

Spezifische Wechselwirkung von Proteinen mit funktionellen Lipidmonoschichten – Wege zur Simulation von Biomembranprozessen

Von Michael Ahlers, Wolfgang Müller, Anke Reichert, Helmut Ringsdorf* und Joachim Venzmer

Das Zusammenspiel von molekularer Selbstorganisation und molekularer Erkennung führt zum Aufbau von funktionellen supramolekularen Systemen, in denen Ordnung und Beweglichkeit kombiniert sind und deren Funktion auf ihrer Organisation beruht. Diese faszinierenden Phänomene – und die lebende Zelle ist die bislang perfekteste Ausführung – sind nur im Zusammenwirken verschiedener Bereiche unserer Wissenschaften zu verstehen. Mit synthetischen supramolekularen Systemen lassen sich natürliche Biomembranprozesse wie die spezifische Erkennung von membrangebundenen Liganden durch Rezeptorproteine simulieren. So führt die spezifische Wechselwirkung von Vitamin H (Biotin) mit dem tetrafunktionellen Protein Streptavidin in der Monoschicht zur zweidimensionalen Kristallisation des Proteins, wobei noch zwei seiner Biotinbindungsstellen frei zugänglich bleiben. Diese sollten durch Andocken von biotinylierten Molekülen den Aufbau proteinhaltiger funktioneller Multischichten ermöglichen. Ein weiteres Beispiel ist die mit dem Erkennungsprozeß gekoppelte Funktion von Enzymen. Bei der Wechselwirkung von Phospholipase A₂ mit Lecithinmonoschichten kommt es nach der spezifischen Erkennung zwischen Enzym und Substrat zur Lipidspaltung, gefolgt von einer Aggregation des Enzyms zu Domänen. Fluoreszenzmikroskopisch konnten diese Prozesse direkt verfolgt werden: ein Enzym wurde in flagranti erwischt.

Der Witz ist der Finder und der Verstand der Beobachter
Georg Christoph Lichtenberg^[1a]

1. Schritte über Grenzen?

1.1. Es gibt viele Wege, ein wissenschaftliches Problem zu lösen

Schritte über Grenzen? Ist es Hochmut, eine solche Überschrift für die Einleitung einer Darstellung wissenschaftlicher Ergebnisse zu wählen? Es wäre lächerlich, wenn das Fragezeichen nicht wäre. Und dennoch beinhaltet diese Frage eines der essentiellen Probleme der modernen Wissenschaftsentwicklung, nämlich die fast beängstigende Einseitigkeit unseres naturwissenschaftlichen Denkens. Die Sachzwänge sind groß geworden und eine Spezialisierung hat schon lange stattgefunden. Gerade deshalb sind Schritte über Grenzen notwendig. Kann man sie lehren, kann man sie lernen?

Es gibt mehrere Theorien darüber, wie man zu wissenschaftlichen Erkenntnissen kommt^[2]. Die diskursive Methode, d. h. die Erkenntnis durch Reflexion und kausale Schlüsse, hat das intuitive Erfassen von Problemlösungen in den Hintergrund gedrängt. Aufgrund des Mangels an absoluter Sicherheit ist die Intuition abgewertet worden und wird im Rahmen unseres Bildungswesens schlecht behandelt^[3]. Das läßt sich teilweise historisch aus dem beherrschenden Ziel der Erkenntnistheorie ableiten: Sicherung der Erkenntnis. Descartes und Kant machen die Sicherheit geradezu zum Kriterium der Wahrheit: Nur das wirklich sichere Wissen kann wahr sein – da bleibt nicht viel Raum für die Intuition.

Wie viele Errungenschaften der Naturwissenschaft und Technik bezeugen, hat die diskursive Methode immer größere Erfolge gebracht. Dies hat zu einer allgemeinen Verwissenschaftlichung unseres Denkens geführt und zu einer grundsätzlichen Abwertung des weniger Sicherem und speziell auch der Intuition in der Wissenschaft. Die Positivisten sprechen dem nicht sicheren Wissen den Charakter der Erkenntnis überhaupt ab und lassen es allenfalls als „Freizeitbeschäftigung“ gelten. Das sichere Wissen ist jedoch nachweislich für Durchbrüche in den Wissenschaften bei weitem nicht ausreichend – von der Bewältigung des Daseins auf diesem Wege^[4] gar nicht zu reden.

Georg Christoph Lichtenberg, der Göttinger Physiker und Philosoph, hat schon vor 200 (!) Jahren die Frage nach Schritten über Grenzen gestellt und pädagogisch beantwortet^[1b]: „Es verdient einmal recht ernstlich untersucht zu werden, warum die meisten Erfindungen durch Zufall müssen gemacht werden. Die Hauptursache ist wohl die, daß die Menschen alles so ansehen, wie ihre Lehrer und die Umgebung es ansieht. Deswegen müßte es nützlich sein, einmal eine Anweisung zu geben, wie man nach gewissen Gesetzen von der Regel abweichen könnte.“ Die Entwicklung der Makromolekularen Chemie ist dafür ein gutes Beispiel. Sie ist aus Schritten über Grenzen, aus intuitiven Konzepten gegen Lehrmeinungen hervorgegangen. Es ist historisch interessant zu sehen, wie Hermann Staudinger auf dem Höhepunkt seiner Kreativität in der Organischen Chemie dieses „klassische“ Gebiet verlassen hat, um die Makromolekulare Chemie zu wagen^[5]. Sicher war die Zeit reif dafür – dennoch hat er sie gegen etablierte Konzepte durchsetzen müssen. Außerdem ein interessantes Beispiel für das alte Wort von Leonardo da Vinci: „Wer sich im Streit der Meinungen auf Autoritäten beruft, bewegt sein Gedächtnis und nicht seinen Verstand.“

[*] Prof. Dr. H. Ringsdorf, Dr. M. Ahlers,
Dipl.-Chem. W. Müller, Dipl.-Chem. A. Reichert,
Dipl.-Chem. J. Venzmer
Institut für Organische Chemie der Universität
J.-J.-Becherweg 18–20, D-6500 Mainz 1

1.2. Funktionalisierte supramolekulare Systeme

Ein aktuelles Forschungsgebiet der modernen Organischen Chemie, das in vielen Laboratorien interdisziplinär bearbeitet wird, sind supramolekulare Systeme. Nachdem die klassische Organische Chemie höchst komplizierte Moleküle aufbauen kann und die moderne Biologie und Biochemie detaillierte Einblicke in natürliche Prozesse gestattet, steigt das Interesse der Organiker, wie von *J. M. Lehn* formuliert, an einer Organischen Chemie jenseits der kovalenten Bindung^[16].

In der Natur wird die Funktion von Systemen durch das Zusammenspiel mehrerer Funktionseinheiten erreicht. Die kleinste Einheit, die das perfekt demonstriert, ist die Zelle^[17]. Es ist das Zusammenspiel von molekularer Selbstorganisation und molekularer Erkennung ihrer einzelnen Bausteine (Lipide, Proteine, Nucleinsäuren...), das zum Aufbau dieses natürlichen supramolekularen Systems führt. Es kombiniert Ordnung und Beweglichkeit, und seine Funktion beruht auf seiner Organisation. Dieses faszinierende Phänomen ist nur zu verstehen, wenn die unterschiedlichsten Bereiche unserer modernen Wissenschaften zusammenwirken. Die Organische und die Makromolekulare Chemie sind hier ganz speziell mit neuen Synthese- und Strukturproblemen konfrontiert. Eine der interessantesten Fragen ist hierbei, ob man nach dem Vorbild natürlicher supramolekularer Systeme neue Materialien entwickeln kann, deren Funktion ebenfalls durch ihre Organisation bedingt ist. Ohne Schritte über die Grenzen des klassischen Denkens der einzelnen Disziplinen wird dies nicht möglich sein.

Wo gibt es Übergänge zwischen getrennten oder scheinbar getrennten Bereichen der Naturwissenschaften? Als ein Beispiel seien die gemeinsamen Perspektiven der Bio- und Materialwissenschaften auf der Basis funktioneller supramolekularer Systeme schematisch dargestellt (Abb. 1).

Die Zelle mit ihren Erkennungsstrukturen an der Oberfläche wird durch die Lipidmembran strukturiert und überwiegend durch Proteine funktionalisiert. Die Stabilität ist hierbei sowohl durch membrandurchspannende Proteine oder Lipide als auch durch Polymernetzwerke wie das Cytoskelett bedingt. Von diesem perfekten natürlichen Vorbild führt ein direkter Weg über die Liposomen^[18] mit ihren Doppelschich-

ten zu den Micellen^[9] mit ihren vielfältigen lyotropen Strukturen^[10]. Ihre Bedeutung im synthetischen und natürlichen Bereich ist lange bekannt und hat in der Kolloidik in den zwanziger Jahren die Physikalische Chemie bestimmt. Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Mono- und Multischichten (Langmuir- und Langmuir-Blodgett-Systeme)^[11] haben zu ultradünnen Filmen geführt, in denen ebenfalls Ordnung und Beweglichkeit kombiniert werden können. Den Materialwissenschaften noch näher stehen die Flüssigkristalle^[12], die heute schon im niedrigen wie im makromolekularen Bereich in der Technik von Interesse sind. Ihre Ordnung beruht auf der Formanisotropie, wobei es Stäbchen^[13], Scheiben^[14] oder Bretter^[15] sein können, die ihre Selbstorganisation bedingen. Zu oft wird allerdings übersehen, daß Flüssigkristalle auch in der Natur von jeher essentiell waren. Zwar nicht thermotrop, sondern lytrop sind viele der natürlichen Polymere und die Zellmembranen selbst als Flüssigkristallsysteme zu sehen^[16].

Neben der molekularen Selbstorganisation ist eine weitere entscheidende Eigenschaft natürlicher supramolekularer Systeme ihre Fähigkeit zur molekularen Erkennung, die zu spezifischen Wechselwirkungen führt. Viele Vorgänge an der Zellmembran beginnen mit Erkennungsprozessen und führen dann zu Enzymreaktionen, z. B. zur Spaltung von Lipiden durch die verschiedenen Phospholipasen^[17]. Das Problem der molekularen Erkennung ist, wie die Vielfalt der Arbeiten über Wirt-Gast-Systeme^[18] und ihre Bedeutung für synthetische supramolekulare Systeme zeigen, heute längst zu einem wichtigen Bestandteil der Organischen Chemie geworden. Hierher gehört auch die Variation von Oberflächen und die Strukturierung ultradünner Schichten mit Schwerpunkten in der Katalysatorforschung, der Sensor-technik und der Tribologie. Wie in Abbildung 1 angedeutet, sind auch Flüssigkristalle funktionalisierbar. Die prinzipielle Funktionsweise von derartigen „adressierbaren“ Flüssigkristallen beruht wiederum auf ihrer Organisation, und die „molekulare Erkennung“ wird durch reaktive, z. B. photosensible Gruppen vermittelt^[19]. Im Bereich der nicht-linearen Optik^[20] und Speichertechnik^[21] werden solche Konzepte heute bereits intensiv bearbeitet.

Hier soll kein Überblick über den Bereich funktioneller supramolekularer Systeme gegeben werden. Es werden lediglich drei Beispiele herausgegriffen, die das Zusammenspiel von molekularer Selbstorganisation und molekularer Erkennung zeigen. Sie kombinieren die Eigenschaften einer Monoschicht, die eine halbe Zellmembran repräsentieren kann, mit der Spezifität der molekularen Erkennung von Proteinen und Enzymen.

1.3. Versuche zur Simulation von Erkennungsprozessen und Proteinfunktionen an Modellmembranen

Die Selbstorganisation von Lipiden zur Plasmamembran^[7] war ein entscheidender Schritt in der Entstehung der frühesten Lebensformen – ohne die schützende Hülle der Lipidmembran ist zelluläres Leben nicht möglich. Die Membran ist jedoch mehr als nur eine passive Barriere zur Abgrenzung des Cytosols von der Umwelt. Sie ist vielmehr ein hochselektiver, aktiver Filter. Die Zelloberfläche spielt darüber hinaus eine wesentliche Rolle in der interzellulären Kommunikation (z. B. bei Immunreaktionen). Während die

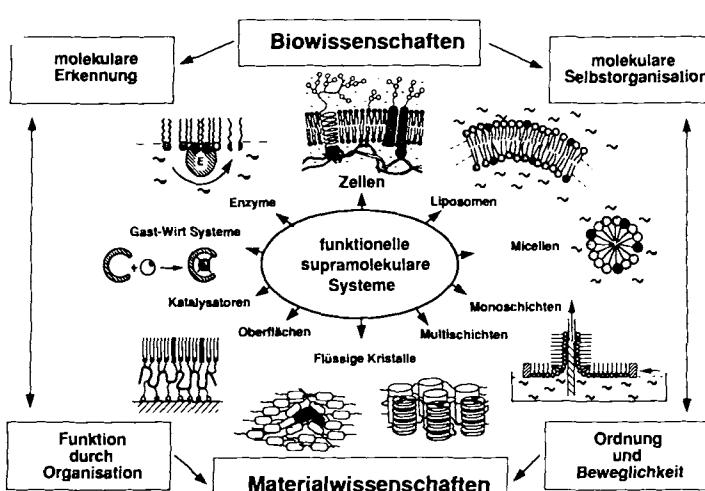


Abb. 1. Funktionelle supramolekulare Systeme – Bindeglied zwischen Biowissenschaften und Materialwissenschaften.

Lipiddoppelschicht die Grundstruktur biologischer Membranen bestimmt, sind membranverankerte Proteine als spezifische Rezeptoren, Enzyme oder Transportsysteme für die meisten Membranfunktionen verantwortlich. Die Zellmembran weist jedoch eine solch komplexe Struktur auf, daß es schwierig ist, einzelne Prozesse im biologischen System gezielt zu studieren. Daher ist es von Vorteil, zur Untersuchung von Biomembranprozessen Modellmembranen zu wählen, die auf wenige veränderliche Faktoren beschränkt werden können. Die Membranprozesse, deren Simulation in Monoschichten in diesem Beitrag diskutiert werden soll, sind in Abbildung 2 dargestellt.

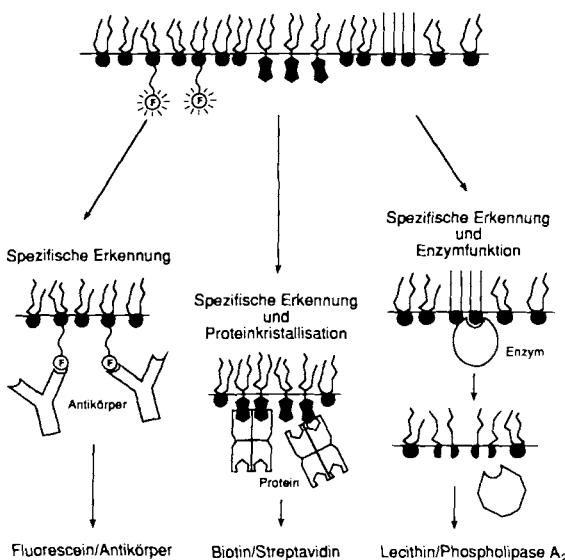


Abb. 2. Beispiele zur Simulation von spezifischen Erkennungsreaktionen an Modellmembranen: Erkennung (Fluorescein/Anti-Fluorescein-Antikörper), Erkennung und Proteinkristallisation (Biotin/Streptavidin), Erkennung und Enzymfunktion (Lecithin/Phospholipase A₂).

Der erste wichtige Schritt bei vielen Oberflächenreaktionen ist die spezifische Erkennung zwischen einem membranständigen Liganden und einem Rezeptorprotein (z. B. Antikörper). Eine solche Wechselwirkung soll am Beispiel von Fluoresceinlipiden und dem Anti-Fluorescein-Antikörper diskutiert werden (Abschnitt 3). Als Konsequenz der spezifischen Erkennung kann es zu Folgereaktionen an der Membran kommen. Ein Beispiel dafür ist die in Abschnitt 4 beschriebene 2D-Kristallisation von Streptavidin nach der Bindung an Biotinlipid-Monoschichten. Dieser Vorgang ist auch hinsichtlich einer potentiellen Anwendung in der Biosensorik von Interesse. Ist das verwendete Protein ein Enzym, so können nach der spezifischen Erkennung die membrangebundenen Proteine enzymatisch wirksam werden. Dies soll am Beispiel der hydrolytischen Wirkung von Phospholipase A₂ an Phospholipid-Monoschichten gezeigt werden (Abschnitt 5).

