

Universität Leipzig

Biophysikalisches Praktikum

Herstellung von Liposomen und die Untersuchung der kationeninduzierten Membranfusion durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer

Institut für Medizinische Physik und Biophysik

Direktor: Prof. Dr. D. Huster

Härtelstraße 16-18

D-04107 Leipzig

Verantwortlicher: Dr. Christian Berger

Wintersemester 2010/2011

Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig

Tel: (0341) 97 15 740, Fax: (0341) 97 15 709

E-Mail: christian.berger@medizin.uni-leipzig.de

Herstellung von Liposomen und die Untersuchung der kationeninduzierten Membranfusion durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

1 Einleitung

Zellmembranen bestehen aus einer fluiden Doppelschicht aus Phospholipiden und Cholesterol, in die Proteine und eine Vielzahl anderer Moleküle eingebettet sind (Abb. 1). Zur Untersuchung verschiedenster Prozesse an Zellmembranen werden aufgrund der hohen Komplexität der biologischen Systeme häufig Phospholipidvesikel als Modellsysteme verwendet.

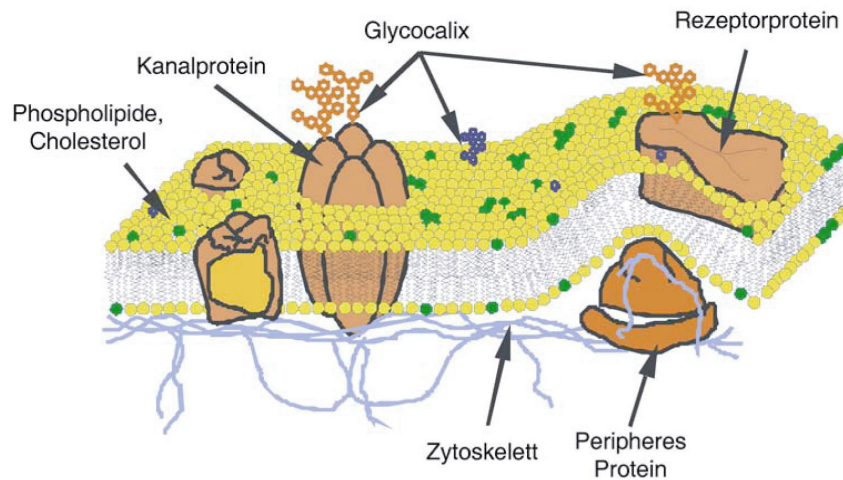


Abb. 1: Das Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicholson beschreibt die Zellmembran als flüide Doppelschicht aus Phospholipiden und Cholesterol, in die intrinsische Membranproteine eingebettet sind. Zusätzlich binden periphere Proteine an die Membranoberfläche.

Ein Phospholipidmolekül ist aus der polaren Kopfgruppe, dem Glycerol-Rückgrat sowie den beiden unpolaren, hydrophoben Alkylketten aufgebaut (Abb. 2). In diesem Versuch verwenden Sie das negativ geladene Phosphatidylglycerol (PG), das aus natürlichen Zellmembranen (Hühnerei) isoliert wurde und daher in einer Mischung aus verschiedenen Alkylketten vorliegt.

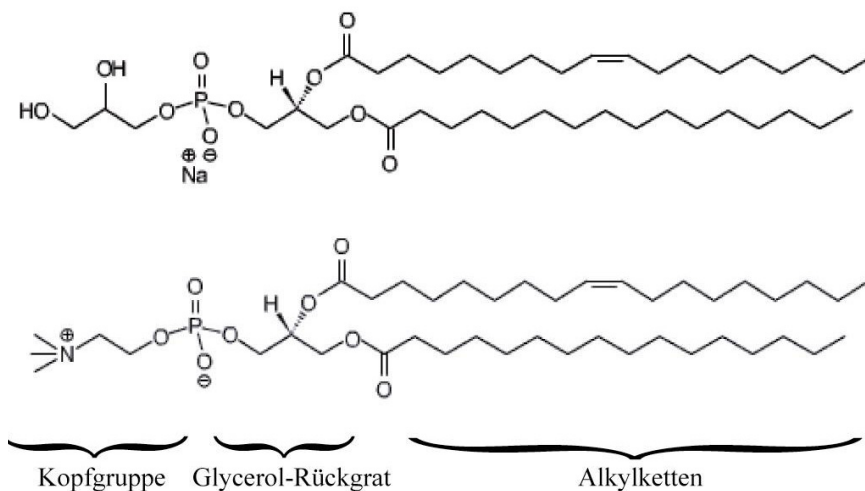


Abb. 2: Chemische Struktur eines Phosphatidylglycerols (oben) und eines Phosphatidylcholins (unten). Die Länge der Alkylketten und die Anzahl der Doppelbindungen können variieren.

