

Die Rolle nichtkovalenter Wechselwirkungen bei der Stabilisierung von *Micrococcus lysodeikticus*-Membranen

Von

A. I. Oparin*, M. A. Lukyanova und N. S. Gel'man

Aus dem Bakh Institute of Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow, USSR

(Eingegangen am 22. Juni 1970)

The Role of Noncovalent Interactions in the Stabilization of Micrococcus lysodeikticus Membranes

The role of ionic and hydrophobic interactions in the stabilization of *Micrococcus lysodeikticus* membranes has been studied. Ionic bonds retain 20—25% of protein, including membrane ATPase and part of malate dehydrogenase. 80% of membrane proteins are bound in the membrane by hydrophobic interactions. Cytochromes are bound exclusively by hydrophobic interactions.

Es wurde die Rolle ionischer und hydrophober Wechselwirkungen bei der Stabilisierung von *Micrococcus lysodeikticus*-Membranen untersucht. 20—25% des Proteins, einschließlich Membran-ATPase und eines Teils der Malatdehydrogenase, ist ionisch gebunden. 80% der Membranproteine sind in der Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Cytochrome sind ausschließlich durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden.

Um den molekularen Aufbau von Membranen in seiner Gesamtheit zu verstehen, ist es wichtig, einen besseren Einblick in die Wechselwirkungen, durch die Lipide und Proteine im Innern der Membran gebunden sind, zu gewinnen.

Hydrophobe Wechselwirkungen stellen den vorherrschenden Typ der Protein—Lipid-Bindung dar. Hydrophobe Wechselwirkungen der Membranen können mit Hilfe oberflächenaktiver Substanzen und chaotroper Agentien¹⁻³ untersucht werden. Besonderes Augenmerk

* Herrn Prof. Dr. E. Broda zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ N. Gel'man, Uspekhi sovrem. biol. **68**, 1 (4), 3 (1969).

² P. Elworthy, A. Florence und C. Macfarlane, Solubilization by Surface Active Agents and Its Application in Chemistry and Biological Sciences. London: Chapman & Hall 1968.

³ Y. Hatefi und W. Hanstein, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **62**, 1129 (1969).

wurde in diesen Untersuchungen auf hydrophobe Protein—Protein-Wechselwirkungen gerichtet. *Fleischer* et al. zeigten⁴, daß man die Struktur innerer Mitochondrienmembranen nach Entfernung von 95% der Lipide unverseht aufrechterhalten kann. Ähnliche Daten wurden bei Verwendung von Membranen des *Myc. laidlawii* und des *M. lysodeikticus* erhalten^{5, 6}. Protein—Protein-Wechselwirkungen wurden weiters mit Hilfe der optischen Rotationsdispersion und des Zirkulardichroismus untersucht.

Spezielle Experimente wurden durchgeführt, um den Effekt von Elektrolyten auf die Membran zu erforschen und daraus die Rolle der ionischen Wechselwirkungen abzuschätzen. Obwohl die Membranen durch die Behandlung mit Salzlösungen nicht vollständig zerstört werden, können auf diese Weise einige Proteine abgespalten werden. So können zum Beispiel einige bakterielle Cytochrome des Typs c durch Extraktion mit Puffern oder schwachen Salzen in Lösung gebracht werden, nicht hingegen Cytochrome der Gruppen a oder b⁷. Keines der Cytochrome des *Bac. megatherium* kann mit 10proz. NaCl extrahiert werden⁸.

Divalente Kationen bilden Salzbrücken, die Bakterienmembranen stabilisieren⁹. In einigen Bakterien ist Membran-ATPase durch Salzbrücken an die Membran gebunden^{10–12}. Im allgemeinen scheint die Menge der Proteine, die durch Salzbrücken in der Membran gebunden sind, gering zu sein.

Diese Daten legen den Schluß nahe, daß biologische Membranen durch nichtkovalente Wechselwirkungen jedes Typs stabilisiert werden können, wobei hydrophobe Wechselwirkungen vorherrschen. Jedoch wurde die ganze Skala dieser Wechselwirkungen nicht an *einer* Membran untersucht. Daher war das Ziel unserer Untersuchung die Erforschung verschiedener nichtkovalenter Wechselwirkungen, die zur Stabilisierung der *M. lysodeikticus*-Membran beitragen.

