

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

MPIBpc News

4. Jahrgang Göttingen

Ausgabe Nr. 7/98

Juli 1998

Berichte aus dem Institut

Fluktuationen und Domänen:

Thermodynamische Eigenschaften und Heterogenität von Membranen

T. Heimbürg, Arbeitsgruppe Membranthermodynamik (AG 012)

PD Dr. T. Heimbürg ist Gruppenleiter der Arbeitsgruppe Membranthermodynamik (AG 012, Tel. 201-1412/1582, theimbu@gwdg.de). An English version of this article will be available on the www-page of the group (www.gwdg.de/~theimbu)

Das "fluid mosaic"-Modell

Die wichtigsten Komponenten von biologischen Membranen sind Proteine und Lipide. Proteine bilden z.B. Enzyme, Ionenpumpen, Kanäle oder andere, für die Funktion einer Zelle wesentliche Strukturen. Lipide sind, verglichen mit Proteinen, kleine, amphiphile Moleküle, die spontan Membranen einer Dicke von ca. 50Å bilden, wenn sie in Kontakt mit Wasser kommen. Das weithin akzeptierte Bild einer biologischen Membran ist das "fluid mosaic"-Modell von Singer und Nicolson (Abb.1), in dem Lipide eine sehr dünne Doppelschicht bilden. Proteine (in Abb.1 grün dargestellt) sind entweder an die Oberfläche gebunden oder durchspannen die Membran, und schwimmen frei in diesem Medium.

Gemeinhin wird deshalb meist angenommen, daß die Lipidmembran eine Art Anker für Proteine bildet und keine eigene Funktionalität hat. Andererseits gibt es in biologischen Membranen hunderte verschiedener Lipide (in Abb.1 deshalb mehrfarbig dargestellt), die sich in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden (z.B. in Ladung und Größe) und man kann sich fragen, warum die Natur sich die Mühe macht, für eine solche Vielfalt von Lipiden

zu sorgen, wenn die Lipidmembran nur eine strukturbildende Funktion hat. Es ist beispielsweise bekannt, daß Bakterien die Lipidzusammensetzung ihrer Membranen verändern, wenn man sie bei verschiedenen Temperaturen wachsen läßt. Warum tun sie das?

Unsere Arbeitsgruppe hat sich zur Aufgabe gesetzt, die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lipidmembranen und ihre Wechselwirkungen mit Proteinen besser zu verstehen, insbesondere die thermodynamischen und mechanischen Eigenschaften von Modellsystemen.

Modellsysteme sind Mischungen aus reinen Komponenten, z.B. aus einem Lipid und einem Protein, die im Reagenzglas hergestellt werden. Sie werden deshalb verwendet, weil biologische Systeme zu viele verschiedenartige Moleküle enthalten. Es ist für einen Physiker fast unmöglich, allgemeine Schlüsse aus experimentellen Daten biologischer (und daher sehr komplexer) Systeme zu ziehen. Experimentelle und theoretische Untersuchungen an Modellsystemen führen jedoch zur Erkenntnis, daß das "fluid mosaic"-Modell wichtiger Modifikationen bedarf.

"Schmelzen" von Lipidmembranen - Bildung von Domänen

Reine Lipide bilden spontan Membranen, wenn sie mit Wasser in Kontakt kommen. Eine sehr interessante Eigenschaft dieser Membranen ist, daß sie schmelzen können. Beim Schmelzen verändert sich der Ordnungszustand und damit die Entropie S der Ketten.

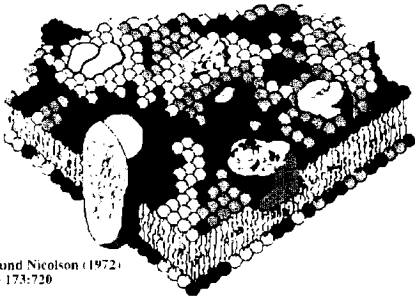
Dies ist in Abb.2 dargestellt. Die Veränderung der Energie (Wärme bzw. Enthalpie ΔH) und die Veränderung der Entropie (ΔS) der Membran kann man in einem Kalorimeter messen.

