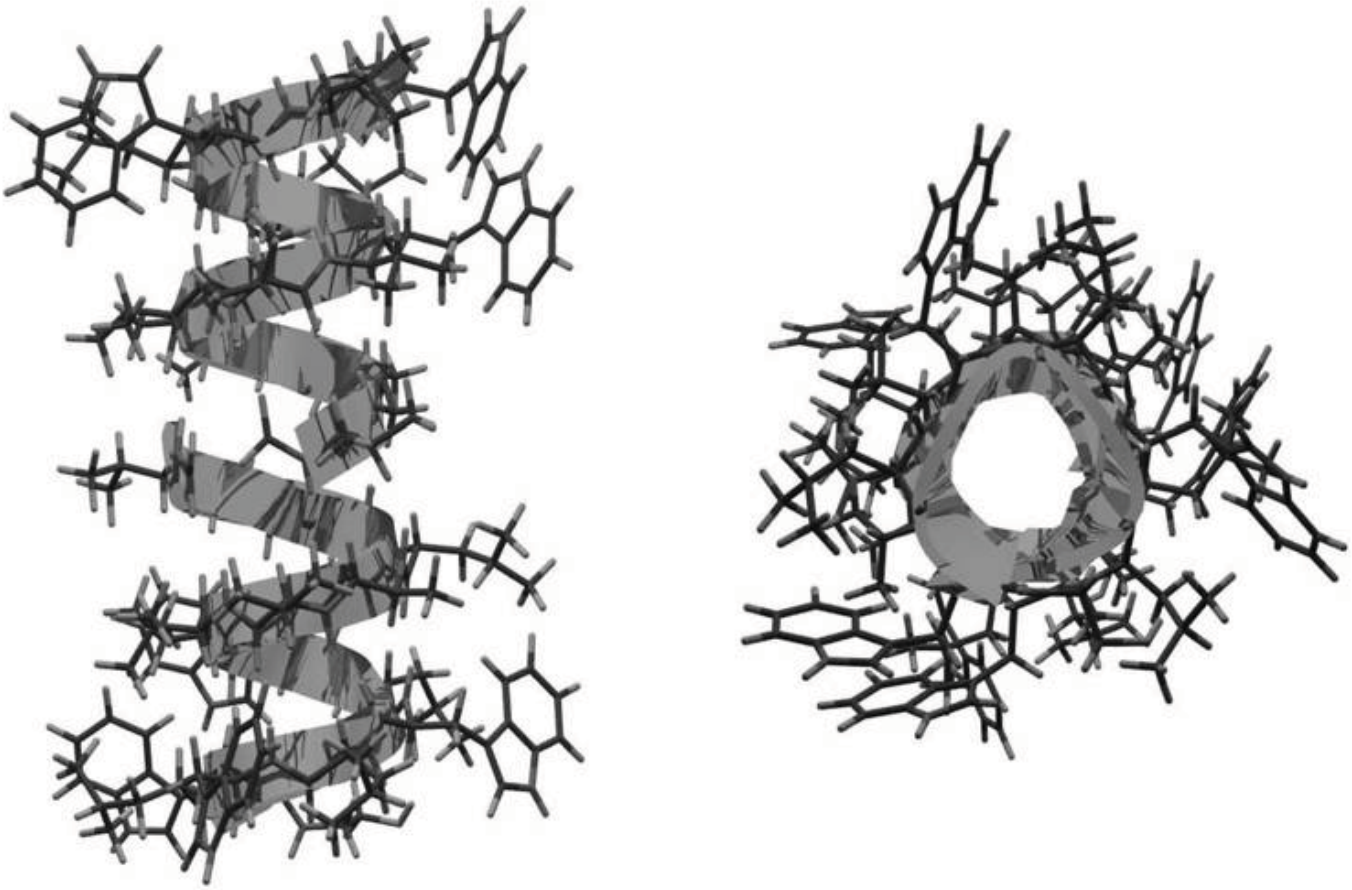
Jörg Eisenblätter

Hochdruck-^{2}H-NMR- und Röntgenbeugungs-Untersuchungen an Phospholipid/Gramicidin D-Mischungen



Cuvillier Verlag Göttingen

Hochdruck-^{2}H-NMR- und Röntgenbeugungs-Untersuchungen an Phospholipid/Gramicidin D-Mischungen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Chemie der
Universität Dortmund vorgelegt

von
Dipl.-Chem. Jörg Eisenblätter
aus Herten

Dortmund 2002

Erstgutachter:	Prof. Dr. R. Winter
Zweitgutachter:	Prof. Dr. A. Geiger
Tag der mündlichen Prüfung:	13.06.2002

Danke...

