um die Gültigkeit des Modells zu bestätigen, wurden die errechneten C_p -Kurven (Abb. V-7) mit kalorimetrischen Daten verglichen. Abb. V-10 zeigt den Einfluß der Bindung des peripheren Proteins Cytochrom c an Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol (DMPG)-Membranen auf die C_p -Kurven als Funktion des Bedeckungsgrades der Membran.

Die experimentellen Parameter dieses Systems unterscheiden sich etwas von den in der Simulation verwendeten Werten ($\Delta H = 6.0$ kcal/mol, $T_m = 297$ K, $\Delta E_p \approx 100$ cal/mol Lipid, vgl. Kap.II). Die experimentellen C_p -Kurven in Abb. V-10 gleichen jedoch qualitativ den errechneten Kurven in Abb. V-7, wobei die proteininduzierte Veränderung der Kurven auch quantitativ in vergleichbaren Größenordnungen liegt. Eine exakte Beschreibung der C_p -Verläufe wird dadurch verhindert, daß für den Fall der Bindung von Cytochrom c an DMPG das Membranpotential verändert wird. Dies kann wiederum einen Einfluß auf die physikalischen Eigenschaften der Membranen haben (siehe Kap.II und IV), die in dem hier beschriebenen Modell nicht berücksichtigt wird. Zudem ist, wie erwähnt, bei Cytochrom-c-DMPG-Komplexen der Parameter ΔE_p nicht konstant mit der Temperatur.

Man erkennt deutlich die sich mit zunehmender Bedeckungsgrad vergrößernde Verschiebung des C_p -Maximums zu höheren Temperaturen und erkennt auch eine sehr ähnliche Progression des qualitativen Verlaufes der Kurven wie in den Simulationen. Sie zeigen bei niedrigeren Bedeckungsgraden eine stark ansteigende Flanke am unteren Ende der Umwandlung und einen flachen Abfall am oberen Ende der Umwandlung, während dies bei höheren Bedeckungsgraden (sowohl in der Simulation als auch im Experiment) umgekehrt ist. Dieses Verhalten läßt sich damit begründen, daß die Anzahl der Lipide, die in direktem Kontakt mit Proteinen steht, bei höherem Bedeckungsgrad größer ist. Diese Lipide schmelzen im statistischen Durchschnitt bei höheren Temperaturen als die Lipide, die nicht in direktem Kontakt mit Proteinen stehen.

Eine Folge dieser Beobachtungen ist, daß auch in dem Cytochrom-c-DMPG-System eine Aggregation der Proteine auf der Lipidoberfläche stattfinden muß.

V-5.3 Wechselwirkung von Lipidmembranen mit integralen Proteinen

Das Modell des vorangegangenen Kapitels kann mit geringfügigen Veränderungen auf integrale Proteine übertragen werden. Ein Problem hierbei ist die Diffusion der integralen Proteine, die nicht so einfach beschrieben kann, wie die Diffusion der peripheren Proteine. Die Diffusionskonstante ist nicht nur durch die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden gegeben sondern zudem durch die laterale Viskosität der Lipidmembran selber. Im folgenden wird die Problemstellung vereinfacht, indem eine experimentelle Beobachtung (aus ESR-Messungen (Marsh & Watts, 1980) benutzt wird, die zeigt, daß Lipide in der direkten Umgebung der integralen Proteine in Mobilität der Kettenisomerisierungen wesentlich eingeschränkt sind. Sie führen zu einer Komponente in den ESR-Spektren, die im wesentlichen denjenigen von gelförmigen Lipiden ähnelt und in gewissen Temperaturgrenzen auch oberhalb der Lipidumwandlung erhalten bleibt. Die Experimente deuten darauf hin, daß es eine fest gebundene Lipidgrenzschicht um ein integrales Protein herum gibt. Es wird deshalb im folgenden angenommen, daß jedes integrale Protein in erster Näherung von einer Lipidschicht einer Sorte (entweder flüssig oder gelförmig) umgeben ist, die durch eine starke Wechselwirkung (wie zum Beispiel die "hydrophobic matching"-Bedingung (Mouritsen & Sperotto, 1992) zustande kommt, und auch beim Durchlaufen der Umwandlung erhalten bleibt. Dies führt dazu, daß jedes integrale Protein mittels seiner gelförmigen oder fluiden Grenzschicht auf die gleiche Art und Weise mit den übrigen Lipiden wechselwirkt, wie dies ein gelförmiges (bzw. fluides) Lipid täte. Durch diese Vereinfachung wird in der Simulation sogar ein Parameter (ΔE_p) weniger benötigt als im Falle der peripheren Proteine. Das Problem der Diffusion wurde hier dadurch integraler Protein gelöst, daß man wie im Kapitel zuvor annimmt, daß das Protein peripher gebunden ist, aber eine solch hohe differentielle Wechselwirkungsenergie $\Delta E_p \rightarrow \infty$ aufweist, daß (für den Fall einer gelförmigen Grenzschicht) alle Lipide unterhalb des peripheren Proteins notwendigerweise immer gelförmig sind. Dieser gelförmige Kern unterhalb des peripheren Proteins wurde als äquivalent zu einem integralen, gelförmigen Teil des Proteins angesehen.

Bei der Bestimmung der mittleren Größen für die Enthalpie, den Anteil des geschmolzenen Lipids und die Zahl der ungleichen Nächstnachbar-Wechselwirkungen der Lipide werden die dem integralen Teil der Proteine zugerechneten Punkte der Matrix nicht mitgezählt. Für die Diffusion der Protein wird also derselbe Algorithmus benutzt wie für die peripheren Proteine. Es wird dieselbe Simulation für die integralen Proteine wie für periphere Proteine durchgeführt, mit dem Unterschied, daß die Zahl der Lipide anders gezählt wird und der Interaktionsparameter ΔE_p auf einen sehr hohen Wert gesetzt wird.

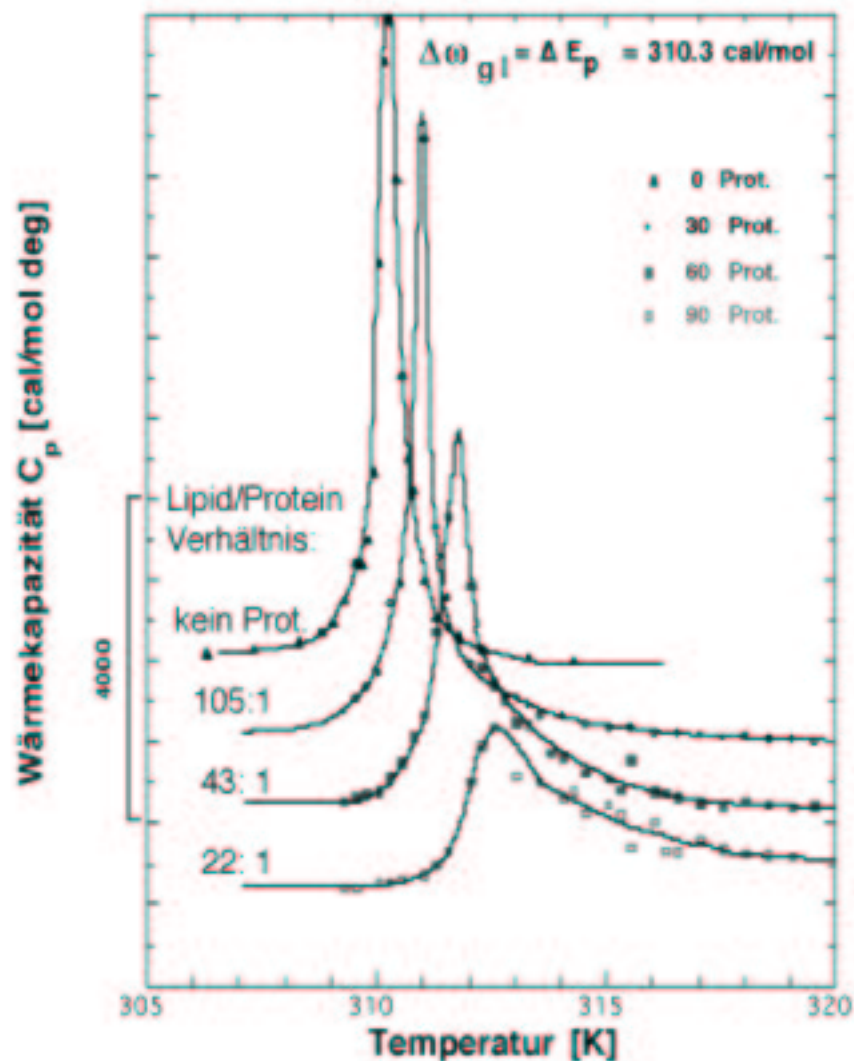
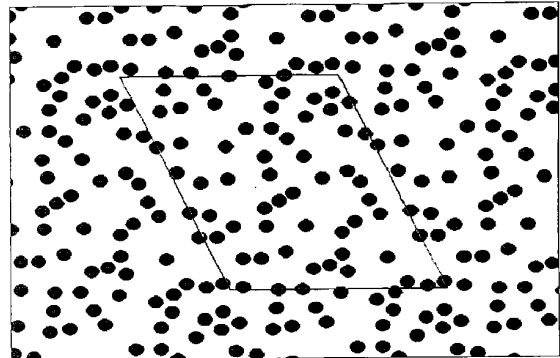
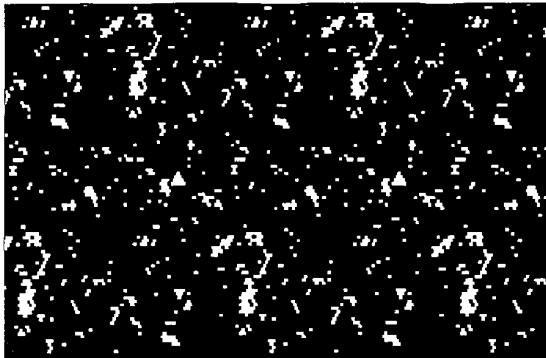