Aufgrund ihres amphiphilen Charakters (polare Kopfgruppe und unpolare Alkylketten) organisieren sich Phospholipide in wässriger Lösung spontan in verschiedenen Überstrukturen, um die freie Enthalpie beim Lösen der hydrophoben Alkylketten in Wasser zu minimieren (hydrophober Effekt). Die Ausbildung der Überstrukturen ist von den Wechselwirkungen zwischen den Lipiden (elektrostatische, van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen), ihrer äußeren Form (Größe der Kopfgruppe im Vergleich zu den Lipidketten) sowie dem Wassergehalt der Membran und der Temperatur abhängig. Werden die hier verwendeten Phospholipide in Wasser überführt, entstehen spontan multilamellare Vesikel (MLV), die mittels verschiedener Methoden in einschichtige Vesikel (Liposomen) verschiedener Größe überführt werden können (Abb. 3). In den sich in wässriger Umgebung gebildeten multilamellaren (mehrschichtigen) Vesikeln sind mehrere Lipiddoppelschichten zwiebelschalenartig angeordnet. MLVs können daher sehr große Durchmesser von bis zu $\sim 10 \mu\text{m}$ erreichen.

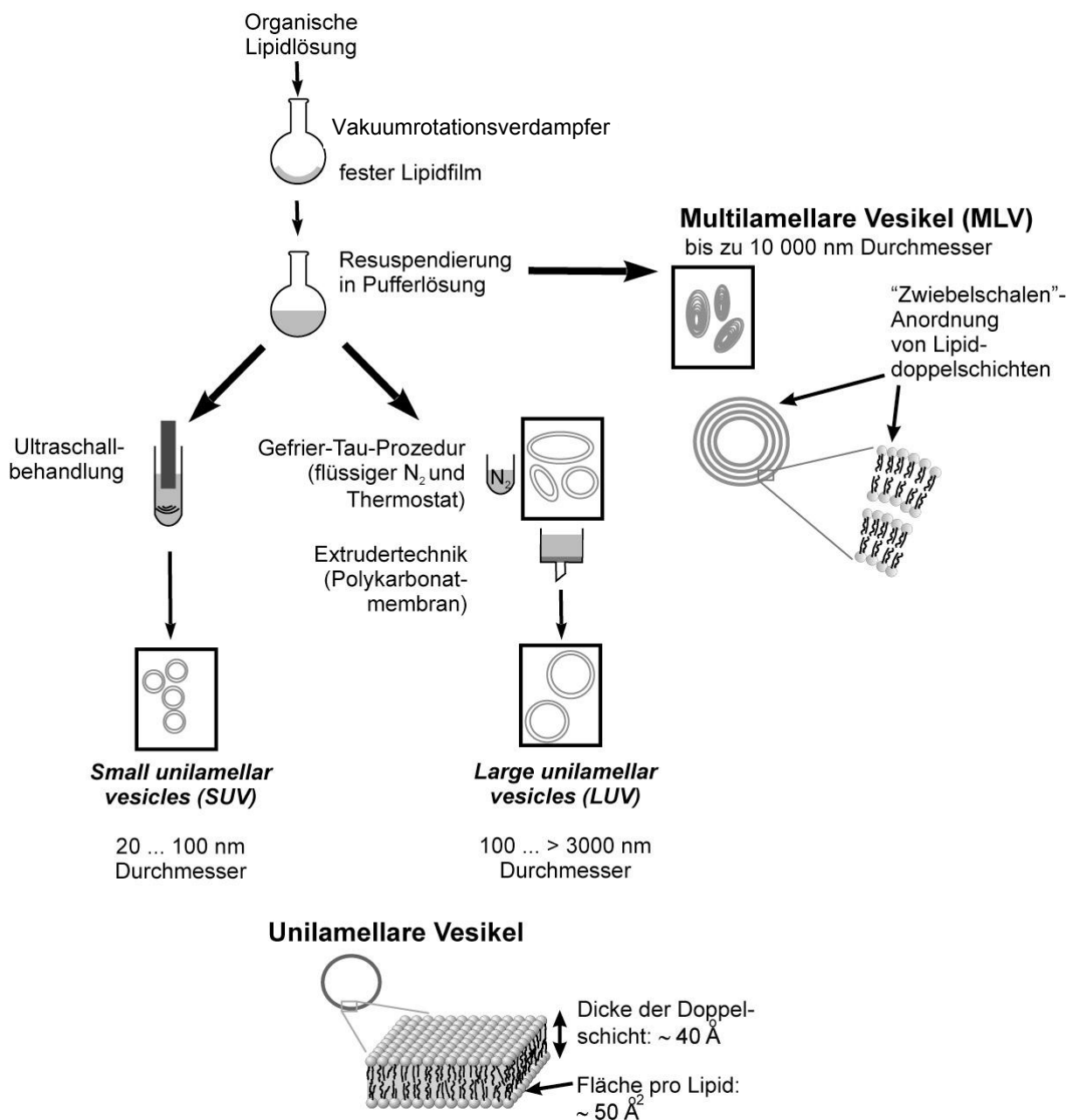


Abb. 3: Protokoll zur Herstellung und Klassifizierung von Lipidvesikeln.

Werden die MLVs mit Ultraschall behandelt, brechen die Vesikel auf, und es bilden sich kleine einschichtige Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUV) mit einem Durchmesser von 20 bis ca. 100 nm. Eine andere Methode zur Herstellung von Liposomen ist das sogenannte Gefrier-Tau-Verfahren. Bei wiederholtem Einfrieren der Vesikelsuspension in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen entsteht eine Suspension einschichtiger Liposomen mit verschiedenen Größen. Wird diese mehrfach mit hohem Druck durch eine Polykarbonatmembran mit Poren definierter Größe gepresst (Extrudertechnik), lässt sich eine Suspension von Liposomen einheitlicher Größe (typisch sind 100 nm) herstellen.