Bevor die oben angesprochenen Membranprozesse im Detail erläutert werden, sollen im nächsten Abschnitt Modellmembransysteme und speziell die verwendeten Charakterisierungsmethoden für Monoschichten kurz dargestellt werden.

2. Lipidmonoschichten als einfache Modelle für Biomembranen

2.1. Modellmembranen

Einzelne Membranvorgänge werden bevorzugt an den in Abbildung 3 dargestellten vier Modellsystemen untersucht. Diese Modellmembranen sind wie ihr natürliches Vorbild – die Zelle – aus Lipiden aufgebaut, die sich als wasserunlösliche amphiphile Moleküle im Kontakt mit Wasser spontan selbstorganisieren. Die Triebkraft für diese Selbstorganisation ist der hydrophobe Effekt^[22]. Je nach der verwendeten Präparationstechnik bilden sich verschiedene supramolekulare Strukturen, die man als Modellmembran verwenden kann.

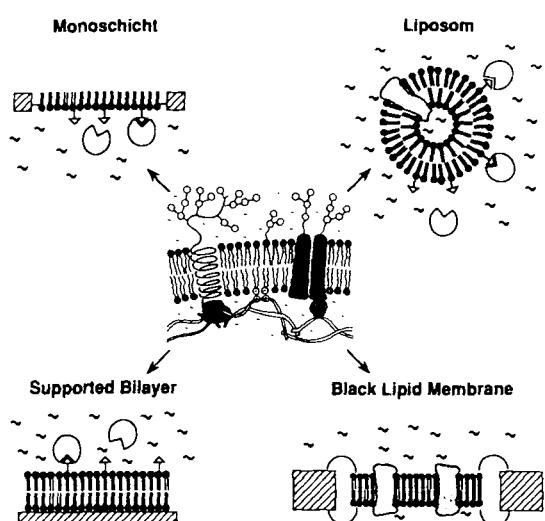


Abb. 3. Einfache Modelle für biologische Membranen: Übersicht über Modellmembranen zum Studium von Oberflächenerkennungsreaktionen, Proteinrekonstitution und Proteinfunktionen.

Bei *Liposomen* (Vesikeln)^[8] handelt es sich um sphärisch geschlossene Lipiddoppelschichten, die in Analogie zur Zellmembran ein wäßriges Kompartiment umschließen. Sie werden unter anderem zur Rekonstitution vom Membranproteinen sowie zum Studium von Oberflächenerkennungsreaktionen verwendet.

Die *Black Lipid Membranes* (BLMs)^[23] sind planare Lipiddoppelschichten, die – ein Loch in einer Trennwand überspannend – zwei wäßrige Kompartimente voneinander trennen. So kann z. B. der Transport von Ionen durch Lipidmembranen – passiv oder aktiv durch eingebaute Proteine – anhand von Leitfähigkeitsmessungen studiert werden.

Präpariert man Lipiddoppelschichten auf einem festen Substrat (*Supported Bilayer*)^[24], erhält man Membranen, die gegenüber einer BLM wesentlich stabiler und an der freien, dem Substrat abgewandten Membranseite einfach zu manipulieren sind. Sie eignen sich damit besonders zum Studium von Oberflächenerkennungsreaktionen.

Monoschichten^[25] entstehen beim Spreiten eines Lipids auf einer Wasseroberfläche und entsprechen formal der Hälfte der Lipiddoppelschicht einer Zellmembran. Dabei

sind die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide dem Wasser und die hydrophoben Alkylketten der Luft zugewandt. Zur Untersuchung von Lipidmonoschichten und ihrer Wechselwirkung mit im Wasser gelösten Substanzen (z. B. Proteinen) gibt es eine Reihe von Methoden. Im folgenden werden die Charakterisierung durch Druck/Flächen-Diagramme und die Fluoreszenzmikroskopie an Monoschichten diskutiert, da sie in diesem Beitrag verwendet werden.

2.2. Druck/Flächen-Diagramm von Lipidmonoschichten^[25a]

Spreitet man die Lösung eines Lipids auf der Wasseroberfläche einer Langmuir-Filmwaage, so bildet sich durch die Tendenz der Moleküle zur Selbstorganisation spontan eine zweidimensionale Lipidphase aus. Diese Monoschicht kann je nach der Lipidkonzentration (Moleküle/Fläche) gas-, flüssig- oder festanalog sein. Wird die dem Lipid zur Verfügung stehende Wasseroberfläche mit einer beweglichen Barriere kontinuierlich verringert, so kann ein zweidimensionales Phasendiagramm bei konstanter Temperatur (Oberflächen-Druck/Flächen-Diagramm) erstellt werden. Der Packungszustand der Moleküle in einer Monoschicht in Abhängigkeit vom Oberflächendruck ist schematisch in Abbildung 4 wiedergegeben.

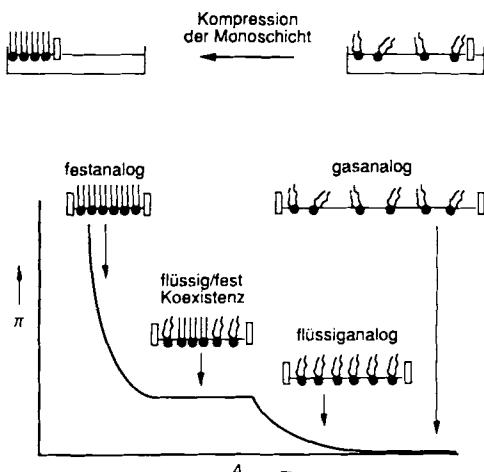


Abb. 4. Druck/Flächen-Diagramm einer Lipidmonoschicht: Schematische Darstellung des Kompressionsverhaltens und der Packung in der gas-, flüssig- und festanologen Phase. π = Oberflächendruck, A = Fläche pro Molekül.

In der gasanalogen Phase sind die Lipidmoleküle weitestgehend ungeordnet. Bei einer Verringerung der Oberfläche gehen die Lipide in die flüssiganalogen Phase über, wobei sich die Nahordnung zwischen den Amphiphilen in einem Anstieg des Oberflächendrucks bemerkbar macht. Wird die Monoschicht weiter komprimiert, gelangt man in den fest/flüssig-Koexistenzbereich. In diesem Phasenübergangsreich beginnen die Alkylketten der Lipide zweidimensional zu kristallisieren, d. h. es bilden sich festanaloge Domänen in einer flüssiganalogen Matrix. Weitere Kompression führt zur Kristallisation der gesamten Lipidmonoschicht, die sich dann nur noch durch eine geringe Kompressibilität auszeichnet (steiler Anstieg der Isothermen). Der Verlauf der Isothermen ist stark von der Struktur der Lipide abhängig^[25, 27].

Druck/Flächen-Diagramme ermöglichen sowohl Aussagen über deren Orientierung und Beweglichkeit als auch über Wechselwirkungen mit in der Subphase gelösten Substanzen.

2.3. Fluoreszenzmikroskopie an Lipidmonoschichten

Die Kombination einer Langmuir-Filmwaage mit einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Abb. 5) erlaubt es, Vorgän-

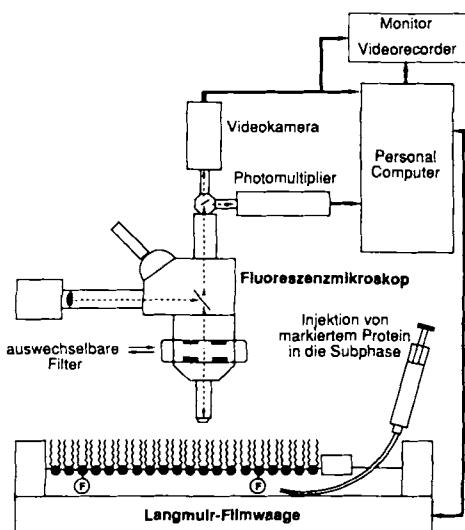


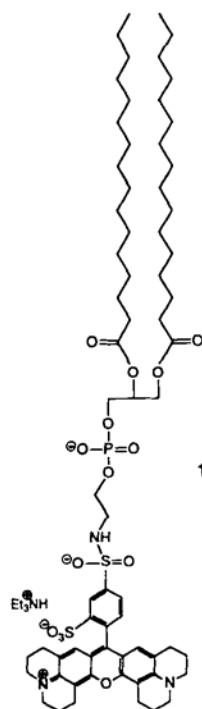
Abb. 5. Schematische Darstellung einer Fluoreszenzfilmwaage (Kombination einer Langmuir-Filmwaage mit einem Fluoreszenzmikroskop): Mit einem Fluoreszenzmikroskop wird eine Monoschicht an der Gas/Wasser-Grenzfläche beobachtet. Die ablaufenden Prozesse können über ein Videosystem dokumentiert werden. Ein Photomultiplier ermöglicht die Quantifizierung der Fluoreszenz. Mit Hilfe des auswechselbaren Filtersystems können die Monoschicht und in die Subphase injiziertes Protein über verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe selektiv beobachtet werden.

ge in oder an der Monoschicht über Fluoreszenzfarbstoffe als Sonden zu beobachten^[26]. Das zu untersuchende Lipid wird hierzu mit 0.5 Mol-% eines fluoreszenzmarkierten Lipids (z. B. das Sulforhodaminlipid 1) dotiert.

Ein solch geringer Zusatz an Fluoreszenzmarker beeinflusst das Verhalten der Monoschicht nicht, so daß im Fluoreszenzmikroskop direkt der Phasenzustand des zu untersuchenden Lipids beobachtet werden kann. Über eine Videokamera werden die Bilder kontinuierlich aufgezeichnet und damit die an der Monoschicht ablaufenden Prozesse dokumentiert. Ein Photomultiplier ermöglicht die Quantifizierung der von der Monoschicht emittierten Fluoreszenz, was die Messung von Quencheffekten erlaubt (siehe auch Abschnitt 3).

Betrachtet man eine mit Fluoreszenzfarbstoff (z. B. 1) dotierte Monoschicht während der Aufnahme eines Druck/Flächen-Diagramms, ergeben sich in Abhängigkeit vom Oberflächendruck die in Abbildung 6 gezeigten Momentaufnahmen.

In der flüssiganalogen Lipidphase ist die Fluoreszenz über das gesamte Beobachtungsfeld homogen. Bei Kompression des Lipidfilms in den Koexistenzbereich zwischen der fest- und der flüssiganalogen Phase bilden sich dunkle, nicht fluoreszierende Lipiddomänen (festanaloges Lipid) in einer hellen, homogen fluoreszierenden Matrix (flüssigana-



pid mit Fluoreszenzfarbstoff). Der Fluoreszenzfarbstoff wird in die kristallinen Bereiche nicht eingebaut; dadurch erscheinen die festanalogen Lipiddomänen dunkel. Die Morphologie der beobachteten Lipiddomänen hängt stark vom verwendeten Lipid ab. So können chirale Lipide chirale

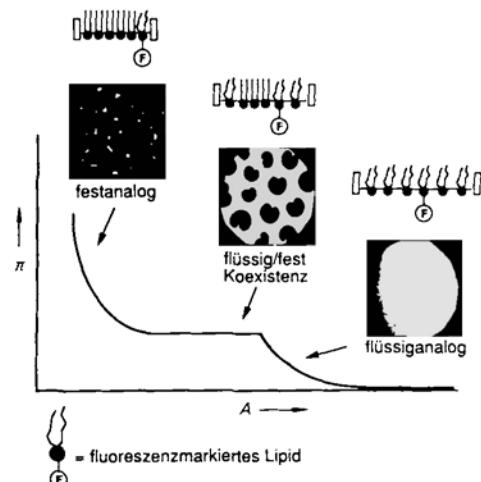


Abb. 6. Phasenverhalten einer mit Fluoreszenzlipid dotierten Lipidmonoschicht: schematische Darstellung und Fluoreszenzmikroskopische Bilder: in der flüssiganalogen Phase ist der Fluoreszenzfarbstoff homogen in der Monoschicht verteilt; im Phasenübergangsgebiet liegen dunkel erscheinende, festanaloge Lipiddomänen (in die der Fluoreszenzfarbstoff nicht eingebaut wird) in einer hellen, flüssiganalogen Matrix nebeneinander vor; die festanaloge Phase erscheint fast vollständig dunkel. π = Oberflächendruck, A = Fläche pro Molekül.

Domänen bilden. Im festanalogen Bereich schließlich ist das Lipid fast vollständig in zwei Dimensionen kristallisiert und von der Fluoreszenzfarbstoff-Phase separiert. Es existieren nur noch kleine fluoreszierende Bereiche (reiner Fluoreszenzfarbstoff) in einer dunklen Matrix (festanaloges Lipid).

Soll die Wechselwirkung der Lipidmonoschicht mit einem in der Subphase gelösten Protein untersucht werden, ist es

vorteilhaft, die Lipidschicht und das Protein getrennt beobachten zu können. Dies kann durch Verwendung eines geeigneten Filtersystems und zweier Fluoreszenzfarbstoffe erreicht werden, deren Absorptionen und Emissionen sich nicht überschneiden (z. B. Sulforhodamin: $\lambda_{Ex} = 584$ nm, $\lambda_{Em} = 607$ nm und Fluorescein: $\lambda_{Ex} = 497$ nm, $\lambda_{Em} = 521$ nm). Einer der beiden Fluoreszenzfarbstoffe wird, wie oben beschrieben, der Lipidmonoschicht beigemischt, der andere dagegen kovalent am Protein fixiert. So kann beispielsweise mit einem Rhodaminfilter gezielt nur die Fluoreszenz einer sulforhodamindotierten Monoschicht angeregt werden, um die Veränderungen der Morphologie in der Lipidschicht zu verfolgen. Im Fluoresceinfilter wird dagegen nur die Fluoreszenz des am Protein fixierten Fluoresceins angeregt, und man sieht praktisch durch die Lipidschicht hindurch.

Die Anwendung dieser Methoden auf die Untersuchung der spezifischen Wechselwirkungen von Proteinen mit Monoschichten (vgl. Abb. 2) wird in den nächsten Abschnitten beschrieben.

3. Hapten-Antikörper-Wechselwirkung an Monoschichten: Spezifische Erkennung zwischen Fluorescein und dem Anti-Fluorescein-Antikörper

Die interzelluläre Kommunikation im Zellverband setzt eine spezifische Erkennung und Bindung auf molekularer Ebene voraus. Derartige Erkennungsvorgänge sind auch für Immunreaktionen von außerordentlicher Bedeutung: Die spezifische Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand zur Bindung von Antikörpern an zelltypische Antigene stellt ein Schlüsselement der Histokompatibilität und Immungenetität dar^[7]. Spezifische Erkennungsreaktionen bilden auch die Grundlage zur Entwicklung von neuen drug-delivery-Strategien^[27] und zur Ausarbeitung neuer Immunoassays.

Für das Studium solcher Antigen/Antikörper-Wechselwirkungen an Modellmembranen wurden bisher überwiegend Dinitrophenyl (DNP)-Lipidkonjugate als Haptene verwendet^[24, 28]. Im folgenden soll das System Fluorescein/Anti-Fluorescein-Antikörper diskutiert werden, dessen Wechselwirkung spektroskopisch leicht verfolgt werden kann, da die Bindung des Antikörpers zu einer Fluoreszenzloschung führt.

3.1. Eigenschaften von Fluorescein und seinem Antikörper

Fluorescein ist aufgrund seines aromatischen, dianionischen Charakters und seiner raumfüllenden Struktur gut als antigene Determinante geeignet^[29]. Der hier verwendete monoklonale Anti-Fluorescein-Antikörper weist die höchste bisher bekannte Bindungskonstante ($3.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) gegenüber einem synthetischen Antigen auf^[30, 31]. Gleichzeitig wird die Fluoreszenz des gebundenen Fluoresceins fast vollständig gelöscht. Dadurch lässt sich die spezifische Erkennung und Bindung des Antigens durch den Antikörper spektroskopisch verfolgen und leicht quantifizieren^[29a].

