

Zusammenfassung

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einer hervorragenden Methode zur Beobachtung der lateralen Struktur von Lipiden in Membranen entwickelt. Mit Hilfe von GUV's in der Größenordnung von $\sim 30 \mu\text{m}$ lassen sich Phasenseparationen und Domänenbildung in Bereich von Mikrometern direkt visualisieren. Der Einfluss verschiedener Zusätze auf die Membran kann somit untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Gramicidin, Cholesterol und verschiedenen lipidierten Peptiden auf das Phasenverhalten der Modellbiomembran DMPC/DSPC untersucht. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Na^+ , K^+ -ATPase, insbesondere mit der Druckinaktivierung des Enzyms.

Das System DMPC/DSPC/Gramicidin

Durch den Einbau des Gramicidins in die Modellbiomembran DMPC/DSPC wird die Struktur der temperaturabhängigen Lipidphasen signifikant geändert. Im gel/fluid-Phasenkoexistenzgebiet werden in GUV's Domänen in der Größenordnung von Mikrometern beobachtet, die nach dem Einbau von GD vollständig verschwinden. Es kommt zu einer drastischen Abnahme der Konzentrationsfluktuationen nicht nur im Mikrometerbereich sondern auch im Nanometerbereich, wie durch SANS-Experimente gezeigt werden konnte. Die Lipidmatrix hat hier auch einen entscheidenden Einfluss auf die Konformation des eingebauten Peptids. Durch einen effektiven molekularen Sortiermechanismus kann ein großes „Hydrophobic Mismatch“ in der Lipidmischung DMPC/DSPC vermieden werden. Dies führt zu beträchtlichen Veränderungen in der Lipidstruktur und in der Konformation des Polypeptids.

Das System DMPC/DSPC/Cholesterol

Durch den Einbau von Cholesterol ist es möglich, den Ordnungsparameter der Lipide, die Kettenlänge und die Packungsdichte in den Lipidphasen zu ändern. Der Einbau von 20 mol% Cholesterol in die Modellbiomembran DMPC/DSPC bewirkt die Ausbildung einer fluiden geordneten L_O -Phase. Dies führt zur Reduzierung der großen Konzentrationsfluktuationen und damit zur Verringerung der gel/fluid-Phasenkoexistenz. Cholesterol baut sich bevorzugt in die DMPC-reichen Regionen der Membran ein. Ab einer Cholesterol-Konzentration $> 33 \text{ mol}\%$ ist ein Phasenübergang im Lipidsystem kaum noch detektierbar.

Das System DMPC/DSPC/lipidiertes Peptid bzw. Protein

Der Einbau unterschiedlich lipidierter Peptide in die Modellmembran DMPC/DSPC wurde mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die hier verwendeten Peptide mit den unterschiedlichen Ankersystemen bauen sich alle bevorzugt in die fluide DMPC-reiche Phase der Mischung ein, die Art der Lipidmodifizierung spielt in diesem Fall keine Rolle.

Das System DMPC/DSPC/Cholesterol/BL2

Wie schon erwähnt, führt der Einbau von Cholesterol in die DMPC/DSPC-Membran zur Ausbildung einer fluiden geordneten L_O -Phase. Diese Lipidphase hat eine große Bedeutung in der aktuellen Diskussion um die „lipid rafts“, denen eine wichtige Rolle bei der lokalen Aufkonzentrierung von Membranproteinen zugeschrieben wird. Der Einbau des Peptids BL2, palmitoyliert und farnesyliert, in das Lipidsystem DMPC/DSPC/20 mol% Cholesterol bewirkt eine Phasenseparation, bei der es aufgrund der hohen Affinität des Peptids zur Ausbildung einer DMPC-reichen fluiden Phase kommt. Bei tiefen Temperaturen, d.h. im Bereich der Gelphasen, ist eine effektive Sortierung nicht mehr möglich und es kommt zur Aggregation der Peptide und damit zur Dimerbildung der BODIPY-gelabelten Moleküle. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass Peptide mit dem hier vorliegenden Motiv der Lipidmodifizierung keine Assoziation mit fluiden geordneten oder gelartigen Domänen in phasenseparierten Lipidmembranen bevorzugen und es somit wahrscheinlich auch nicht zum Einbau in die „lipid rafts“ natürlicher Systeme kommen dürfte.

Die Na^+ , K^+ -ATPase

Das Enzym Na^+ , K^+ -ATPase ist der Schlüssel für die Gradienten von Na^+ und K^+ entlang biologischer Membranen von eukaryotischen Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Präparationen und Experimente sind die ersten wichtigen Schritte auf dem Weg zur Aufklärung des Mechanismus der Druckinaktivierung des Enzyms. Eine präparierte Plasmamembranfraktion mit dem angereicherten Enzym diente zum Aufbau eines Systems zur Messung der ATPase-Aktivität des Enzyms als Funktion des Drucks. Eine reversible Inaktivierung des Enzyms bis zu einem Druck von 2 kbar konnte ermittelt werden.