

**Schrittweise Bindung zweiwertiger Kationen an Phospholipid-Membranen: eine Moleküldynamikstudie\*\****Rainer A. Böckmann und Helmut Grubmüller\**

Die spezifische Wechselwirkung von Kationen – insbesondere zweiwertigen Kationen – mit biologischen Membranen ist nicht nur von zentraler Bedeutung für die Struktur, Dynamik und Stabilität von Membranen, sondern auch für die Bindung von Proteinen an Membranen und deren Einlagerung in Membranen sowie für die Membranfusion und den Transport kleiner Moleküle durch Membranen. So wurde gezeigt, dass die Membranfusion durch Calciumionen beschleunigt wird.<sup>[1,2]</sup> Ferner spielen Calciumionen bei der neuronalen Signaltransduktion eine wesentliche Rolle, und damit ist auch ihre Wechselwirkung mit neuronalen Membranen von großer Bedeutung.<sup>[3]</sup>

Zahlreiche experimentelle Methoden wurden entwickelt und mit dem Ziel eingesetzt, die Wechselwirkung von Kationen mit Membranen zu untersuchen. NMR-Experimente deuteten auf Konformationsänderungen in der polaren Region von Dipalmitoylphosphatidylcholin(DPPC)-Membranen hin<sup>[4]</sup> sowie auf ein Calciumionen/Phospholipid-Verhältnis von 1:2 bei 5 M  $\text{CaCl}_2$ .<sup>[5]</sup> Zusätzliche Konformationsänderungen im Bereich der Carbonylgruppe von Phosphatidylethanolcholin(POPC)-Lipiden konnten mithilfe der IR-Spektroskopie aufgedeckt werden.<sup>[6]</sup> Aus Neutronenbeugungsexperimenten ließ sich die Calciumverteilung im Bereich der Lipid-Kopfgruppe von DPPC-Membranen im flüssigkristallinen Zustand ableiten.<sup>[7]</sup>

Zusammengenommen sprechen die genannten Experimente für eine überwiegende Bindung von Calciumionen an die Phosphatgruppen zweier Lipide. Bis heute jedoch gibt es keine direkten Belege für dieses Modell und somit auch keine Vorstellung über die atomare Struktur der Ionen-Lipid-Komplexe. Das größte experimentelle Hindernis ist das niedrige Signal/Rausch-Verhältnis, da die Grenzregion zwischen Lipid und Lösungsmittel nur einen Bruchteil des gesamten Probenvolumens umfasst. Somit lässt der gegenwärtige Kenntnisstand Raum für unterschiedliche Interpre-

[\*] Dr. R. A. Böckmann, <sup>+</sup> Priv.-Doz. Dr. H. Grubmüller  
Arbeitsgruppe für theoretische molekulare Biophysik  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
Fax: (+49) 551-201-2302  
E-mail: hgrubmu@gwdg.de

[<sup>†</sup>] Derzeitige Adresse: Biochemisches Institut, Universität Zürich,  
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch EU-BIOTECH-Programme (Projekte QLRT-2000/00778 und QLRT-2000/00504) und die Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung Göttingen (Computerzeit) unterstützt. Wir danken B. de Groot, T. Heimburg, G. Schröder, C. Schütte und P. Vöhringer für anregende Diskussionen und für das sorgfältige Lesen des Manuskriptes sowie B. de Groot für seine Hilfe mit dem GROMACS-Programm.

tationen, wie eine 1999 erschienene Fluoreszenzstudie des Einflusses von Anionen und Kationen auf das Dipolpotential von Phosphatidylcholinvesikeln belegt.<sup>[8]</sup> In dieser Studie wurde – übereinstimmend mit den verfügbaren experimentellen Daten, aber im Widerspruch zum oben skizzierten Modell – eine gemessene Reduktion des Gesamtdipolpotentials als Bindung von Anionen an die Lipid-Kopfgruppen interpretiert. Weitaus detailliertere Informationen zur atomaren Struktur können von kürzlich durchgeführten Röntgenbeugungsuntersuchungen an oligolamellaren Lipiddoppelschichten erwartet werden,<sup>[9]</sup> die von den geschilderten Unzulänglichkeiten sehr viel weniger betroffen sind.