Abbildung 7 zeigt die Fluoreszenzspektren einer Fluoresceinlösung, die mit steigenden Mengen an Antikörperlösung

titriert wurde. Deutlich ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei steigender Antikörperkonzentration zu sehen. F_{AB}-Fragmente des Antikörpers ließen sich im Komplex mit Fluorescein kristallisieren, so daß die räumliche Struktur des Antikörper-Bindungszentrums aufgeklärt werden kann.

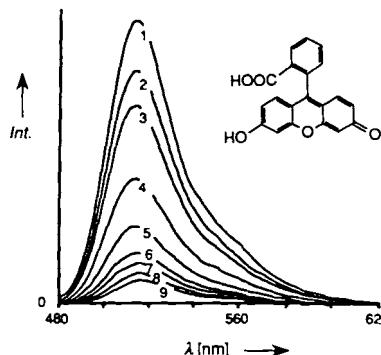


Abb. 7. Fluoreszenzspektren von Fluorescein ($2.7 \times 10^{-12} \text{ M}$) vor (1) und nach (2 bis 9) Inkubation mit dem Anti-Fluorescein-Antikörper: Mit steigender Antikörperkonzentration wird die Fluoreszenz des Fluoresceins in zunehmendem Maße gequenched; Antikörperkonzentrationen: (2) $8.5 \times 10^{-13} \text{ M}$; (3) $1.7 \times 10^{-12} \text{ M}$; (4) $3.4 \times 10^{-12} \text{ M}$; (5) $5.1 \times 10^{-12} \text{ M}$; (6) $6.8 \times 10^{-12} \text{ M}$; (7) $8.5 \times 10^{-12} \text{ M}$; (8) $1.1 \times 10^{-11} \text{ M}$; (9) $1.5 \times 10^{-11} \text{ M}$.

te^[32]. Im Antikörper/Hapten-Komplex ist das Fluoresceinmolekül durch van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Ladungsneutralisierung tief (ca. 15 Å) in der Bindungstasche des Antikörpers verankert (Abb. 8).

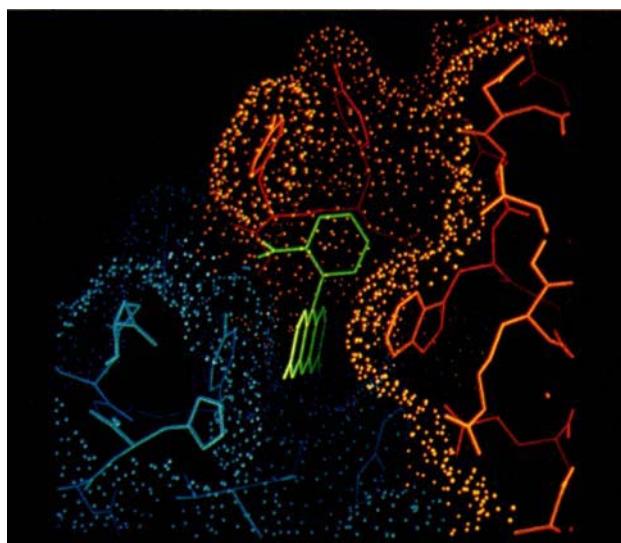
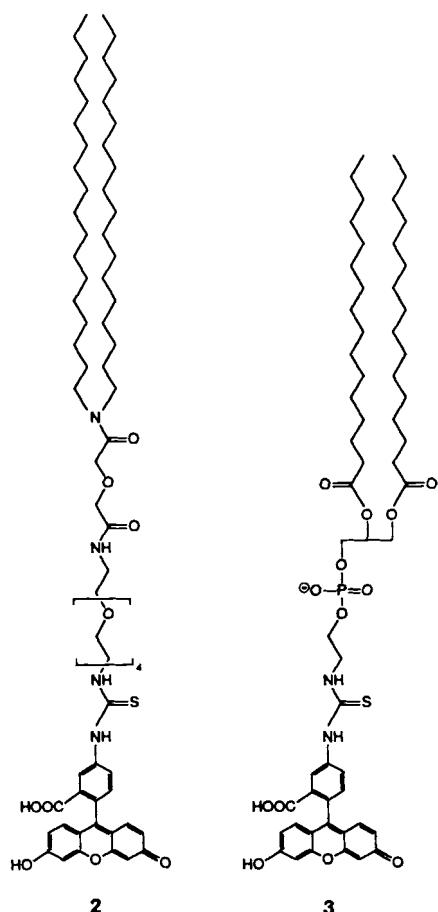


Abb. 8. Raummodell der Bindungsregion des Anti-Fluorescein-Antikörpers (orange, blau); sein Hapten Fluorescein (grün) ist tief in der Bindungstasche verankert, die nur durch einen schmalen Kanal zugänglich ist^[32].

Aus diesem Grund ist zu erwarten, daß membranständiges Fluorescein nur dann richtig gebunden werden kann, wenn es über einen hinreichend langen Spacer an der Membran fixiert ist. Die Untersuchungen in Monoschichten wurden deshalb mit dem spacerhaltigen Lipid 2 und dem spacerlosen Lipid 3 durchgeführt^[33a].



3.2. Spezifische Wechselwirkung von Fluoresceinlipiden mit dem Anti-Fluorescein-Antikörper in Monoschichten

Die spezifische Wechselwirkung des Fluoresceinlipids 2 mit dem Anti-Fluorescein-Antikörper wurde an einer flüssiganalogen Mischmonoschicht mit 10% Fluoresceinlipid in einer inerten Lecithin-Matrix aus Palmitoyloleylphosphatidylcholin (POPC) untersucht. Hierzu wurde die Monoschicht im flüssiganalogen Phasenzustand bei konstantem Druck (16 mN m^{-1}) gehalten, und der Antikörper unter die fluoresceinhaltige, zur Kontrolle auch unter die reine POPC-Monoschicht injiziert (Abb. 9).

Die Injektion des Antikörpers unter die haptenhaltige Monoschicht führt zu einer starken Flächenzunahme. Im

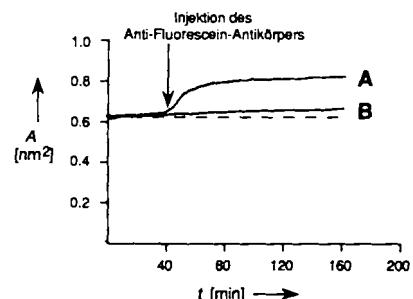


Abb. 9. Spezifische und unspezifische Wechselwirkung des Anti-Fluorescein-Antikörpers mit Monoschichten: A) die spezifische Wechselwirkung mit fluoresceinhaltigen Monoschichten (10% 2 in POPC) führt zu einer starken Flächenaufweitung; B) die unspezifische Wechselwirkung mit der reinen POPC-Matrix hat nur einen geringen Effekt; $\pi = 16 \text{ mN m}^{-1}$, A = Fläche pro Molekül.

Fall der reinen POPC-Monoschicht wird nur eine sehr geringe Flächenaufweitung beobachtet, die auf eine unspezifische Wechselwirkung des Antikörpers mit dem Matrixlipid zurückzuführen ist. Die starke Flächenzunahme im ersten Fall beruht also auf der spezifischen Wechselwirkung des Antikörpers mit dem eingemischten Fluoresceinlipid.

Zur weiteren Charakterisierung dieser Antigen/Antikörper-Wechselwirkung wurde die im Abschnitt 2.3. beschriebene Methode der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Als Fluoreszenzmarker in der Monoschicht dienen dabei die Fluoresceinlipide selbst.

Der sulforhodaminmarkierte Antikörper wurde unter eine flüssigalogeno ($\pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$) POPC-Monoschicht mit 1% Fluoresceinlipid injiziert (Abb. 10 A). Er bindet an das membranständige Hapten und quenches dessen Fluoreszenz (Abb. 10 B). Im Fluoreszenzmikroskop beobachtet man eine Aggregation der Protein-Lipid-Komplexe (dunkle Bereiche im FluoresceinfILTER, Abb. 10 C). Die Aggregate enthalten den gebundenen Antikörper, da sie im Sulforhodaminfilter hell erscheinen (Abb. 10 D). Eine Domänenbildung konnte

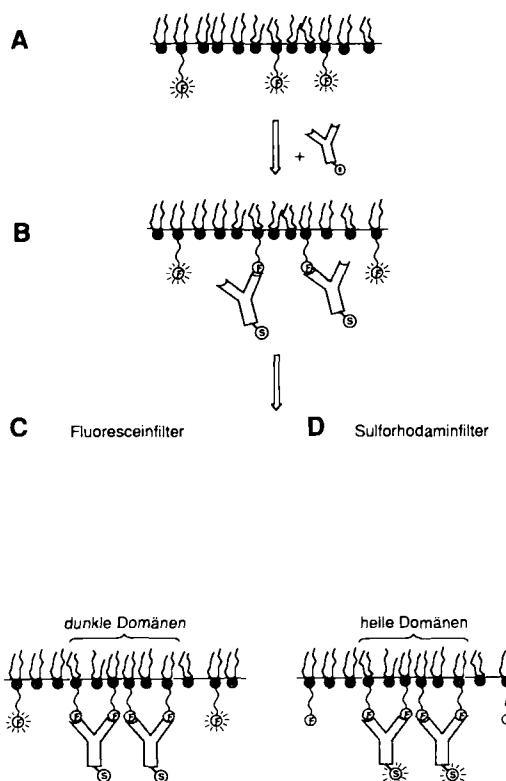


Abb. 10. Schematische Darstellung der Bindung des Anti-Fluorescein-Antikörpers an fluoresceinlipiddotierte Monoschichten: der in der Subphase gelöste sulforhodaminmarkierte Antikörper bindet spezifisch an das membranständige Hapten und quenches dessen Fluoreszenz (A, B); im Fluoreszenzmikroskop kann dann eine Domänenbildung des Antikörpers beobachtet werden (C, D). Diese Domänen erscheinen im FluoresceinfILTER aufgrund der Fluoreszenzlösung dunkel (C) und im Sulforhodaminfilter durch die Sulforhodaminmarkierung des Antikörpers hell (D); 1% Fluoresceinlipid 2 in POPC; $\pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$; $5 \text{ mm} \approx 20 \mu\text{m}$.

bei höherem Oberflächendruck nicht mehr beobachtet werden. Die laterale Mobilität der Protein/Lipid-Komplexe scheint also eine wichtige Rolle bei der Aggregation des Antikörpers zu spielen.

Durch den angeschlossenen Photomultiplier (siehe Abb. 5) kann die Fluoreszenzlösung der Monoschicht

beim Binden des Anti-Fluorescein-Antikörpers quantifiziert werden.

Dabei sollte das Ausmaß der Fluoreszenzlösung von der Zugänglichkeit des Antigens durch den Antikörper abhängig sein. Deshalb wurde neben dem spacerhaltigen Lipid 2 das käufliche spacerlose Lipid 3 untersucht.

Die Injektion des Anti-Fluorescein-Antikörpers unter eine Monoschicht mit 1% Fluoresceinlipid führt bei beiden Lipiden zu einer raschen Abnahme der Fluoreszenzintensität innerhalb der ersten Minuten. Danach stabilisiert sich die Fluoreszenzlösung für das spacerfreie Lipid 3 bei 45–50%, für Lipid 2 bei 70%.

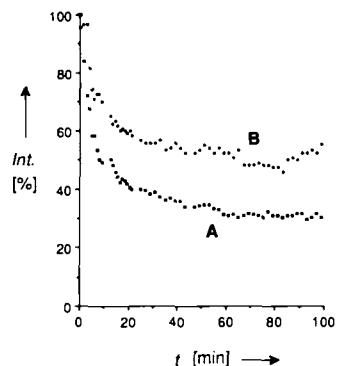


Abb. 11. Quantifizierung der Fluoreszenzlösung bei Bindung des Antikörpers an Fluoresceinlipide in Monoschichten: A) die Fluoreszenz des spacerhaltigen Lipids 2 wird zu 70% gequencht; B) beim spacerlosen Lipid 3 beträgt die Fluoreszenzlösung nur 50%; 1% Fluoresceinlipid in POPC, $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$.

Wie die Fluoreszenzlösung zeigt, bindet der Antikörper erheblich besser an das spacerhaltige Fluoresceinlipid 2 als an das spacerlose Lipid 3. Durch die Entkopplung der funktionellen Kopfgruppe (Fluorescein) von den membranbildenden Alkylketten durch einen langen hydrophilen Spacer kann im Fall des Lipids 2 der Antikörper an das Fluorescein binden, ohne von der Lipidmonoschicht behindert zu werden. Die Bindung des Antikörpers wird jedoch nicht nur vom Charakter des Lipids, sondern auch vom Zustand der Monoschicht beeinflußt. So ist zwischen 2 mN m^{-1} und 30 mN m^{-1} die Quenchreaktion zwar annähernd vom Druck unabhängig, bei niedrigem Druck tritt jedoch die in Abbildung 10 gezeigte Domänenbildung auf. Durch die geringe Packungsdichte ist hierbei eine hohe laterale Mobilität der Antikörper-Fluoresceinlipid-Komplexe gegeben, die zur Bildung der beobachteten Proteinaggregate führt.

4. Biotinlipid-Streptavidin-Wechselwirkung in Monoschichten: Spezifische Erkennung und zweidimensionale Kristallisation von Streptavidin

Ein Beispiel für spezifische Protein Lipid-Wechselwirkungen in Monoschichten ist die im vorhergehenden Abschnitt diskutierte Erkennung der Fluoresceinlipide 2 und 3 durch ihren Antikörper. R. Kornberg et al. haben gezeigt, daß eine solche Wechselwirkung unter bestimmten Bedingungen zur zweidimensionalen Kristallisation des Proteins führen kann^[34]. Am Beispiel der spezifischen Erkennung zwischen

dem tetrafunktionellen Protein Streptavidin und Lipiden mit Biotinkopfgruppen^[35] soll in diesem Abschnitt gezeigt werden, wie derartige Vorgänge in Monoschichten studiert und eventuell für Anwendungen in der Biosensorik genutzt werden können.

4.1. Bedeutung des Systems Biotin/Avidin

Avidin ($M = 68 \text{ kDa}$) und Streptavidin ($M = 60 \text{ kDa}$) sind zwei homologe wasserlösliche Proteine, deren Unterschied im Molekulargewicht durch zusätzliche Oligosaccharideinheiten am Avidin zu erklären ist^[36]. Sie sind beide aus je vier identischen Untereinheiten aufgebaut. Jede dieser vier Untereinheiten weist eine spezifische Bindungsstelle für Biotin (Vitamin H) 4 auf (Abb. 12)^[37].

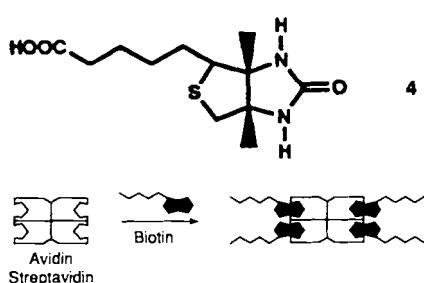


Abb. 12. Schematische Darstellung der Bindung von Biotin (Vitamin H) 4 an die tetrameren Proteine Avidin bzw. Streptavidin.

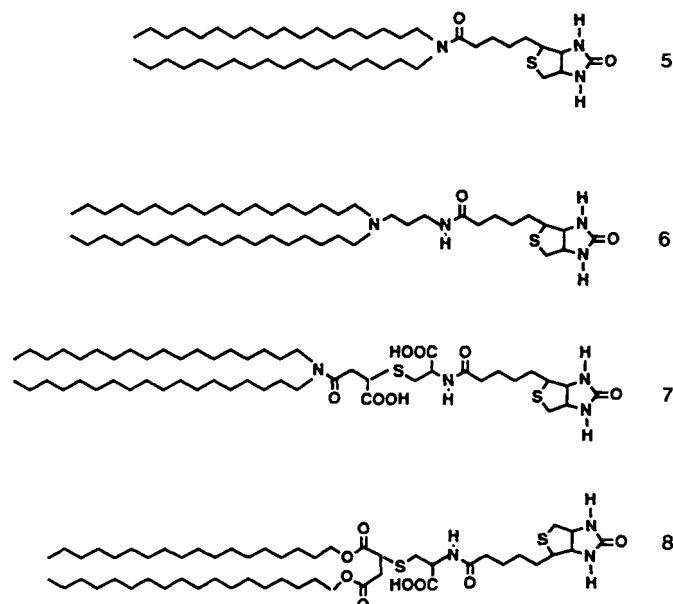
Eine Besonderheit dieser Erkennungsreaktion ist die extrem hohe Bindungskonstante von 10^{15} M^{-1} , die einer Bindungsenthalpie von 20 kcal mol⁻¹ entspricht. Sie liegt damit nur um etwa eine Größenordnung unter der Energie einer kovalenten Bindung^[38]. Die Bindung des Biotins an Avidin/Streptavidin ist damit nahezu irreversibel.

