



Doctoral Thesis

**Kapazitätsminimalisierung
eine neue Methode zur Messung von Oberflächenpotentialen von
künstlichen Lipidmembranen und ihre Anwendung auf Lipid/
Peptid Wechselwirkungen**

Author(s):

Schoch, Peter

Publication Date:

1980

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000204837> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH 6699

KAPAZITÄTSMINIMALISIERUNG

EINE NEUE METHODE ZUR MESSUNG VON OBERFLÄCHENPOTENTIALEN VON
KÜNSTLICHEN LIPIDMEMBRANEN UND IHRE ANWENDUNG AUF
LIPID / PEPTID WECHSELWIRKUNGEN

Abhandlung
zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
PETER SCHOCH
dipl. Naturwissenschaftler ETH
geboren am 24. Mai 1949
von Fischingen TG, Zürich und Stäfa ZH

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. R. Schwyzer, Referent
Prof. Dr. P. Läger, Korreferent
Dr. D.F. Sargent, Korreferent
1980

ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Im methodischen Teil der vorliegenden Arbeit wird ein neues und einfaches Verfahren zur Bestimmung asymmetrischer Oberflächenpotentiale künstlicher Lipidbilayer beschrieben. Die Methode heisst Kapazitätsminimalisierung und beruht auf der spannungsabhängigen Kapazität kompressibler Membranen. Lipidmembranen zeigen minimale Kapazität im spannungslosen Zustand. Das Kapazitätsminimalisierungspotential (V_{Cmin}) symmetrischer Membranen beträgt deshalb Null. Für asymmetrische Membranen hingegen entspricht V_{Cmin} der Spannung, bei der das intrinsische elektrische Feld aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenpotentiale auf den beiden Membranseiten kompensiert wird: $V_{Cmin} = -(\psi_2 - \psi_1) = -\Delta\psi$. Die Messung von V_{Cmin} erlaubt deshalb, alle Vorgänge an der Membranoberfläche zu verfolgen, die zu einer asymmetrischen Änderung der Oberflächenpotentiale führen (Beispiele siehe unten). $\Delta\psi$ enthält im allgemeinen einen Dipol- und Ladungsanteil: $\Delta\psi = \Delta V_D + \Delta V_G$. Da nur ΔV_G ionenstärkeabhängig ist, kann experimentell zwischen den beiden unterschieden werden.

Die Apparatur für die Bestimmung von V_{Cmin} und die Grundlagen der Kapazitätsmessung werden ausführlich beschrieben. Die Kapazität wurde gemessen, indem die 90° Komponente eines angelegten Wechselstromes von 1000 Hz gleichgerichtet und mit der Spannungsamplitude normiert wurde. Eine überlagerte, dreiecksförmige Spannungswelle führt zu einem hystereseeähnlichen, schmetterlingsförmigen Zeitverlauf der Membrankapazität. Das Zentrum dieser Figur liegt bei der Spannung minimaler Kapazität $V = V_{Cmin}$. Für die meisten Kapazitätsminimalisierungsstudien wurde V_{Cmin} jedoch automatisch durch einen Prozessrechner bestimmt, der direkt die Spannung sucht, bei der das Kapazitätssignal minimal wird.

Als Test für die V_{Cmin} -Methode wurde die Bilayer-Asymmetrie auch aus der Strom-Spannungscharakteristik einseitig abgeschirmter PS-Membranen in Gegenwart von Nonactin bestimmt. Der Analyse der Gleichrichtung lag die Nernst-Planck Gleichung zugrunde, die für eine asymmetrische, trapezoide Energiebarriere und Gleichgewicht der Oberflächenreaktionen integriert wurde. Die erhaltene Strom-Spannungsgleichung (Gl. 76) beschreibt die experimentellen $I_m(V)$ -Kurven schwach kompressibler Membranen sehr genau. Bei stark lösungsmittelhaltigen Membranen nimmt jedoch der Strom bei grossen Spannungen ($V > 150$ mV) schneller zu als erwartet. Als Grund dieser Diskrepanz wird die Spannungsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten und der Geometrie der Energiebarriere angesehen. Es wurde deshalb eine semiempirische Korrekturfunktion $E(V)$ (Gl. 90) gesucht, die diese Nichtidealitäten auffängt und die gesamte Strom-Spannungscharakteristik auf spannungsinvariante Parameter normiert. Bei Berücksichtigung dieser Korrekturfunktion liefern beide Methoden, V_{Cmin} und $I(V)$ -Analyse, konsistente Resultate für die Differenz der Oberflächenpotentiale asymmetrischer Membranen.

Der spannungsinduzierten Relaxationen der Membrankapazität wurden mit Simulationsstudien analysiert, wobei mindestens 3 Komponenten aufgelöst werden konnten. Für lösungsmittelhaltige Bilayer liegen die Amplituden zwischen 1 und 5 V^{-2} und die Zeitkonstanten zwischen 5 msec und 5 sec.

