

Stefanie Vehring
Nele Alder-Baerens
Ursula Muschick
Thomas Pomorski

FLIP-FLOP DER LIPIDE

Auf der Suche nach Lipidtransportern und ihrer biologischen Funktion

Die Juniorprofessur »Zellbiophysik« stellt sich vor

Zellen von Pflanzen, Tieren und Menschen verfügen über ein komplexes System verschiedener Membranen (Abb. 2). Durch die Plasmamembran wird eine Zelle von ihrer Umgebung abgegrenzt und ein kontinuierlicher Stoff- und Informationsaustausch ermöglicht. Intrazelluläre Membranen gliedern die Zelle in zahlreiche Kompartimente. Ohne diese Unterteilung in einzelne Funktionsräume wäre die große Anzahl der biochemischen Reaktionen und ein geordneter Stoffwechsel nicht möglich. Unsere Untersuchungen an der Bäckerhefe dienen dazu, die Bildung, Aufrechterhaltung und Funktionen der einzelnen Membranstrukturen und ihrer Transportsysteme in Zellen zu verstehen.

Alle biologischen Membranen besitzen eine gemeinsame Grundstruktur. Es ist eine Doppelschicht aus über hundert verschiedenen Lipiden. Die meisten Membranlipide gehören zur Klasse der Phospholipide. Sie besitzen einen hydrophilen (wasserliebenden) Kopf aus einer Phosphatgruppe und zwei hydrophobe (wasserabweisende) Fettsäureketten. In wässrigen Lösungen formen diese Moleküle spontan eine bimolekulare Schicht, in der die Fettsäureketten der Lipide einen hydrophoben Kernbereich bilden und die hydrophilen Köpfe dem Wasser zugewandt sind. Zusätzlich sind in biologischen Membranen Proteine eingelagert, die einen geregelten Transport durch diese Membranen ermöglichen oder wichtige enzymatische Reaktionen katalysieren.

Lipiddynamik in biologischen Membranen

Die meisten Lipide und Membranproteine entstehen am endoplasmatischen Reticulum (ER), einem weitverzweigten Membransystem, das sich durch das Cytoplasma eukaryotischer (kerntragender) Zellen zieht und einen einzigen Innenraum, das ER-Lumen, umschließt. Die verschiedenen Phospholipide werden dabei ausschließlich auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran produziert. Um ein gleichmäßiges Wachstum der Lipiddoppelschicht zu gewährleisten, muss ein Teil der neu synthetisierten Lipide auch auf die lumenale Hälfte der Membran verteilt werden. Ein solcher Seitenwechsel von Lipidmolekülen wird als Flip-Flop bezeichnet und umfasst sowohl die Einwärtsbewegung (Flip) als auch die Auswärtsbewegung (Flop). Obwohl für die Bildung von Membranen unerlässlich, ist eine Flip-Flop-Bewegung energetisch sehr ungünstig, da die Lipide mit ihren polaren Kopfgruppen durch das hydrophobe Membraninnere wandern müssen. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Wechsel durch membranständige Transportproteine vermittelt wird, die man als Flippasen bezeichnet. Obwohl im ER bisher keine Flippasen identifiziert werden konnten, scheinen diese Proteine ohne direkten Energieverbrauch schnell und gleichmäßig die verschiedenen Phospholipide zwischen den Membranhälften umzuverteilen.

Im Gegensatz zur ER-Membran sind in der Plasmamembran nahezu aller eukaryotischen Zellen die Phos-