Liposomen stellen einfache Modelle für Zellmembranen dar. Sie können je nach Präparation z.B. Proteine und ähnliche Moleküle enthalten und werden als Transportvehikel für pharmakologische Wirkstoffe verwendet.

2 Grundlagen

2.1 Membranfusion

Membranfusionen sind Bestandteil wichtiger zellbiologischer Prozesse wie Exozytose, Endozytose, dem intrazellulären Vesikeltransport, der Befruchtung sowie der Virus- und Bakterieninfektion von Zellen. Ihr molekularer Mechanismus ist jedoch bis heute noch nicht vollständig verstanden. Im mehrstufigen Modellschema zur Fusion von Phospholipidvesikeln (Abb. 4) spielen verschiedene physikalische Wechselwirkungen zwischen den Vesikeln und Triggermolekülen eine Rolle. In diesem Versuch wird die Vermischung der Vesikelmembranen bei Fusion unter dem Einfluss von Ca^{2+} -Ionen mit Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

A	Aggregation	unspezifische Wechselwirkungen (van-der-Waals-Anziehung, reduzierte elektrostatische Abstoßung)
B	direkter molekularer Kontakt der Oberflächen	reduzierte hydrostatische Abstoßung
C	lokale Störung der Lipiddoppelschicht	u.a. hydrophobe Wechselwirkungen
D	Mischung der Liposomen <ul style="list-style-type: none"> • Mischung der Lipide der äußeren Doppelschicht evtl. ohne echte Fusion (Semifusion) • Vermischung der Liposomeninhalte (vollständige „echte“ Fusion) 	

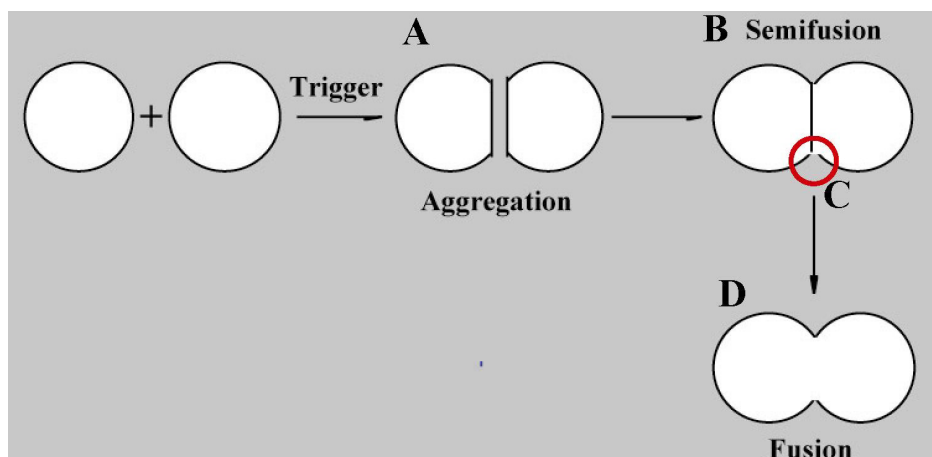


Abb. 4: Schema der Membranfusion. Als Trigger für die Fusion kommen Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , La^{3+} , ...), kalziumbindende Proteine, Virusproteine, Peptide oder Polymere in Frage.