Abb. V-11

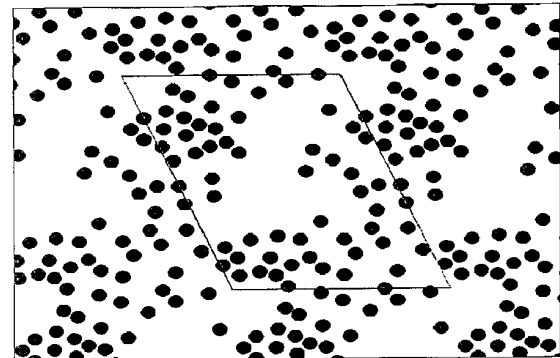
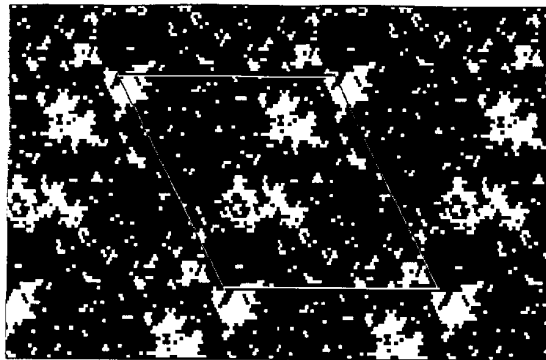
Monte-Carlo Simulationen der Wärmekapazitätsprofile von Lipidkomplexen mit unterschiedlichem Gehalt von integralen Proteinen: (von oben nach unten) 0, 30, 60 und 90 Proteinmoleküle, eingebettet in eine Matrix mit 61·61 Plätzen. Verwendete Parameter waren: mit $\Delta H = 8.7$ kcal/mol, $T_m = 310.3$ K und $\Delta\omega_{gl} = \Delta E_p 310.3$ cal/mol mit einer Proteingröße entsprechend 19 Lipidquerschnitten.

In Abb. V-11 sind die Verläufe der Wärmekapazität für eine Membran dargestellt, die so definierte integrale Proteine enthält. Sie weisen einen Durchmesser auf, der (wie bei den peripheren Proteinen) 5 Lipiddurchmessern entspricht. Man erkennt, daß wie bei den peripheren Proteinen die Umwandlung verbreitert und zu höheren Temperaturen verschoben wird. Bei allen Proteinkonzentrationen liegt jedoch das Maximum der Wärmekapazität am unteren Ende der Umwandlung. Ein wesentlicher Unterschied zwischen integralen und peripheren Proteinen ist insbesondere dann ersichtlich, wenn für einen repräsentativen Fall (60 integrale Proteine in einer 61·61 Matrix, von der 2581 Plätze von Lipiden und 1159 Plätze von Proteine besetzt sind) die Abhängigkeit der Verteilung gelförmiger und fluider Lipide sowie die Proteinverteilung als Funktion der Temperatur dargestellt wird (Abb. V-12). Unterhalb der

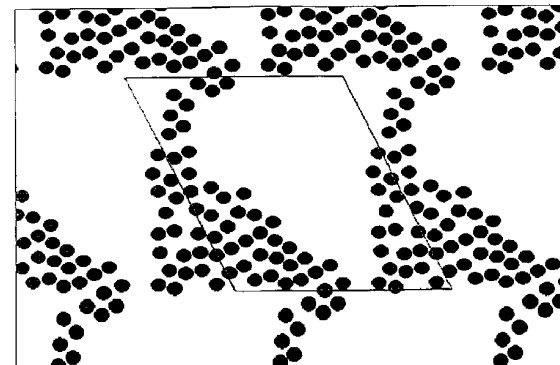
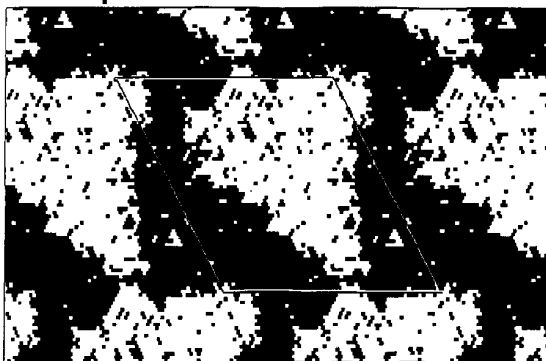
Umwandlung sind die Proteinmoleküle statistisch verteilt. Das ist wegen den Randbedingungen auch zu erwarten.



Unterhalb des C_p -Maximums (309.3 K)



Am C_p -Maximum (311.3 K)



Oberhalb des C_p -Maximums (313.3 K)

Abb. V-8

Lipidmatrix (61·61-Matrix, links) und Proteinmatrix (60 Proteine, rechts) für Komplexe aus Lipiden und integralen Proteinen, bei Temperaturen unterhalb (oben), innerhalb (Mitte) und oberhalb (unten) der Umwandlung des Lipides. Deutlich zu erkennen ist eine Aggregation des Proteins im Bereich oberhalb der Umwandlung. Die Proteine sind in einen gelförmigen Bereich eingebettet, ihr integraler ist in der Lipidmatrix ebenso wie gelförmige Lipide schwarz dargestellt. . Verwendete Parameter waren: mit $\Delta H=8.7$ kcal/mol, $T_m=310.3$ K und $\Delta\omega_{gl} = \Delta E_p 310.3 \text{ cal/mol}$ mit einer Proteingröße entsprechend 19 Lipidquerschnitten.

Während des Durchlaufens der Lipidschmelze beginnen die eingebetteten Proteinmoleküle zu aggregieren. In der flüssig-kristallinen Phase finden sich enggepackte Aggregate von Proteinen

mit einem verbleibenden Anteil eingelagerter, gelförmiger Lipide ergeben. Im Gegensatz zu den peripheren Proteinen findet die Aggregation also nicht während der Umwandlung statt, sondern in dem Zustand der Membran, bei dem die Grenzfläche zwischen Proteinen und Lipiden den höheren Beitrag zur freien Energie der Matrix liefert. Zwischen den Proteinen in den Aggregaten verbleiben Lipide in gelförmigen Zustand, die erst bei sehr hohen Temperaturen schmelzen. Dies führt zu der unsymmetrischen Form der C_p -Kurven. Diese Form bleibt bei allen Proteinkonzentrationen erhalten und ist von derjenigen verschieden, die in der Gegenwart von peripheren Proteinen bestimmt wurde. Dies erlaubt im Prinzip, ein peripheres Protein von einem integralen Protein zu unterscheiden. Der, aus den in Abb. V-11 wiedergegebenen Simulationen errechnete, Verlauf der Aggregation wird in Abb. V-13 durch die Wiedergabe des Cluster-Parameters verdeutlicht. Die Aggregation der Proteine beginnt in der Phasenmwandlung und $C(T)$ erreicht einen Wert nahe von eins oberhalb der Umwandlung. Die Gültigkeit der oben gemachten Annahmen wurden mit Experimenten an Membranen überprüft, die integrale Proteine enthielten. Der integrale Teil der Sequenz des sogenannten "langsamen Kalium-Kanals", I_{sK} , wurde in einer Membran des synthetischen Lipids Dimyristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) untersucht. Dabei wurde die Kurve des reinen DMPC in Abwesenheit von Peptiden mit denjenigen einer Lipid-Peptidmischung im Verhältnis von ca. 20:1 verglichen (Abb. V-14). Man erkennt, daß sich in diesem Falle in Anwesenheit der Peptide die Umwandlung zu tieferen Temperaturen verschiebt, wobei das Maximum der Kurve am oberen Ende der Umwandlung liegt. Dies ist genau spiegelsymmetrisch zu den Kurven in Abb. V-11, woraus sich schließen läßt, daß dieses Peptid im Gegensatz zu obigem Beispiel eine energetisch ungünstige Wechselwirkung mit dem gelförmigen Lipid hat. Ansonsten ist der Verlauf der Kurven qualitativ sehr ähnlich. Die Annahme der energetisch ungünstigen Wechselwirkung mit der fluiden Phase wurde jedoch oben willkürlich (mit Anlehnung an ESR-Daten) gemacht.

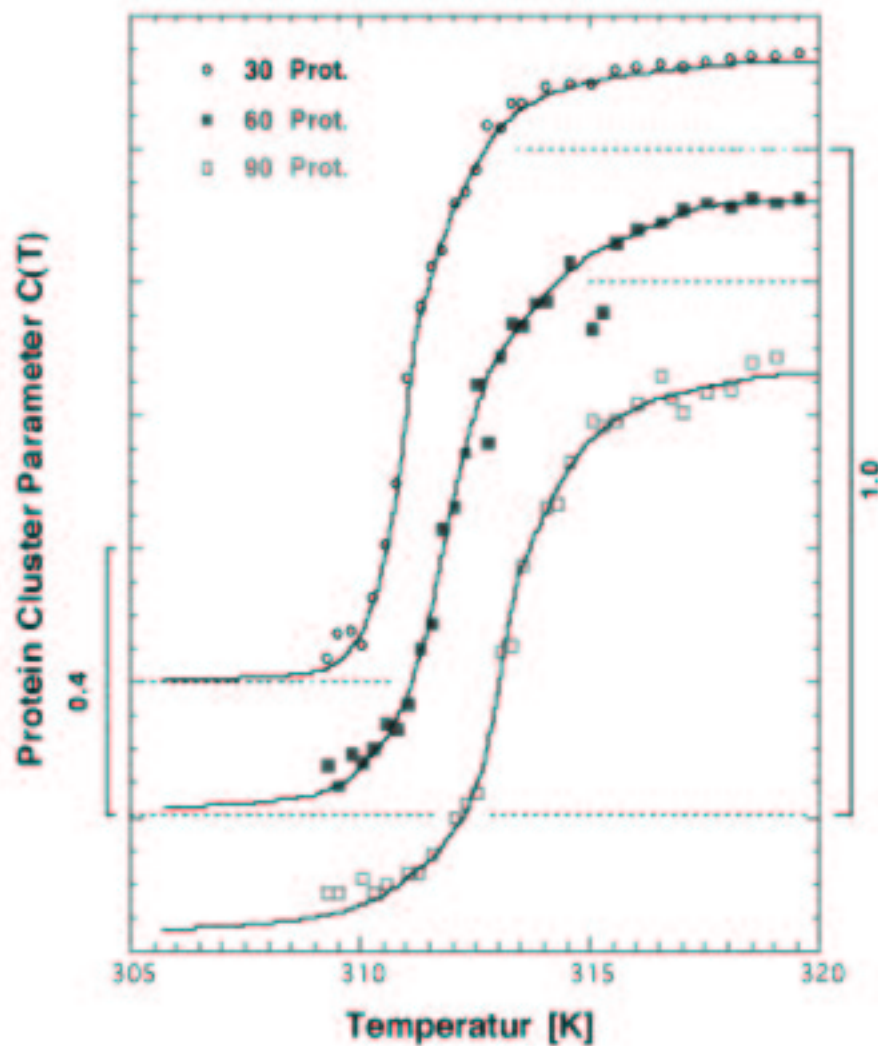


Abb. V-13

Werte des Cluster-Parameters $C(T)$ für die integralen Proteine, deren C_p -Kurven in Abb. V-11 dargestellt sind. Die Kurven sind versetzt zueinander abgebildet.