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Roland Winter für die interessante Themenstellung und seine kompetente Betreuung sowie die stete Diskussionsbereitschaft, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Prof. Dr. Alfons Geiger danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats

Prof. Dr. Franz Fujara gilt mein Dank für die Ermöglichung der temperaturabhängigen NMR-Untersuchungen in seiner Arbeitsgruppe. Bei seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die freundliche Aufnahme bedanken und bei Dr. Olaf Isfort für interessante Diskussionen und seine Bereitschaft, mir zu erklären wie Physiker NMR-Probenköpfe konstruieren.

Für die freundschaftliche und erfolgreiche Zusammenarbeit bei einigen Forschungsaufenthalten am DESY in Hamburg bedanke ich mich bei Dr. Jürgen Woenckhaus, Dr. Eva-Maria Pospiech, Dr. Andrea Gabke und Rudolf Köhling.

Bei Dr. Kai Hochgesand und Dr. Christine Lorkowski bedanke ich mich für ihre Bereitschaft mir bei wissenschaftlichen und weniger wissenschaftlichen Fragestellungen stets zur Seite zu stehen.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises PC I gilt mein Dank für das freundschaftliche Arbeitsklima und die stets vorhandene Bereitschaft zur Zusammenarbeit.

Und schließlich danke ich ganz besonders:

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

2 AUFBAU UND STRUKTUR BIOLOGISCHER MEMBRANEN 5

2.1 Lipide 6
2.2 Proteine 10
2.3 Gramicidin 14

3 EXPERIMENTELLES 21

3.1 Präparation der Proben 21
3.2 Kleinwinkel-Röntgenbeugung 23
3.2.1 Grundlagen der Beugung an teilgeordneten Systemen 24
3.2.2 Experimentelle Aspekte der Beugungsuntersuchungen 26
3.3 Grundlagen der kernmagnetischen Resonanz 30
3.3.1 ZEEMAN-Wechselwirkung 32
3.3.2 Quadrupol-Wechselwirkung 33
3.3.3 Deuterium-NMR Spektren kristalliner Proben 34
3.3.4 Deuterium-NMR-Spektren von Lipidaggregaten 37
3.3.5 Interpretation von Lipid-Ordnungsparametern 39
3.3.6 Experimentelle Aspekte der NMR-Untersuchungen 46

4 ERGEBNISSE 53

4.1 Kleinwinkel-Röntgenbeugung 53
4.1.1 Das System DMPC/Gramicidin 53
4.1.2 Das System DPPC/Gramicidin 67
4.2 NMR-Untersuchungen 82
4.2.1 Das System DMPC-d_{54}/Gramicidin 82
4.2.2 Das System DPPC-d_{62}/Gramicidin 107

5 ZUSAMMENFASSUNG 129

6 LITERATURVERZEICHNIS 135

A FIRMENVERZEICHNIS I

1 Einleitung

Zellen können als miniaturisierte chemische Fabriken angesehen werden, und was sie vollbringen, ist erstaunlich. So verlaufen eine Vielzahl komplexer chemischer Reaktionen, für die in der klassischen Chemie oft aggressive Reagenzien, extreme Bedingungen von Druck und Temperatur oder die Zufuhr elektrischer Energie benötigt werden, in biologischen Systemen mit hohen Ausbeuten unter Normalbedingungen und im wäßrigen Milieu ab. Eine wichtige Rolle bei der Ausübung der Zellfunktionen übernehmen dabei Membranen, die bei allen Zellen zur Abgrenzung zwischen intra- und extrazellulärem Raum und zur Regulierung des Stoffaustausches dienen. Darüber hinaus weisen eukaryotische Zellen eine Kompartimentierung des intrazellulären Raumes auf, durch die membranumschlossene Zellorganellen, wie z.B. die Mitochondrien, das endoplasmatische Reticulum oder der Zellkern entstehen.