Die Bedeutung dieser Wechselwirkung in der Natur konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Über die Funktion des Biotins selbst gibt es dagegen ein wesentlich detaillierteres Bild. Es kommt in allen höheren Organismen vor und wirkt als CO₂-Gruppen übertragendes Coenzym bei verschiedenen Carboxylasen^[39]. Diese Funktion wird durch Avidin und Streptavidin gehemmt, indem die Proteine Biotin so fest binden, daß es nicht mehr für die enzymatische Carboxylierung zur Verfügung steht. Das spezifische Bindungsverhalten des Ligand/Rezeptor-Paares Biotin/Avidin hat zu Anwendungen in der Bioanalytik^[40], der Molekularbiologie^[41] und der Immunologie^[42] geführt. Weitere Vorteile dieses Systems liegen in der hohen Stabilität des Proteins und der Möglichkeit, Biotin an seiner freien Carboxylgruppe zu funktionalisieren, ohne seine Bindungseigenschaften zu beeinträchtigen. Damit besteht die Möglichkeit, Biotin als Kopfgruppe in Lipide einzubauen und so die Erkennungsreaktion zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin an Modellsystemen zu untersuchen.

4.2. Spezifische und unspezifische Wechselwirkung von Streptavidin mit Biotinlipid-Monoschichten^[43]

Zum Studium der Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin in Monoschichten wurde eine Rei-

he von Lipiden synthetisiert, die Biotin in der Kopfgruppe enthalten (5–8). Sie unterscheiden sich in der Länge des hydrophilen Spacers, der die Erkennungsstruktur Biotin von den membranbildenden Alkylketten trennt.



Neben den spezifischen Wechselwirkungen von Streptavidin und Avidin mit membrangebundenem Biotin muß auch deren unspezifische Adsorption an Grenzflächen berücksichtigt werden. Diese unspezifische Adsorption ist beim oligosaccharidhaltigen Avidin wesentlich stärker ausgeprägt als beim Streptavidin. Deshalb wurde für die im folgenden beschriebenen Experimente, in denen speziell die spezifische Erkennungsreaktion untersucht werden sollte, ausschließlich Streptavidin verwendet.

Zur Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung von Streptavidin mit Biotinlipid-Monoschichten wurden Druck/Flächen-Diagramme auf verschiedenen proteinhaltigen Subphasen aufgenommen. Dabei wurde sowohl aktives Protein mit vier freien Biotinbindungsstellen, als auch inaktiviertes, d. h. mit Biotin gesättigtes Protein, verwendet. Es ergeben sich signifikante Unterschiede in den Isothermen (Abb. 13, 14). Im Fall des

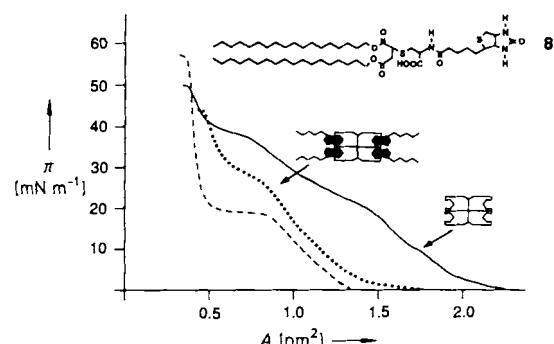


Abb. 13. Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Bindung von Streptavidin an Lipidmonoschichten aus spacerhaltigen Biotinlipiden: die spezifische Wechselwirkung des Proteins mit den Biotinlipiden (Subphase mit aktivem Streptavidin) führt im Gegensatz zur unspezifischen Wechselwirkung (Subphase mit inaktiviertem, d. h. biotingesättigtem Protein) zu einer starken Flächenaufweitung; Druck/Flächen-Diagramme von Biotinlipid 8: (---) proteinfreie Subphase; (—) Subphase mit aktivem Streptavidin; (···) Subphase mit inaktiviertem (biotingesättigtem) Streptavidin.

spacerhaltigen Lipids **8** beobachtet man eine starke Verschiebung zu größeren Flächen, wenn auf einer Subphase mit aktivem Protein gemessen wird (Abb. 13). Dies ist mit einer starken Wechselwirkung des Streptavidins mit der Biotinlipid-Monoschicht zu erklären. Bei Verwendung von inaktiviertem Streptavidin ist nur eine geringe Verschiebung der Isothermen zu beobachten. Dies beruht auf einer unspezifischen Wechselwirkung des Proteins mit den Lipiden, da das Protein keine freien Bindungsstellen für die spezifische Erkennung von Biotin mehr aufweist. Somit handelt es sich bei der beobachteten starken Wechselwirkung des aktiven Proteins mit der Biotinlipid-Monoschicht eindeutig um einen auf die spezifische Erkennung zurückzuführenden Effekt.

Der Einfluß des Spacers zwischen der Biotinkopfgruppe und dem membranbildenden Lipidanteil geht aus Abbildung 14 anschaulich hervor. In diesem Fall sind die Druck/Flä-

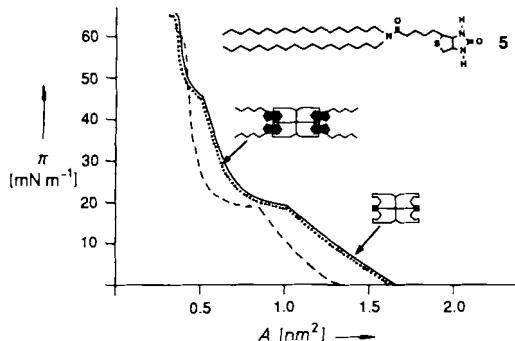


Abb. 14. Wechselwirkung von Streptavidin mit Monoschichten aus spacerfreien Biotinlipiden: Druck/Flächen-Diagramme von Biotinlipid **5** zeigen eine ausschließlich unspezifische Adsorption des Proteins, da der Abstand des Biotins von der Membran für eine effektive Bindung zu kurz ist: (—) proteinfreie Subphase; (—) Subphase mit aktivem Streptavidin; (···) Subphase mit desaktiviertem (biotingesättigtem) Streptavidin.

chen-Diagramme des spacerfreien Lipids **5** nach Zugabe von Streptavidin und mit Biotin gesättigtem Streptavidin identisch. Der Abstand des Biotins von der Membran scheint also zu kurz für eine effektive Bindung zu sein, und man erfaßt lediglich die unspezifische Wechselwirkung des Streptavidins mit der Biotinlipid-Monoschicht.

4.3. Zweidimensionale Kristallisation von Streptavidin als Konsequenz der spezifischen Erkennung

4.3.1. Fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Domänenbildung

Die Vorgänge bei der spezifischen Erkennung zwischen Biotin und Streptavidin wurden mit der in Abschnitt 2.3. beschriebenen Methode der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Unter einer Biotinlipid-Monoschicht aus **8** im gasanalogen Zustand wird eine Lösung von fluoresceinmarkiertem Streptavidin injiziert. Nach einer gewissen Zeit bilden sich regelmäßig geformte Streptavidindomänen, deren Entstehung sich wie folgt erklären läßt: Die zunächst noch homogen in der Subphase verteilten Proteinmoleküle erkennen den Liganden an der Lipidschicht (Abb. 15 A, B). Es kommt zur Bindung und Vororientierung der Proteinmoleküle an der Monoschicht, und schließlich aufgrund der hohen Mobi-

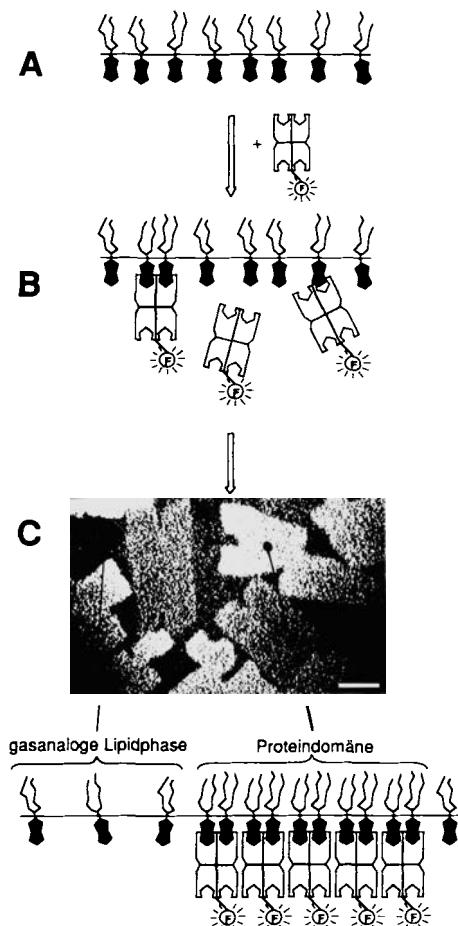


Abb. 15. Schematische Darstellung der Bindung von Streptavidin an Biotinlipid-Monoschichten: das in der Subphase gelöste fluoresceinmarkierte Streptavidin bindet spezifisch das membranständige Biotin (A, B); im Fluoreszenzmikroskop kann dann eine Domänenbildung des Streptavidins beobachtet werden (helle Bereiche im Fluoresceinfilter, C); $\pi = 0 \text{ mN m}^{-1}$, Balken $\cong 20 \mu\text{m}$.

lität in der Ebene der Monoschicht zu einer Aggregation der Streptavidinmoleküle (Abb. 15 C).

Die Form der Domänen hängt stark von den Präparationsbedingungen ab. Sie variiert von dendritischen über H-förmige bis hin zu schmetterlingsartigen Strukturen.

Wird zur Anregung der Fluoreszenz linear polarisiertes Licht verwendet, so ergibt sich die in Abbildung 16 gezeigte Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Streptavidindomänen von der Polarisatorstellung. Die beiden Photos zeigen dieselbe Stelle der Monoschicht, wobei der Polarisator von A nach B um 90° gedreht wurde. Proteindomänen, die in 16 A hell erscheinen, sind in 16 B dunkel und umgekehrt. Diese optische Anisotropie läßt auf eine hohe Ordnung und

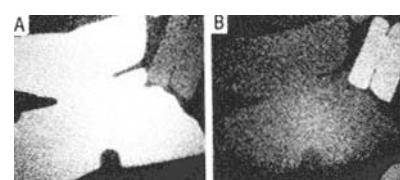


Abb. 16. Optische Anisotropie der Streptavidindomänen im Fluoreszenzmikroskop: die Polarisationsebene des Anregungslichtes wurde von A nach B um 90° gedreht; Domänen, die in A hell erscheinen, sind aufgrund der optischen Anisotropie in B dunkel und umgekehrt; Biotinlipid **8**, 5 mm $\cong 30 \mu\text{m}$.

geringe Beweglichkeit der Proteinmoleküle in den Domänen schließen.

Kontrollexperimente mit biotingesättigtem Streptavidin und mit nicht bindungsaktiven, d.h. biotinfreien Lipidschichten (z.B. Dipalmitoylphosphatidylcholin DPPC) führten in keinem Fall zur Bildung von Proteindomänen. Deren Bildung ist also eine Konsequenz der spezifischen Erkennung des Biotins durch Streptavidin.

4.3.2. Elektronenmikroskopische Strukturaufklärung

Die optische Anisotropie der Streptavidindomänen lässt vermuten, daß es sich bei diesen um zweidimensionale Proteinkristalle handelt. Aus diesem Grund wurden in Kooperation mit R. D. Kornberg et al. die Proteindomänen elektronenmikroskopisch genauer untersucht (Abb. 17)^[33].

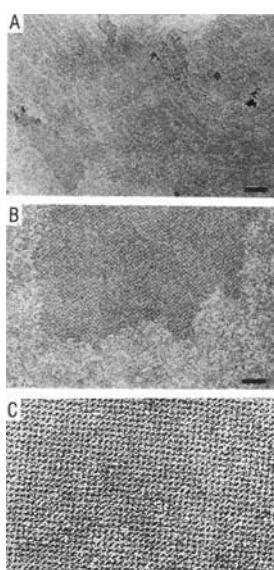


Abb. 17. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Streptavidinkristallen bei steigender Vergrößerung; Balken $\cong 0.5 \mu\text{m}$ (A), 125 nm (B), 25 nm (C); Kontrastierung mit Uranylacetat.

In Abbildung 17 A sind bei geringer Vergrößerung mehrere Proteindomänen gezeigt, die teilweise durch die Präparation zerbrochen sind. Bei steigender Vergrößerung (Abb. 17 B, C) ist ein regelmäßiges Muster mit tetragonaler Ordnung zu erkennen. Wie die Elektronenbeugung an diesen geordneten Bereichen zeigt, handelt es sich tatsächlich um zweidimensionale Streptavidin-Einkristalle. Mit diesen zweidimensionalen Kristallen konnte die Struktur des an die Biotinlipidschicht gebundenen Streptavidins mit einer Auflösung von 15 \AA ermittelt werden. Zur gleichen Zeit wurde von Hendrickson die dreidimensionale Struktur des Proteins inklusive der Lage der Biotinbindungsstellen durch Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 3 \AA aufgeklärt^[44]. Projiziert man die von Hendrickson und die aus den zweidimensionalen Kristallen erhaltenen Struktur übereinander, findet sich eine sehr gute Übereinstimmung. Dies erlaubt, die Position der Biotinbindungsstellen in die aus den zweidimensionalen Kristallen gewonnene Rekonstruktion der Proteinoberfläche zu übertragen (Abb. 18). Auf der Basis dieser Ergebnisse läßt sich erstmals die Orientierung des

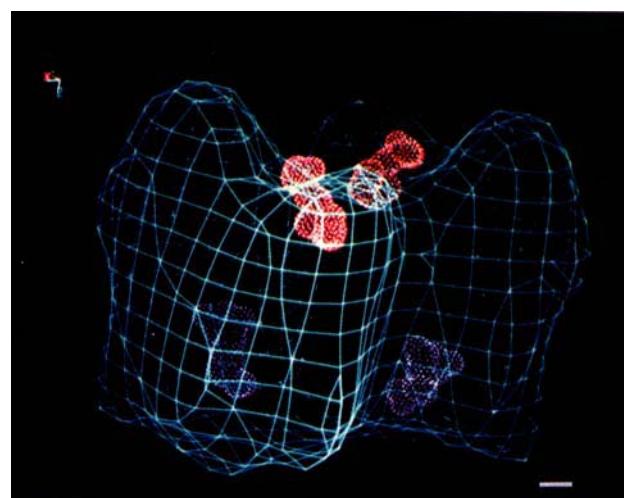


Abb. 18. Raummodell von Streptavidin (blaue Konturlinien); eingezeichnet sind die vier Biotinbindungsstellen (nach Hendrickson^[44]); Balken $\cong 4 \text{ \AA}$.

an die biotinhaltige Monoschicht gebundenen Streptavidins darstellen (Abb. 19).