Der umgekehrte Fall steht in keinem Widerspruch mit dem Modell. Simulationen unter der Annahme einer präferenziellen Wechselwirkung integraler Proteine mit der Gelphase der Lipide führen zu Kurven, die zu denjenigen aus Abb. V-11 spiegelsymmetrisch sind und die den experimentellen Kurven in Abb. V-14 in starkem Maße ähneln, in der Tat eine erstaunliche Übereinstimmung aufweisen. Ein schönes Beispiel für C_p -Kurven einer Membran mit integralen Proteinen, die qualitativ mit denjenigen aus Abb. V-11 übereinstimmen, findet sich für den Fall des integralen "human erythrocyte band 3 proteins" bei Morrow et al. (1986).

Aus der Form der kalorimetrischen Umwandlung kann geschlossen werden, daß das I_{SK} -Peptid bei Temperaturen (im Gegensatz zu dem "human erythrocyte band 3"-Proteins) unterhalb der Phasenumwandlung von DMPC aggregiert und einen Teil des Lipids in proteinreichen Clustern in flüssig-kristallinem Zustand einschließt. Es sei betont, daß diese Simulationen

neben den experimentell meßbaren Werten für die Schmelzwärme ΔH des Lipids und der Schmelztemperatur T_m nur die Kooperativität in Form eines Parameters Δ_{gl} beinhaltet, insofern also frei von unbestimmbaren Parametern ist.

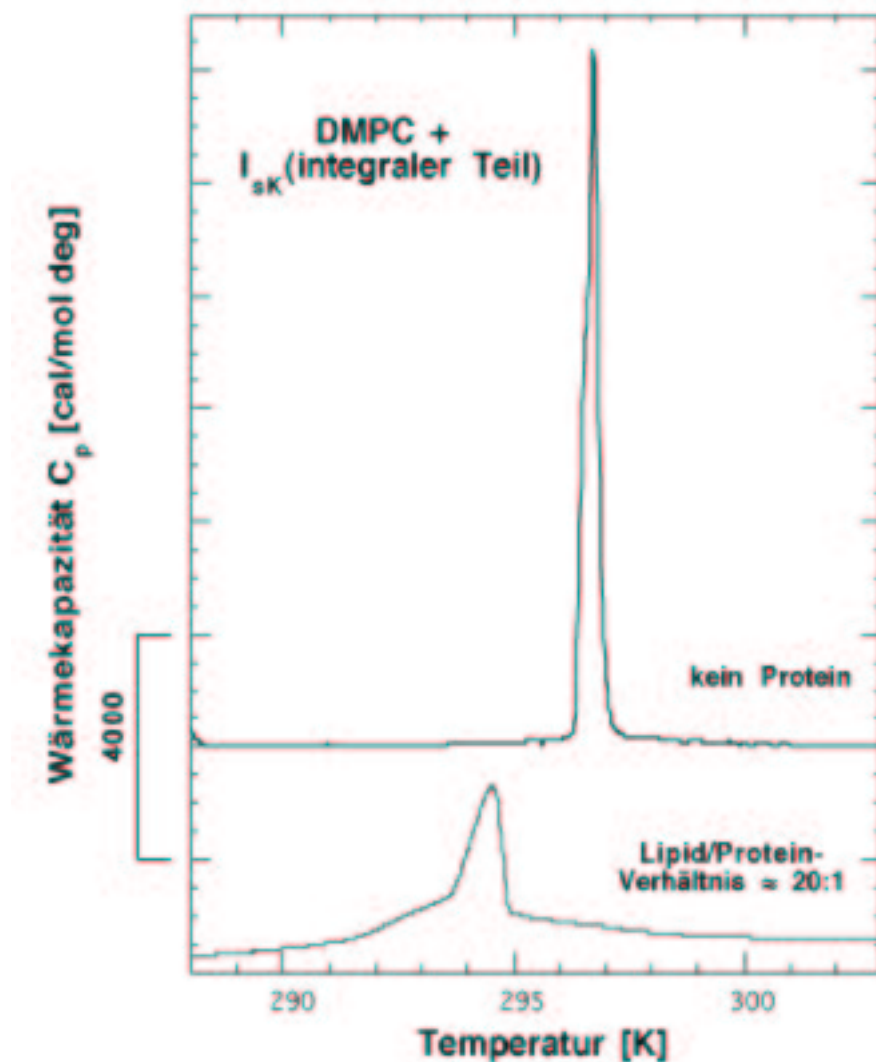


Abb. V-14

Kalorimetrisch bestimmte Wärmekapazitätsprofile des integralen Peptides des langsamen Kalium-Kanals (I_{sK}) in Dimyristoylphosphatidylcholin bei einem Lipid/Protein-Verhältnis von ca. 20:1. Das CP-Maximum wird zu tieferen Temperaturen verschoben, was auf eine präferenzielle Wechselwirkung des Peptides mit der flüssig-kristallinen Lipid-Phase und eine Aggregation in der Gel-Phase schließen läßt (vgl. Die errechneten Kurven in Abb. V-11)

Diese drei Parameter reichen offensichtlich aus, um das komplexe Verhalten von Lipiden in Wechselwirkung mit integralen Proteinen qualitativ und quantitativ darzustellen.

V-6 DISKUSSION

In den vorangegangenen Abschnitten dieses Kapitels wurden ein einfaches Modell für die Wechselwirkung peripherer und integraler Proteine mit Lipiden vorgestellt. Es baut auf dem einem Ising-Modell für die Lipidumwandlungen auf, das nur zwei Zustände für Lipide in Membranen zulässt: gelförmig und fluid (Marsh et al., 1977; Mouritsen and Biltonen, 1992; Sugar et al., 1992, 1993). Durch die Einführung einer Grenzflächenenergie $\Delta\omega_{gl}$ zwischen ungleichen Lipiden wird die Kooperativität der Umwandlung beschrieben. Diese Annahmen führen in der Nähe der thermotropen Schmelzumwandlung der Lipide zu der Koexistenz von Domänen von Lipiden der beiden unterschiedlichen Zustände. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Vielzahl von anderen theoretischen Veröffentlichungen (Mouritsen, 1991; Mouritsen & Biltonen, 1992; Zhang et al., 1992; Mouritsen et al., 1992; Mouritsen & Jørgensen, 1992). Experimentell gibt es eine Reihe von Hinweisen auf die Ausbildung von Domänen in Lipidmatrizen. In Monoschichten wurden sie durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtet (Grainger et al., 1989; Grainger et al., 1990). Indirekt wurden sie durch Fluoreszenzlöschungs-Experimente (FRAP = fluorescence recovery after photobleaching) beobachtet (Almeida et al., 1993; Vaz et al., 1989, 1990). In diesen Experimenten wird die Diffusion von markierten Lipiden in einer Lipidmatrix untersucht, die sich am sogenannten Perkulationspunkt stark ändert. Der Perkulationspunkt ist der Zustand der Membran, an dem sich die Domänen eines Zustandes zu berühren beginnen und ein durchgängiges Netzwerk bilden. An diesem Punkt verändert sich die freie Diffusion von Partikeln, die nur in einer der Phasen löslich sind. Die Koexistenz von Domänen nahe dem Perkulationspunkt führt zu einer unvollständigen Rückgewinnung der Fluoreszenz an den gebleichten Stellen der Membranen.

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Lipidmembranen wurde von einer Reihe von Gruppen theoretisch untersucht. Dabei wurden im wesentlichen integrale Proteine und deren Wechselwirkung mit den Lipiden in direkter Umgebung der Proteine behandelt. Ausgehend von Arbeiten von Pink & Chapman (1979, 1980) beruhen die meisten Ansätze auf dem sogenannten Pink-Modell, das mit einer Reihe von Parametern insgesamt zehn verschiedene Zustände jedes Lipids betrachtet. Die Verwendung dieser Parameter setzt eine gute Kenntnis mikroskopischer Vorgänge zwischen den Lipiden voraus. Von der Gruppe von O.G.Mouritsen in Kopenhagen wurde insbesondere das Konzept der Größe der hydrophoben Grenzfläche eines integralen Proteins im Vergleich mit der Ausdehnung des hydrophoben Kerns der Membran, das sogenannte "hydrophobic matching", propagiert (Mouritsen & Biltonen, 1992; Sperotto & Mouritsen, 1989; Sperotto et al., 1991; Sperotto & Mouritsen, 1993; Fattal & Ben-Shaul, 1993). Diesen Arbeiten zufolge gibt für das "hydrophobic matching" einen optimalen Wert. Daraus ergibt sich zwangsläufig ein Unterschied der Grenzflächenenergie von Lipid-Proteinkomplexen in der

Gelphase und in der flüssig kristallinen Phase, denn die Lipiddimensionen ändern sich beim Durchlaufen der Lipidschmelze. Alle diese Arbeiten sagen die Möglichkeit einer Aggregation von integralen Proteinen abhängig von der Wahl der Lipide und Lipidmischungen und von den zugehörigen Parametern voraus, wenn auch keine konkreten Beispiele für die Schmelzkurven oder von Aggregationsprofilen von proteinhaltigen Membranen gegeben werden.