2.2 Fluoreszenzspektroskopie

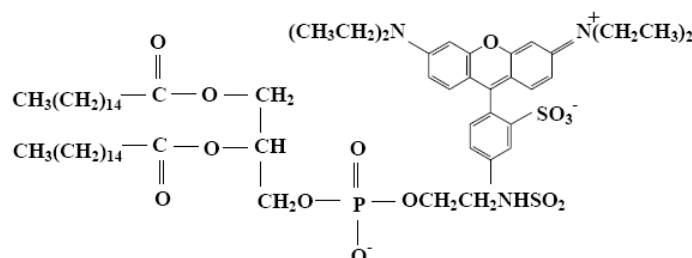
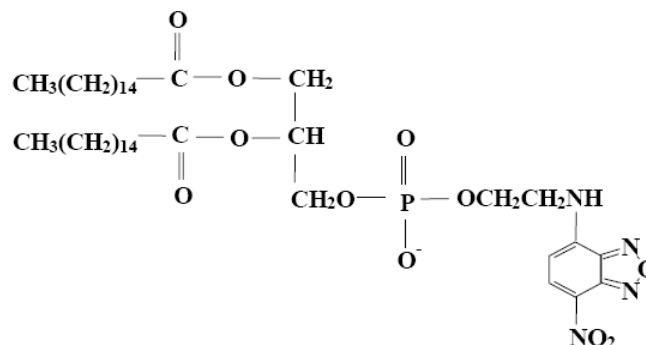
Grundlage der Fluoreszenzspektroskopie ist die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Absorbiert ein Molekül elektromagnetische Strahlung mit einer Frequenz im ultravioletten oder sichtbaren Bereich, führt das zur Anregung von Übergängen zwischen den Elektronenenergieniveaus des Moleküls. Die einfallende Strahlung hebt ein Elektron aus einem energetisch niedrigeren in ein energetisch höheres Orbital, was zu einem angeregten, energiereicheren Zustand des Moleküls führt.

Im Anschluss an die Absorption finden verschiedene Deaktivierungsprozesse statt, durch welche die Abgabe der aufgenommenen Energie erfolgt. Diese Energieabgabe kann entweder strahlungslos oder unter Aussendung von Strahlung verlaufen. Ein Molekül besitzt daher ein Absorptions- und ein Emissionsspektrum. Das Emissionsspektrum ist aufgrund der kleineren Quantenenergien gegenüber dem Absorptionsspektrum zu größeren Wellenlängen verschoben.

Fluoreszenz wird meist bei aromatischen oder heterozyklischen Molekülen beobachtet. Insbesondere Moleküle mit zwei oder mehreren kondensierten Ringen haben für diese Vorgänge eine große Bedeutung. Solche Moleküle werden auch als Fluorophore bezeichnet.

In diesem Versuch wird die Membranfusion mit Hilfe von Fluoreszenzsonden untersucht, die bei der Präparation der Liposomen in die Modellmembranen eingebaut werden. Hierbei wird die Vermischung der Membranlipide, wie sie im Zuge einer Membranfusion oder bei einer starken Aggregation von Liposomen auftritt, mit Hilfe des NBD-Rhodamin-Mischungsassays nachgewiesen. Dazu sind die Fluorophore an die Kopfgruppe von Phospholipiden gebunden (Abb. 5).

NBD-PE



Rhodamine-PE

Abb. 5: Chemische Struktur von Rhodamin-PE und NBD-PE

Das Donatormolekül NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol) stellt einen Fluorophor dar, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 460 nm liegt. Das Emissionsmaximum von NBD liegt mit 520 nm im Absorptionsmaximum von Rhodamin (Rho). Die Anregungsenergie

des Donatormoleküls kann also bei einem hinreichend kleinen Abstand zwischen den Molekülen strahlungslos auf das Akzeptormolekül Rhodamin übertragen werden (Förstermechanismus). Das dadurch seinerseits angeregte Rhodamin emittiert dann die Strahlung mit dem Emissionsmaximum bei 588 nm (Abb. 6).