Hierbei sind zwei Punkte bemerkenswert: Der Abstand der Bindungstasche von der Lipidmonoschicht entspricht in etwa der Spacerlänge des verwendeten Biotinlipids **8**. Dies

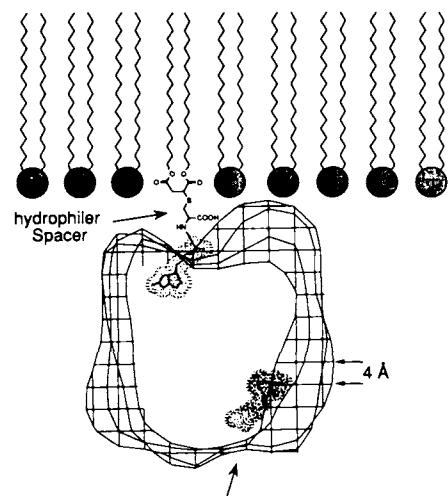


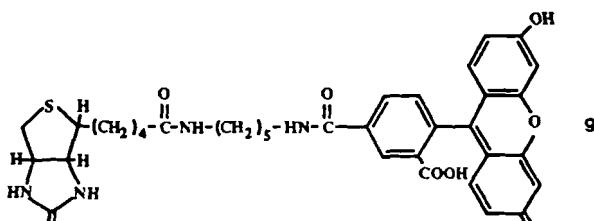
Abb. 19. Schnitt durch eine biotinlipidhaltige Monoschicht mit gebundenem Streptavidin: der Abstand der oberen Biotinbindungsstelle von der Monoschicht entspricht in etwa der Spacerlänge des Biotinlipids **8**; die untere, noch freie Bindungsstelle ist von der Subphase aus zugänglich (Pfeil).

erklärt die rasche Wechselwirkung des Proteins mit **8** und seine zweidimensionale Kristallisation. Darüber hinaus enthält jedes Streptavidinmolekül zwei weitere freie Bindungsstellen für Biotin, die in die wässrige Phase zeigen. Wie im nächsten Abschnitt diskutiert, stehen diese für weitere Reaktionen von „biotinylierten“ Molekülen an der Proteinschicht zur Verfügung.

4.4. Andocken von biotinylierten Molekülen an zweidimensionale Streptavidinkristalle

An zwei Beispielen soll gezeigt werden, daß die zweidimensionalen Streptavidinkristalle eine Matrix darstellen, die

über Biotin weiter funktionalisiert werden kann. Freie Biotinbindungsstellen an der kristallisierten Streptavidinschicht können durch Andocken eines gut zu detektierenden biotinylierten Moleküls wie des Fluorescein-Biotins **9** nachgewiesen werden (Abb. 20)^[4,5].



Sulforhodaminfilter

FluoresceinfILTER

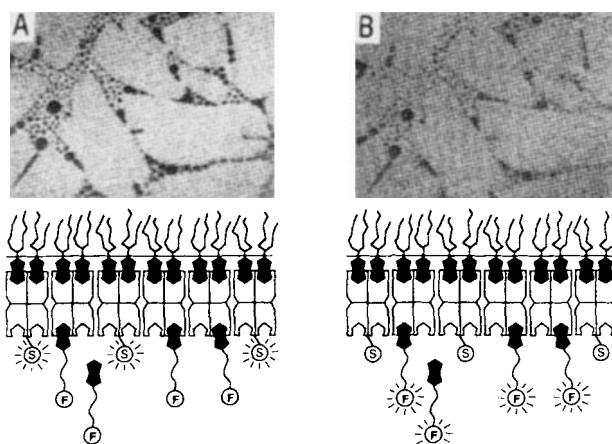


Abb. 20. Andocken von Biotin-Fluorescein **9** an zweidimensionale Kristalle aus sulforhodaminmarkiertem Streptavidin: im Fluoreszenzmikroskop erscheinen die Streptavidindomänen sowohl im Sulforhodaminfilter (Marker am Protein, A) als auch im FluoresceinfILTER (Fluorescein-Biotin, B) hell; 5 mm \cong 20 μm .

Für dieses Experiment wird sulforhodaminmarkiertes Streptavidin verwendet, das an einer Monoschicht aus Biotinlipiden die bereits beschriebenen Proteindomänen bildet, welche im Sulforhodaminfilter hell erscheinen. Injiziert man unter eine derartige Proteinmonoschicht **9**, so dockt dieses an die freien Bindungsstellen des Streptavidins an. Dies zeigt sich daran, daß nach kurzer Inkubationszeit die Proteindomänen nicht nur im Sulforhodaminfilter, sondern jetzt auch im FluoresceinfILTER hell erscheinen.

Für das Andocken eines Makromoleküls wurde biotinyliertes Ferritin als Modellsystem gewählt^[3,3]. Dieses sehr hochmolekulare Protein hat mit 600 kDa ein circa zehnmal höheres Molekulargewicht als Streptavidin. Es ist außerdem eisenhaltig und damit im Elektronenmikroskop gut zu detektieren. Auf ein festes Substrat übertragene Streptavidindomänen wurden mit einer Lösung von biotinyliertem Ferritin inkubiert und anschließend gründlich gewaschen. Im Elektronenmikroskop sieht man über der regelmäßigen Kristallstruktur des Streptavidins einzelne Ferritinmoleküle, die an die Streptavidinschicht gebunden sind (Abb. 21). Daß dies tatsächlich auf der Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung beruht, zeigt das Vergleichsexperiment mit nicht biotinyliertem Ferritin, bei dem die zweidimensionale Streptavidinschicht ferritinfrei gewaschen werden kann.

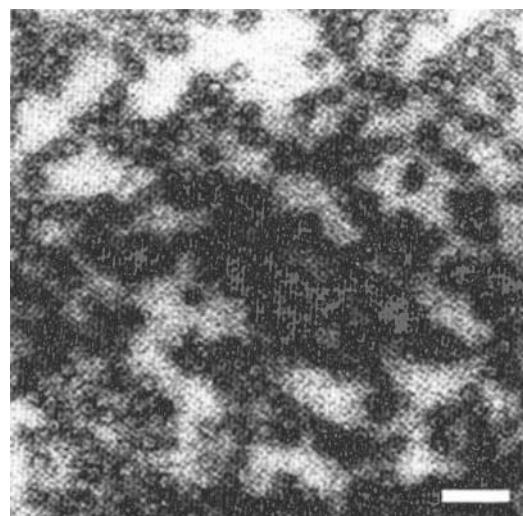


Abb. 21. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines 2D-Streptavidinkristalls mit gebundem biotinylierten Ferritin; Balken \cong 50 nm; Kontrastierung mit Uranylacetat.

4.5. Proteinhaltige Monoschichten in der Biosensorik?

In der Affinitätschromatographie wird schon seit langem die hochspezifische und außerordentlich feste Bindung von Biotin an Avidin/Streptavidin genutzt^[4,0]. Es gibt auch schon eine Reihe von Immunoassays, die von dieser Protein/Ligand-Wechselwirkung Gebrauch machen. Bisher bedient man sich allerdings noch nicht der Eigenschaften von hochgeordneten, monomolekularen Schichten, wie sie aufgrund der bisherigen Ergebnisse mit Streptavidin an Biotinlipidschichten präpariert werden können.

Aus der im letzten Abschnitt diskutierten Möglichkeit zur Funktionalisierung von zweidimensionalen Streptavidinkristallen ergibt sich eine Reihe potentieller Anwendungen proteinhaltiger Monoschichten (Abb. 22).

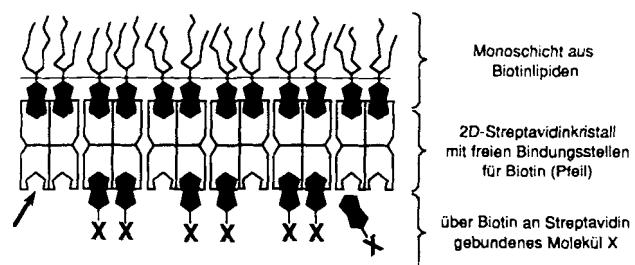


Abb. 22. Funktionalisierung einer zweidimensionalen kristallinen Streptavidinschicht durch Bindung von biotinylierten Molekülen X an freie Biotinbindungsstellen: X = Protein, funktionelle Gruppe, Polymer, Biotin (bis-Biotinverbindung).

Mit bifunktionellen Biotinderivaten ist der Aufbau von sehr dünnen, wohldefinierten Streptavidin-Multischichtstrukturen denkbar. Daneben könnte die kristalline Proteinschicht auch als hochgeordnete, proteinverträgliche Matrix zum Andocken von weiteren biotinylierten Proteinen (z. B. Enzyme, Antikörper) oder Nucleinsäuren (z. B. RNA, DNA) dienen. Hierbei ist sowohl die Funktion der angekoppelten Proteine zur weiteren Funktionalisierung als auch

deren zweidimensionale Kristallisation – insbesondere bei schlecht kristallisierenden Proteinen – von Interesse.

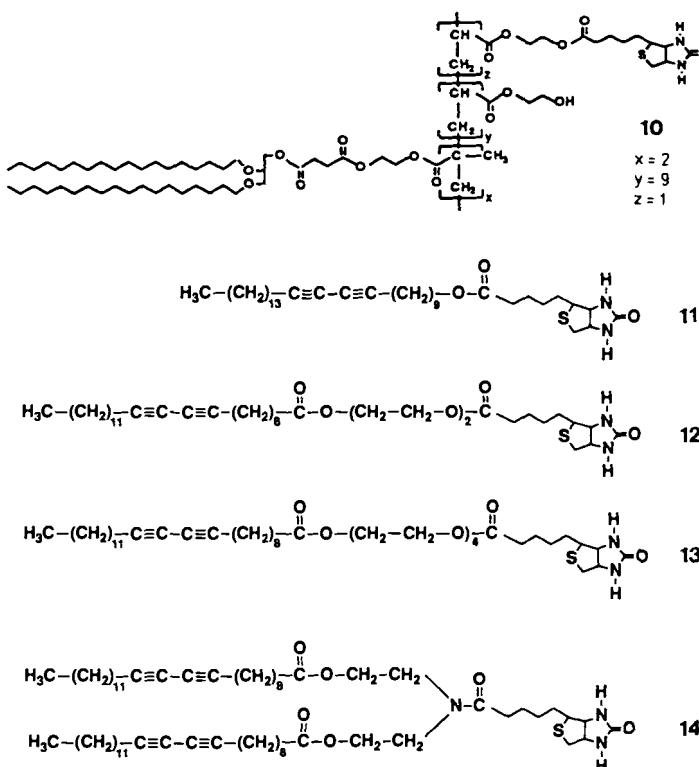
Für derartige Anwendungen wäre eine stabilisierte Lipidschicht, an die das Streptavidin binden kann, von Vorteil. Dafür kommen biotinhaltige Polymere (z. B. 10)^[45] oder polymerisierbare biotinhaltige Amphiphile, zum Beispiel die Diacetylen-Biotinlipide 11–14, in Frage. Die biotinhaltigen

Membran ablaufende Umsetzung ist die Hydrolyse von Esterbindungen durch die Phospholipase A₂. Ihre Wechselwirkung mit Lecithinmonoschichten soll im folgenden diskutiert werden.

5.1. Funktion und Eigenschaften von Phospholipase A₂

Die Phospholipasen stellen eine biologisch wichtige Klasse von Enzymen dar^[17, 50]. Sie katalysieren die Hydrolyse von Esterbindungen in membranbildenden Phospholipiden. Aus dieser Klasse von Enzymen ist die sehr weit verbreitete Phospholipase A₂ bisher am besten untersucht^[51]. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist der Abbau und Umbau von Zellmembranen. Der Regulationsmechanismus für die Kontrolle dieses Enzyms ist bisher jedoch noch unbekannt. Es stellt sich die Frage, wieso nicht alle Zellmembranen einfach zerstört werden. Daneben induziert die Phospholipase A₂ durch Freisetzung von Arachidonsäure die Bildung von entzündungsauslösenden Wirkstoffen (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane)^[52]. Eine Möglichkeit zur Regulation ihrer Aktivität wäre demnach eine elegante Methode zur Kontrolle von Entzündungsprozessen.

Die Phospholipase A₂ ist mit einem Molekulargewicht von 12–14 kDa relativ klein, wasserlöslich und durch einen hohen Anteil an Disulfidbrücken sehr stabil. Sie katalysiert die Spaltung der Esterbindung in C-2-Position der natürlich vorkommenden Glycerophospholipide, wobei das entsprechende Lysolecithin und die freie Fettsäure entstehen (Abb. 23).



Polydiacetylene weisen neben hoher Stabilität noch andere interessante Eigenschaften auf. So können kleinste Konformationsänderungen im Polymerrückgrat durch die Änderung der spektroskopischen Eigenschaften des Polymers (z. B. in den UV- und Raman-Spektren^[46, 47] sowie im Circulardichroismus^[48]) oder der Leitfähigkeit nach Dotierung sehr empfindlich detektiert werden. Auf dieser Basis könnte ein empfindlicher Sensor für das Binden des Streptavidins an die polymere Lipidschicht entwickelt werden. Koppelt man ein zu detektierendes Molekül an Streptavidin, ist eine Vielzahl von „Biosensoren“ denkbar.

5. Enzym-Substrat-Wechselwirkung: Spezifische Erkennung, Funktion und Domänenbildung von Phospholipase A₂ an Lecithinmonoschichten

Den meisten chemischen Reaktionen, die in einem Organismus ablaufen und den Stoffwechsel regulieren, liegen Enzymreaktionen zugrunde^[49]. Bei ihnen kommt es ebenso wie bei den in Abschnitt 3 und 4 diskutierten Beispielen zunächst zu einer spezifischen Erkennung zwischen einem Protein und seinem Substrat. Die Besonderheit eines Enzyms liegt darin, daß es das gebundene Substrat nicht nur erkennt, sondern anschließend noch chemisch verändert (Bindungsspaltung oder Bindungsbildung). Ein Beispiel für eine solche an einer

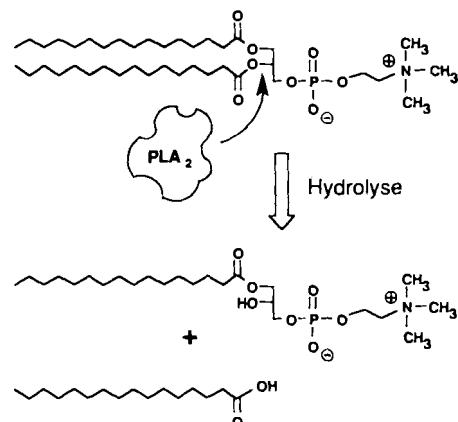


Abb. 23. Schematische Darstellung der von der Phospholipase A₂ katalysierten Spaltungsreaktion: das Enzym hydrolysiert die Esterbindung in C-2-Position eines Lecithins, wobei das entsprechende Lysolecithin und die freie Fettsäure entstehen.

Die Reaktion verläuft sowohl regioselektiv, d. h. nur die Kette in C-2-Position wird abgespalten, als auch stereospezifisch, d. h. nur die natürlich vorkommende L-Form des Lipids kann hydrolysiert werden – die D-Form ist inert^[53]. Die Aktivität der Phospholipase A₂ hängt sehr stark vom physikalischen Zustand des Substrates ab^[17, 50, 51, 54]. Geht man von homogener Lösung zu organisierten Substraten wie Micellen, Liposomen oder Monoschichten über, so erhöht sich die Aktivität um ein Vielfaches. In Liposomen wird die höchste Aktivität beobachtet, wenn sich das Lipid im Phasenübergangsbereich befindet^[54a, 55]. Diese Eigenschaft der

Phospholipase A₂ macht sie speziell für Untersuchungen in Monoschichten interessant, da sowohl die Zusammensetzung als auch der physikalische Zustand der Membran in weitem Rahmen einfach variiert werden können (vgl. Domänenbildung der Lipide in Abb. 6 in Abschnitt 2.3).

5.2. Hydrolyse von Substratlipiden der Phospholipase A₂ in Monoschichten

Zur Untersuchung der hydrolytischen Aktivität der Phospholipase A₂ wurde wieder die in Abschnitt 2.3. beschriebene Fluoreszenzfilmwaage verwendet. Bei diesen Experimenten wurde die Monoschicht mit einem Sulforhodaminlipid dotiert und die Phospholipase A₂ mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Durch diese Doppelmarkierung können Vorgänge in der Lipidmonoschicht und das Verhalten des Enzyms getrennt beobachtet werden. Der Verlauf eines solchen Experiments ist schematisch in Abbildung 24 dargestellt.