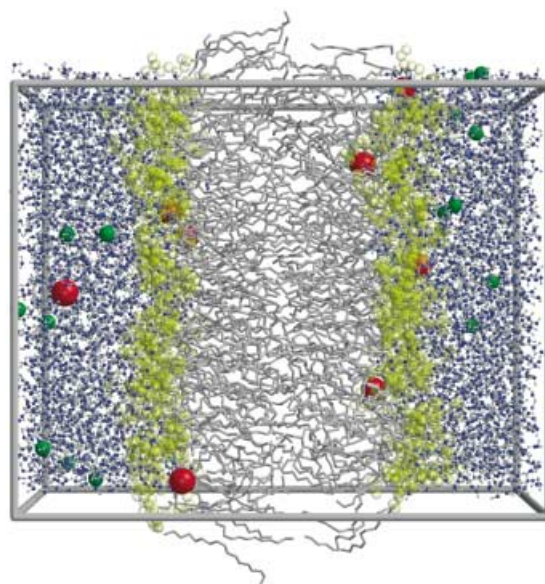
Die Schwierigkeiten auf experimenteller Seite machen den Einsatz theoretischer Studien attraktiv. Tatsächlich haben Moleküldynamik(MD)-Simulationen von Lipiddoppelschichten in Wasserumgebung viel zu unserem Verständnis der Lipidkonformation und -anordnung in den Membranen auf atomarer Ebene beigetragen, und sie stimmten oft quantitativ mit experimentellen Daten überein.<sup>[10–13,15]</sup>

Bislang war es jedoch wegen der langsamen Kinetik der Ionenbindung und -dissoziation an Lipidmembranen, welche eine hinreichende Äquilibration des Simulationssystems während der üblichen erreichbaren Simulationszeitspannen im Nanosekundenbereich verhindert, nicht möglich, MD-Studien zur Ionenbindung an Lipiddoppelschichten durchzuführen.<sup>[14]</sup> Kürzlich gelang uns eine Simulation, die hinreichend lang war, um die Bindung von Natriumionen an die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen von Phospholipiden aufzudecken.<sup>[15]</sup> Diese Studie ergab, dass selbst die Bindung einwertiger Ionen unerwartet langsam abläuft, und sie ließ den Schluss zu, dass der Selbstdiffusionskoeffizient der Lipide unter dem Einfluss von Natriumchlorid reduziert würde, was mittels Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie bestätigt werden konnte.<sup>[15]</sup>

Diese Simulation war jedoch zu kurz, um ausreichend konvergierte Ergebnisse für die Bindung von Calcium zu liefern, was eine Verlängerung der Simulationszeit nötig machte. Wir zeigen nun 200 ns lange MD-Simulationen, die hinreichend konvergiert sind, um die Bindung von Calciumionen an Lipidmembranen analysieren zu können. Weiterhin eignet sich diese Simulation, um Unterschiede im Bindungsverhalten ein- und zweiwertiger Kationen aufzudecken. Schließlich konnten wir mithilfe der Simulationen die für die beiden Ionen sehr unterschiedliche Bindungskinetiken genauer charakterisieren.

Zwei Simulationssysteme (A und B), welche aus jeweils ca. 20000 Atomen bestanden, wurden verwendet (Abbildung 1). Beide Systeme enthielten 128 in einer Lipiddoppelschicht angeordnete POPC-Lipide sowie ca. 5000 Wassermoleküle. Dem System A fügten wir 10 Natrium- und 10 Chloridionen, dem System B 8 Natrium- und 16 Chloridionen hinzu. Alle Ionen wurden an zufällig gewählten Orten in der Wasserphase platziert. Das Natriumchlorid-Simulationssystem wurde bereits an anderer Stelle beschrieben;<sup>[15]</sup> für die vorliegende Studie wurde seine Simulation auf 200 ns verlängert. Die Simulationszeit für System B betrug ebenfalls 200 ns.