Im Kontext dieser Arbeit entspricht das "hydrophobic matching" der Grenzflächenenergie. Bei peripheren Lipiden ergibt der Begriff des hydrophobic matching keinen Sinn. Deshalb wurde eine differentielle Bindungsenergie ΔE_p eingeführt, die sich direkt aus der Verschiebung der C_p -Kurven in kalorimetrischen Experimenten ergibt. Die hier vorgestellte Beschreibung beruht auf dem Zwei-Zustands-Modell, das für die Wechselwirkung der Lipide nur einen Parameter verwendet. Dies ist wesentlich einfacher und transparenter als die komplizierten Pinkmodelle, die auf molekularer Ebene vermutlich vollständiger sind. Mouritsen & Biltonen (1992) und Sugar et al. (1992,1993) stellten fest, daß das Ising-Modell den Verlauf der Wärmekapazität ähnlich gut wiedergibt wie die Pink-Modelle. Durch die zwei Parameter $\Delta\omega_{gl}$ und ΔE_p können die experimentellen Temperaturverläufe der Wärmekapazitäten von Lipid-Proteinkomplexen qualitativ gut wiedergegeben werden. Der große Vorteil dieser einfachen Beschreibung liegt darin, daß keine unbestimmbaren Parameter in der Beschreibung auftauchen. Beide Parameter sind experimentell direkt aus den Verläufen der Wärmekapazität bestimmbar. Für die peripheren Proteine wurde dies hier zum ersten Male beschrieben. Die einfache Formulierung der Übergangswahrscheinlichkeiten der Lipide von einem Zustand in den jeweils anderen läßt zudem die Möglichkeit offen, den Verlauf der Wärmekapazität analytisch zu formulieren. Zumindestens für das reine Lipid ist dies unter Verwendung von Gl.(5.12) wahrscheinlich möglich.

Proteine können präferentielle Wechselwirkungen mit Gel- oder fluider Phase der Lipide haben. Im Falle der peripheren Proteine können die Komplexe von Cytochrom c mit DMPG (diese Arbeit), die eine stärkere Wechselwirkung des Proteins mit der Gelphase aufweist, oder "myelin basic protein" mit DMPS (Ramsay et al., 1987), wo dies anders herum ist, als Beispiel dienen. Diese Unterschiedlichkeit hat vermutlich mikroskopische Ursachen, wie zum Beispiel die räumliche Anordnung der Ladungen oder die Krümmung der Proteinoberfläche. Die Wechselwirkung führt zu einer Verschiebung der Umwandlung zu höheren oder tieferen Temperaturen, mit einer resultierenden Aggregation der Proteine im Koexistenzbereich von Gel- und fluider Phase. Integrale Proteine haben in ihrer Mehrzahl eine energetisch günstigere Wechselwirkung mit der fluide Phase (vgl. Mouritsen & Biltonen, 1992), was zu einer Verschiebung der Umwandlung zu tieferen Temperaturen führt. Dies ist z.B. für das integrale Peptid des langsamen Kalium-Kanals (I_{sK}) der Fall (Abb. V-14). Die Wechselwirkung des Human Erythrocyte band 3 Proteins liefert ein schönes Beispiel für den umgekehrten Fall (Morrow et al., 1986). Im Gegensatz zu den peripheren Proteinen aggregieren integrale

Proteine mit Vorliebe in einer der beiden Lipidphasen. Diese Eigenschaft gibt den Wärmekapazitätsprofilen eine charakteristische Form, indem sie zu den Temperaturen größerer Aggregation hin eine Schulter zeigen. Diese Form rührt davon her, daß Lipide zwischen den aggregierenden Proteinen eingeschlossen werden, die erst viel später die Umwandlung des Lipids durchlaufen. Die peripheren Proteine umschließen keine Lipide und weisen auch keine direkte (im Modell berücksichtigte) Grenzfläche mit den Lipiden auf. Dies bewirkt, daß die Schultern der C_p -Kurven sich in diesem Falle nicht ausschließlich in auf einer Seite der Umwandlung wiederfinden, sondern daß die Form der Umwandlung von der Proteinkonzentration abhängt (vgl. Abb. V-7 und Abb. V-11). Es ist also aufgrund der kalorimetrischen Kurven prinzipiell möglich, integrale und periphere Protein voneinander zu unterscheiden. Dies bietet unter Umständen Ansätze für eine Bewertung von Proteinen wie Apocytochrom c, das Vorstufenprotein zu Cytochrom c, das im Laufe seiner Synthese irgendwann durch die Mitochondrienmembran hindurchdringt und vermutlich zumindestens zeitweise integralen Charakter besitzt (Görissen et al., 1986).

Zur biologischen Signifikanz der Ausbildung von Domänen tragen einige Faktoren bei (siehe z.B. Marsh, 1993; Mouritsen & Jørgensen, 1992; Thompson et al., 1992). An erster Stelle ist die Proteinaggregation zu nennen. Es sei betont, daß sie, sowohl im Falle der integralen als auch im Falle der peripheren Proteine eine notwendige Folge der proteininduzierten Verschiebung der Phasenumwandlung der Lipide ist, die von mikroskopischen Details der theoretischen Modelle nicht abhängt. Die Implikationen der hier beschriebenen Rechnungen sind insbesondere dann von Bedeutung, wenn Proteine mit sich selber wechselwirken. Dies geschieht möglicherweise bei der Dimerisierung von Phospholipase A₂ (Romero et al., 1987; Bell & Biltonen, 1989), oder bei der Formation von Poren, die vermutlich beim I_{sk}-Kanal (Horvath & Heimburg, unveröffentlichte FTIR-Experimente) oder beim porenbildenden Peptid Alamethicin (Gennis, 1989) geschieht. Auch bei den hier nicht näher betrachteten Wechselwirkungen verschiedenener Proteine, wie in der Signalkaskade zwischen Rezeptorproteinen und G-Proteinen, ist das Verständnis von induzierter Aggregation von Wichtigkeit. Eine Phasenänderung von Lipiden der Membran ist prinzipiell in der Lage, die Kommunikation zwischen Proteinen zu unterbrechen oder, ggf. sogar Poren zum Dissoziieren zu bringen. Interessanterweise gibt es Alamethicin-Poren verschiedener Größe (Hanke & Boheim, 1980). Zudem kann die Leitfähigkeit von Alamethicinporen in dem reinen Lipid SMPC (1-Stearoyl-3-Myristoyl-Phosphatidylcholin) in starkem Maße von der Phase des Lipids gesteuert werden. Dabei wächst die Leitfähigkeit in der Gelphase um mehrere Größenordnungen an und gleichzeitig wird die Umwandlung zu tieferen Temperaturen verschoben (Boheim et al., 1980). Die experimentelle Kurve der von Boheim et al. bestimmten Leitfähigkeiten von Alamethicin sind in der Einführung (Kap.I) abgebildet. Sie sind mit errechneten Aggregationsprofilen konsistent, die eine präferentiellen Wechselwirkung des

Peptids mit der flüssig-kristallinen Phase voraussetzen. Ähnlich müssen die Resultate für die Membranen interpretiert werden, die den I_{SK}-Kanals enthielten (siehe Abb. V-14).

Ein weiterer funktionaler Aspekt ist die Perkolation, deren möglicher Effekt sich am Beispiel des peripheren Proteins Carboxylester Lipase demonstrieren läßt. Die Hydrolyse von Lipidmischungen durch dieses Enzym verändert sich am Perkulationspunkt stark (Muderwha & Brockman, 1992).

Zusammenfassend muß man schließen, daß die in diesem Kapitel vorgestellten Rechnungen und Modelle von einiger Relevanz für biologische Systeme sein und wichtige Hinweise für ein Verständnis der Steuerung von Kanalproteinen, Poren oder Enzymen beitragen können.

V-7 LITERATUR

- Almeida, P.F.F., Vaz, W.L.C. und Thompson, T.E. *Biophys.J.* 64 (1993), 399 - 412
Percolation and diffusion in three-component lipid bilayers: effect of cholesterol on an equimolar mixture of two phosphatidylcholines
- Bell, J.D. und Biltonen, R.L. *J.Biol.Chem.* 264 (1989), 225 - 230
Thermodynamics and kinetic studies of the interaction of vesicular dipalmitoylphosphatidcholine with agkistrodon piscivorus piscivorus phospholipase A₂
- Boheim, G., Hanke, W. und Eibl, H.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 (1980), 3403 - 3407
Lipid phase transition in planar bilayer membrane and its effect on carrier- and pore-mediated transport
- Cornell, B.A., Separovic, F., Thomas, D.E., Atkins, A.R. und Smith, R.
B.B.A. 985 (1989), 229
Effects of acyl chain length on the structure and motion of gramicidin A in lipid bilayers
- Cortese, J.D. und Fleischer, S. *Biochemistry* 26 (1987), 5283 - 5293
Noncooperative vs. cooperative reactivation of D-β-hydroxybutyrate-dehydrogenase: Multiple equilibria for lecithin binding are determined by the physical state (soluble bs.bilayer) and composition of the phospholipid
- Fattal, D.R. und Ben-Shaul, A. *Biophys.J.* 65 (1993), 1795 - 1809
A Molecular Model for Lipid-Protein Interaction in Membranes: the Role of hydrophobic mismatch
- Elliott, J.R., Needham, D., Dilger, J.P. und Haydon, D.A. *B.B.A.* 735 (1983), 95
The effects of bilayer thickness and tension on gramicidin single-channel lifetime
- Fraser, D.P., Zuckermann, M.J. und Mouritsen, O.G.
Phys.Rev.A 43 (1991), 6642 - 6656