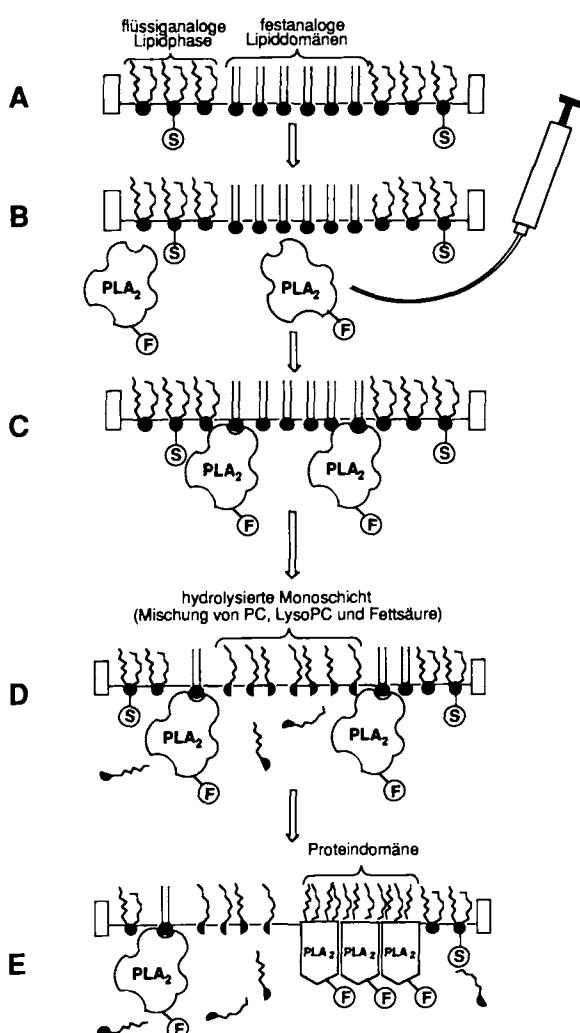


Abb. 24. Hydrolyse einer Lipidmonoschicht durch Phospholipase A₂, (Schema): A) Monoschicht im Phasenübergangsbereich mit festanalogen Lipiddomänen in einer Matrix aus flüssiganalogen Lipid gemischt mit einem Sulforhodaminmarker; B) Injektion der FITC-markierten Phospholipase A₂; C) spezifische Erkennung der Substratlipide durch das Enzym und bevorzugter Angriff an den Phasengrenzen zwischen fest- und flüssiganalogen Phase; D) hydrolytischer Abbau der festanalogen Lipiddomänen und Anreicherung der Hydrolyseprodukte in der Monoschicht; E) Aggregation des Enzyms zu Domänen. PC = Phosphatidylcholin.

Die Lipidmonoschicht wird in den Phasenübergangsbereich zwischen flüssiganalogen und festanalogen Phase komprimiert. Dabei bilden sich festanaloge Lipiddomänen in der flüssiganalogen Matrix (Abb. 24 A; vgl. auch Abschnitt 2.3). Nach Injektion der markierten Phospholipase A₂ in die Subphase (Abb. 24 B) kommt es zur spezifischen Erkennung zwischen Enzym und Substrat. Der Angriff des Proteins erfolgt bevorzugt an den Phasengrenzen zwischen flüssig- und festanalogen Lipid (Abb. 24 C)^[56]. Mit fortschreitender Hydrolysedauer werden die festanalogen Lipiddomänen abgebaut, wobei sich die Hydrolyseprodukte in der Monoschicht anreichern (Abb. 24 D). Nach einer gewissen Reaktionszeit beginnt die Phospholipase A₂, zu spezifisch geformten Domänen zu aggregieren (Abb. 24 E). Dies deutet auf eine Konformationsänderung des Proteins durch Wechselwirkung mit der hydrolysierten Monoschicht hin. Dieser Vorgang der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Domänenbildung des Proteins kann in seiner zeitlichen Abfolge fluoreszenzmikroskopisch direkt beobachtet werden^[57]. In den nächsten beiden Abschnitten wird dies am Beispiel von L- α -DPPC- und L- α -Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)-Monoschichten gezeigt.

5.2.1. Hydrolyse festanaloger L- α -DPPC-Domänen^[57]

Direkt nach Enzyminjektion unter die Monoschicht, zum Zeitpunkt Null, sind im Sulforhodamin-Filter die für das L- α -DPPC typischen dunklen festanalogen Lipiddomänen^[58] in der hellen fluiden Matrix aus flüssiganalogen Lipid und Sulforhodaminmarker zu sehen (vgl. Abb. 25 A und Schema in Abb. 24 A, B). Im Fluoresceinfilter zeigt sich die homogene Fluoreszenz des Proteins unterhalb der Monoschicht (vgl. Abb. 25 B). Bereits nach 10 Minuten lassen erste Anzeichen darauf schließen, daß das Enzym sein Substrat in der Monoschicht spezifisch erkennt und beginnt, es zu hydrolysieren. Im Sulforhodaminfilter zeigen sich an den festanalogen Lipiddomänen kleine ausgefranste Bereiche, die sich spezifisch an den bereits vorhandenen Einbuchtungen der Domänen gebildet haben (vgl. Abb. 25 C und Schema in Abb. 24 C). Die Phospholipase A₂ beginnt, die festanalogen Domänen von diesem Punkt aus nach innen hinein abzubauen (Abb. 25 C, E). Hat das Enzym an die Phasengrenze gebunden und die ersten Lipide hydrolysiert, kommt es zur lokalen Anreicherung der Säure und des Lysolecithins, was zur autokatalytischen Aktivierung an diesem Punkt führen kann^[59]. Damit ist eine bevorzugte Hydrolyse von diesem ersten Angriffspunkt aus verständlich.

Nach circa 60 Minuten sind nur noch kleine Reste der Lipiddomänen übrig (Abb. 25 E, G, I, L). Bei Beobachtung des Enzyms durch den Fluoresceinfilter erscheinen nach 30 Minuten kleine helle Punkte (Abb. 25 F), die im Sulforhodaminfilter dunkel sind: das Protein beginnt, unterhalb der Monoschicht zu aggregieren^[57, 59a, 60]. Diese hellen Punkte nehmen im weiteren Verlauf der Reaktion an Anzahl und Größe zu (Abb. 25 F, H, K), bis sie am Ende der Reaktion (circa 60 Minuten) die typische Form einer „Niere“ (vgl. Abb. 25 L) angenommen haben. Die Monoschicht besteht zu diesem Zeitpunkt nur noch aus den fast völlig zerstörten festanalogen Lipiddomänen und den Proteindomänen in einer flüssiganalogen Matrix (vgl. Abb. L, M).

Es ist auffällig, daß die Domänen der Phospholipase A₂ eine ähnliche Form wie ein Teil der zu Beginn der Reaktion

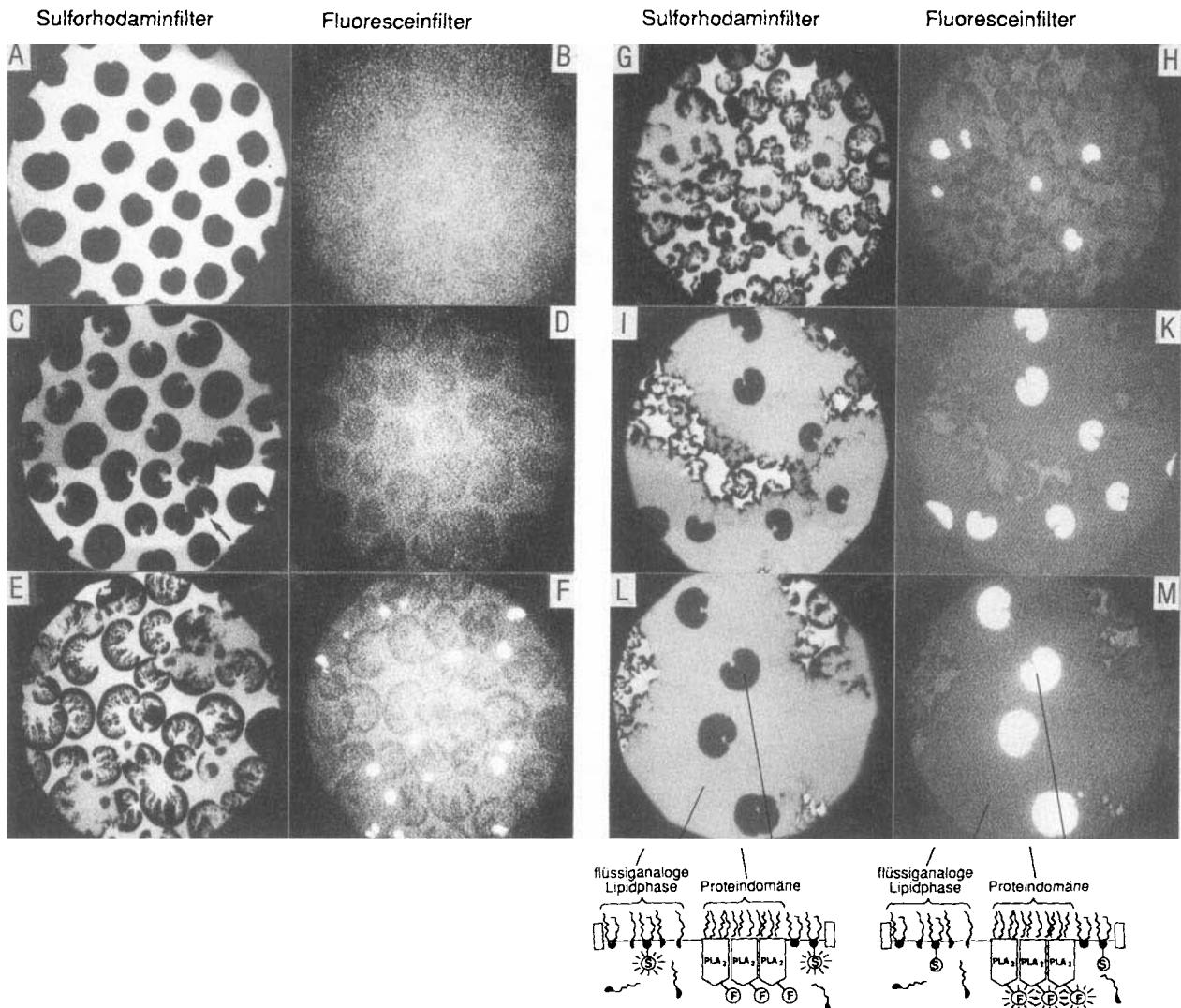


Abb. 25. Fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Hydrolyse einer L- α -DPPC-Monoschicht durch Phospholipase A₂; im Sulforhodaminfilter (links) ist die Monoschicht, im Fluoresceinfilter (rechts) das Enzym zu sehen: A) dunkle festanaloge Lipiddomänen in einer hellen flüssiganalogen Matrix; B) homogene Fluoreszenz des Enzyms in der Subphase; C) erste Anzeichen für die beginnende Hydrolyse der festanalogen Lipiddomänen (Pfeil); D) homogene Fluoreszenz des Enzyms in der Subphase; E), F) fortschreitender Abbau der festanalogen Lipiddomänen und erste Anzeichen für die Bildung von Enzymaggregaten unterhalb der Monoschicht (helle Punkte im Fluoresceinfilter (E), dunkle Punkte im Sulforhodaminfilter (F)); G) bis K) weitere Hydrolyse der festanalogen Lipiddomänen (G, I) bei gleichzeitigem Wachstum der Proteindomänen (H, K); L, M) nach fast vollständigem Abbau der festanalogen Lipiddomänen sind nur noch die entstandenen Proteindomänen in einer flüssiganalogen Matrix aus den Hydrolyseprodukten und DPPC zu sehen; diese spezifisch geformten Enzymdomänen erscheinen im Sulforhodaminfilter dunkel (L) und im Fluoresceinfilter hell (M); A, B) $t = 0$ min (direkt nach Enzyminjektion); C, D) $t = 10$ min; E, F) $t = 30$ min; G, H) $t = 40$ min; I, K) $t = 50$ min; L, M) $t = 60$ min; $\pi = 22 \text{ mN m}^{-1}$; $T = 30^\circ\text{C}$; $5 \text{ mm} \pm 20 \mu\text{m}$.

vorhandenen Lipiddomänen haben (vgl. Abb. 25L, M und Abb. 24 A). Um einen möglichen Templateffekt zu untersuchen, wurde das Hydrolyseexperiment auch mit L- α -DMPC durchgeführt, das festanaloge Lipiddomänen stark unterschiedlicher Morphologie bildet.

5.2.2. Hydrolyse festanaloger L- α -DMPC-Domänen^[57b]

Die festanalogen Lipiddomänen im Phasenübergangsreich einer L- α -DMPC-Monoschicht sind im Vergleich zu denen des DPPCs klein und sternförmig (vgl. Abb. 26 A und Abb. 25 A). Nach Injektion der FITC-markierten Phospholipase A₂ sind bereits nach 5 Minuten im Sulforhodaminfilter an diesen Domänen kleine Einbuchtungen zu sehen. Im Fluoresceinfilter erkennt man an den entsprechenden Stellen helle Punkte – die ersten Anzeichen der beginnenden Proteinaggregation (vgl. Pfeile in Abb. 26 B und 26 C)^[57, 59a, 60].

Im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es zum Wachstum dieser Proteinaggregate (Abb. 26 D–I), wobei letztendlich Enzymdomänen der gleichen Morphologie wie bei der Hydrolyse einer L- α -DPPC-Monoschicht entstehen (vgl. Abb. 25 L, M). Dies zeigt, daß die Form der Proteindomänen unabhängig von der Form der ursprünglich vorhandenen festanalogen Lipiddomänen ist.

Bei der Betrachtung des Ablaufs der Hydrolyse ergibt sich jedoch ein unterschiedliches Bild. Während beim L- α -DPPC spezifisch einzelne Domänen angegriffen und abgebaut werden, erzeugt das Enzym beim L- α -DMPC nach der spezifischen Anlagerung an die Domänengrenzen zuerst größere Bereiche ohne festanaloges Lipid. Die Proteindomänen erscheinen dann in der Mitte dieser „Höfe“ (Abb. 26 D–G). Es ist bisher noch nicht klar, wie das beobachtete unterschiedliche Abbauverhalten in Bezug auf den Hydrolysemechanismus zu interpretieren ist.