Es sei angemerkt, dass die Simulationssysteme relativ klein gewählt werden mussten, um hinreichend lange Simula-

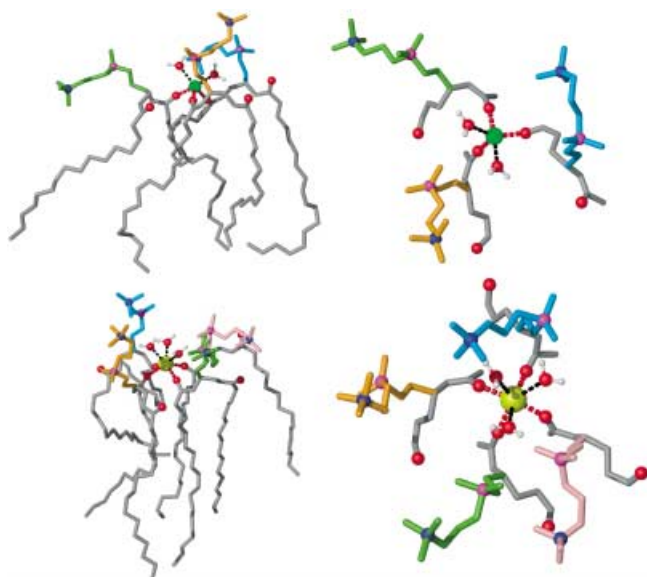


**Abbildung 1.** Momentaufnahme von Simulationssystem B nach 100 ns (128 POPC-Lipide, Kohlenwasserstoffketten grau, Wasser hellblau,  $\text{Ca}^{2+}$  rot,  $\text{Cl}^-$  grün, hydrophile Kopfgruppen gelb).

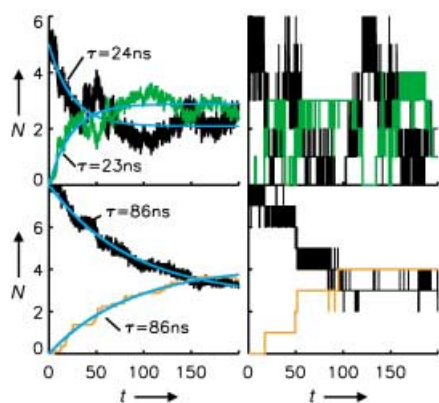
tionszeiten erzielen zu können. Für die gewählte Calciumionenkonzentration (0.089 M) ist die Debye-Hückel-Länge mit  $\lambda_D = 5.9 \text{ \AA}$  jedoch sehr viel kleiner als die Größe der periodischen Box ( $62 \times 62 \times 80 \text{ \AA}^3$ ); daher sollten die Wechselwirkungen zwischen Ionen in benachbarten periodischen Einheitszellen – selbst gegen Ende der Simulation, wenn alle Calciumionen an die Membran gebunden sind ( $\lambda_D = 10.2 \text{ \AA}$ ) – sehr gering sein. Dieser nahezu äquilibrierte Endzustand hat eine relativ geringe Calciumionenkonzentration in der Wasserphase und entspricht daher annähernd physiologischen Bedingungen.

In Abbildung 2 sind Momentaufnahmen unserer Simulationen der Bindung einwertiger (oben) und zweiwertiger Kationen (unten) an die Sauerstoffatome der Lipid-Carbonylgruppen gezeigt. Der Verlauf der Äquilibration der Kationen (Abbildung 3) wird anhand ihrer durchschnittlichen Koordinierung durch Wasser- (schwarz) und Lipid-Carbonylsauerstoffatome (grün, orange) als Funktion der Simulationszeit verdeutlicht. Monoexponentielle Anpassungen (blaue Kurven) an den erhaltenen Verlauf ergeben Bindungszeiten von 23 ns für Natrium- und 86 ns für Calciumionen sowie Gleichgewichts-Koordinationszahlen mit Lipid-Carbonylsauerstoffatomen von 2.9 für  $\text{Na}^+$  und von 4.2 für  $\text{Ca}^{2+}$ .

Die Simulationen ergaben eine sequenzielle Bindung der Lipid-Carbonylsauerstoffatome an die Calciumionen (Abbildung 4). Die Bindung der ersten Carbonylgruppe erfordert, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zunächst die hydrophilen Lipidkopfgruppen durchdringen, und findet bei der gewählten Konzentration innerhalb von 30–40 ns statt (rote Kurve). Nach 200 ns hat etwa die Hälfte der Ionen die bevorzugte Koordination durch mindestens vier Phosphatidylcholinmoleküle erreicht (grüne Kurve). Die roten, blauen und orangefarbenen Kurven stehen für ein-, zwei- und dreifache Lipidkoordinierung.