Die Schmelzpunkte (T_m) natürlich vorkommender Lipide liegen in der Regel im Bereich zwischen -20°C und $+60^\circ\text{C}$, also im weiteren Sinne in einem physiologisch relevanten Bereich. Die Schmelztemperatur hängt außer von den Kettenlängen und der Ladung der Kopfgruppe von einigen wichtigen äußeren Parametern ab: von der Ionenstärke, dem pH, der Gegenwart von Proteinen oder anderer Molekülen wie Cholesterin oder von Anaesthetika. Durch Protonierung von geladenen Lipiden kann zum Beispiel deren Schmelzpunkt um 20 Grad erhöht werden.

Fortsetzung auf S. 2

Inhalt

Membranthermodynamik	1-4
Neue Arbeitsgruppe: AG 012	5
Neueinstellungen	6
Gäste	7
Abgänge	7
Promotionen, Ehrungen	7
ZEWEG-Info	7
Impressum	7
CWDG-Info	8
Publikationen	8
Jubiläen: 25 Jahre MPI	8
Der neue Betriebsrat	9



nach
Singer und Nicolson (1972)
Science 173:720

Abb.1: Bild einer Plasma-Membran, modifiziert nach dem berühmten Bild des "fluid mosaic"-Modells von Singer & Nicolson (1972). In verschiedenen Farben werden unterschiedliche Lipide gezeigt, die sich nicht homogen, sondern in Domänen unterschiedlicher Zusammensetzung anordnen. In grün sind periphere und integrale Proteine abgebildet.

Schmelzprozesse einer Membran kann man mit einem Computer simulieren. Die Idee hinter den Simulationen besteht darin, in einer im Computer erzeugten Membran die Wahrscheinlichkeit des Schmelzens eines individuellen Lipides in einer gegebenen Lipid- (Protein-) Umgebung zu bestimmen und das Lipid mit dieser Wahrscheinlichkeit zu schmelzen. Dieser Prozess wird für jedes Lipid viele tausendmale wiederholt. Man nennt solche Simulationen "Monte-Carlo"-Simulationen. Eine solche simulierte Membran wird in Abb.3 gezeigt. Man sieht drei "Schnappschüsse" von Lipidmembranen bei Temperaturen unterhalb, an und oberhalb der Schmelztemperatur. Jeder dunkle Punkt in dieser Graphik stellt ein geförmiges Molekül, jeder helle ein flüssiges (fluides) Molekül dar (siehe auch Abb.2). Eine wichtige Beobachtung in diesen Simulationen ist die Ausbildung von Domänen, d.h. von Gruppen geförmiger und flüssiger Lipide, deutlich erkennbar in Abb.3.

Die Ausbildung von Inhomogenitäten in Membranen ist eine wesentliche Erkenntnis, die aus der thermodynamischen Analyse von Membranprozessen folgt. Es ist klar, daß diese Inhomogenitäten in einer biologischen Membran wichtige Konsequenzen haben kann.

Bindung von Proteinen an Membranen - Heterogenität von Membranen

Proteine binden in der Regel unterschiedlich stark an unterschiedliche Lipide oder unterschiedliche Lipidzustände.

Das kann man aus kalorimetrischen Daten schließen (dazu weiter unten). Wenn Proteine nun an eine Membran mit Domänen binden, verteilen sie sich ungleich auf der Membranoberfläche, wie in Abb.4 gezeigt. Diese führt dazu, daß man lokal stark unterschiedliche Proteinkonzentrationen erhalten kann.

Man stelle sich zwei Proteinsorten vor, die an unterschiedliche Domänen binden (oder in sie eingebettet sind): solche Proteine würden sich auf der Membran nicht "sehen". In dem modifizierten "fluid mosaic"-Bild in Abb.1 würden sich zum Beispiel die Proteine nicht treffen, da sie sich in Domänen unterschiedlicher Natur aufhalten. Nun ist aber der Kontakt zwischen Proteinen Teil einiger enzymatischer Reaktionskaskaden. Für die Kommunikation zwischen Proteinen ist es sehr wichtig, in welchen Domänen sie sich aufhalten. Sie ist vom physikalischen Zustand der Membran abhängig und kann durch Veränderung der Umgebung (Temperatur, Ionenstärke, pH,...) oder auch durch Veränderung der Lipidzusammensetzung (beispielsweise infolge der Aktivität einer

Phospholipase, die eine Kopfgruppe oder eine Fettsäurekette der Lipide abtrennt) beeinflusst werden.