Die Zellmembran ist semipermeabel und muß die Aufnahme von Nährstoffen und Salzen sowie die Ausscheidung von Abfallprodukten ermöglichen. Je nach ihrer spezifischen Funktion sind Zellmembranen ganz unterschiedlich aufgebaut; sie werden jedoch in den allermeisten Fällen durch eine Doppelschicht aus Lipiden gebildet, in die Kohlenhydrate, Fettsäuren, Steroide und Proteine eingebettet sind. Durch die Vielzahl an funktionellen Untereinheiten, die in natürlichen Zellmembranen vorliegen, sind physikalisch-chemische Untersuchungen zu Wechselwirkungsbeziehungen einzelner funktioneller Gruppen untereinander oder mit der Lipid-Doppelschicht sehr schwierig zu interpretieren. Man begann daher mit Untersuchungen an einfacher aufgebauten Modellbiomembranen, wie z.B. binären Systemen (Lipid/Wasser). Die Modellsysteme werden dann durch Änderung der Lipidzusammensetzung oder die Integration amphiphiler Moleküle und Proteine immer komplexer und somit biologischen Membranen ähnlicher gestaltet.

Proteine sind nahezu an allen biologischen Funktionen beteiligt; sie dienen als Enzyme zur Katalyse biochemischer Reaktionen, transportieren Moleküle oder Ionen von einem Organ zum anderen – wie z.B. das Hämoglobin oder Lipoproteine – oder sie verleihen biologischen Strukturen Stabilität und Schutz, wie z.B. das Collagen oder Keratin. Zudem können sie den Organismus vor eindringenden Bakterien oder bei Verletzungen vor Blutverlusten schützen (Immunglobuline bzw. Blutgerinnungsproteine wie das Thrombin) und wichtige regulatorische Funktionen übernehmen. So steuert beispielsweise das Insulin den Zuckerstoffwechsel und das Parathormon reguliert den Calcium- und den Phosphattransport. Je nach ihrer Funktion befinden sich Proteine in wäßriger Lösung, wie z.B. im Cytosol oder im Blutplasma, oder sie sind an eine Membran gebunden oder ihr eingelagert.

Eine weitere wichtige Proteinklasse ist die der Ionenkanäle und Ionenpumpen. Sie übertragen nicht nur den Nervenimpuls, indem sie entlang der Nervenfaser das Aktionspotential von etwa -100 mV bis -120 mV ständig wieder aufbauen, sondern übersetzen auch physikalische oder chemische Sinnesreize in neuronale Signale. Selbst Zellen, die nicht an das Nervensystem gekoppelt sind, benutzen sie zu Kommunikationszwecken. Eine „durchschnittliche“ Zelle weist zwischen 10000 und 1000000 Ionenkanäle auf, wobei diese Zahl sich aus bis zu 50 verschiedenen Kanaltypen zusammensetzt.

Ein sehr einfaches Modellsystem für Ionenkanäle stellt Gramicidin dar. Dieses ist ein antibakterielles Polypeptid mit einer Molmasse von 1,8 kDa, das zur Klasse der Ionophore gezählt wird. Es kann in Lipidmembranen eingelagert werden und Kanäle bilden, durch die die Permeabilität für einwertige Ionen, wie Na^+ und K^+, stark erhöht wird. Obwohl Gramicidin aufgrund seiner außergewöhnlichen Struktur und der vergleichsweise geringen Molmasse nicht als Modell für biologische Kanäle, wie den Acetylcholin-Rezeptor, gelten kann, so können doch grundlegende Untersuchungen zu Wechselwirkungsbeziehungen am Modellsystem Lipid/Gramicidin durchgeführt werden, die helfen können, die Funktionen natürlicher Biomembranen zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sind Untersuchungen zum druck- und temperaturabhängigen Phasenverhalten von Phospholipid/Gramicidin D-Mischungen in wäßriger Lösung durchgeführt worden.