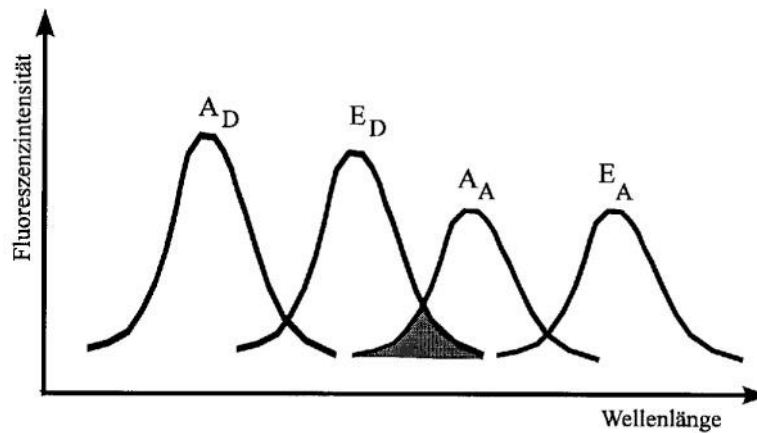


Abb. 6: Absorptions- und Emissionsspektrum eines Donator-Akzeptor-Paares. A bezeichnet das Absorptionsspektrum, E das Emissionsspektrum. Die Indizes bezeichnen Donator (D) und Akzeptor (A).

Tritt eine Vermischung von Membranlipiden im Zuge einer Fusion von Liposomen mit und ohne Fluorophor auf, so werden die Fluorophore durch laterale Diffusion über die nun größere Oberfläche verdünnt. Der Abstand zwischen Donatoren und Akzeptoren wird vergrößert, und die Transfereffizienz sinkt. Die Akzeptorfluoreszenz nimmt ab, und die Donatoreigenfluoreszenz nimmt zu (Abb. 7).

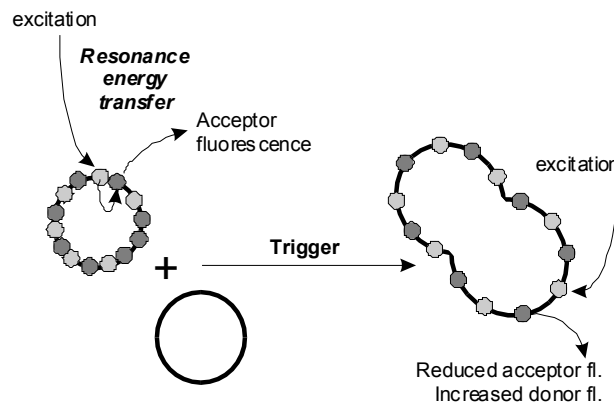


Abb. 7: Zum Prinzip des Rhodamin-NBD-Mischungsassays.

Die Berechnung der Mischungsausbeute M erfolgt nach folgender Gleichung:

$$M = \frac{\left(\frac{I_{520}^{Ca}}{I_{588}^{Ca}} - \frac{I_{520}^0}{I_{588}^0} \right)}{\left(\frac{I_{520}^{Triton}}{I_{588}^{Triton}} - \frac{I_{520}^0}{I_{588}^0} \right)} \cdot 100\% .$$

In die Berechnung gehen sowohl Donator- (I_{520}) als auch Akzeptorfluoreszenzintensität (I_{588}) ein. Dabei sind die Intensitäten in Abwesenheit von Kalziumionen mit „0“ indiziert, die mit „Triton“ indizierten Werte sind die Fluoreszenzintensitäten nach der Lysierung mit 1 vol% Triton X-100. Der vom System hierdurch eingenommene Zustand ist durch eine sehr starke

Verdünnung der Sonden gekennzeichnet und wird als 100%-Wert der Lipidmischung angenommen.