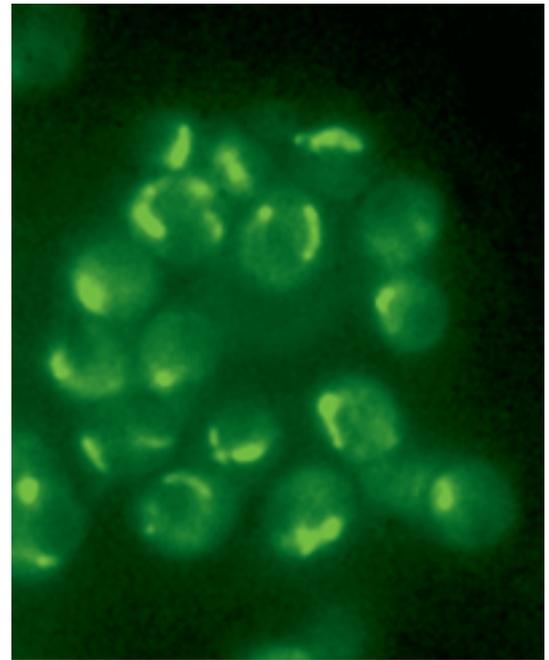


Abb. 1

Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden mit einer grün fluoreszierenden Lipidsonde inkubiert, um deren Aufnahme in das Zellinnere zu untersuchen. Die Lipidsonde hat sich insbesondere in den Mitochondrien der Zellen angereichert. Eine einzelne Zelle hat einen Durchmesser von etwa 10 μm .

pholipide überraschenderweise zwischen den Membranhälften nicht gleichverteilt. Besonders asymmetrisch ist die Anordnung des Phosphatidylserins: Dieses Lipid ist ausschließlich auf der inneren, d.h. der dem Cytoplasma zugewandten Membranhälfte zu finden. Veränderungen in der asymmetrischen Verteilung kontrollieren zahlreiche physiologische Prozesse. So ist der Verlust der Lipidasymmetrie und das damit verbundene Auftreten von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche ein Merkmal alternder Zellen und dient der Erkennung sowie Eliminierung dieser Zellen durch Makrophagen (Fresszellen). Für den Aufbau und Erhalt der asymmetrischen Lipidverteilung wird ein aktiver Transport von Lipiden durch spezifische energiegetriebene Flippasen verantwortlich gemacht. Solche Transportproteine nutzen die Energie, die bei der Spaltung der energiereichen Verbindung Adenosintriphosphat (ATP) frei wird, um Lipide auf einer Seite der Membran anzureichern. Untersuchungen zur Chemoresistenz von Tumorzellen führten zur Identifizierung von ATP-getriebenen Proteinen aus der Familie der ABC-Transporter, die einen auswärts gerichteten Transport von Lipiden zur Zelloberfläche vermitteln. Für die Anreicherung von Phosphatidylserin in der cytoplasmatischen Plasmamembranhälfte wird dagegen die Aktivität eines anderen Transportproteins angenommen. Es konnte bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Mögliche Kandidaten gehören zu einer neuen Untergruppe von P-Typ ATPasen, einer Proteinfamilie, die bisher nur mit dem aktiven Transport von Ionen über biologische Membranen in Verbindung gebracht wurde.

Viele Vertreter aus den Familien der ABC-Transporter und P-Typ ATPasen sind beim Menschen von medizinischer Relevanz. So ist zum Beispiel ein Defekt in einem

ABC-Transporter (CFTR-Protein), welcher an der Aufrechterhaltung des Chloridhaushalts in Lungenzellen beteiligt ist, die Ursache für die *Mukoviszidose*. Bei Patienten mit einer erblichen Lipidstoffwechselstörung (*intrahepatische Cholestase*) scheint ein Mitglied der P-Typ ATPasen in seiner Funktion defekt zu sein. Dadurch kommt es zu Beeinträchtigungen in der Bildung von Gallenflüssigkeit durch die Leberzellen. Ein Funktionsverlust eines anderen Vertreters aus dieser Familie wird beim Menschen mit dem *Angelman-Syndrom* in Verbindung gebracht, einem neurologischen Gendefekt, der durch eine schwere geistige Behinderung gekennzeichnet ist. Wie die Defekte mit der vermuteten biochemischen Funktion dieser Transportproteine in Verbindung stehen, ist bisher nicht bekannt. Ein weiteres hochaktuelles Problem ist die Resistenz von Tumorzellen und Parasiten gegenüber Medikamenten, auch hier sind oft ABC-Transporter und P-Typ ATPasen beteiligt.

Lipidtransportern auf der Spur

In unserem Labor arbeiten wir deshalb mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, des DAAD und der Schering Forschungsgesellschaft intensiv an der Identifizierung und Charakterisierung von lipidtransportierenden Proteinen. Enge Kooperationen bestehen mit der Arbeitsgruppe »Molekulare Biophysik« am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin, mit dem Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum, mit der Universität Utrecht in den Niederlanden sowie dem Institut für Parasitologie und Biomedizin in Spanien. Durch gemeinsame Anstrengungen hoffen wir, die Ursachen dieser Funktionsstörungen aufzuklären und deren biochemische Folgen besser zu verstehen.