Durch die Untersuchung der Lipid-Dispersionen unter der Anwendung hydrostatischen Drucks erhält man die Möglichkeit, den Einfluß von Volumeneffekten auf Lipid-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen, da durch Druckänderungen die Dichte des Systems verändert werden kann, ohne seine thermische Energie zu variieren. Zudem kann innerhalb einer Lipid-Phase die Dicke der Doppelschicht über einen weiten Bereich nahezu stufenlos eingestellt werden; so nimmt die lamellare Gitterkonstante d z.B. in der flüssig-kristallinen Phase in Phospholipid-Doppelschichten um ca. $\mathrm{d}d/\mathrm{d}p = 1$ Å kbar^{-1} ab [Czeslik 1998]. Dies ermöglicht, das Konzept des ‚hydrophobic mismatch‘ [Fattal 1993, Mouritsen 1993] bei der Wechselwirkung von gesättigten Phospholipiden mit Gramicidin einer Überprüfung zu unterziehen und mehr über die Zusammenhänge zwischen der Lipid-Doppelschichtdicke und dem Konformerengleichgewicht des Gramicidins zu erfahren. Des weiteren sind einige der beobachteten Gel-Phasen bei Normaldruck einer Untersuchung nicht, oder zumindest nur schwer zugänglich.

Es werden Kleinwinkel-Röntgenbeugungsexperimente vorgestellt, die zur Bestimmung der druck- und temperaturabhängigen Phasenumwandlungen und der Charakterisierung der verschiedenen Lipid-Phasen dienen. Zudem ergibt sich die Möglichkeit, zu studieren, ob durch den Einbau von Gramicidin Entmischungsphänomene auftreten und durch Bestimmung der lamellaren Gitterkonstanten abzuschätzen, ob die hydrophobe Länge der Lipid-Doppelschicht mit der eines Gramicidin-Konformers korreliert.

^{2}H-NMR-Untersuchungen wurden an kettenperdeuterierten Proben gleicher molarer Zusammensetzung durchgeführt, um Informationen über den Einfluß des Polypeptids auf die Kettendynamik und Konformation der Lipide zu gewinnen. Diese Experimente geben detaillierte Informationen über die lokale Struktur und Dynamik der Methylengruppen entlang der perdeuterierten Acylketten, da die Deuteronen als lokale Kernspinsonden betrachtet werden können. In der fluiden Phase kann aus den Kettenordnungsparametern die hydrophobe Kettenlänge und der mittlere Flächenbedarf der Lipide ermittelt werden. Die spektralen Momente der Spektren ermöglichen eine qualitative Beurteilung der Kettendynamik in allen untersuchten Phasen und eine Untersuchung von Phasenübergängen.

2 Aufbau und Struktur biologischer Membranen

Biologische Membranen sind komplex aufgebaute Aggregate, die aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten bestehen. Man darf sie sich jedoch nicht als starre Barrieren vorstellen, sondern ihre Funktion ist eng an ihre dynamischen Eigenschaften geknüpft. Sie sind nach dem *Flüssig-Mosaik-Modell* (Abb. 2-1), das von SINGER und NICOLSON entwickelt wurde [Singer 1972], als viskose, zweidimensional orientierte Lösungen zu verstehen, die eine selektive Permeabilitätsbarriere senkrecht zur Membranfläche darstellen, wobei die laterale Diffusion schnell erfolgt. Während die Wasserpermeabilität recht groß ist, können Ionen die Membran nur durch sogenannte Ionenpumpen oder –kanäle passieren. Diese Proteine und die Mechanismen, die zu einem Öffnen bzw. Schließen dieser Tore führen, spielen damit eine entscheidende Rolle sowohl beim Wahrnehmen von Sinnesreizen, als auch zur Reiz-weiterleitung und Kommunikation zwischen Zellen.