⁴ *S. Fleischer, B. Fleischer* und *W. Stoeckemus*, *J. Cell Biol.* **32**, 193 (1967).

⁵ *E. Grula, T. Butler, R. King* und *G. Smith*, *Canad. J. Microbiol.* **13**, 1499 (1967).

⁶ *H. Morowitz* und *T. Terry*, *Biochim. Biophys. Acta* **183**, 276 (1969).

⁷ *R. Bartsh*, *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 181 (1968).

⁸ *P. Broberg* und *L. Smith*, *Biochim. Biophys. Acta* **131**, 479 (1967).

⁹ *S. Rottem, O. Stein* und *S. Razin*, *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 46 (1968).

¹⁰ *E. Munoz, M. Nachbar, M. Schor* und *M. Salton*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 539 (1968).

¹¹ *E. Munoz, M. Salton, M. Ng* und *M. Schor*, *Europ. J. Biochem.* **7**, 490 (1969).

¹² *A. Abrams*, *J. Biol. Chem.* **240**, 3675 (1965).

Die nichtkovalenten Wechselwirkungen wurden untersucht, indem die Membran auf verschiedene Weise behandelt wurde. Als Agentien, die ionische und Salzwechselwirkungen angreifen, wurden KCl, H₂O, EDTA und Alkali verwendet. Durch Behandlung mit Wasser wurden Kationen ausgewaschen, was zu einer Lockerung der Salzbrücken und zu einer Schwächung der ionischen Wechselwirkungen führte. Die Behandlung mit EDTA verursachte einen Chelateffekt und vergrößerte die Zerstörung, die durch die Behandlung mit Wasser hervorgerufen worden war. Harnstoff wurde als Agens verwendet, das Wasserstoffbrücken aufbricht, obwohl es als gesichert gilt, daß die freie Energie der Wasserstoffbrücken im wäßrigen Medium auf den fünfzigsten Teil ihres Wertes absinkt.

Zur Erforschung hydrophober Wechselwirkungen wurden folgende oberflächenaktive Substanzen herangezogen: Na-Cholat und Na-Desoxycholat, nichtionogenes Tween-80 und Triton X-100 (1%) und anionisches N-Dodecylsulphat (0.4%).

Der Grad der Membranfragmentierung wurde an Hand der Entfernung markanter Proteine, nämlich der an Membran gebundenen ATPase und der Cytochrome a₆₀₁, b₅₅₆ + b₅₆₀, c₅₅₀, abgeschätzt. Die Behandlung der Membran liefert augenscheinlich Fragmente, die durch eines der Proteine gekennzeichnet sind.

24-Stunden-Kulturen des *Micrococcus lysodeikticus*, Stamm Fleming, wurden bei 37° in Erlenmeyerkolben unter Schütteln in einem Medium, das Rindfleischextraktbrühe enthielt, gezüchtet. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren geerntet, zweimal gewaschen und bei -4° gelagert. Die Bakterien wurden zerstört, und die Membranfraktion wurde in 0.04M-Tris-HCl-Puffer, pH 7.4, der 10⁻³ Mol/l MgSO₄ enthielt, hergestellt. Die genaue Vorgangsweise wurde bereits früher beschrieben¹³.

Nach Kontakt mit dem Agens wurden die Membranen bei 22 000 · g zentrifugiert, die resultierenden Fraktionen wurden auf ihren Gesamtproteingehalt und die markanten Komponenten der Membranen analysiert. In den Experimenten mit Detergentien, die zu einer merklichen Zerstörung der Membranen führten, wurde die überstehende Fraktion, die wir durch Zentrifugieren mit 22 000 · g erhielten, weiter fraktioniert, um die Menge der kleinen Teilchen (die bei 144 000 · g · 60 Min. ausfielen) und des gelösten Materials (das nicht bei 144 000 · g ausfiel) zu bestimmen. Dieser Vorgang wurde im Detail an anderer Stelle beschrieben^{13, 14}.