- Theory and simulations for hard-disk models of binary mixtures of molecules with internal degrees of freedom
- Görrissen, H. und Marsh, D. Biochemistry 25 (1986), 2904 - 2910
Apocytochrome c binding to negatively charged lipid dispersions studied by spin-label electron spin resonance
- Gennis, R.B. Biomembranes. Molecular structure and function Springer, New York, 1989
- Grainger, D.W., Reichert, A., Ringsdorf, H. und Salesse, C.
B.B.A. 1023 (1990), 365 - 379
Hydrolytic action of phospholipase A2 in monolayers in the phase transition region: direct observation of enzyme domain formation using fluorescence microscopy
- Grainger, D.W., Reichert, A., Ringsdorf, H. und Salesse, C.
Fed.Eur. Biochem.Soc. Letters, 252 (1989), 73 - 82
An enzyme caught in action: direct imaging of hydrolytic function and domain formation of phospholipase A2 in phosphatidylcholine monolayers
- Hanke, W. und Boheim, G. B.B.A. 596 (1980), 456 - 462
The lowest conductance state of the alamethicin pore
- Heimburg, T. und Biltonen, R.L. Biochemistry 33 (1994) 9477-9488
The thermotropic behavior of dimyristoyl phosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c
- Hill, T.L. An introduction to statistical thermodynamics, Dover Publications, New York 1960
- Huang, H.W. Biophys.J. 50 (1986), 1061
Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime
- Kurrlé, A., Rieber, P. und Sackmann, E. Biochemistry, 29 (1990), 8274
Reconstitution of transferrin receptor in mixed lipid vesicles. An example of the role of elastic and electrostatic forces for protein/lipid assembly
- Lewis, B.A. und Engelman, D.M. J.Mol.Biol. 166 (1983), 203
Bacteriorhodopsin remains dispersed in fluid phospholipid bilayers over a wide range of bilayer thicknesses
- Morrow, M.R., Davis, J.H., Sharom, F.J. und Lamb, M.P. B.B.A.858 (1986), 13
Studies of the interaction of human erythrocyte band 3 with membrane lipids using deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry
- Marsh, D., Watts, A. und Knowles, P.F. B.B.A.465 (1977), 500 - 514
Cooperativity of the phase transition in single- and multibilayer lipid vesicles
- Marsh, D. und Watts, A. Spin-labeling and lipid-protein interactions in membranes.
In: Lipid-Protein Interactions. Vol.2.P.C.Jost und O.H.Griffith, Hrg., Wiley-Interscience, New York 1982, 53 - 126
- Mouritsen, O.G. Computer simulation of cooperative phenomena in lipid membranes
CRC Press, R.Brasseur, Hrg., Boca Raton, Florida, 1989
- Mouritsen, O.G. Chemistry and physics of lipids 57 (1991), 179 - 194
Theoretical models of phospholipid phase transitions

- Mouritsen, O.G. und Biltonen, R.L. Protein-lipid interactions and membrane heterogeneity
New Comprehensive Biochemistry, A.Watts, Hrg. Protein Lipid Interactions, Elsevier 1992
- Mouritsen, O.G. und Sperotto, M.M. Thermodynamics of lipid-protein interactions in lipid membranes:
The hydrophobic matching condition
in: Thermodynamics of cell surface receptors, Jackson, M. ,Hrg., CRC Press, Inc, Boca Raton,
Florida, 1992, S. 127 - 181
- Mouritsen, O.G., Ipsen, J.H., Jørgensen, K., Sperotto, M.M., Zhang, Z., Corvera, E., Fraser, D.P. und
Zuckermann, M.J.
Computer simulation of phase transitions in nature's preferred liquid crystal: the lipid bilayer membrane
book chapter in: Computer simulation of liquid crystals, Luckhurst, G.F. ,Hrg., Kluwer academic
publishers, Niederlande, 1992
- Mouritsen, O.G. und Jørgensen, K. BioEssays 14 (1992), 129 - 135
Dynamic lipid-bilayer heterogeneity: a mesoscopic vehicle for membrane function?
- Muderwha, J.M. und Brockman, H.L. Biophys.J. 61 (1992), A367
Lipid surface organization as factor in the regulation of lipolytic enzymes
- O'Connell, A.M., Koeppe, R.E. und Andersen, O.S. Science 250 (1990), 1256
Kinetics of gramicidin channel formation in lipid bilayers: transmembrane monomer association
- Pink, D.A. und Chapman, D. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 (1979), 1542 - 1546
Protein-lipid interactions in bilayer lipids: a lattice model
- Pink, D.A., Green, T.J. und Chapman, D. Biochemistry 19 (1980), 349 - 356
Raman Scattering in bilayers of saturated phosphatidylcholines. Experiment and theory
- Ramsay, G., Prabhu, R. und Freire, E. Biochemistry 25 (1986), 2265 - 2270
Direct measurement of the energetics of association between myelin basic protein and phosphatidylserine
vesicles
- Romero, G., Thompson, K. und Biltonen, R.L.
J.Biol.Chem. 262 (1987), 13476 - 13482
The activation of porcine pancreatic phospholipase A₂ by dipalmitoylphosphatidylcholine large
unilamellar vesicles
- Sperotto, M. und Mouritsen, O.G. eingereicht an *Biophys.J.* 1993
Lipid enrichment and selectivity of integral membrane proteins in two component lipid bilayers
- Sperotto, M.M. und Mouritsen, O.G. Biophys.J. 59 (1991), 261 - 270
Monte Carlo simulation studies of lipid order parameter profiles near integral membrane proteins
- Sperotto, M.M., Ipsen, J.H. und Mouritsen, O.G.
Cell Biophysics 14 (1989), 79 - 95
Theory of protein-induced lateral phase separation in lipid membranes
- Stauffer, D. Introduction to percolation theory Taylor & Francis, London, 1985
- Sugar, I., Mitchard, N. und Biltonen, R.L. Biophys.J. 63 (1992), A238
Two-state model of the gel-liquid crystalline transition of small unilamellar vesicles of dipalmitoyl
phosphatidylcholine

- Sugar, I.P., Mitchard, N. und Biltonen, R.L. Methods in enzymology 1993(in Druck)
Monte Carlo simulations of membranes: the phase transition of small unilamellar DPPC vesicles
- Thompson, T.E., Sankaram, M.B. und Biltonen, R.L.
Comments in Molecular and Cell Biophysics (1992)
Biological membrane domains: Functional significance
- Vaz, W.L.C., Melo, E.C.C und Thompson, T.E. Biophys.J.56 (1989), 869 - 876
Translational diffusion and fluid domain connectivity in a two-component, two-phase phospholipid bilayer
- Vaz, W.L.C., Melo, E.C.C. und Thompson, T.E. Biophys.J. 58 (1990), 273 - 275
Fluid-phase connectivity in an isomorphous, two-component- two phase phosphatidylcholine bilayer
- Zimm, B.H. und Bragg, J.K. J.Chem.Phys. 31 (1959), 526 - 535
Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains
- Zhang, Z., Zuckermann, M.J. und Mouritsen, O.G. Phys.Rev.A 46 (1992), Vol.10
Effect of intermonolayer coupling on the phase behavior of lipid bilayers

Kapitel VI

Zusammenfassung

Im abschließenden Kapitel werden die Ergebnisse der vier vorangegangenen Kapitel zusammengefaßt und graphisch dargestellt. Für eine detaillierte Beschreibung sei auf die jeweiligen Kapitel verwiesen, insbesondere für die Ausführung der statistisch thermodynamischen Modelle.

Die Kapitel haben verschiedene Schwerpunkte, die Teilaspekte des komplexen Wechselspiels von Kräften und strukturellen Umwandlungen in Lipid-Proteinkomplexen näher untersuchen. Als Beispiel diene in den meisten Fällen die Interaktion des peripheren Proteins Cytochrom c mit geladenen Lipidmembranen. Die Modelle, die zu der Analyse dieser Wechselwirkungen entwickelt wurden, haben jedoch allgemeinen Charakter.

Die Wechselwirkung zwischen Proteinen mit Lipidmembranen kann vielfältige Auswirkungen sowohl auf die Struktur der Proteine als auch der Membranen haben. In vielen Fällen führt sie zu kooperativen Veränderungen der dreidimensionalen Anordnung der in ihr enthaltenen Lipide (Kapitel II). Gleichzeitig mit Phasenumwandlungen in den Lipiden können Strukturumwandlungen in Proteinen stattfinden, die nicht nur zu einer verschiedenen Faltung des Proteins, sondern auch zu einer veränderten Funktionalität führen (Kapitel III).

Die thermodynamischen Eigenschaften von Lipidmembranen werden durch die Bindung von Protein beeinflusst. Dies geschieht insbesondere dann, wenn die freie Energie der Bindung des Proteins an verschiedene Zustände der Membran unterschiedlich ist. Als Folge werden nicht nur die Schmelzpunkte der Lipidmembranen verschoben und die Umwandlungsspeaks verbreitert, sondern unter Umständen auch die Umwandlungsenthalpien verändert (Kap.II und V). Abhängig von den Randbedingungen scheinen periphere, lösliche Proteine in die Lipidmembran integrieren zu können. Für Cytochrom c folgt dies sowohl aus großen Assoziationskonstanten als auch aus Elektronenspinresonanz-Spektren (Kap.IV). In Gegenwart einer hohen Proteinkonzentration kann auch Bindung in mehreren Schichten stattfinden.

Die Kooperativität der Umwandlung führt im Schmelzbereich der Lipidketten zur Koexistenz von Lipiddomänen unterschiedlichen physikalischen Zustandes. Die Existenz dieser Domänen kann dazu führen, daß sowohl integrale als auch periphere Protein abhängig vom physikalischen Zustand der Membranen aggregieren können. Dies ist ein wichtiger Aspekt der Lipid-Proteinwechselwirkung in Fällen, in denen die Aktivität eines Proteins von der Wechselwirkung mit anderen Proteinen abhängt (Kap.V).

Die Bindung von Cytochrom c an Dimyristoyl-Phosphatidylglycerol(DMPG)-Membranen führt zu einer komplexen Folge von Umwandlungen des Lipids, die in Kapitel II ausführlich untersucht wurden. DMPG-Dispersionen formen unter Bedingungen niedriger Ionenstärke dreidimensional vernetzte, bikontinuierliche Lipidphasen, was für sich genommen eine sehr interessante Beobachtung ist.