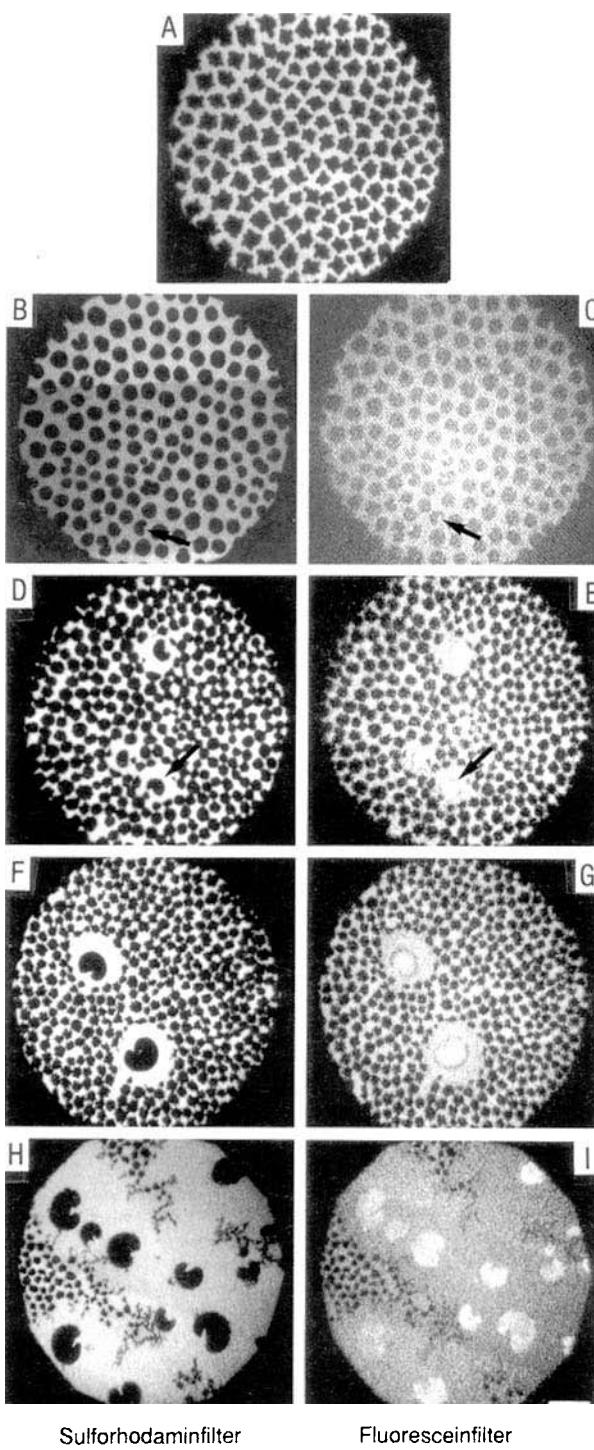


Abb. 26. Fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Hydrolyse einer L- α -DMPC-Monoschicht durch Phospholipase A₂; im Sulforhodaminfilter ist die Monoschicht und im Fluoresceinfilter das Enzym zu sehen: A) dunkle festanaloge Lipiddomänen in einer hellen flüssiganalogen Matrix; B), C) erste Anzeichen für die beginnende Hydrolyse der festanalogen Lipiddomänen; an den korrespondierenden Stellen sind im Fluoresceinfilter kleine helle Punkte zu sehen – die ersten Anzeichen für die beginnende Proteinaggregation (Pfeile in B und C); D) bis G) fortschreitende Hydrolyse führt zu runden Bereichen ohne festanaloges Lipid in deren Zentren die Proteindomänen (Pfeil) wachsen; H), I) nach fast vollständigem Abbau der festanalogen Lipiddomänen sind nur noch die entstandenen Proteindomänen in einer flüssiganalogen Matrix aus den Hydrolyseprodukten und DMPC zu sehen; diese spezifisch geformten Enzymdomänen erscheinen im Sulforhodaminfilter dunkel (H) und im Fluoresceinfilter hell (I); A) $t = 0$ min (direkt nach Enzyminjektion); B), C) $t = 10$ min; D), E) $t = 20$ min; F), G) $t = 30$ min; H), I) $t = 50$ min; $\pi = 22$ mN m⁻¹; $T = 10^\circ\text{C}$; Balken $\leq 20 \mu\text{m}$.

5.2.3. Kompression einer hydrolysierten L- α -DPPC-Monoschicht

Mehr Information über die Natur des Proteins in den Domänen konnte durch Variation des Oberflächendrucks einer hydrolysierten L- α -DPPC-Monoschicht erhalten werden^[57b].

Bei Expansion bis in den gasanalogen Zustand ($\pi = 0$ mN m⁻¹) bleibt die Form der Proteindomänen erhalten, was auf ihre hohe Stabilität hindeutet. Abbildung 27 zeigt die bei der Kompression zu beobachtenden Prozesse schematisch und im fluoreszenzmikroskopischen Bild. Hierbei bilden sich neue festanaloge Lipiddomänen in der fluiden Matrix (Abb. 27 B). Dies zeigt, daß auch nach vollständiger Hydrolyse der ursprünglich vorhandenen Lipiddomänen immer noch ungespaltes Lecithin in der Monoschicht vorhanden ist. Bemerkenswert ist jedoch, daß nicht nur in der fluiden Phase, sondern auch direkt an den Rändern der Proteindomänen (hell im FluoresceinfILTER) neue Lipiddomänen entstehen.

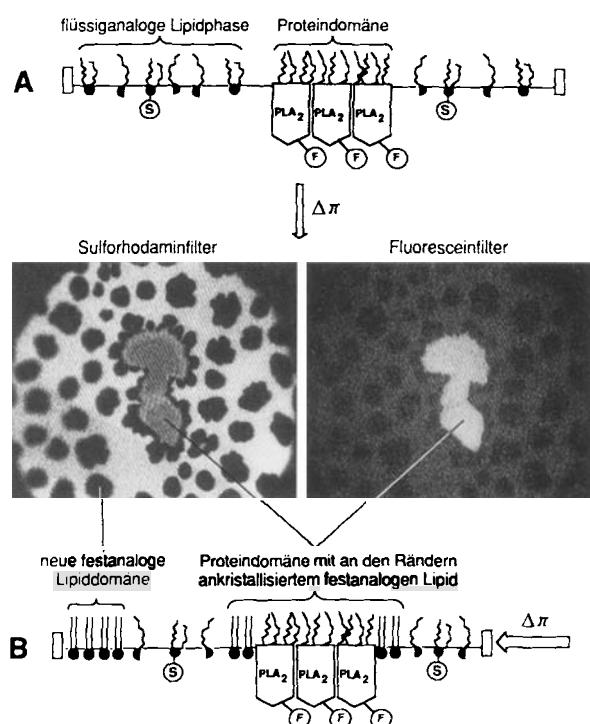


Abb. 27. Kompression einer L- α -DPPC-Monoschicht nach hydrolytischem Abbau durch Phospholipase A₂: A) schematische Darstellung einer Proteindomäne in einer flüssiganalogen Matrix aus Hydrolyseprodukten und DPPC; B) Kompression führt zur Bildung von neuen festanalogen Lipiddomänen sowohl in der fluiden Matrix als auch direkt an den Rändern der Proteindomänen (fluoreszenzmikroskopische Bilder und schematische Darstellung); 5 mm \equiv 20 μm .

Dieses ankristallisierte Lipid wird nicht von dem in den Proteindomänen organisierten Enzym angegriffen und abgebaut, was darauf hindeutet, daß die aggregierte Phospholipase A₂ nicht mehr aktiv ist. Erste Hinweise auf die wichtige Rolle der Hydrolyseprodukte Lysolecithin und Fettsäure bei der Bildung der Proteindomänen ergeben sich bereits aus analogen Experimenten mit D- α -DPPC: dieses Lipid kann vom Enzym zwar erkannt, aber nicht gespalten werden^[53]. Im Gegensatz zur Hydrolyse einer L- α -DPPC-Monoschicht

werden auch nach zwei Stunden weder die festanalogen Lipiddomänen abgebaut noch Proteindomänen gebildet. Da die Existenz der Hydrolyseprodukte in der Monoschicht also eine notwendige Voraussetzung für die Bildung der Proteindomänen zu sein scheint, wurden Untersuchungen an Mischmonoschichten durchgeführt.

5.3. Phasenverhalten von Mischmonoschichten aus Lecithin, Lysolecithin und Fettsäure und deren Wechselwirkung mit Phospholipase A₂

Um zu bestätigen, daß die Existenz der Hydrolyseprodukte in der Monoschicht entscheidend für die beobachtete Aggregation und Inhibierung der Phospholipase A₂ ist, wurde der Einfluß der Hydrolyseprodukte getrennt von der eigentlichen Hydrolyse untersucht. Dies läßt sich durch Verwendung von Mischmonoschichten aus Lecithin, Lysolecithin und Fettsäure in verschiedenen Verhältnissen (1:x:y, x = 1–5) erreichen; eine derartige Mischung simuliert eine vorangegangene Hydrolysereaktion. Unter der Annahme, daß allein die Spaltprodukte und nicht Reaktionen während des Hydrolyseprozesses (z. B. Acylierung^[61]) die Domänenbildung und Inhibierung der Phospholipase A₂ induzieren, sollte es bei geeigneter Zusammensetzung derartiger Mischmonoschichten spontan zur Bildung von Proteindomänen kommen. Dies soll im folgenden Beispiel gezeigt werden.

Nach Spreiten einer Mischung aus L- α -DPPC, L- α -LysoDPPC und Palmitinsäure im Verhältnis 1:5:5 erscheint die flüssigalogenen Monoschicht im fluoreszenzmikroskopischen Bild homogen hell (Abb. 28 A). Die Kompression führt jedoch zur Phasenseparation und damit zur Bildung von Domänen bisher unbekannter Zusammensetzung (1:x:y)^[62] (Abb. 28 B).

Diese Mischdomänen sind im Unterschied zu den schwarzen festanalogen Lipiddomänen grau; der Fluoreszenzfarbstoff wird also nicht vollständig aus diesen Domänen ausgeschlossen.

Injiziert man nun die FITC-markierte Phospholipase A₂ unter eine Mischmonoschicht mit solchen grauen Domänen, so kommt es bereits innerhalb von zwei Minuten zur Bindung des Proteins an diese Mischdomänen, ohne daß der Film vorher sichtbar hydrolytisch abgebaut wird (Abb. 28 C). Dies ist umso bemerkenswerter, wenn man es mit der relativ langsamen Bildung der Proteindomänen bei hydrolytischer Aktivität der Phospholipase A₂ vergleicht (ca. 60 Minuten, siehe Abb. 25 L, M). Die Mischdomänen stellen demnach eine bevorzugte Bindungsumgebung für das Protein dar. Sie wirken direkt als Template für die sich schnell bildenden Proteindomänen: Die Form der Mischdomänen (Sulforhodaminfilter) ist identisch mit der Form der Proteindomänen (FluoresceinfILTER). Verwendung der D-Form des DPPCs in den Mischungsexperimenten führt zu den gleichen Resultaten. Dies ist ein eindeutiger Beweis dafür, daß für die rasche Aggregation des Proteins die Erkennung der Kopfgruppe des Lecithins notwendig ist, nicht aber dessen Spaltbarkeit.

Geht man von einer DPPC-freien Mischung von Lysolecithin und Fettsäure (1:1) aus, so wird weder eine Domänenbildung dieser Hydrolyseprodukte noch eine Proteinaggregation beobachtet. Das ungespaltene Lecithin ist demnach notwendig zur Induktion der Aggregation des Proteins.

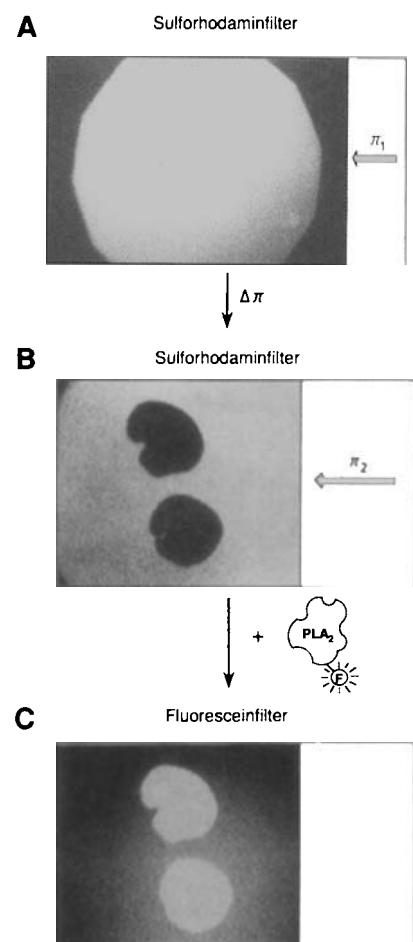


Abb. 28. Wechselwirkung von Phospholipase A₂ mit Mischmonoschichten aus Lecithin, Lysolecithin und Fettsäure (1:5:5): A) homogene Fluoreszenz der mit Sulforhodaminlipid 1 dotierten flüssigalogenen Mischmonoschicht; B) Kompression führt zur Bildung von grauen Mischdomänen unbekannter Zusammensetzung (1:x:y); C) unter diese Monoschicht injizierte fluoresceinmarkierte Phospholipase A₂ bindet sehr rasch an diese Mischdomänen, die dadurch im FluoresceinfILTER hell erscheinen. 5 mm \cong 20 μ m.

Auf der Basis dieser Monoschichtuntersuchungen kann zur Zeit noch kein direkter Beitrag zu den intensiv diskutierten Fragen des Hydrolysemechanismus der Phospholipase A₂ geliefert werden^[17, 50, 51]. Während zahlreiche Arbeiten vorliegen, die eine Inhibition der Phospholipase A₂ diskutieren^[17, 50–52], konnte eine direkte Domänenbildung nach hydrolytischer Aktivität des Proteins bisher noch nicht beobachtet werden. Die Anschaulichkeit des diskutierten Verfahrens könnte nicht nur neue Wege eröffnen, Inhibitoren für die Phospholipase A₂ zu testen, sondern auch dazu beitragen, einen detaillierten Einblick in den Katalysemechanismus dieser essentiellen Enzymklasse zu erhalten.

6. Schlußbemerkung

Die Experimente mit Fluorescein/Anti-Fluorescein-Antikörper und Biotin/Streptavidin waren Versuche, spezifische Erkennungsreaktionen an Zellmembranen auf Monoschichten als Modellsysteme zu übertragen. Durch Verwendung der relativ jungen Methode der Fluoreszenzmikroskopie an Monoschichten konnten neben der zu erwartenden spezifischen Wechselwirkung zusätzliche Phänomene beobachtet

werden: In beiden Fällen bildeten sich an der Monoschicht spontan Proteindomänen, die sich beim Streptavidin als zweidimensionale Kristalle erwiesen. Weitaus interessanter ist jedoch, daß mit der hochgeordneten Streptavidinschicht eine Matrix zur Verfügung steht, die pro Proteinmolekül zwei weitere hochaktive Bindungsstellen aufweist. Dies eröffnet möglicherweise, wie in Abschnitt 4.5. bereits diskutiert, Anwendungen im Bereich der Biosensorik.

Das Beispiel einer enzymatischen Aktivität an der Monoschicht, nämlich der Wechselwirkung von Phospholipase A₂ mit Lecithindomänen, geht ursprünglich auf Überlegungen zur Zerstörung („Entkorkung“) von Liposomen durch Phospholipase A₂ zurück^[6c]. In der Monoschicht konnten jetzt erstmals Enzymreaktionen an einem organisierten Substrat, den Lipiddomänen, direkt visuell verfolgt werden. Darüber hinaus bildeten sich auch hier Enzymdomänen regelmäßiger Morphologie, was auf eine Inhibierung der Phospholipase A₂ durch die Hydrolyseprodukte hinweist und erklären könnte, warum die im Körper weit verbreiteten Phospholipasen nicht alle Zellmembranen zerstören.

So bleibt die Frage interessant, wie auf der Basis funktionaler supramolekularer Systeme die Materialwissenschaft von den Biowissenschaften lernen kann. Von zahlreichen Prozessen in der Biochemie weiß man sicher, daß sie auf Modellsysteme übertragen werden können. Eine wachsende Zahl von Beispielen liefern die Affinitätschromatographie, die Affinitätschemotherapie und der aktuelle Bereich der Biosensorik.