Das "fluid mosaic"-Modell bedarf also ganz offensichtlich einer Erweiterung, die die lateralen Inhomogenitäten in Membranen mit in Betracht zieht, die sich aus dem physikalischen Zustand der Lipide und der Mischbarkeit der Komponenten ergeben.

Fluktuationen

Während der Monte-Carlo Simulation des Schmelzprozesses in der Membran schwankt die Zahl der flüssigen Lipide um einen Mittelwert (in Abb.5 wird das Schwanken um den Schmelzpunkt, herum dargestellt). Man nennt diese Schwankungen auch Fluktuationen. Die Fluktuationen sind ein sehr nützliches "Abfall-" Produkt der Simulation, denn man kann eine Reihe von nützlichen thermodynamischen Größen aus ihnen bestimmen, darunter Wärmekapazitäten, Kompressibilitäten, Relaxationszeiten und indirekt auch Schallgeschwindigkeiten.

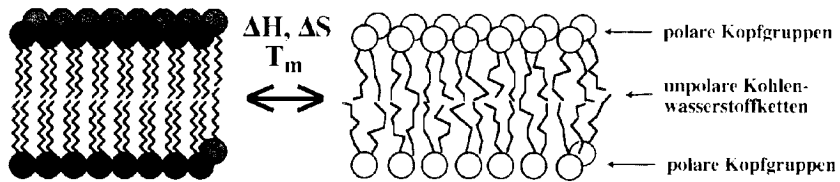


Abb.2: Schematisches Bild des Schmelzens einer Lipidmembran. Die Ketten im festen (Gel-) Zustand sind geordnet, im flüssigen (fluiden) Zustand sind sie ungeordnet. Die Veränderung der Wärme, ΔH , der Entropie, ΔS , und den Schmelzpunkt T_m kann man in einem Differentialkalorimeter bestimmen.

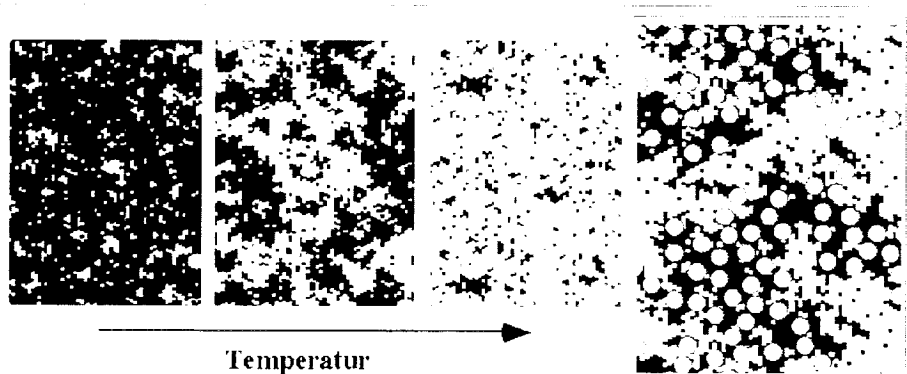


Abb.3 (links): Typische Aufsicht-Schnappschüsse von Monte-Carlo Simulationen des Schmelzens von Lipidmembranen bei zunehmender Temperatur. Geförmige Lipide sind als dunkelblaue Punkte, fluide Lipide als hellblaue Punkte wiedergegeben. Man erkennt deutlich das Ausbilden von Domänen.

Abb.4 (rechts): Schnappschuß einer Monte-Carlo Simulation einer Lipidmembran am Schmelzpunkt in Gegenwart eines peripheren Proteins, das stärker an geförmige Domänen bindet. Die Proteine ordnen sich nicht mehr homogen auf der Oberfläche an.



Die Wärmekapazität bestimmt sich zum Beispiel aus den Fluktuationen der Enthalpie aus der einfachen Beziehung

$$\Delta C_p = \frac{\overline{(\Delta H)^2} - (\overline{\Delta H})^2}{RT^2}$$

Diese Wärmekapazitäten bestimmen wir sowohl aus der Monte-Carlo Simulation als auch experimentell in einem Mikrokalorimeter.