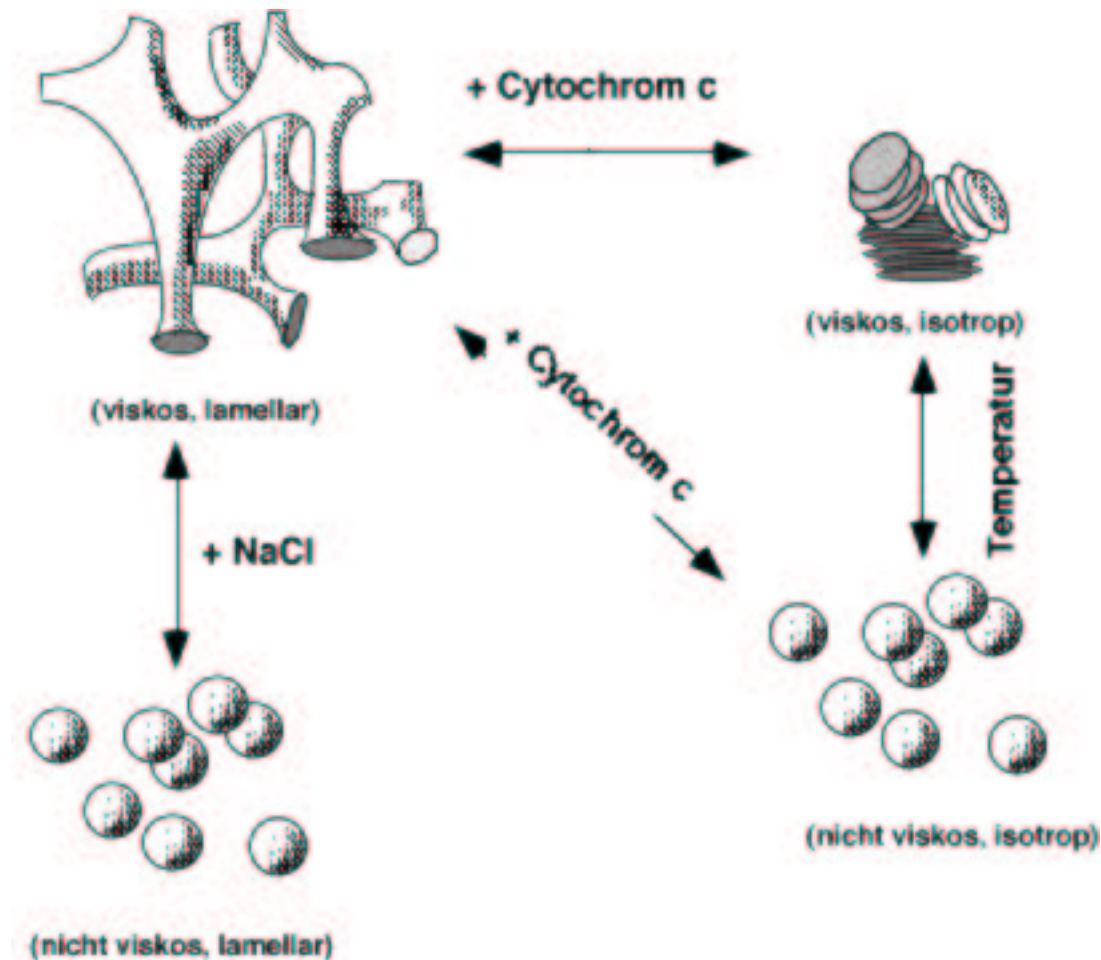


Abb. VI-1

Schematische Darstellung der strukturellen Umwandlung in DMPG-Membranen nach Zugabe von Cytochrom C oder von Kochsalz. Aus Membrannetzwerken werden kleine Vesikel, in Gegenwart von Cytochrom C bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlung bilden sie Aggregate scheibenförmiger Vesikel (siehe Kapitel II)

Sie werden vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert, deren Reichweiten bei niedrigen Ionenstärken groß sind, sich bei der Erhöhung der Ionenstärke jedoch sehr rasch verkürzen. Diese netzwerkartige Lipidphase scheint bei allen Temperaturen vorzuliegen, wobei allerdings der Grad der Vernetzung sehr vom Lipidzustand abhängt und innerhalb der Schmelzumwandlung der Lipide am größten ist. Dies führt zu einer stark erhöhten Viskosität der Lipiddispersion. Bei Zugabe von Kochsalz sowie bei der Bindung von Proteinen wird die Reichweite der Wechselwirkungen verringert und die Lipidphase kollabiert zu kleinen Vesikeln.

Die Lipid-Proteinkomplexe formen oberhalb der thermotropen Lipidschmelze Aggregate scheibenförmiger Vesikel (siehe Abb. VI-1).

Die durch Proteinbindung hervorgerufenen strukturellen Änderungen in den Lipidmembranen spiegeln sich in der Veränderung verschiedener Größen wie der Wärmekapazität, der Viskosität der Dispersionen, und der Fluidität der Lipidketten wieder. Die Enthalpie der thermotropen Schmelzumwandlung reduziert sich beträchtlich. Die kalorimetrischen Daten können quantifiziert und in guter Übereinstimmung durch ein statistisch thermodynamisches Modell erklärt werden, das von proteininduzierten, kooperativen Umwandlungen in den Lipidmembranen ausgeht. Differential- und Titrationskalorimetrie sind dabei thermodynamisch selbstkonsistent. "Negative stain"-elektronenmikroskopische Bilder bestätigen die Vermutung, daß strukturelle Veränderungen vorliegen.

In dem eben beschriebenen Modell wurden mögliche strukturelle Veränderungen des Proteins nicht berücksichtigt. In Kapitel III wurde dieser Aspekt mit Hilfe von "Fourier transform"-Infrarotspektroskopie (FTIR) untersucht. Es erweist sich, daß Cytochrom c bei der Bindung an geladenen Membranen keine signifikanten Veränderungen der Sekundärstruktur erfährt. Dahingegen sind die Raten, mit denen die Amidprotonen des Proteins in der Gegenwart von D_2O gegen Deuteronen ausgetauscht werden, beim gebundenen Protein anders als beim gelösten Protein. Die Deuterierungsraten des gebundenen Proteins sind sehr temperaturabhängig und verändern sich im Intervall von 10-40 °C um mehrere Größenordnungen. Die Deuterierungsraten des ungebundenen Proteins sind in demselben Temperaturintervall fast temperaturunabhängig. Aus diesen Daten wurde geschlossen, daß mindestens zwei tertiäre Faltungen, C_1 und C_2 , des Proteins koexistieren, die unterschiedliche Zugänglichkeit für Wasser aufweisen und in einem raschen Gleichgewicht miteinander stehen (siehe Abb. VI-2). Das Gleichgewicht (mit der Gleichgewichtskonstanten K_0) zwischen diesen Zuständen bestimmt die Deuterierungsraten des Proteins. Trägt man die Ratenkonstanten in einer Arrheniusauftragung auf, erkennt man zudem eine Diskontinuität, die auf eine zusätzliche Konformationsänderung im Protein hinweist. Die Temperatur dieser Umwandlung hängt von dem physikalischen Zustand der Lipide ab und ist insbesondere für den Fall, daß sich der Lipidzustand im selben Temperaturintervall verändert, an die thermotrope Lipidschmelze gekoppelt. In Abb. VI-2 wird dies durch die Zustände C'_1 und C'_2 und durch eine veränderte Gleichgewichts-konstante K'_0 bei der Bindung an eine flüssig-kristalline Membran ausgedrückt. Die Existenz dieser Umwandlung steht mit früheren Resonanz-Raman-Messungen in Einklang, die ergaben, daß sich der Koordinations- und Spinzustand des Eisens in der Hämgruppe des Cytochrom c bei dieser Temperatur verändert. Bei dieser Umwandlung ändert sich auch das Redoxpotential des Cytochrom c und damit seine Funktion.

Es gibt demzufolge unterschiedliche strukturelle Formen des Cytochrom c, die sich in ihrer Sekundärstruktur kaum unterscheiden und doch unterschiedliche tertiäre Faltungen aufweisen. Solche Zustände sind in letzter Zeit unter der Bezeichnung "molten globules" (geschmolzene globulare Proteine) bekanntgeworden.

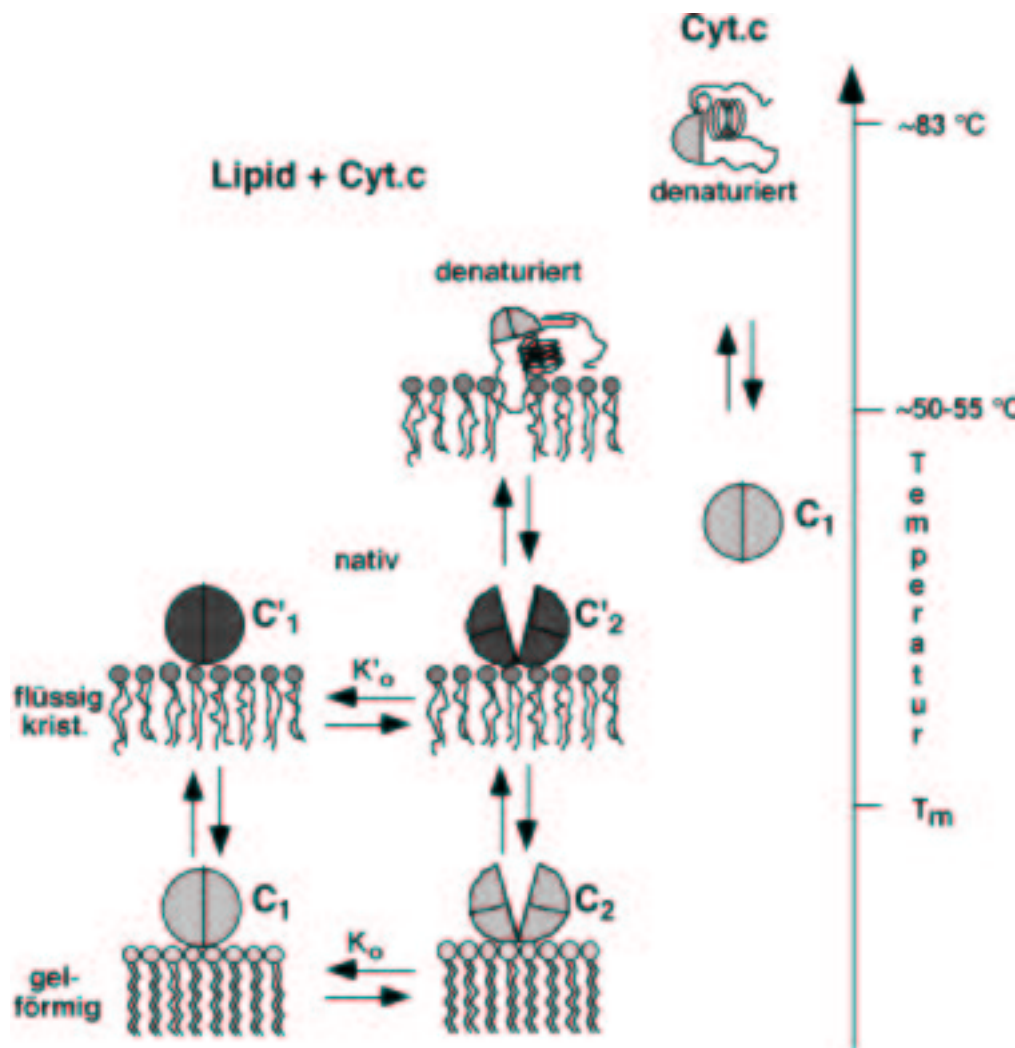


Abb. VI-2

Konformationsgleichgewichte von Cytochrom C auf geladenen Membranen. Es gibt ein Gleichgewicht mit der Gleichgewichtskonstante K_0 zwischen zwei Zuständen C_1 und C_2 , die unterschiedliche Grade des Kontaktes mit Wasser zulassen. K_0 hängt von der Temperatur und dem Phasenzustand des Lipides ab. Bei hohen Temperaturen denaturiert das Protein, im gebundenen Zustand jedoch bei ca. 30° niedrigeren Temperaturen als im gelösten Protein (vgl. Kap. III).