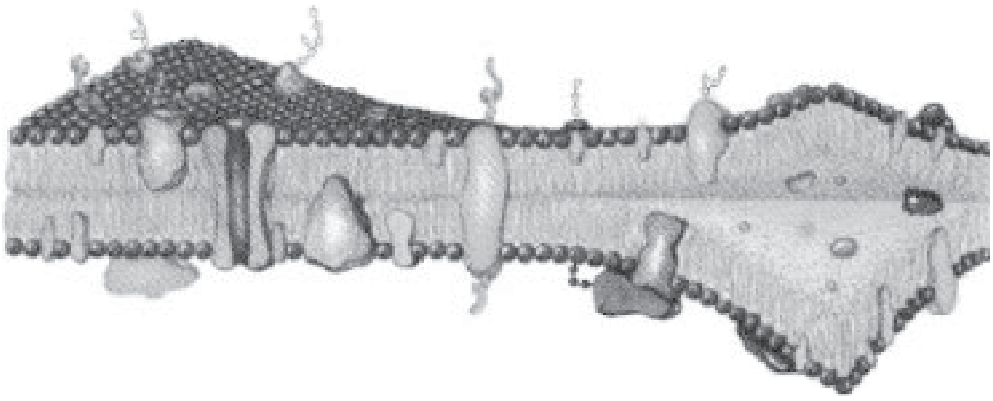


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung einer biologischen Membran mit integralen und peripheren Proteinen nach dem *Flüssig-Mosaik-Modell*.

Die Lipide bilden die Matrix der Membran, der die Proteine ihre spezifische biologische Funktion geben. Es ist aber erwiesen, daß auch die Proteine die Struktur der Membran entscheidend beeinflussen können. Proteine, die in die Membran eingebettet sind und sie ganz oder teilweise durchdringen, bezeichnet man als integrale Proteine, während andere, die nur an die Membranoberfläche gebunden sind, periphere Proteine genannt werden.

2.1 Lipide

Unter dem Begriff Lipide[1] werden Naturstoffe zusammengefaßt, die wasserunlöslich sind oder sich in wenig polaren Lösungsmitteln lösen. Zu den Membranlipiden zählen in erster Linie die Glycerinphosphatide, meist als Phospholipide bezeichnet, aber auch andere Phosphatide, Glycolipide und Cholesterin. In Abb. 2.1-1 sind die Strukturformeln einiger Membranlipide dargestellt – sie alle zeichnen sich durch ihre amphiphilen Eigenschaften aus, da sie räumlich voneinander getrennt polare (hydrophile, in der Abbildung links zu finden) und unpolare (hydrophobe, in der Abbildung rechts) Molekülbereiche aufweisen.