Eingegangen am 5. Juni 1990 [A 789]

- [1] G. C. Lichtenberg: *Aphorismen*, Insel-Taschenbuch, Frankfurt 1979, a) S. 202; b) S. 204.
- [2] a) P. K. Feyerabend: *Wider den Methodenzwang*, Suhrkamp, Frankfurt 1983; b) *Ausgewählte Schriften, Band 1: Der wissenschaftstheoretische Realismus und die Autorität der Wissenschaften; Band 2: Probleme des Empirismus*, Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden 1978, 1981; c) K. R. Popper: *Objective Knowledge. An Evolutionary Approach*, Oxford 1972; d) in I. Lakatos, A. Musgrave (Hrsg.): *Criticism and the Growth of Knowledge*, Cambridge 1970, S. 51; e) T. S. Kuhn: *Die Struktur wissenschaftlicher Revolutionen*, Suhrkamp, Frankfurt 1967; f) in I. Lakatos, A. Musgrave (Hrsg.): *Criticism and the Growth of Knowledge*, Cambridge 1970, S. 1; g) W. Stegmüller: *Neue Wege der Wissenschaftsphilosophie*, Springer, Berlin 1980.
- [3] In einer Arbeit über *Die Bedeutung der Intuition. Von der Einseitigkeit unseres wissenschaftlichen Denkens* nimmt H. Sachsse dazu Stellung: *DABEI-Forum* 9 (1986) 1.
- [4] Hierzu meinte L. Wittgenstein fast resignierend: „Wir fühlen, daß selbst wenn alle möglichen wissenschaftlichen Fragen beantwortet sind, unsere Lebensprobleme noch gar nicht berührt wurden.“ in: *Tractatus logico-philosophicus*, Suhrkamp, Frankfurt 1960, Kapitel 6.52.
- [5] a) H. Morawetz, *Angew. Chem.* 99 (1987) 95; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 93; b) C. Priesner: *H. Staudinger, H. Marx und K. H. Meyer - Thesen zur Größe und Struktur der Makromoleküle: Ursachen und Hintergründe eines akademischen Disputes*, Verlag Chemie, Weinheim 1980; c) H. Staudinger: *Arbeitserinnerungen*, Hüthig, Heidelberg 1961.
- [6] a) J.-M. Lehn, *Science (Washington D.C.)* 227 (1985) 849; b) *Angew. Chem.* 100 (1988) 91; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 89; c) H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer, *ibid.* 100 (1988) 117 bzw. 27 (1988) 113.
- [7] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson: *Molecular Biology of the Cell*, Garland, New York 1983; *Molekularbiologie der Zelle*, VCH, Weinheim 1986.
- [8] a) G. Gregoriadis, A. C. Allison (Hrsg.): *Liposomes in Biological Systems*, Wiley, Chichester 1980; b) C. G. Knight (Hrsg.): *Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications*, Elsevier, Amsterdam 1981; c) G. Gregoriadis (Hrsg.): *Liposome Technology, Vol. I-III*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984; d) M. J. Ostro (Hrsg.): *Liposomes*, Dekker, New York 1983; e) M. J. Ostro (Hrsg.): *Liposomes: From Biophysics to Therapeutics*, Dekker, New York 1987.
- [9] J. N. Israelachvili in V. Degiorgio, M. Corti (Hrsg.): *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions*, North-Holland, Amsterdam 1985, S. 24.
- [10] a) G. W. Gray, P. A. Winsor (Hrsg.): *Liquid Crystals and Plastic Crystals, Vol. I-II*, Horwood, Chichester 1974; b) G. J. T. Tiddy, *Phys. Rep.* 57 (1980) 1; c) B. J. Forrest, L. W. Reeves, *Chem. Rev.* 81 (1981) 1.
- [11] *Thin Solid Films* 68 (1980); *ibid.* 99 (1983); *ibid.* 132–134 (1985); *ibid.* 159–160 (1988); *ibid.* 178–180 (1989).
- [12] a) F. D. Saeva (Hrsg.): *Liquid Crystals: The Fourth State of Matter*, Dekker, New York 1979; b) H. Kelker, R. Hatz: *Handbook of Liquid Crystals*, Verlag Chemie, Weinheim 1980; c) C. B. Mc Ardle (Hrsg.): *Side Chain Liquid Crystal Polymers*, Blackie, Glasgow 1989.
- [13] V. Percec, C. Pugh in [12c], S. 30.
- [14] a) S. Chandrasekhar, B. K. Sadashiva, K. A. Suresh, *Pramana* 9 (1977) 471; *Chem. Abstr.* 88 (1978) 30 566y; b) C. Destrade, P. Fouquer, H. Gasparoux, Nguyen Huu Tinh, A.-M. Levelut, J. Malthète, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 106 (1984) 121; c) W. Kreuder, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 4 (1983) 807; d) W. Kreuder, H. Ringsdorf, P. Tscherner, *ibid.* 6 (1985) 367; e) G. Wenz, *ibid.* 6 (1985) 577.
- [15] a) H. Ringsdorf, P. Tscherner, O. H. Schönher, J. H. Wendorff, *Makromol. Chem.* 188 (1987) 1431; b) M. Ebert, O. H. Schönher, J. H. Wendorff, H. Ringsdorf, P. Tscherner, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 7 (1990) 63; c) M. Ballauff, G. F. Schmidt, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 8 (1987) 93.
- [16] a) J. D. Barnal, *Trans. Faraday Soc.* 29 (1933) 1022; b) *The Physical Basis of Life*, Rutledge Kegan, London 1951; c) G. H. Brown, J. J. Wolken: *Liquid Crystals and Biological Systems*, Academic, New York 1979.
- [17] M. Waite: *The Phospholipases*, Plenum, New York 1987.
- [18] a) F. Vögtle, H.-G. Löhr, J. Franke, D. Worsch, *Angew. Chem.* 97 (1985) 721; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 727; b) F. Vögtle, E. Weber (Hrsg.): *Host Guest Complex Chemistry, Vol. I-III (Top. Curr. Chem.)* 98 (1981), *ibid.* 101 (1982), *ibid.* 121 (1984); c) *Biomimetic and Bioorganic Chemistry, Vol. I-III (Top. Curr. Chem.)* 128 (1985), *ibid.* 132 (1986), *ibid.* 136 (1986); d) D. J. Cram, *Angew. Chem.* 98 (1986) 1041; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 1039; e) F. H. Kohnke, J. P. Mathias, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Adv. Mater.* 101 (1989) 1129; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Adv. Mater.* 28 (1989) 1103; *Adv. Mater.* 1989, 275.
- [19] I. Cabreria, M. Engel, H. Ringsdorf in D. O. Hall, G. Grassi (Hrsg.): *Photoconversion Processes for Energy and Chemicals, Energy from Biomass*, Elsevier, London 1989, S. 68.
- [20] W. Groh, D. Lupo, H. Sixl, *Angew. Chem. Adv. Mater.* 101 (1989) 1580; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Adv. Mater.* 28 (1989) 1548; *Adv. Mater.* 1989, 366.
- [21] a) H. J. Coles, R. Simon, *Polymer* 26 (1985) 1801; b) M. Eich, J. H. Wendorff, B. Reck, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 8 (1987) 59.
- [22] C. Tanford: *The Hydrophobic Effect*, Wiley, New York 1980.
- [23] a) H. T. Tien: *Bimolecular Lipid Membranes - Theory and Practice*, Dekker, New York 1974; b) P. Läuger, *Angew. Chem.* 97 (1985) 939; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 905.
- [24] H. M. McConnell, T. H. Watts, R. M. Weis, A. A. Brian, *Biochim. Biophys. Acta* 864 (1986) 95.
- [25] a) G. L. Gaines: *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Wiley Interscience, New York 1966; b) H. Kuhn, D. Möbius, *Angew. Chem.* 83 (1971) 672; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10 (1971) 620.
- [26] a) V. von Tscharner, H. M. McConnell, *Biophys. J.* 36 (1981) 409; b) H. Möhwald, M. Lösche, *Rev. Sci. Instrum.* 55 (1984) 1968; c) P. Meller, *ibid.* 59 (1988) 2225.
- [27] L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* 93 (1981) 311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 305.
- [28] a) K. Uemura, R. A. Nicoletti, H. R. Six, S. C. Kinsky, *Biochemistry* 13 (1974) 572; b) H. Bader, *Dissertation*, Universität Mainz 1985; c) E. E. Uzgiris, R. D. Kornberg, *Nature (London)* 301 (1983) 125; d) L. K. Tam, *Biochemistry* 27 (1988) 1450; e) H. R. Six, K. Uemura, S. C. Kinsky, *ibid.* 12 (1973) 4003; f) S. C. Kinsky, *Biochim. Biophys. Acta* 265 (1972) 1.
- [29] a) E. W. Voss (Hrsg.): *Fluorescein Haptens: An Immunological Probe*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984; b) T. W. Athey, R. E. Cathou, *Immunochemistry* 14 (1977) 397.
- [30] R. M. Bates, D. W. Ballard, E. W. Voss, *Mol. Immunol.* 22 (1985) 871.
- [31] J. N. Herron, D. M. Kranz, D. M. Jameson, E. W. Voss, *Biochemistry* 25 (1986) 4602.
- [32] J. N. Herron, X.-M. He, M. L. Mason, E. W. Voss, Jr., A. B. Edmundson, *Proteins* 5 (1989) 271.
- [33] a) M. Ahlers, *Dissertation*, Universität Mainz 1990; b) S. A. Darst, M. Ahlers, P. H. Meller, E. W. Kubalek, R. Blankenburg, H. O. Ribi, H. Ringsdorf, R. D. Kornberg, *Biophys. J.* im Druck..
- [34] a) S. A. Darst, H. O. Ribi, D. W. Pierce, R. D. Kornberg, *J. Mol. Biol.* 203 (1988) 269; b) E. E. Uzgiris, R. D. Kornberg, *Nature (London)* 301 (1983) 125; c) E. E. Uzgiris, *J. Cell. Biochem.* 29 (1985) 239; d) E. E. Uzgiris, *Biochem. J.* 242 (1987) 293; e) D. S. Ludwig, H. O. Ribi, G. K. Schoolnik, R. D. Kornberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 8585; f) R. A. Reed, J. Mattai, G. G. Shipley, *Biochemistry* 26 (1987) 824; g) H. O. Ribi, D. S. Ludwig, K. L. Mercer, G. K. Schoolnik, R. D. Kornberg, *Science (Washington D.C.)* 239 (1988) 1272; h) H. O. Ribi, P. Reichard, R. D. Kornberg, *Biochemistry* 26 (1987) 7974; i) E. E. Uzgiris, *Biophys. J.* 41 (1983) 389 a.
- [35] a) E. A. Bayer, M. Wilchek, *Biochim. Biophys. Acta* 550 (1979) 464; b) K. Hashimoto, J. E. Loader, S. C. Kinsky, *ibid.* 901 (1986) 556; c) R. Blankenburg, P. Meller, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Biochemistry* 28 (1989) 8214; d) M. Ahlers, R. Blankenburg, D. W. Grainger, P. Meller, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Thin Solid Films* 180 (1989) 93.

- [36] a) Y. Hiller, J. M. Gershoni, E. A. Bayer, M. Wilchek, *Biochem. J.* **248** (1987) 167; b) K. Hofmann, S. W. Wood, C. C. Brinton, J. A. Montibeller, F. M. Finn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 4666.
- [37] a) M. Green, *Adv. Protein Chem.* **29** (1975) 85; b) R. M. Buckland, *Nature (London)* **320** (1986) 557; c) E. A. Bayer, M. Wilchek, *TIBS* **14** (1989) 408.
- [38] R. K. Garlick, R. W. Giese, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 210.
- [39] F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jüttig, E. Ringemann, *Angew. Chem.* **71** (1959) 481.
- [40] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Anal. Biochem.* **171** (1988) 1.
- [41] E. A. Bayer, M. Wilchek, *Meth. Biochem. Anal.* **26** (1980) 1.
- [42] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Immunol. Today* **2** (1984) 39.
- [43] R. Blankenburg, *Dissertation*, Universität Mainz 1989.
- [44] a) P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science (Washington D.C.)* **243** (1989) 85; b) W. A. Hendrickson, A. Pähler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merrit, R. P. Phizackerley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 2190.
- [45] E. Rump, *Diplomarbeit*, Universität Mainz 1990.
- [46] D. Batchelder, D. Bloor in R. J. H. Clark, R. E. Hester (Hrsg.): *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*, Vol. 11, Wiley, 1984, S. 133.
- [47] D. N. Batchelder in H. Bässler (Hrsg.): *Optical Techniques to Characterize Polymer Systems*, Elsevier, Amsterdam 1989.
- [48] A. F. Drake, D. J. Ando, D. Bloor, J. S. Obhi, S. Mann, *Polymer* **30** (1989) 1063.
- [49] R. F. Doolittle, *Spektrum Wiss.* **12** (1985) 78.
- [50] a) E. A. Dennis in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 16, 3. Aufl., Academic Press, New York 1983, S. 307; b) H. Van den Bosch, *Biochim. Biophys. Acta* **604** (1980) 191.
- [51] a) H. M. Verheij, A. J. Slotboom, G. H. de Haas, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **91** (1981) 91; b) A. Achari, D. Scott, P. Barlow, J. C. Vidal, Z. Otwinskiowski, S. Brunie, P. B. Sigler, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52** (1987) 441; c) J. Drenth, B. W. Dijkstra, R. Renetseder in F. A. Jurnak, A. McPherson (Hrsg.): *Biological Macromolecules and Assemblies, Vol. 3 - Active Sites of Enzymes*, Wiley, New York 1987, S. 287; d) M. K. Jain, O. G. Berg, *Biochim. Biophys. Acta* **1002** (1989) 127.
- [52] a) J. Chang, J. H. Musser, H. McGregor, *Biochem. Pharmacol.* **36** (1987) 2429; b) P. Vadas, W. Pruzanski, *Lab. Invest.* **55** (1986) 391; c) G. C. Liggins, M. D. Wilson, T. Wilson, *Am. J. Perinatol.* **6** (1989) 153; d) T. J. Nevalainen, *Z. Med. Laboratoriums diagn.* **30** (1989) 299; e) W. Scheuer, *Klin. Wochenschr.* **67** (1989) 153.
- [53] P. P. M. Bonsen, G. H. De Haas, W. A. Peterson, L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta* **270** (1972) 364.
- [54] a) N. Gheriani-Gruszka, S. Almog, R. L. Biltonen, D. Lichtenberg, *J. Biol. Chem.* **263** (1987) 11808; b) T. Thuren, P. Vainio, J. A. Virtanen, P. Somerharju, K. Blomquist, P. K. J. Kinnunen, *Biochemistry* **23** (1984) 5129; c) J. N. Israelachvili, S. Marcelja, G. Horn, *Q. Rev. Biophys.* **13** (1980) 121; d) P. N. Barlow, J.-C. Vidal, M. D. Lister, E. A. Dennis, P. B. Sigler, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 12954; e) G. Romero, K. Thompson, R. L. Biltonen, *ibid.* **262** (1987) 13476; f) R. Sundler, *Chem. Phys. Lipids* **34** (1984) 153; g) D. Lichtenberg, G. Romero, M. Menashe, R. L. Biltonen, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 5328; h) D. Lichtenberg, G. Romero, M. Menashe, R. L. Biltonen, *ibid.* **261** (1987) 5334; i) A. Alsina, O. Valls, G. Rieroni, R. Verger, S. Garcia, *Colloid Polymer Sci.* **261** (1983) 923; k) A. Alsina, M. L. Garcia, O. Valls, S. Garcia, *Colloids Surf.* **14** (1985) 277; l) A. Alsina, M. L. Garcia, M. Espina, O. Valls, *Colloid Polymer Sci.* **267** (1989) 923; m) D. W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, C. Salesse, D. E. Davies, J. B. Lloyd, *Biochim. Biophys. Acta* **1022** (1990) 146.
- [55] a) J. A. F. Op den Kamp, J. De Gier, L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta* **345** (1974) 253; b) D. O. Tinker, A. D. Purdon, J. Wei, E. Mason, *Can. J. Biochem.* **56** (1978) 552.
- [56] a) J. C. Wilschut, J. Regts, H. Westenberg, G. Scherphof, *Biochim. Biophys. Acta* **508** (1978) 185; b) G. C. Upreti, M. K. Jain, *J. Membr. Biol.* **55** (1980) 113.
- [57] a) D. W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, C. Salesse, *FEBS Lett.* **252** (1989) 74; b) D. W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Biochim. Biophys. Acta* **1023** (1990) 365.
- [58] H. M. McConnell, L. K. Tamm, R. M. Weis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (1984) 3249.
- [59] a) A. Plückthun, E. A. Dennis, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 11099; b) M. K. Jain, D. V. Jahagirdar, *Biochim. Biophys. Acta* **814** (1985) 313; c) M. K. Jain, M. R. Egmond, H. M. Verheij, R. Apitz-Castro, R. Dijkman, G. H. De Haas, *ibid.* **688** (1982) 341.
- [60] a) T. L. Hazlett, E. A. Dennis, *Biochemistry* **24** (1985) 6152; b) T. L. Hazlett, E. A. Dennis, *Biochim. Biophys. Acta* **961** (1988) 22; c) C. R. Kensil, E. A. Dennis, *J. Biol. Chem.* **254** (1979) 5843; d) G. Romero, K. Thompson, R. L. Biltonen, *ibid.* **262** (1987) 13476; e) C. M. Smith, M. A. Wells, *Biochim. Biophys. Acta* **663** (1981) 687; f) R. A. Deems, E. A. Dennis, *Methods Enzymol.* **71** (1981) 703.
- [61] W. Cho, A. G. Tomasselli, R. L. Heinrickson, F. J. Kezdy, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 11237.
- [62] Hinweise auf eine Phasenseparation der Hydrolyseprodukte gibt es auch in Vesikeln, siehe B.-Z. Yu, A. Kozubek, M. K. Jain, *Biochim. Biophys. Acta* **980** (1989) 23.