Es handelt sich bei diesen Zuständen vermutlich um Zwischenzustände auf dem Weg zur vollständigen Faltung des Proteins. Eine geringere Stabilität des Proteins im "molten globule"-Zustand wird durch die Beobachtung deutlich, daß die Denaturierungstemperatur, bei der die sekundäre Faltung des Proteins zerstört wird, durch die Bindung an Lipidmembranen um ca. 30°C reduziert wird (siehe Abb. VI-2).

Die Wechselwirkung von Cytochrom c mit Lipiden führt zu einer Steuerung der Funktion des Proteins über eine Veränderung des Zustands der Lipidmembran. Ein möglicher Grund für diese Steuerung wird weiter unten durch die Erläuterung der Ergebnisse von Monte-Carlo-Rechnungen (Kap.V) gegeben.

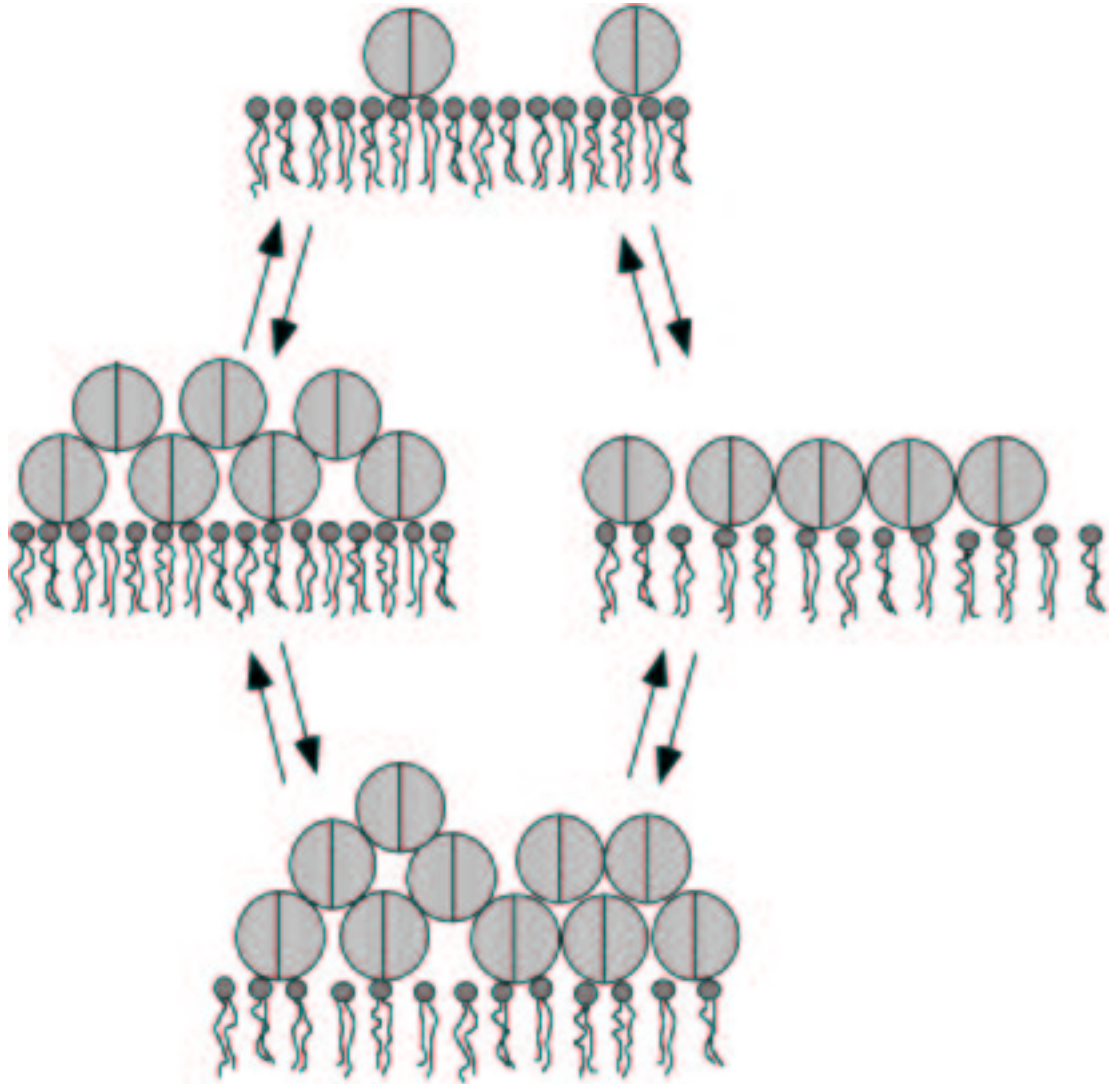


Abb. VI-3

Bindung von nicht-wechselwirkenden Proteinen an Lipidmembranen. Es kann, je nach Stärke der elektrostatischen Wechselwirkung zur Ausbildung von mehreren Proteinschichten (Mitte links), zur Vergrößerung der Membranoberfläche (Mitte rechts) oder zu beiden Effekten kommen (unten) (vgl. Kap. IV)

Das Modell, das in Kapitel II zur Beschreibung der kooperativen, proteininduzierten Umwandlung in den Lipidmembranen verwendet wurde, basierte auf den Annahmen, daß diskrete Bindungsplätze auf einer Oberfläche existieren und die intrinsische Bindungskonstante an einen Bindungsplatz unabhängig vom Bedeckungsgrad der Oberfläche konstant bleibt. Dies berücksichtigt jedoch nicht die Tatsache, daß es sich bei der Lipidmembran um eine nahezu

kontinuierliche Oberfläche handelt, deren elektrostatische Eigenschaften sich bei der Bindung geladener Proteine verändern.

In Kapitel IV wurde durch eine statistisch thermodynamische Behandlung eine analytische Form einer Bindungsisotherme hergeleitet, welche sowohl die Veränderung der Elektrostatik beim Binden von Proteinmolekülen als auch die Kontinuität der Oberfläche berücksichtigt. Letzteres geschieht dadurch, daß die gebundenen Liganden als ein zweidimensionales reales Gas behandelt werden. Dies ermöglicht, attraktive oder repulsive Wechselwirkungen zwischen den Liganden auf der Oberfläche mitzuberechnen.

Wenn die Reichweite der elektrostatischen Wechselwirkungen bei hohen Ionenstärken hinreichend gering ist, führt diese Beschreibung zu guten Anpassungen an experimentelle Daten für die Bindung von Cytochrom c an Dioleoyl-Phosphatidyl-glycerol(DOPG)-Membranen. Sie kommt ohne Annahme von Parametern aus, die nicht unabhängig bestimmbar sind (Größe der Liganden, Ladung, Bindungskonstanten).

Bei niedrigen Ionenstärken wird die charakteristische Länge des elektrostatischen Potentials der Membran größer als der Durchmesser des bindenden Liganden. Unter diesen Umständen kann man nur dann eine gute Beschreibung des experimentellen Isothermen finden, wenn man annimmt, daß mehrere Schichten von Liganden binden können. Bei der geringst-möglichen Ionenstärke (in destilliertem Wasser) binden nahezu so viele Proteine an die Oberfläche, daß das Potential der Membran vollständig neutralisiert wird. Elektronenspinresonanz-Experimente bestätigen die Existenz von mehreren Schichten bei niedrigen Ionenstärken. Zudem ergeben sie einen zunehmenden Kontakt von Cytochrom c mit den Lipidketten des DOPG in der Membran. Man kann daraus schließen, daß auch die Gesamtoberfläche der Membran unter diesen Umständen nicht konstant bleibt. Ein schematisches Bild gibt dies in Abb. VI-3 wieder. Diese Schlußfolgerung ist mit der oben geschilderten Beobachtung konsistent, daß Schmelzenthalpien bei der Lipid-Proteinwechselwirkung verändert werden können. Die Umwandlungsenthalpien von Lipidmembranen stehen in direktem Zusammenhang mit der Packungsdichte der Lipide in der Membran. Es sei zudem daran erinnert, daß sich bei niedrigen Ionenstärken auch strukturelle Umwandlungen der dreidimensionalen Anordnung der Lipidpartikel ergeben (siehe oben).

Wie schon weiter oben beschrieben, denaturiert Cytochrom c auf geladenen Membranen bei wesentlich niedrigeren Temperaturen als in Lösung. Dies ermöglicht es, die Bindung von denaturiertem Protein zu bestimmen, da man die Komplexe des denaturierten Proteins mit Lipiden leicht vom gelösten Protein trennen kann. Die Isothermen, die man in für das denaturierte Protein erhält, lassen sich nur dann durch die hergeleitete Gleichung anpassen, wenn man annimmt, daß die denaturierten Proteine auf der Oberfläche aggregieren. Dies wurde schon aufgrund der, bei der Denaturierung entstehenden zusätzlichen Infrarotbanden vorhergesagt (Kap.III). Eine weitere Beobachtung ist, daß trotz ähnlich großer Ladung die

intrinsischen Bindungskonstanten sehr viel größer sind. Daraus folgt, daß zusätzliche nicht-elektrostatische Beiträge zur Bindungskonstante in der Größenordnung von 4 kcal/mol vorhanden sind. Sie rühren vermutlich aus einer partiellen Integration des Proteins in die Lipidmembran her (siehe Abb. VI-4).