Die Sauerstoffaufnahme wurde polarographisch bestimmt; die Cytochrome wurden mit einem DSP-2 Differenzspektrophotometer gemessen; ATPase wurde mit Hilfe des P_i-Inkrement bestimmt¹⁵. Die an die *Micrococcus*membran gebundene, Mg⁺⁺-aktivierende ATPase wurde an anderer Stelle beschrieben¹⁶. Protein wurde nach Lowry et al.¹⁷ bestimmt. Das

¹³ G. Tikhonova, I. Simakova, M. Lukyanova, S. Tapytkova, H. Mikel-saar und N. Gel'man, *Biokhimiya* **35**, 1123 (1970).

¹⁴ I. Simakova, M. Lukyanova, V. Birjuzova und N. Gel'man, *Biokhimiya* **34**, 1271 (1969).

¹⁵ M. Kondrasshova, M. Lesogorova und C. Shnoll, *Trudi Wsesojuzn. Biochem. Sjezda* **3**, 221 (1964).

¹⁶ I. Simakova, M. Lukyanova, V. Birjuzova und N. Gel'man, *Biokhimiya* **33**, 1047 (1968).

¹⁷ O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr und R. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

Lutein in den Membransuspensionen wurde mit einem SDP-2 Spektrophotometer gemessen, wobei wir die optischen Dichten der Peaks bei 480 oder bei 455 nm heranzogen.

Phospholipide wurden durch den P_i -Gehalt in den Lipidextrakten der Membranfraktionen berechnet. Die Lipide wurden mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1) extrahiert; P_i wurde nach der in¹⁸ beschriebenen Methode gemessen.

In Tab. 1 sind Daten über die Beiträge ionischer und Wasserstoffbrückenbindungen bei der Stabilisierung der Membranen angeführt. Alle Zahlenwerte beziehen sich auf Membranplätzchen von 22 000 g, die wir als Folge der obigen Behandlung erhielten. Wie man aus Tab. 1 ersehen kann, sind die Membranen resistent gegenüber der Behandlung mit Salzlösungen; 4M-KCl mit pH 7.4 kann als Membranstabilisator empfohlen werden, denn das Protein tritt nicht in der überstehenden Flüssigkeit auf. 15—20% des Membranproteins tritt nach der Behandlung mit Wasser oder EDTA aus der Membran aus; der Gehalt an Cytochromen in den Membranen bleibt jedoch unverändert. ATPase ist an Kationenbrücken gebunden, da 30—40% dieses Enzyms nach einer einzigen Behandlung mit Wasser oder EDTA aus der Membran extrahiert werden können.

Tabelle 1. Die Rolle polarer Wechselwirkungen in bezug auf die Membranstabilisierung

Agens und Einwirkungs- dauer	Protein, % des Kontroll- plätzchens (22 000 g)	Cytochrome (a + b ₅₅₆ + b ₅₆₀ + c ₅₅₀) Mole 10 ⁻³ in der Fraktion		ATPase in µg- Atomen von P _i in der Fraktion	
		Test	Kontrolle	Test	Kontrolle
H ₂ O, 15 Min., 0°	77	—	—	38	25.4
H ₂ O, 15 Stdn., 0°	77	104	103	—	—
EDTA, 0.1 Mol/l, 15 Min., 0°	73	—	—	38	22.6
EDTA, 0.1 Mol/l, 60 Min., 0°	73	99	96	—	—
Urea, 2 Mol/l, 60 Min., 0°	77	145	141	57	25.4
KCl, 4 Mol/l, 30 Min., 25°	100	104	104	—	—
pH 9, 30 Min., 25°	83	153	137	—	—
pH 10, 30 Min., 25°	67	153	135	—	—

Die Behandlung der Membran mit Alkali von pH 9 und 10 bewirkt, daß 17 bzw. 33% des Proteins in Lösung gehen, und daß nur 5—7% der Cytochrome extrahiert werden. Erhöht man den pH-Wert weiter auf 11—12, so gehen 50% des Membranproteins und gleichzeitig 25% der Membrancytochrome in Lösung.