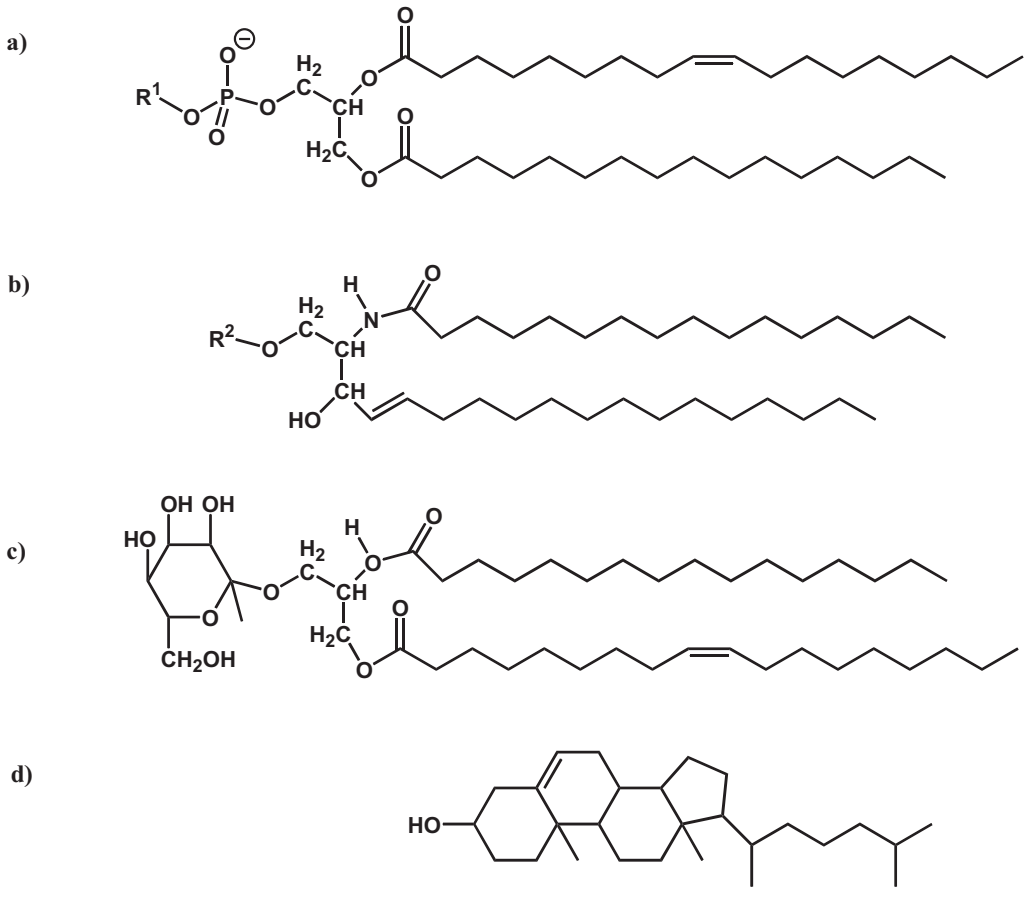


Abbildung 2.1-1: Strukturformeln einiger Membranlipide: a) Phospholipide (R^1 = H, Ethanolamin, Cholin, Serin, Inosit), b) Sphingolipide (R^2 = H, Phosphocholin, Glucose oder andere Saccharide), c) ein Glycolipid und d) Cholesterin.

[1] von griech. lipos: Fett

Die Struktur von Aggregaten derartiger Verbindungen in wäßrigen Lösungen wird durch den sogenannten hydrophoben Effekt bestimmt. Die Ausbildung einer geordneten Wasserstruktur, z.B. einer Clathrat-Struktur, um ein hydrophobes oder amphiphiles Teilchen dient zur Ausbildung einer maximalen Zahl von Wasserstoffbrückenbindungen; sie ist aber ein entropisch ungünstiger Vorgang. Daher werden sich weitere Teilchen bevorzugt an das erste anlagern und sich mit einem gemeinsamen Wasserkäfig umgeben. Dies geschieht mit der Bildung molekularer Aggregate bei Lipiden ab der *kritischen Mizellkonzentration cmc* (10^{-10} mol L^{-1} für DPPC).
Die gebildeten Lipid-Mesophasen zeigen eine ausgeprägte Strukturvielfalt (Abb. 2.1-2). Ein einfaches Modell zur Vorhersage ihrer Struktur auf der Basis geometrischer Faktoren, bedient sich des kritischen Packungsparameters *CPP*, der definiert ist als:

$$CPP = \frac{V}{A \cdot l} \tag{2.1-1}$$

Diese dimensionslose Größe gibt das Verhältnis des hydrophoben Kettenvolumens V zur Querschnittsfläche A der Kopfgruppe, normiert auf die Kettenlänge l, an. Kegelförmige Moleküle, die ein kleines Kettenvolumen bei großem Flächenbedarf der Kopfgruppe haben ($CPP < ⅓$), wie z.B. Natrium-Dodecylsulfat (SDS), bilden bevorzugt Kugelmizellen, während zylinderförmige Moleküle, die einen Packungsparameter zwischen ½ und 1 aufweisen, wie z.B. die Phosphatidylcholine, Lipid-Doppelschichten formen. Ungesättigte Phosphatidylethanolamine mit großem Raumbedarf der Acylketten ($CPP > 1$) hingegen werden sich zu inversen Mizellen zusammenlagern.