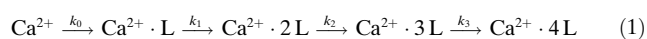


**Abbildung 2.** Typische Momentaufnahme der Koordination von  $\text{Na}^+$  (oben) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (unten) durch Lipid-Carbonylsauerstoffatome (rote unterbrochene Balken) und durch Sauerstoffatome von Wassermolekülen (schwarze unterbrochene Balken). Links: Seitenansicht, rechts: Draufsicht.

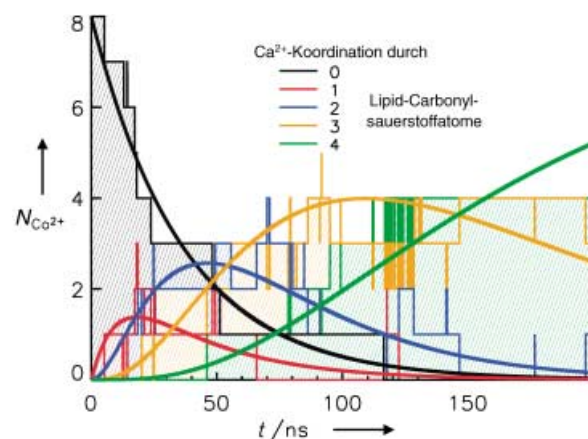


**Abbildung 3.** Gesamtzahl  $N$  an Wasser- (schwarz) und Lipid-Carbonylsauerstoffatomen (grün, orange) innerhalb von 2.8 Å um Natrium- (oben) und von 3 Å um Calciumionen (unten) als Funktion der Simulationszeit  $t$ . Zusätzlich angegeben sind die Relaxationszeiten  $\tau$ , abgeleitet aus der Anpassung monoexponentieller Funktionen (blau) an die Daten. Die rechte Seite zeigt die entsprechenden Größen für repräsentative einzelne Kationen.

Die beobachtete Abfolge von Zwischenstufen legt es nahe, die Bindung der Lipidmoleküle an die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch eine sequenzielle Reaktionsgleichung zu beschreiben [Gl. (1)]. Da in unseren Simulationen der Fluss der sich



bindenden Ionen sehr viel größer ist als derjenige der dissoziierenden, vernachlässigen wir im Folgenden Rückreaktionen, um die Rechnung zu vereinfachen. Die fett gedruckten Linien in Abbildung 4 zeigen Anpassungen der Lösungen dieser Gleichungen an die aus den Simulationen



**Abbildung 4.** Koordination von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Lipid-Carbonylsauerstoffatome als Funktion der Simulationszeit  $t$  ( $N_{\text{Ca}^{2+}}$  ist die Zahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit einer bestimmten Koordinationszahl). Die Farben unterscheiden die Koordination durch Wasser (schwarz), eine (rot), zwei (blau), drei (orange) und vier Lipid-Carbonylgruppen (grün). Ebenfalls gezeigt ist eine Anpassung an die Simulationsdaten (fett gedruckte Kurven), wobei eine schrittweise, sequenzielle Bindung der Calciumionen an zuletzt vier Lipid-Carbonylgruppen angenommen wurde (siehe Text).

gewonnenen Koordinationszahlen, woraus sich die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten  $k_i$  und Bindungszeiten  $\tau_i = 1/k_i$  ergeben. Die erzielte Übereinstimmung liegt vollständig innerhalb der statistischen Streuung für die begrenzte Zahl beobachteter Ereignisse.

Nach der Bindung der ersten Lipid-Carbonylgruppe ( $\tau_0 = 36_{-11}^{+16} \text{ ns}^{[*]}$ ) läuft die zweite Koordinierung deutlich schneller ab ( $\tau_1 = 10_{-4}^{+5} \text{ ns}$ ). Die Koordinierung der dritten und vierten Carbonylgruppe ist dagegen wieder deutlich langsamer, wie man aus den entsprechend höheren Bindungszeiten [ $\tau_2 = 31_{-10}^{+14} \text{ ns}$ ,  $\tau_3 = 107_{-50}^{+90} \text{ ns}$ ] erkennen kann. Eine genauere Untersuchung der Anordnung der entstehenden Komplexe (siehe Abbildung 2) ergab, dass die Bindung des dritten und vierten Lipids zunächst eine starke Reorientierung und eine Optimierung der Lipid-Ionen-Packung erfordert, was für eine entropische Barriere als Grund für die langsame Kinetik spricht. Diese Barriere ist auch der Hauptgrund für die langsame Kinetik des gesamten Bindungsvorgangs. Sättigungseffekte sollten bei höheren Salzkonzentrationen Abweichungen von den genannten Bindungszeiten bewirken. Die Exponenten und Indices an diesen Zahlen beschreiben die Fehlerbalken der Werte.