Für unsere Untersuchungen wählten wir die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser einzellige eukaryotische Mikroorganismus ist ein bewährtes Modellsystem der zellulären Grundlagenforschung. Er entspricht in seinem Aufbau und in vielen grundlegenden zellulären Vorgängen den höheren Eukaryoten Pflanzen, Tieren und Menschen. Um den Lipidtransport über zelluläre Membranen messbar zu machen, verwenden wir u.a. von uns synthetisierte Lipidsonden, die in ihrem Grundaufbau aus hydrophilem Kopf mit zwei hydrophoben Fettsäureketten den natürlichen Phospholipiden entsprechen. Eine dieser Fettsäuren trägt jedoch zusätzlich eine fluoreszierende (leuchtende) Gruppe, die eine Lokalisierung und Verfolgung der Sonde erlaubt. Nach Zugabe dieser Lipidsonden zu Hefezellen lässt sich beispielsweise unter dem Mikroskop für Phosphatidylserin eine schnelle Aufnahme und Anreicherung beobachten, die auf einem Transport über die Plasmamembran der

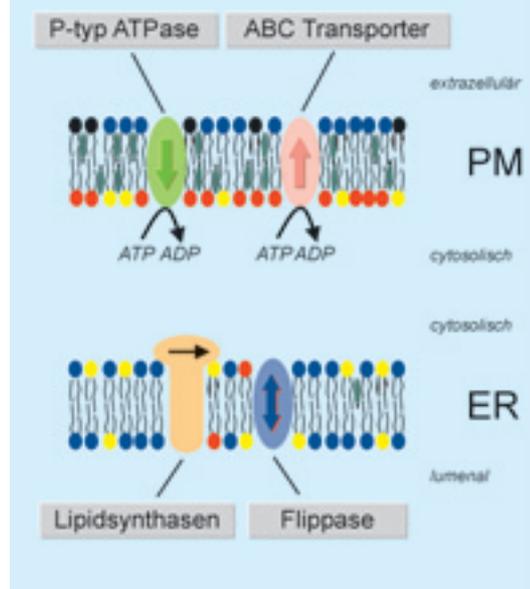
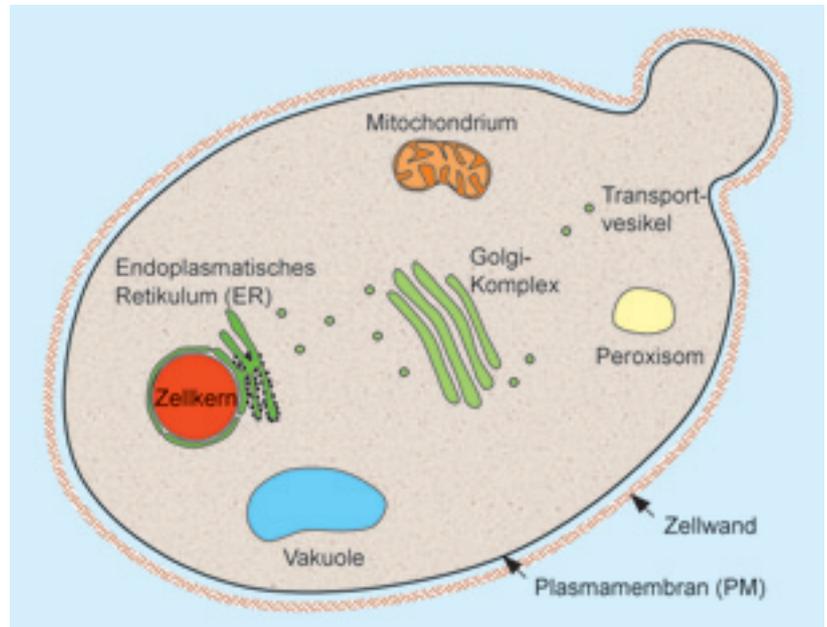
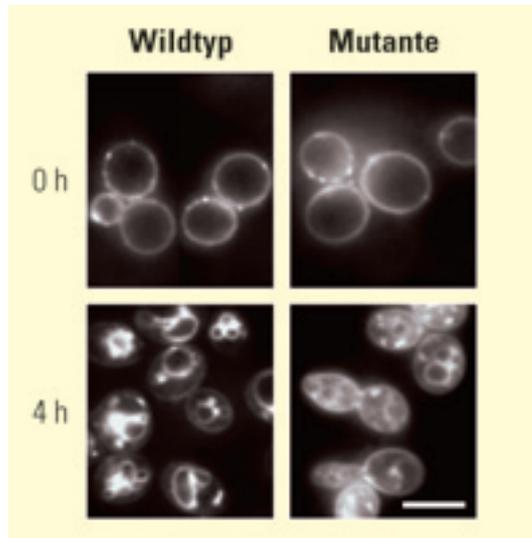