3 Ablauf

3.1 Liposomenpräparation

Material:

Egg PG	$M_w = 771 \text{ g/mol}$
Rho-PE	$M_w = 1276 \text{ g/mol}$
NBD-PE	$M_w = 898 \text{ g/mol}$

- Stellen Sie 0,5 L der Pufferlösung 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,4 her. Berechnen Sie die Zugaben **vor Praktikumsbeginn**. ($M_{\text{HEPES}} = 238,3 \text{ g/mol}$, $M_{\text{NaCl}} = 58,44 \text{ g/mol}$)
- Stellen Sie zunächst jeweils eine Probe multilamellarer Vesikel (MLV) aus PG mit und ohne Fluoreszenzmarker her.
- Die Phospholipide liegen als Pulver vor. Wiegen Sie die benötigten Mengen der Lipide ein, um ca. 3 ml Vesikelsuspension einer Konzentration von 1 mg/ml zu erhalten. Für die MLV ohne Fluoreszenzmarker nehmen Sie diese direkt im Puffer auf.
- Für die Vesikel mit Fluoreszenzmarkern stellen Sie zunächst eine Chloroformlösung (Arbeiten Sie unter dem Abzug!) der Lipide in der gleichen Menge und Konzentration wie oben her, der Sie je 1 mol% Rhodamin-PE und NBD-PE (Abb. 5) zusetzen. Evaporieren Sie das Chloroform im Rotationsverdampfer. Lösen Sie den so hergestellten Lipidfilm mit Pufferlösung von der Glaswand ab. Berechnen Sie die benötigten Mengen **vor Praktikumsbeginn**. ($\text{Konz}_{\text{Rho-PE}} = 1 \text{ mg/ml}$, $\text{Konz}_{\text{NBD-PE}} = 1 \text{ mg/ml}$)
- Die Lipidsuspensionen werden für ca. 30 min bei 37°C im Schüttelbad inkubiert.
- Teilen Sie die MLV-Suspensionen auf (2 ml für LUV, 1 ml für SUV) und stellen Sie daraus mittels Ultraschalltechnik *small unilamellar vesicles* (SUV) bzw. mittels Extrudertechnik *large unilamellar vesicles* (LUV) her.
- **Präparation von SUV:** Ultraschallbehandlung (GEHÖRSCHUTZ verwenden! Eiswasser zur Kühlung der Probe, Spitze säubern, Spitze in die Mitte des Röhrchen - keine Berührung mit dem Rand!), 15 min - cycle 0,5 - Leistung bis zu 100% (langsam vom Minimum steigern, um ein Herausspritzen zu vermeiden).
- **Präparation von LUV (100 nm Durchmesser):** 10 Gefrier-Tau-Zyklen mit flüssigem Stickstoff, Lipex Biomembranes Extruder: Extruder säubern, 2 Polycarbonatmembranen einlegen, Stickstoffdruck 20-25 bar, vorher 2x mit Puffer spülen, 5 Extrusionszyklen.

3.2 Messung der Membranfusion mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

- Messen Sie die Vermischung der Lipidmembranen für die verschiedenen hergestellten Systeme unter Einfluss von Ca^{2+} -Ionen, d.h. für LUV/LUV*, LUV/SUV*, SUV/LUV*, SUV/SUV* (*=markierte Vesikel)!
- Mischen Sie hierzu markierte und unmarkierte Vesikel im Verhältnis 1:1 (je 20 μl) mit 2 ml Puffer in der Küvette (Wie hoch ist die molare Lipidkonzentration in der Küvette?).
- Die Messung der Spektren erfolgt am Fluoromax 2 Spektrometer (Anregung bei 460 nm, Aufzeichnung der Spektren von 500-630 nm, Inkrement 1nm, Integrationszeit 0,2 s, Temperierung 37°C).

- Messen Sie Fluoreszenzspektren für eine Ca^{2+} -Konzentration von 0/0,2/0,5/1/2/5/8/10/20 und 50 mM in der Küvette. (Die jeweiligen Zugabemengen an Ca^{2+} -Lösung werden mit Hilfe eines speziellen Programms berechnet (Stammlösungen: 10/100/1000 mM Ca^{2+} .)
- Messen Sie ein Fluoreszenzspektrum nach Zugabe von 1 vol% Triton X-100 Lösung (20%ige Stammlösung) für die Werte bei vollständiger Lipidmischung.
- Werten Sie die Intensitäten bei 520 und 588 nm für Ausgangsspektrum (I^0), Tritonspektrum (I^{Triton}) und jedes Spektrum der verschiedenen Ionenkonzentrationen (I^{Ca}) aus. Berechnen Sie die Mischungsausbeute M entsprechend der obigen Gleichung und stellen Sie diese graphisch in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration dar (halblogarithmisch).

Protokoll

1. Zielstellung

2. Methode

3. System

4. Präparation

5. Messung

Wertetabelle

Beobachtungen

Spektren-Ausdruck

Ergebnis-Grafik

6. Diskussion