¹⁸ E. Gerlach und B. Deuticke, Biochem. Z. **337**, 477 (1963).

Tab. 1 zeigt, daß mit 2 Mol/l Harnstoff ungefähr 20% des Proteins extrahiert werden können. In diesem Betrag ist keines der Cytochrome enthalten; hingegen können ungefähr 50% der ATPase gleichzeitig in Lösung gebracht werden.

Bei der Behandlung mit KCl und Wasser wird kein Lutein extrahiert. Die Behandlung mit *EDTA* führt zur Extraktion von 15% des ursprünglichen Luteins und 23% der Phospholipide. Dieser Effekt der Behandlung mit *EDTA* scheint auf der Tatsache zu beruhen, daß einige Lipoproteine von der Membran abgespalten werden.

Faßt man die Daten aus Tab. 1 zusammen, gelangt man zu der Schlußfolgerung, daß ionische Wechselwirkungen, Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen nicht an der Fixierung der Cytochrome an die *Micrococcus*-Membran beteiligt sind; das ATPase-Ensemble umfaßt im Gegenteil divalente Kationen. Malatdehydrogenase verhält sich ähnlich wie ATPase. 30% dieses Enzyms, das im Lipoprotein-komplex enthalten ist, kann unter dem Einfluß von *EDTA* in Lösung gebracht werden¹⁹.

Die Rolle hydrophober Wechselwirkungen in der Membran bestimmen wir, indem wir die Membranen einer Behandlung mit Detergentien unterzogen. Tab. 2 gibt die Daten an, die sich auf die Verteilung von Protein, Phospholipiden und Lutein auf die einzelnen Fraktionen beziehen. Die Detergentien können in einer Reihe geordnet werden, die einen zunehmenden Effekt der Detergentien auf das Aufbrechen der Membranstruktur zeigt (Tab. 2). Tween-80 erwies sich als das mildeste Agens, welches von der Membran ungefähr 30% des Proteins entfernte, in einer Form, die nur geringe Mengen an Phospholipiden und Lutein enthält. Wiederholtes Behandeln mit Tween bewirkte keinen erhöhten Effekt. Cholat brachte ungefähr 50% des Membranproteins, aber nur 12% der Phospholipide und 18% des Luteins in Lösung. Das in Lösung gebrachte Protein enthielt eine verringerte Menge an Lipiden. Bei der Behandlung mit Tween oder Cholat zeigte das Lipidmaterial eine höhere Widerstandsfähigkeit gegen lösenden Angriff als das Protein. Das scheint ein paradoxes Phänomen zu sein: Lipide, die ohne weiteres durch Detergentien in Lösung gebracht werden, sind stärker an die Membran gebunden als einige Proteine! Man kann annehmen, daß sich die hydrophoben Wechselwirkungen von Protein und Lipiden in der Membran in ihrer Stärke unterscheiden.

Im Vergleich zu Tween und Cholat wirkten Triton X-100 und Desoxycholat heftiger auf die Membran ein und brachten ungefähr 80% des Proteins, 90% der Phospholipide und 100% des Luteins in Lösung.

¹⁹ I. Zhukova, D. Ostrovskii, N. Gel'man und A. Oparin, *Biokhimija* **31**, 1209 (1966).

Tabelle 2. Protein-, Phospholipid- und Luteinverteilung bei der Membranfragmentierung durch Detergentien*

Detergens Fraktion	Tween-80		Na-Cholat		Na-Desoxychololat		Triton X-100		Na-Do- decyl- sulfonat Protein
	Protein	Phos- pho- lipid	Protein	Phos- pho- lipid	Protein	Phos- pho- lipid	Protein	Phos- pho- lipid	
22 000 g · 30 Min.- Partikel	56 (50--62)	86 97	40 (23--50)	64 55	8 0	4 0	5 3	0 0	0
144 000 g · 60 Min.- Partikel	5 (5--16)	3 2	11 (5--16)	24 37	10 0	5 0	11 5	1 1	0
144 000 g · 60 Min., überstehende Flüssigkeit	31 (25--38)	10 10	50 (41--59)	12 18	80 80	90 100	81 91	93 93	100