Abb. 2 Hefezellen besitzen bereits eine komplexe Unterteilung, wie sie im Prinzip auch in Zellen von Pflanzen, Tieren und Menschen gefunden wird. Neben der Plasmamembran (PM) haben diese Organismen in ihrem Inneren weitere, durch eine Membranhülle vom übrigen Zellraum abgegrenzte Kompartimente, wie z.B. das Endoplasmatische Retikulum (ER) (Bild oben). Die verschiedenen Membranen unterscheiden sich erheblich in der Zusammensetzung und Anordnung ihrer Lipide (Bild unten). Unterschiedliche Membranproteine vermitteln den Transport von Lipiden zwischen beiden Membranhälften und regulieren dadurch deren Verteilung.

Zellen beruht (Abb. 1). Auf der Suche nach den verantwortlichen Transportproteinen konzentrieren wir uns gegenwärtig auf die bereits erwähnte Untergruppe von P-Typ ATPasen. Dabei konnten wir zwei Mitglieder in der Plasmamembran der Hefe identifizieren. Ihr gezieltes Ausschalten verhindert die Aufnahme bestimmter fluoreszierenden Lipidsonden über die Membran. Dieser Befund unterstützt unsere Vermutung, dass die beiden P-Typ ATPasen als Lipidtransporter in der Plasmamembran der Hefe fungieren.

Abb. 3

Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden mit einem fluoreszierenden Endozytosemarker (FM4-64) angefärbt, um den Vesikeltransport in das Zellinnere zu untersuchen. Der Mutante fehlen, im Gegensatz zum Wildtyp, zwei P-Typ ATPasen in der Plasmamembran. Unmittelbar nach der Markierung befindet sich die Probe ausschließlich in der Plasmamembran der Zellen. Nach einer Inkubation von 4 Stunden hat sich der Farbstoff in Wildtyp-Zellen fast vollständig auf die Membran der Vakuole umverteilt, während in den Mutanten-Zellen noch ein beträchtlicher Anteil des Markers in der Plasmamembran lokalisiert ist. Balken, 10 μm .



Einblick in die physiologische Funktion

Welche biologische Funktion könnte der gerichtete Transport von Lipiden in zellulären Membranen haben? Erste Hinweise erhielten wir aus Untersuchungen zur Endozytose, einem essenziellen Vorgang, der der Zelle ermöglicht, große Moleküle aufzunehmen. Dabei kommt es zu einer Einstülpung eines kleinen Abschnitts der Plasmamembran und der Bildung eines intrazellulären membranbegrenzten Vesikels. Mit Hilfe eines Farbstoffes (FM4-64) konnten wir zeigen, dass dieser Vorgang in Zellen, denen die beiden ATPasen in der Plasmamembran fehlen, beeinträchtigt ist (Abb. 3). Dies weist auf eine Beteiligung der Transporter und des aktiven Transports von Membranphospholipiden hin. Bei der Bildung eines der Endozytosevesikel ist aufgrund der Membrankrümmung eine Flächenvergrößerung der inneren Hälfte der Lipiddoppelschicht erforderlich, die durch einen gerichteten Transport von