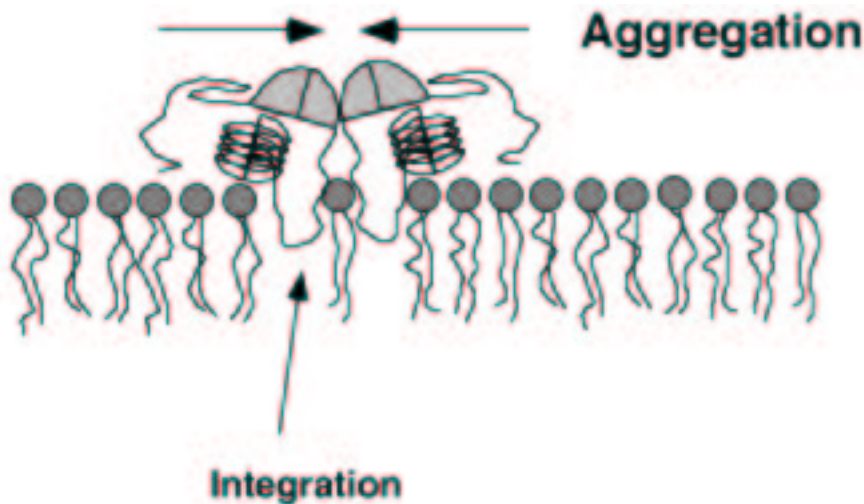


Abb. VI-4

Infrarotmessungen und die Analyse der Bindungsisothermen deuten darauf hin, daß das denaturierte Cytochrom C auf geladenen Lipidmembranen aggregiert und teilweise in die Membran integriert (Kap. III und IV).

Die Umwandlungen in Lipidmembranen sind sehr kooperativ. Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, daß die Lipidmembranen in der Schmelz-umwandlung vermutlich Domänen von Lipiden in unterschiedlichen Zuständen enthalten. Diese Domänen kommen zustande, wenn die Grenzfläche zwischen Lipiden unterschiedlichen Zustandes einen positiven Energiebeitrag liefert, der zu ihrer räumlichen Trennung führt. In der Literatur gibt es Modelle, die die Umwandlungen in den Membranen mit der Annahme von bis zu 10 Zuständen der Lipide simulieren. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Annahme von nur zwei Zuständen eines Lipids (gelförmig oder flüssig kristallin) ausreicht, um quantitativ die Form der kalorimetrischen Umwandlung zu beschreiben.

Die Form der Domänen ist komplex, und ihre Oberfläche hat eine hohe, schwer bestimmbare Entropie. Eine rechnerische Bestimmung des Temperaturverlaufes der Wärmekapazität findet deshalb durch Monte-Carlo-Simulationen statt.

In Kap.V dieser Arbeit wurden Simulationen der Lipid-Proteinwechselwirkung mit Hilfe eines Ising-Modells durchgeführt, das nur zwei Parameter neben der Schmelztemperatur der Lipidmembran und der Enthalpie der Umwandlung enthält: Die Grenzflächenenergie zwischen ungleichen Lipiden und die differentielle Bindungsenergie der Proteine an die unterschiedlichen Lipidzustände. Der erste Parameter bestimmt die Kooperativität der Lipidumwandlung und der

zweite die Verschiebung der Schmelztemperatur durch die Bindung des Proteins. Beide sind deshalb experimentell zugänglich.

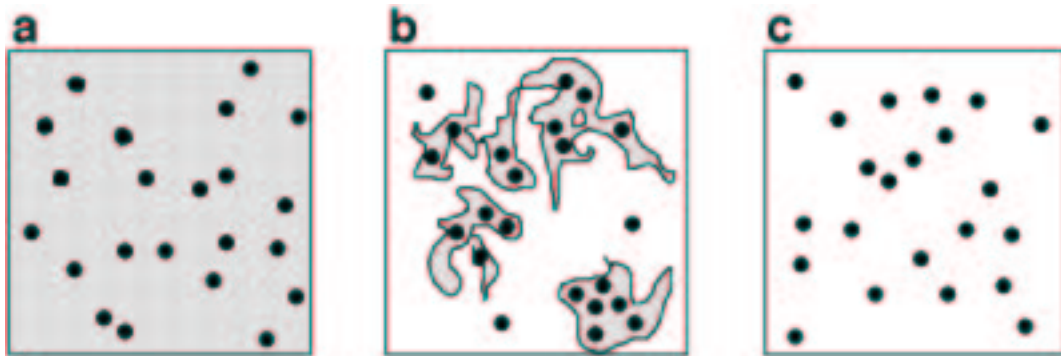


Abb. VI-5

Periphere, die Gelphase bevorzugende Proteine in verschiedener Lipidumgebung: (a) Gelphase, (b) im Umwandlungsbereich der Membran, und (c) flüssig-kristalline Phase. Die gebundenen Proteine aggregieren im Schmelzbereich der Membran und sind ansonsten statistisch verteilt (Kap. V).

Die differentielle Bindungsenergie führt dazu, daß periphere Proteine im Umwandlungsbereich der Membran, in dem Domänen von Lipiden unterschiedlichen Zustands koexistieren, präferentiell an die Domänen einer der beiden Phasen binden. Dies führt im Umwandlungsbereich zu einer Aggregation der peripher gebundenen Proteine (siehe eine schematische Wiedergabe hiervon in Abb. VI-5). Das beschriebene Modell macht qualitativ gute Voraussagen über den Temperaturverlauf der Wärmekapazität.

Integrale Proteine haben im Gegensatz zu peripheren Proteinen immer eine Grenzfläche mit den Lipidketten. Dies führt dazu, daß sie nicht vorwiegend in der Phasenumwandlung der Lipide aggregieren, sondern in der Lipidphase, mit der sie eine große Grenzflächenenergie aufweisen (siehe Abb.VI-6).

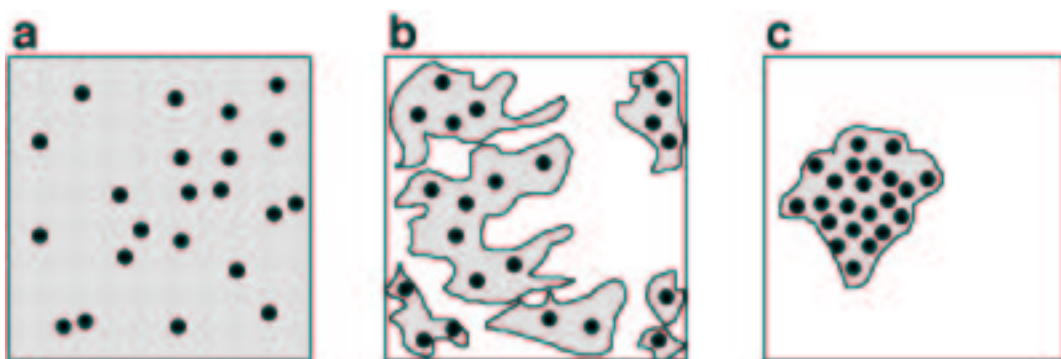


Abb. VI-6

Integrale, die Gelphase bevorzugende Proteine in verschiedener Lipidumgebung: (a) Gelphase, (b) im Umwandlungsbereich der Membranen, und (c) flüssigkristalline Phase. Die eingebetteten Proteine aggregieren in der flüssig kristallinen Phase (vgl. Kap.V).

Das unterschiedliche Aggregationsverhalten von peripheren und von integralen Proteinen führt zu unterschiedlichen Temperaturverläufen der Wärmekapazität, die es prinzipiell möglich machen, kalorimetrisch zwischen integralen und peripheren Proteinen zu unterscheiden.

Die Rechnungen haben interessante Implikationen für die Funktion integraler und peripherer Proteine wie z.B. Alamethicin und Phospholipase A₂, wenn ihre Funktion von Aggregationsgleichgewichten in oder auf der Membran abhängt. Zudem erlaubt es eine differentielle Bindungsenergie, bei peripheren Proteinen die Gleichgewichte zwischen unterschiedlichen Zuständen des gebundenen Proteins zu verschieben (Cytochrom c, siehe oben).

Die verschiedenen vorgestellten Aspekte der Lipid-Proteinwechselwirkung können nicht getrennt voneinander betrachtet werden. Deshalb stellt jede Detailbetrachtung eine starke Vereinfachung der Vorgänge in komplexen Lipid-Proteinsystemen dar. Eine strukturelle Veränderung der Lipidmembran muß in demselben Maße an strukturelle Veränderungen innerhalb des Proteins koppeln, wie dies umgekehrt der Fall ist. Veränderungen von Proteinstrukturen sind zudem nicht getrennt von der Tatsache verständlich, daß diese Proteine aggregieren oder in die Membran integrieren können. Die Wechselwirkung zwischen Lipiden und Proteinen ist andererseits nur sehr schwer durch die gleichzeitige Behandlung aller Vorgänge beschreibbar. Deshalb sind diese Aspekte in der vorliegenden Arbeit getrennt beschrieben worden. Die verschiedenen Abschnitte der Arbeit ergänzen sich gegenseitig und stehen in keinem erkennbaren Widerspruch zueinander. Die Ergebnisse demonstrieren, daß die Lipidmembran eine sehr große Rolle bei der Steuerung von Funktion und Ort der Proteine auf oder in der Membran spielt. Das Verständnis der Lipid-Proteinwechselwirkung liefert deshalb einen Beitrag zum Verständnis der Funktion und kooperativen Steuerung von Enzymen und anderen Proteinen sowie der gesamten biologischen Membran.

Lebenslauf Thomas Heimbürg

31.3.1960	Geboren in London
1978	Erlangen der allgemeinen Hochschulreife in Stuttgart
1978-84	Studium der Physik an den Universitäten Stuttgart und Göttingen
1984	Diplom im Fach Physik an der Universität Göttingen
1989	Promotion an der Universität Göttingen
1989-1990	Gastwissenschaftler an der University of Virginia in Charlottesville
1992	Gastdozent an der University of Virginia
1990-1994	Mitarbeiter des MPI für biophysikalische Chemie