* In der Tabelle sind Mittelwerte aus 3 bis 4 Messungen mit jedem Detergens angeführt. Die Zahlenangaben in Klammer bedeuten die obere und untere Grenze der Streuung der Meßergebnisse. Die Protein-, Phospholipid- und Luteinverteilung ist ausgedrückt in Prozent des Proteins, der Phospholipide und des Luteins der Ausgangsmembranen.

Nach diesen beiden Behandlungsweisen blieben in den Teilchen nur 16 bis 18% des an Lipiden verarmten Proteins zurück, dessen hydrophobe Protein—Protein-Wechselwirkungen intakt blieben, wenn man sie mit den obigen Detergentien nach der beschriebenen Vorgangsweise behandelte. Diese Daten wurden in jüngster Zeit als Folge der Behandlung von *M. lysodeikticus*-Membranen mit 1% Na-Desoxycholat erhalten^{20, 21}.

Na-Dodecylsulfat bewirkte eine vollständige Auflösung der Membranen.

Die aus den Detergentien-Experimenten stammenden Daten führen zu einem besseren Verständnis des Ensembles der Cytochromproteine, die durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden sind. Einen indirekten Hinweis auf die Stärke dieser hydrophoben Wechselwirkungen liefert die Tatsache, daß Cytochrome mit Tween-80 nicht extrahiert werden können, obwohl man damit bis zu 30% des Proteins in Lösung bringen kann. Na-Cholat bringt ungefähr 15% der ursprünglich vorhandenen Cytochrome in Lösung; bei einigen Experimenten wurde durch Behandlung mit Cholat bevorzugt Cytochrom b_{556} extrahiert (Tab. 3).

Na-Desoxycholat und Triton X-100 üben einen ähnlichen Effekt auf die Cytochrome aus. Außer Phospholipiden und Lutein extrahieren beide Agentien 50 bis 80% der Cytochrome, die sich in der überstehenden Flüssigkeit (144 000 g) befinden. Die an Lipid verarmten Teilchen behalten nur 20—50% der Cytochrome zurück. Erwähnenswert ist, daß beide Fraktionen nach Behandlung mit Desoxycholat und Triton eine 4- bis 6fache Konzentration an Cytochromen pro mg Protein aufweisen (für Cytochrom a_{601} bis zu 1.2; für die Cytochrome $b_{556} + b_{560}$ bis zu 3.4; für Cytochrom c_{550} bis zu $3.2 \mu\text{Mol} \cdot 10^{-3}/\text{mg Protein}$).

Daher spiegelt der Grad der Auflösung der Cytochrome direkt den Grad der Unversehrtheit des Membranstromas wider; mit anderen Worten, je stärker das Detergens die Membran als ganze zerstört, desto größer ist die Menge der in Lösung gehenden Cytochrome.

Faßt man die angeführten Daten zusammen, kann man den Schluß ziehen, daß bei der Stabilisierung der *M. lysodeikticus*-Membranen nicht-kovalente Wechselwirkungen jedes Typs auftreten, wobei der Anteil jedes Typs verschieden ist. Die größte Bedeutung haben hydrophobe Kräfte, da die Membranen nur durch die Behandlung mit Detergentien vollständig aufgelöst werden können. Unsere Ergebnisse werden durch Literaturdaten bestätigt^{22, 23}. Weiters bewirkt die Behandlung der Mem-

²⁰ M. Salton und M. Schmitt, Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 529 (1967).

²¹ M. Salton, J. Freer und D. Ellar, Biochem. Biophys. Res. Commun. **33**, 909 (1968).

²² M. Salton und A. Netschey, Biochim. Biophys. Acta **107**, 539 (1965).

²³ T. Butler, G. Smith und E. Grula, Canad. J. Microbiol. **13**, 1471 (1967).