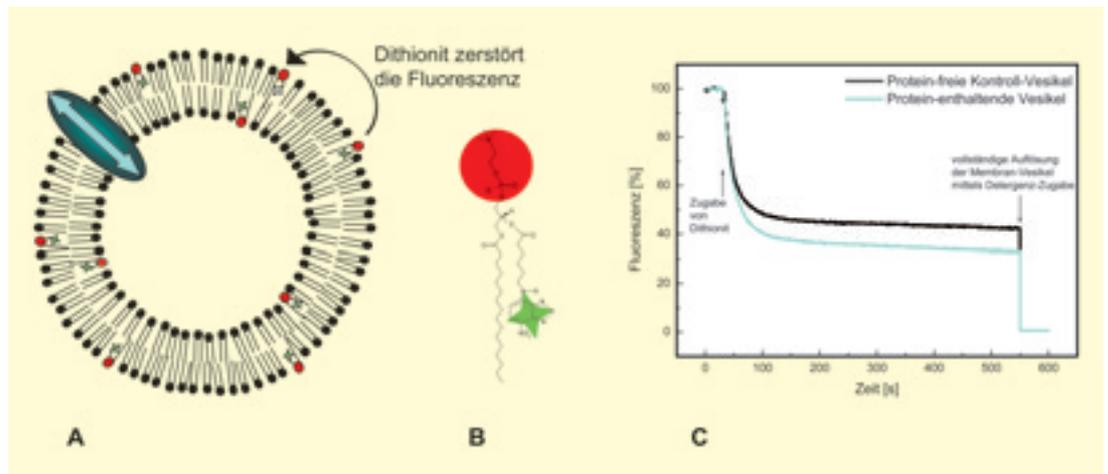
spezifischen Lipiden hergestellt werden kann. Im Hinblick auf die kritische Funktion der ATPasen bei der Bildung von Endozytosevesikeln ist es wahrscheinlich, dass die Aktivität dieser Proteine einer zellulären Regulation unterliegt. Interessanterweise wurde vor kurzem ein weiteres Protein in der Hefe identifiziert, das am einwärts gerichteten Lipidtransport über der Plasmamembran beteiligt, jedoch kein aktiver Transporter ist. Wir vermuten, dass dieses Protein eine regulatorische Untereinheit der ATPasen darstellt.

Isolieren, reinigen und analysieren

Mittlerweile haben wir zwei weitere Mitglieder dieser P-Typ ATPasen in den Kompartimenten des Golgi-Komplexes lokalisiert. Dieses Kompartiment ist eine Art Zwischenstation im Vesikelverkehr zwischen dem ER und der Plasmamembran und könnte eine zentrale Rolle im Aufbau der Lipidasymmetrie besitzen. Tatsächlich lassen erste experimentelle Ergebnisse darauf schließen, dass die Golgi-lokalisierten ATPasen an der Regulation der Lipidverteilung in diesem Kompartiment beteiligt sind. Den endgültigen Beweis sollen Untersuchungen an künstlich hergestellten Membranen liefern (Abb. 4). Dazu lösen wir zunächst mit Hilfe von Detergenzien (synthetische Waschmittel) alle Proteine aus der biologischen Membran heraus. Einmal in Lösung, kann die ATPase gereinigt und anschließend in künstliche Phospholipidmembranen eingebaut werden. Auf diese Weise können Proteine einzeln untersucht und damit deren Funktion eindeutig bestimmt werden. Diese Strategie nutzen wir auch für die Identifizierung der Flippase(n) im ER. Beim Zellaufschluss zerfällt das ER in kleine, geschlossene als Mikrosomen bezeichnete Vesikel. Aufgrund ihres Dichteunterschiedes können sie durch Zentrifugation von den anderen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Kürzlich ist es uns gelungen, aus solchen Mikrosomen Proteinfractionen anzureichern,

Abb. 4

Funktionsanalyse von Lipidtransportern. Die für den Flip-Flop verantwortlichen Proteine werden aus der biologischen Membran herausgelöst und in ein Modellsystem aus einer künstlichen Membran gebracht (A), die fluoreszierende Lipidsonden enthält. Durch selektive Zerstörung der Fluoreszenz in der äußeren Membranhälfte ist es möglich, die Verteilung dieser Lipidsonden zwischen den Membranhälften zu ermitteln. Im Falle eines Flip-Flops ist ein höherer Fluoreszenz-Anteil zerstörbar (blaue Kurve in C) als die zu erwartenden 50% (schwarze Kurve) einer gleichmäßig markierten Membran.