Für Calcium konnte, wie schon zuvor für Natrium, gezeigt werden, dass die Bildung von Komplexen die Selbstdiffusion der Lipidmoleküle reduziert. Darüber hinaus sagen wir wegen des Anstiegs der Halbwertszeit  $t_{1/2} \propto 1/D_R$  der Rotationskorrelationsfunktion (2) einen niedrigeren Rotationsdif-

$$C_2(t) = \frac{1}{2} \langle 3[p(t)p(0)]^2 - 1 \rangle \quad (2)$$

[\*] Die Exponenten und Indices an diesen Zahlen beschreiben die Fehlerbalken der Werte.

fusionskoeffizienten für die Lipid-Kopfgruppen vorher. Für die Fluktuation des Vektors  $\mathbf{p}$ , der das Phosphor- und das Stickstoffatom der Lipid-Kopfgruppe verbindet, erhöht sich die Halbwertszeit von 0.96 ns ohne Ionen auf ca. 1.83 ns in Gegenwart von 330 mM  $\text{CaCl}_2$  (1.11 ns bei 110 mM  $\text{NaCl}$ ; 1.58 ns bei 330 mM  $\text{NaCl}$ ).

Der unterschiedliche Verlauf der Bindung von einwertigen und zweiwertigen Kationen an Lipidmembranen hat entsprechend unterschiedliche Konformationen der Lipid-Kopfgruppen zur Folge (siehe Abbildung 2). Insbesondere führt die dichte Packung der Lipide um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen zu einem kleineren Winkel (ca.  $60^\circ$ ) zwischen dem Dipolmoment der Kopfgruppen und der Membrannormalen (im Mittel  $63.5^\circ$ , im Gegensatz zu  $69.8^\circ$  ohne Ionen<sup>[15]</sup>). Ferner wurde eine deutliche Erhöhung des Ordnungsparameters der Acylketten dieser Lipide beobachtet.

Unsere Simulationen ergaben ein atomistisches Modell für die Bindung von Natrium- und Calciumionen an neutrale, zwitterionische POPC-Lipidmembranen. Die wichtigsten Merkmale dieses Modells sind die sequenzielle Bindung der Ionen und die Koordinierung von Kationen durch drei oder vier Sauerstoffatome der Lipid-Carbonylgruppen. Diese Vorhersagen können mit großer Wahrscheinlichkeit in naher Zukunft mithilfe von Röntgenbeugungsmessungen an oligolamellaren Membranen und durch Festkörper-NMR-Experimente überprüft werden. Die vorliegenden Resultate sollten es darüber hinaus ermöglichen, quantitative Modelle für biologische Prozesse wie Calciumbindung, neuronale Signaltransduktion oder Membranfusion zu entwerfen und zu verfeinern.<sup>[16]</sup>

## Methoden

Beide Simulationen wurden mit der GROMACS-Programmsammlung<sup>[17]</sup> durchgeführt, wobei das Kraftfeld von Berger et al.<sup>[18]</sup> verwendet wurde. Kraftfeldparameter für die ungesättigten Kohlenstoffatome wurden dem GROMOS87-Kraftfeld entnommen. Der Einsatz der Lincs<sup>[19]</sup> und der Settle-Methode<sup>[20]</sup> erlaubte eine Integrationsschrittweite von 2 fs. Es muss angemerkt werden, dass das verwendete Kraftfeld kein polarisierbares ist; die Beschreibung der Ionen-Carbonyl-Wechselwirkung ist daher möglicherweise ungenau. Entsprechend können die tatsächlichen Bindungsgeschwindigkeiten von den hier berechneten etwas abweichen, vermutlich um einen gemeinsamen Skalierungsfaktor. Die Particle-Mesh-Ewald(PME)-Methode<sup>[21]</sup> wurde verwendet, und die Simulationen wurden im NPT-Ensemble durchgeführt, wobei die Membran und das Lösungsmittel getrennt an ein 300-K-Wärmebad gekoppelt wurden, mit einer halbisotropen Druckkopplung in lateraler und senkrechter Richtung zur Membranoberfläche, wie an anderer Stelle bereits beschrieben wurde.<sup>[15]</sup> Die Koordinationszahlen für die Ionen als Funktion der Simulationszeit wurden mithilfe der kumulativen radialen Verteilungsfunktion bei den Abständen 2.8 Å ( $\text{Na}^+$ ) und 3.0 Å ( $\text{Ca}^{2+}$ ) berechnet.