Als illustrierende Anwendungen der V_{Cmin} -Methode wurden i) die Differenzen der Oberflächenpotentiale asymmetrisch zusammengesetzter Lipidmembranen bestimmt, ii) die spezifische Wirkung von Li^+ auf das Oberflächenpotential von PC- und GMO-Membranen nachgewiesen, iii) die Titrationskurve einer PE-Membran aufgenommen und iv) die Oberflächenaktivität von Taurocholol gegenüber PC-Membranen gemessen.

Die Kapazitätsminimalisierungstechnik wurde des weiteren benutzt um die Adsorption von 2 Peptiden, Melittin und ACTH, mit Lezithinmembranen zu studieren. Die Messung der resultierenden Oberflächenpotentiale erlaubt es, ausführliche Bindungsstudien anzustellen.

Melittin⁶⁺ (Bienengift, ein Hexacosapeptid) bindet stark an die Lipid/Wasser Grenzfläche, ohne jedoch die trans-Seite der Membran zu beeinflussen. Seine Lokalisierung scheint deshalb auf die vordere Membranseite beschränkt zu sein. Die Analyse der Bindungskurven zeigt, dass die Gouy-Chapman Theorie das für die Adsorption wirksame Oberflächenladungspotential nicht adäquat zu beschreiben vermag. Das wird deutlich aus dem Esin-Markov Koeffizienten (Steigung der Bindungskurve), dessen theoretischer Wert für mehrfach geladene Adsorbentien berechnet wurde (Gl.96). Sein experimenteller Wert ist um das Mehrfache grösser als man bei homogener Ladungsverteilung erwarten würde. Die Daten legen deshalb die Existenz diskreter Ladungsinteraktionen auf der Membranoberfläche nahe. Aus der diskreten Modellierung hexagonal angeordneter Oberflächenladungen konnte ein 'discreteness factor' $\gamma = V_{\text{eff}}/V_G$ hergeleitet werden (Gl.106), der es erlaubte, die Stern Adsorptionsgleichung für diskrete Ladungen zu modifizieren (Gl.108) und mit den Daten in Einklang zu bringen. Die thermodynamische Analyse der Melittin/Lezithin Assoziation ergab 2 verschiedene Bindungsenergien für 10 mM und 100 mM Ionenstärke, nämlich -7.85 und -8.26 kcal/Mol. Die Bindung sättigt bei ca. 650 Å²/Molekül. Die Debye-Hückel Länge für membranassoziierte Ladungen scheint um 1/3 kleiner zu sein als in freier Lösung.

Die Bindungseigenschaften des Polypeptidhormons ACTH⁶⁺₁₋₂₄ gegenüber Lezithinmembranen sind bedeutend komplexer als jene von Melittin. Bei der Bindung an die vordere Seite der Membran wird auch das Oberflächenpotential auf der Rückseite ionenstärkeabhängig ('trans-Effekt'). Die experimentelle Bindungskurve und der trans-Effekt lassen sich erklären mit einem 2-stufigen Gleichgewicht zwischen freiem, adsorbiertem und inkorporiertem Hormon, wobei die Inkorporation von einer Translokation von 1 (oder weniger wahrscheinlich 2) Ladungen auf die andere Seite der Membran begleitet ist. Es wird angenommen, dass der N-Terminus die penetrierende Sequenz darstellt. Für die thermodynamische Analyse wurde wiederum die Melittin erprobte, modifizierte Stern-Gleichung benützt. Die Bindungsenergie für beide Spezies 'ad' und 'in' zusammen beträgt etwa - 6 kcal/Mol. Allerdings ist das Verhältnis 'in'/'ad' sehr verschieden, je nachdem, ob 1 oder 2 Ladungen transloziert werden. Im ersten Fall beträgt es 20, im zweiten etwa 1. Die Bindung sättigt schon früh bei circa 4000 Å² -7500 Å² pro Molekül (je nach Modell). Die unerwartet starke

Lipidassoziation von ACTH könnte bedeutende Konsequenzen für den Mechanismus der Rezeptorauslösung haben. Sie ist zB. stark genug, dass angenommen werden muss, dass die Interaktion mit dem Rezeptor in der Lipidphase erfolgt. Die Lipidkomponente der Zellmembran würde dann als 2-dimensionale Antenne für den Hormoneinfang fungieren. Weiter wird postuliert, dass die inkorporierte Spezies die aktive Form des Hormons darstellt. Damit würde die 'message'-Sequenz (Pos.5-9) im zentralen Teil der Membran und die Potentiatorssequenz (Pos.1-4) nahe der inneren Membranoberfläche an den Diskriminator binden. Die pharmakologischen Eigenschaften des N-terminalen Tetrapeptides erhalten dadurch eine einfache Erklärung. Zudem besteht die Möglichkeit einer direkten Interaktion von ACTH über seinen N-Terminus mit Effektoren, die auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert sind.