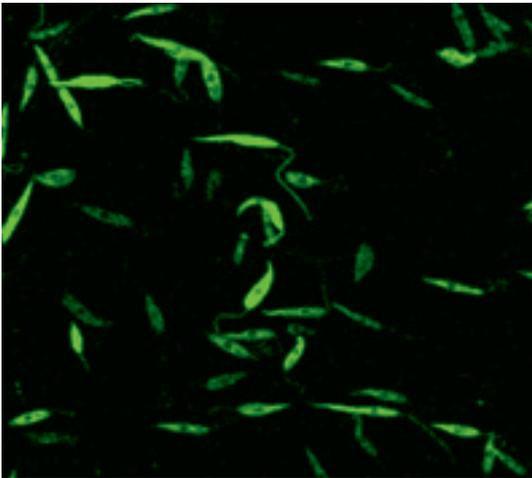


Abb. 5
Lokalisation eines potentiellen Lipidtransporters im Parasiten Leishmania. Die Zellen wurden genetisch verändert, so dass sie den Transporter als leuchtmarkiertes Protein synthetisieren, dessen Fluoreszenz anzeigt, wo sich das Protein in der Zelle befindet. (Aufnahme: Javier Pérez-Victoria)

die nach Einbau in reine Phospholipidmembranen einen schnellen Flip-Flop von Lipiden katalysieren. Damit sind die Voraussetzungen für eine weitere proteinchemische Anreicherung und Identifizierung der ER Flippase(n) gegeben.

Ausblick

Unsere Hefestämme setzen wir auch bei der Suche nach weiteren Lipidtransportern anderer Organismen ein. So haben wir in Zusammenarbeit mit einer spanischen Forschergruppe mit der Funktionsanalyse von potentiellen Lipidtransportern im Parasiten *Leishmania* begonnen, einem Einzeller, der beim Menschen die Leishmaniose verursacht (Abb. 5). Dabei prüfen wir, ob sich die Defekte im Transport einzelner Phospholipide über die zellulären Membranen der Hefe durch bestimmte Transportproteine des Parasiten korrigieren lassen. Auf diesem Weg können auch die zahlreichen medizinisch wichtigen Kandidaten der menschlichen Lipidtransporter charakterisiert werden. Deren Analyse wird dazu beitragen, in Zukunft unser Verständnis der molekularen Ursachen für die bereits erwähnten Funktionsstörungen bei Menschen zu vertiefen.

Internet

<http://www.biologie.hu-berlin.de/~cellbp/>

Prof. Dr. Thomas Pomorski

Jg. 1968. Studium der Biophysik an der Humboldt-Universität zu Berlin, 1996 Promotion, Forschungsaufenthalte am Institut de Biologie Physico-Chimique Paris und an der Universität Utrecht (Niederlande), 1997–1999 Postdoc am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin, 1999–2002 EMBO Stipendiat am Universitätsklinikum in Amsterdam. Seit 2002 Juniorprofessor für Zellbiophysik an der Humboldt-Universität zu Berlin. Forschungsschwerpunkte: Lipidorganisation und -transport in zellulären Membranen, Identifikation und Funktionsanalyse von Lipidtransportern. Rolle von Lipiden bei der zellulären Signalübertragung.

Kontakt

Humboldt-Universität zu Berlin
 Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I
 Institut für Biologie/Biophysik
 Invalidenstr. 42
 D–10115 Berlin
 Tel.: +49 30 2093–8326
 Fax: +49 30 2093–8585
 E-Mail: thomas.pomorski@rz.hu-berlin.de

Dipl.-Biophys. Stefanie Vehring

Jg. 1976. Studium der Biologie an der Universität Konstanz und der Biophysik an der Humboldt-Universität zu Berlin. 2002 Diplom. Forschungsaufenthalte 2001 am King's College in London, 2002 an der University of Wisconsin in Madison (USA). Forschungsschwerpunkte: Eigenschaften biologischer Membranen, Lipid-Protein-Wechselwirkungen, Lipidtransport und -dynamik.



Thomas Pomorski

Dipl.-Biophys. Nele Alder-Baerens

Jg. 1978. Studium der Biophysik an der Humboldt-Universität zu Berlin. 2002 Diplom. Seit 2003 Stipendiatin der Schering Forschungsgesellschaft und Kollegiatin des Graduiertenkollegs »Dynamik und Evolution zellulärer und makromolekularer Prozesse«. 2003 Arbeitsaufenthalt an der Universität Utrecht (Niederlande). Forschungsschwerpunkt: Lipidtransport durch ATPasen.



Stefanie Vehring

Ursula Muschick

Jg. 1945. Medizinisch-technische Assistentin und Fachassistentin für Experimentelle Medizin. Ab 1969 Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin. Seit 2002 Mitarbeiterin in der AG Zellbiophysik.



Nele Alder-Baerens



Ursula Muschick