Die Fehlerbalken ( $1\sigma$ ) der Geschwindigkeitskonstanten  $k_i$  wurden durch vielfach wiederholte Monte-Carlo-Simulationen von Gleichung (1) bestimmt, wobei für  $k_i$  die den oben genannten  $\tau_i$  entsprechenden Werte verwendet wurden sowie, wie auch in der MD-Simulation, acht Calcium-Ionen. Damit erhielten wir hinreichend viele, statistisch unabhängige Replika der in Abbildung 4 gezeigten Daten. Für jedes dieser Replika wurden vier Geschwindigkeitskonstanten  $k_i$  berechnet, wobei das gleiche Anpassungsverfahren wie bei den MD-Simulationen angewendet wurde. Die daraus bestimmte statistische Streuung der  $k_i$  entspricht dem zu erwartenden statistischen Fehler der aus den MD-Simulationen gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten. Man beachte, dass die Streuung auf einer logarithmischen Skala berechnet wurde, die zur Beschreibung von Geschwindigkeitskonstanten besser geeignet ist als eine lineare Skala; daher sind die Fehlerbalken nicht symmetrisch.

Alle Simulationen wurden auf einem Dual-Prozessor-PC mit zwei Prozessoren vom Typ Athlon MP 2200+ durchgeführt; für 1 ns Simulationszeit waren ca. 26 h Rechenzeit erforderlich.

Eingegangen am 8. September 2003 [Z52784]

Online veröffentlicht am 4. Dezember 2003

**Stichwörter:** Calcium · Kationen · Membranen · Moleküldynamik · Phospholipide

- [1] D. Papahadjopoulos, S. Nir, N. Düzgünes, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1990**, 22, 157.
- [2] J. A. Szule, S. E. Jarvis, J. E. Hibbert, J. D. Spafford, J. E. A. Braun, G. W. Zamponi, G. M. Wessel, J. R. Coorsen, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 24251.
- [3] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, **2002**.
- [4] H. Akutsu, J. Seelig, *Biochemistry* **1981**, 20, 7366.
- [5] C. Altenbach, J. Seelig, *Biochemistry* **1984**, 23, 3913.
- [6] H. Binder, O. Tschörnig, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, 115, 39.
- [7] C. A. N. L. Herbet, R. V. McDaniel, *Biophys. J.* **1984**, 46, 677.
- [8] R. J. Clarke, C. Lüpfert, *Biophys. J.* **1999**, 76, 2614.
- [9] T. Salditt, M. Vogel, W. Fenzl, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 178101.
- [10] P. van der Ploeg, H. J. C. Berendsen, *J. Chem. Phys.* **1982**, 76, 3271.
- [11] H. Heller, M. Schaefer, K. Schulten, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 8343.
- [12] R. M. Venable, Y. Zhang, B. J. Hardy, R. W. Pastor, *Science* **1993**, 262, 223.
- [13] D. P. Tieleman, S. J. Marrink, H. J. C. Berendsen, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1331, 235.
- [14] S. A. Pandit, D. Bostick, M. L. Berkowitz, *Biophys. J.* **2003**, 84, 3743.
- [15] R. A. Böckmann, A. Hac, T. Heimburg, H. Grubmüller, *Biophys. J.* **2003**, 85, 1647.
- [16] R. Jahn, H. Grubmüller, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14, 488.
- [17] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Model.* **2001**, 7, 306.
- [18] O. Berger, O. Edholm, F. Jähnig, *Biophys. J.* **1997**, 72, 2002.
- [19] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, *J. Comput. Chem.* **1997**, 18, 1463.
- [20] S. Miyamoto, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 952.
- [21] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 10089.