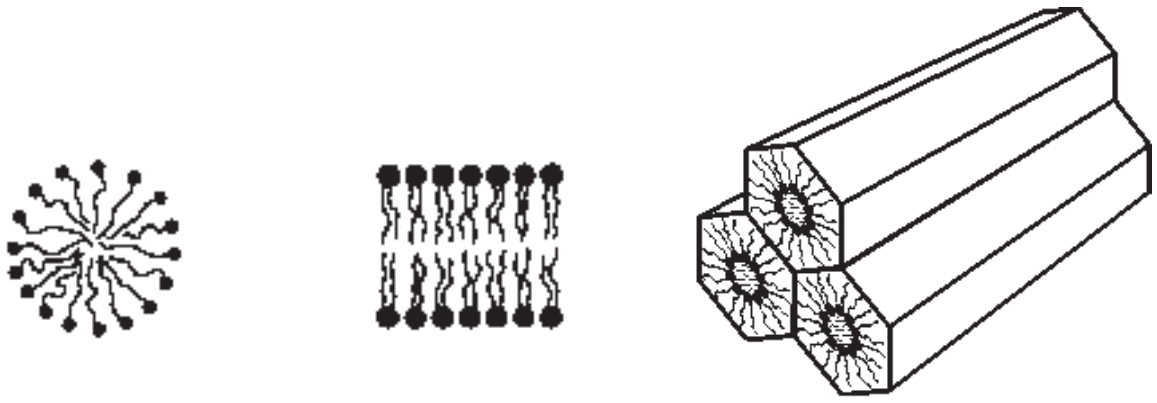


Abbildung 2.1-2: Schematische Darstellung einiger Lipid-Mesophasen (Kugelmizelle, lamellare Doppelschicht und invertiert hexagonale Phase).

Neben der Molekülgeometrie ist hier jedoch das Wechselspiel attraktiver und repulsiver lateraler Wechselwirkungskräfte von entscheidender Bedeutung. Durch repulsive sterische Effekte zwischen den Kopfgruppen benachbarter Moleküle (z.B. durch höhere Hydratationsgrade) oder der Kohlenwasserstoffketten (aufgrund ihrer Rotation) können lamellare Phasen eine Tendenz zur Krümmung der Monoschichten aufweisen. In Lipid-Doppelschichten ist dies jedoch nicht möglich, da die entgegengesetzte Krümmung der gegenüberliegenden Monoschichten zur Bildung eines freien Volumens führen würde. Diese Krümmungsfrustration der Doppelschicht kann schließlich zur Bildung hexagonaler Phasen (meist der invertiert hexagonalen H_{II}-Phase) führen. In diesen müssen die Fettsäureketten jedoch gestreckt sein, um das freie Volumen auszufüllen. Einen Kompromiß zwischen Krümmungs- und Packungsfrustration stellt die Ausbildung kubischer lamellarer Lipid-Phasen dar, wie sie z.B. bei Monoacylglycerolen beobachtet werden.

Die lamellaren Lipid-Phasen sollen im Folgenden etwas detaillierter beschrieben werden, da sie von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten gesättigten Phospholipiden im Wasserüberschuß ausschließlich gebildet werden. Die Phospholipide wurden als Modellsysteme gewählt, weil sie in allen biologischen Membranen in großer Menge vorkommen [Stryer 1996]. Die gebildeten Lipid-Doppelschichten schließen sich ab einem Wassergehalt von etwa 30 Gew.% spontan zu Hohlkugeln – sogenannten Vesikeln – zusammen (Abb. 2.1-3), in denen ein wassergefüllter Hohlraum von einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten umgeben ist. In den multilamellaren Vesikeln sind die einzelnen Lipid-Doppelschichten (Dicke: 4-5 nm) wiederum durch eine etwa 1-2 nm dicke Wasserschicht voneinander getrennt. Die Bildung kleiner unilamellarer Vesikel wird zumeist erst nach Behandlung mit Ultraschall beobachtet.

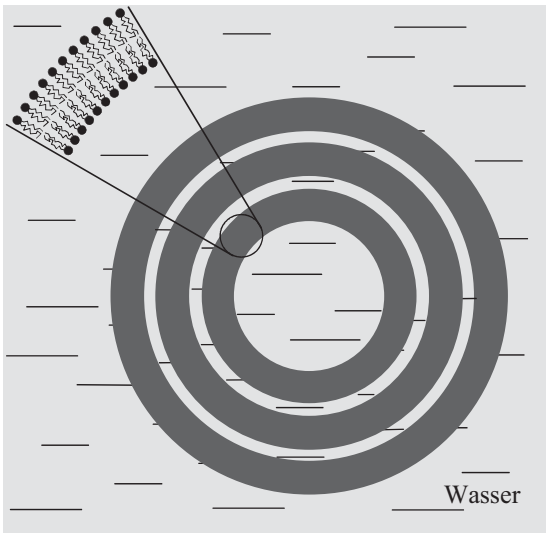


Abbildung 2.1-3: Querschnitt durch ein multilamellares Vesikel (Liposom).