Tabelle 3. Cytochromverteilung bei der Membranfragmentierung durch Detergentien

Cytochrom	Tween-80		Na-Cholat		Triton X-100		Na-Desoxycholat	
	Partikel	überstehende Flüssigkeit	Partikel	überstehende Flüssigkeit	Partikel	überstehende Flüssigkeit	Partikel	überstehende Flüssigkeit
a ₆₀₁	100	0	92	13	30	70	37	57
b ₅₅₆ + b ₅₆₀	100	0	89	10	50	50	23	81
c ₅₅₀	100	0	85	12	50	50	27	75

Der Cytochromgehalt in den Fraktionen ist ausgedrückt in Prozent des Anfangsgehalts in den Membranen. Der Cytochromgehalt (Mittelwert aus 10 Messungen) in den Ausgangsmembranen ist angegeben in $\mu\text{Molen pro g Protein}$: a₆₀₁ = 0.18 (0.14 bis 0.23), b₅₅₆ + b₅₆₀ = 0.48 (0.30—0.58), c₅₅₀ = 0.47 (0.30—0.65).

Der Cytochromgehalt wurde aus den Differenzspektren der oxidierten und der mit Dithionit reduzierten Proben berechnet. Jedes Detergens wurde in 3 bis 4 Experimenten verwendet. In der Tabelle ist jeweils ein erhaltener Wert angegeben. Die Partikel und die überstehende Flüssigkeit wurden nach 60 Min. bei 144 000 g erhalten.

bran mit Wasser, *EDTA*, 2*M*-Harnstoff und Alkali eine nur unbeträchtliche Zerstörung; es werden nicht mehr als 20—25% des Proteins, das durch polare Bindungen innerhalb der Membran fixiert zu sein scheint, in Lösung gebracht. Die *M. lysodeikticus*-Membran kann nicht einmal durch 8*M*-Harnstoff in Lösung gebracht werden²³.

Die Proteine, die bei Störung der elektrostatischen Kräfte, besonders bei Beschädigung der Salzbrücken, von der Membran abgespalten werden, umfassen Malatdehydrogenase, ATPase, außerdem einige Proteine außerhalb der Atmungskette und eine kleine Menge von Phospholipiden. Malatdehydrogenase kommt in Membranfragmenten vor und kann nicht getrennt davon in Lösung gebracht werden²⁴.

Untersuchungen hydrophober Wechselwirkungen wiesen die Existenz solcher Teile der Membran nach, von denen Lipide fast vollständig entfernt werden können und in denen Proteine durch hydrophobe Protein—Protein-Wechselwirkungen zurückgehalten werden. Hierher gehören Partikel, die man bei Behandlung mit Desoxycholat und Triton erhält und die die Cytochrome a_{601} , c_{550} und b_{560} enthalten.

Außerdem liefert die Behandlung der Membranen mit Tween oder Cholat eine Fraktion (ungefähr 50% des Membranproteins), die um das 1.5—2fache an Lipiden angereichert ist, was auf der Entfernung der Proteine von der Membran beruht. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Membran Proteine mit mehr oder weniger starken Lipid—Protein-Wechselwirkungen enthält, wie es die Protein- und Lipidverteilung nach Behandlung mit Tween, das eine Extraktion von 30% von praktisch lipidfreien Proteinen gestattet, nahelegt.

Die hier angeführten Ergebnisse reichen aus zwei Gründen nicht aus, um den Aufbau der *M. lysodeikticus*-Membran auf der Basis des gegenwärtigen Modells aufzuklären. Erstens haben wir nicht den Aufbau aller Teile der Membran untersucht, sondern beschränkten uns auf die Untersuchung jenes Membrananteils, der die Atmungskette trägt. Zweitens zeigt dieser Teil der Membran eine beträchtliche Uneinheitlichkeit in seiner Struktur, was sich in der Tatsache ausdrückt, daß dieselben Enzymproteine durch verschiedene Bindungen an die Membran gebunden sein können.

²⁴ I. Zhukova, Kandidaten-Dissertat., Moskau 1969.