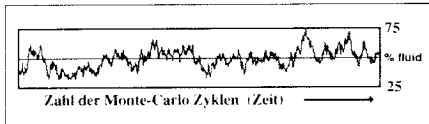


Abb.5: Fluktuationen der Zahl flüider Lipide um den Schmelzpunkt als Funktion der (Simulations-) Zeit. Ergebnis einer Monte-Carlo Simulation.

In Abb.6 sieht man die kalorimetrischen Schmelzkurven von Membranen in Abwesenheit und in Gegenwart zunehmender Proteinmengen, und zwar ist *links* das Ergebnis einer Simulation und *rechts* ein vergleichbares experimentelles Ergebnis wiedergegeben. Mit zunehmenden Proteinkonzentrationen verändern sich die Wärmekapazitätskurven. Die Schmelzkurven werden zu höheren Temperaturen verschoben, was bedeutet, daß dieses spezielle Protein an Domänen gelförmiger Lipide stärker bindet.

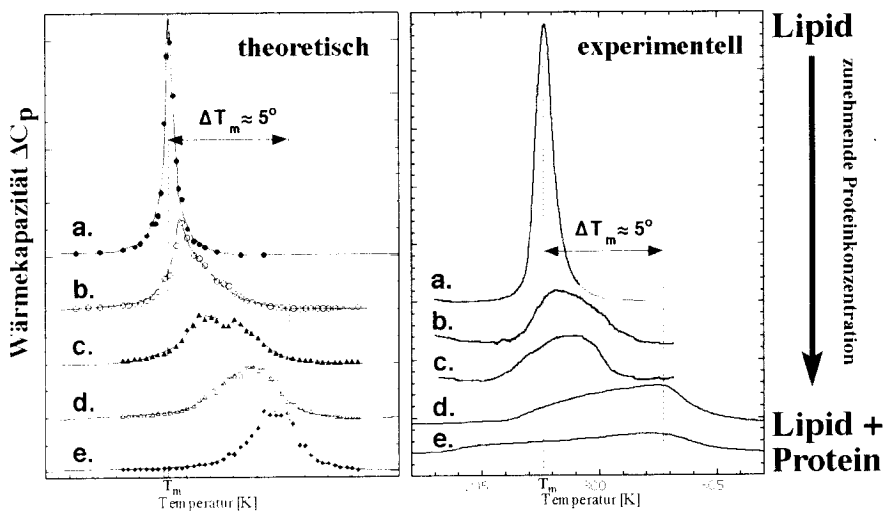


Abb.6: Wärmekapazitätsprofile von Lipiden in Abhängigkeit von der Konzentration eines peripher bindenden Proteins. Links sind die Ergebnisse einer Monte-Carlo Simulation und rechts experimentelle Ergebnisse (hier: Cytochrome c-Bindung an negativ geladene DMPG-Membranen). Die Verschiebung der Kurven zu höheren Temperaturen beweist die starke Bindung an Domänen aus festem Lipid.

Mechanische Eigenschaften von Membranen

Eine wichtige Beobachtung unserer Arbeitsgruppe ist, daß sich im Schmelzbereich von Membranen die Enthalpie (die Wärme) und das Volumen proportional zueinander verändern. In Abb. 7 ist übereinander die kalorimetrische Schmelzkurve eines Lipides $d(\Delta H)/dT$ und die durch Densitometrie bestimmte Veränderung des Volumens $d(\Delta V)/dT$ wiedergegeben. Beide Kurven liegen fast perfekt aufeinander.

Dies hat weitreichende Konsequenzen: Die Veränderung der Kompressibilität einer Membran ist gegeben durch eine ähnlich einfache Gleichung wie die Wärmekapazität

$$\Delta \kappa_T = \frac{\overline{(\Delta V)^2} - (\overline{\Delta V})^2}{V \cdot RT}$$

Die Fluktuationen des Volumens und der Wärme sind nun proportional zueinander und deshalb sind auch Wärmekapazität und Kompressibilität zueinander proportional. Dieses Ergebnis ist alles andere als trivial (sondern ist im Gegenteil sehr erstaunlich) und es ermöglicht, Rückschlüsse auf die mechanischen Eigenschaften von Membranen zu ziehen. Daraus folgt, daß Membranen in der Nähe des Schmelzpunktes weich und elastisch wer-

den, daß sie außerhalb der Schmelzumwandlung aber recht steif sind. Die Zugabe von Proteinen verändert deshalb nicht nur die Wärmekapazitäten, sondern beeinflusst auch die mechanischen Eigenschaften einer Membran.