Phospholipide zeigen einen ausgeprägten thermotropen und barotropen Polymorphismus, d.h. die Gestalt der von ihnen gebildeten lamellaren Doppelschichten variiert drastisch unter dem Einfluß von Druck- und Temperaturänderungen (Abb. 2.1-4).
Inkubiert man Phospholipid-Dispersionen längere Zeit bei tiefen Temperaturen, so bildet sich eine Sub-Gel-Phase (L_C) aus. Diese Phase ist durch eine starke Einschränkung der Rotation der Kohlenwasserstoffketten, die in einem orthorhombischen Gitter kristallin angeordnet sind, gekennzeichnet. Bei Erwärmung erfolgt der Übergang in verschiedene Gel-Phasen, wobei die Ketten in der zunächst gebildeten $L_{\beta'}$-Phase um etwa 30° zur Membrannormale geneigt sind und eine verzerrte, quasi-hexagonale Packung aufweisen. Die als Vorübergang bezeichnete Umwandlung in die $P_{\beta'}$-Phase ist gekennzeichnet durch die Ausbildung einer welligen Überstruktur der lamellaren Doppelschicht und eines regulären hexagonalen Gitters der Kohlenwasserstoffketten, die relativ zur Membrannormalen nur leicht geneigt angeordnet sind. Beide Gel-Phasen weisen eine gestreckte Anordnung der Ketten auf, d.h. sie liegen überwiegend in der *all-trans*-Konformation vor, was dazu führt, daß die Dicke der Lipid-Doppelschicht recht hoch ist.

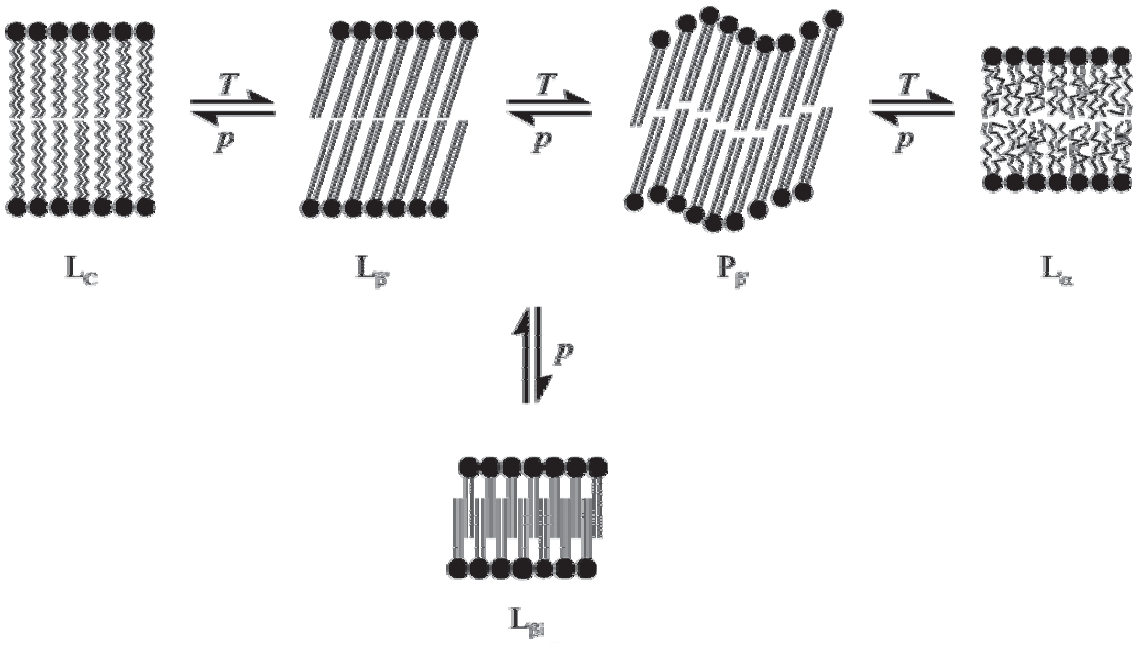


Abbildung 2.1-4: Schematische Darstellung einiger der thermotropen und barotropen lamellaren Phasen, die von Phospholipiden gebildet werden.