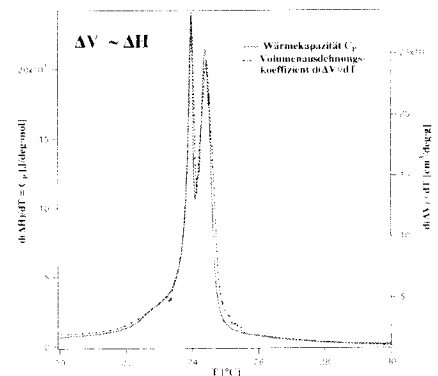


Abb.7: Proportionalität von Enthalpie H und Volumen V (bzw. von Volumenausdehnungskoeffizient dV/dT und der Wärmekapazität C_p in der Umwandlung eines Lipids

Strukturelle Umwandlungen in Membranen

Die Resultate des letzten Abschnitts führen zu dem Ergebnis, daß Membranen in der Nähe der Schmelzpunkte besonders flexibel werden. Es ist bekannt, daß die bestimmenden Faktoren für die Form eines Lipidvesikels die elastischen Konstanten der Membran und osmotische Kräfte sind, hervorgerufen zum Beispiel durch unterschiedliche Ionenstärken im Inneren des Vesikels und in der Umgebung. Da die Elastizität der Membranen in der Nähe der Schmelzumwandlung groß ist, ist dort auch die Wahrscheinlichkeit für strukturelle Umwandlungen sehr groß.

In Abb.8 ist ein schönes Beispiel hierfür wiedergegeben. Bestimmte anionische (negativ geladene) Lipide formen sphärische Vesikel, die sich in der Nähe der Schmelztemperatur in ein dreidimensionales Membran-Netzwerk umwandelt. Oberhalb der Schmelztemperatur findet man wieder sphärische Vesikel. Man kann diese Strukturumwandlungen im Elektronenmikroskop verfolgen. Man hat hier eine Kopplung zwischen der Schmelzumwandlung der Lipide und geometrischen Veränderungen vorliegen. Sie führen dazu, daß der Schmelzpeak der Wärmekapazität sich in drei Maxima aufspaltet. Zwischen

Fortsetzung aus Seite 4

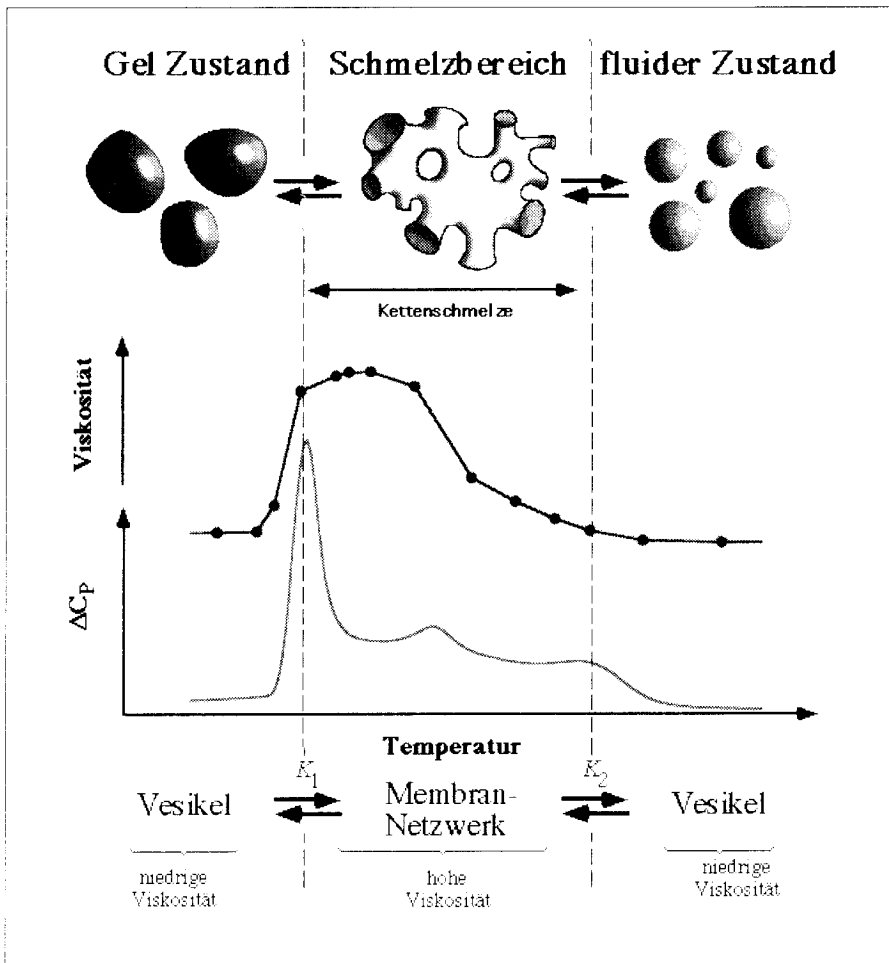


Abb.8: Ausbildung einer dreidimensional vernetzten Membranphase im Schmelzbereich der Lipidketten. Die Natur der Phasen wurde mit Elektronenmikroskopie bestimmt. Die geometrischen Umwandlungen der Membranen sind sowohl in der Wärmekapazität als auch in der Viskosität sichtbar.

diesen Maxima findet man ein starkes Ansteigen der Viskosität der Lipiddispersion, die sich auf die dreidimensionale Vernetzung der Membranen zurückführen läßt.

Zusammenfassung

Das "fluid mosaic"-Modell muß nach heutigem Kenntnisstand so modifiziert werden, daß auch Heterogenitäten in den Membranen zugelassen werden. Diese Heterogenitäten werden von vielen Faktoren beeinflusst: Von der Gegenwart von Proteinen (und möglicherweise von deren Konformationsumwandlungen), von der Elektrostatik (Ionenstärke, pH), aber auch von der Geometrie einer Membran. Diese Eigenschaften sind vorwiegend makroskopischer Natur, also Eigenschaften der Membran als Ganzes und weniger lokaler Natur, ganz abgesehen von der Tatsache, daß die Funktion einiger Proteine auch lokal von der Lipidumgebung abhängen.

Mein persönliches, vielleicht etwas spekulatives Bild einer biologischen

Membran ist das Folgende: Zweifellos sind Proteine die wichtigsten Funktionsträger einer Membran. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß auch ihre räumliche Anordnung für die biologische Funktion wichtig ist. Die Membran ist ein Vielkomponentensystem, und die physikalischen Eigenschaften der Membran sind mehr als nur die Summe der Einzeleigenschaften der Moleküle. Fluktuationen hängen sehr empfindlich von Randbedingungen ab. Sie führen zu Domänenstrukturen, die wiederum einen Einfluß auf Diffusionskoeffizienten und Reaktionswahrscheinlichkeiten haben. Um die Funktion der Gesamtmembran zu verstehen, reicht es wohl nicht aus, die einzelnen Makromoleküle zu untersuchen, sondern man muß auch die physikalischen Eigenschaften des makroskopischen, thermodynamischen Ensembles berücksichtigen. Diese makroskopischen Eigenheiten einer Membran hängen aber sehr empfindlich von den Umgebungsbedingungen ab und ermöglichen potentiell eine empfindliche Steuerung biologischer Funktion. ▢

Literatur

- Mouritsen, O.G. und R.L.Biltonen (1992) Protein-lipid interactions and membrane heterogeneity New Comprehensive Biochemistry, A.Watts (Ed.) Protein Lipid Interactions, Elsevier
- Heimburg, T. und R. L. Biltonen (1996) Biophys. J. 70, 84-96 A Monte-Carlo simulation study of protein-induced heat capacity changes and lipid-induced protein clustering
- Heimburg, T., and D. Marsh (1996) in "Biological membranes - A molecular perspective from computation and experiment", B. Roux and K.M.Merz, eds., Birkhäuser, Boston, Basel, Berlin Thermodynamics of the interaction of proteins with lipid membranes
- Halstenberg, S., T.Heimburg, T.Hianik, U.Kaatze, und R.Krivanek (Biophys.J.7/1998) Cholesterol induced variations in the volume and enthalpy fluctuations of lipid bilayers
- Heimburg, T. (1998) submitted Mechanical aspects of membrane thermodynamics - estimation of mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry