

Fed fysik og elektrostatik

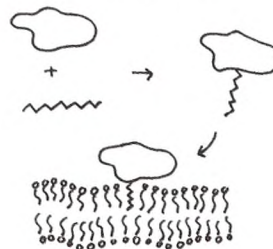
Amy C. Rowat, MEMPHYS – Center for Biomembran Fysik, Syddansk Universitet.

Protein-membran vekselvirkninger er vigtige både for biologisk struktur og funktion. Proteiner kan lokaliseres til membranen bl.a. ved hjælp af bindinger til andre membranproteiner, elektrostatiske vekselvirkninger, og/eller ved at påhæfte en lipidkæde til proteinet.

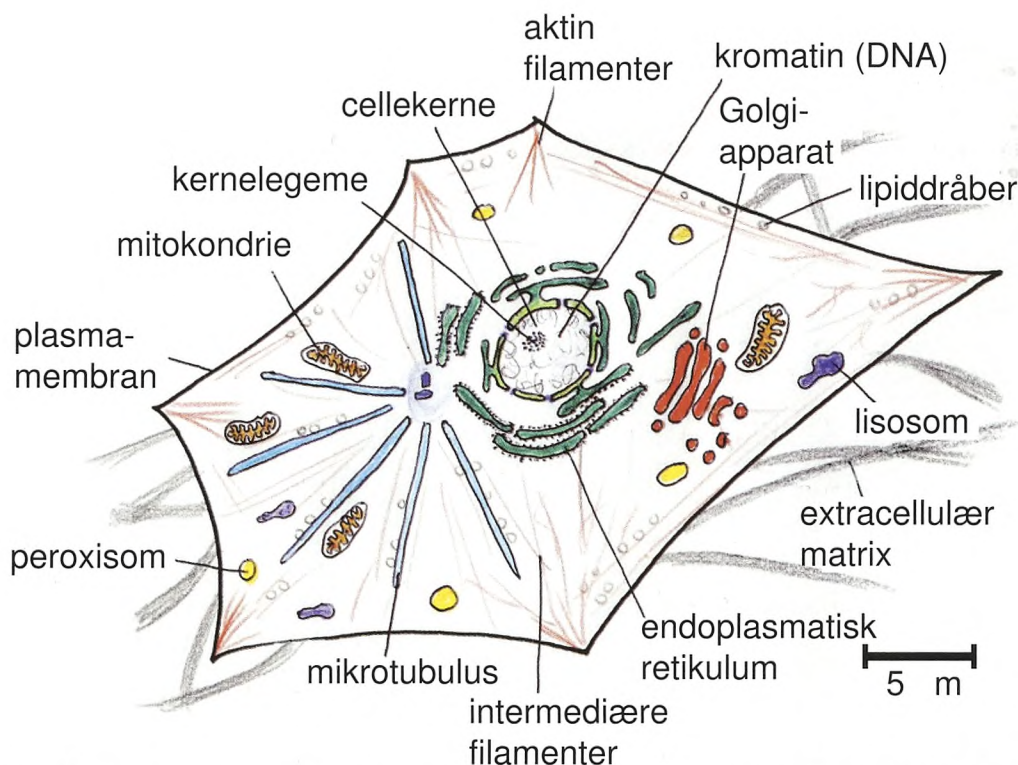
Forestil dig at du er inde i en celle (figur 1). Her oplagres energi som ATP, signalkaskader trigges, og den genetiske kode aflæses med henblik på syntese af proteiner. Mange af disse biologiske funktioner i cellen er afhængig af vekselvirkninger imellem specifikke molekulære komponenter. Men hvordan finder de hinanden?

En meget almindelig måde at bringe proteiner i nærheden af hinanden på er at lokalisere dem ved en membran, f.eks. plasmamembranen eller en organelmembran¹. Protein-membran vekselvirkninger er vigtige både for biologisk struktur og funktion. Proteiner, der er associerede med membranen, inkluderer bl.a.: strukturdannende proteiner – f.eks. laminproteiner i cellekernen – og signalproteiner knyttet til cellens biologiske funktion – f.eks. RAS, et protein som styrer cellevæksten. Proteiner kan lokaliseres til

membranen bl.a. ved hjælp af bindinger til andre membranproteiner, elektrostatiske vekselvirkninger, og/eller ved at påhæfte en lipidkæde til proteinet. Ved kovalentbinding af en lipidkæde til aminosyresekvensen efter syntesen i *ribosomerne* (translation), øges proteinets affinitet² for membranen, idet kædens olieagtige (hydrofobe) natur gør at den opløses i membranens indre (figur 2) [1].



Figur 2. Det lipiderede protein indsat i membranen (et lipiddobbeltlag).

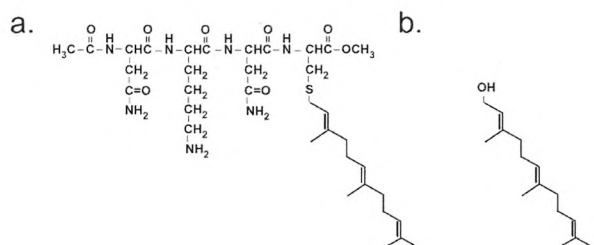


Figur 1. Opbygningen af en eukaryot celle (celle med cellekerne). Indeni cellen, der er afgrænset til omgivelserne med en plasmamembran, findes der organeller¹, proteinnetværk samt små lysosomer og vesikler, alt sammen i et viskøst cytoplasma.

¹organel = celledel med en særskilt funktion og membranafgrænsning, f.eks. endoplasmatisk retikulum, Golgi-apparat og mitokondrie.

²affinitet = to stoffers tilbøjelighed til at reagere med hinanden og danne en kemisk forbindelse.

For at forstå hvorledes disse lipiderede proteiner vekselvirker med membraner må man arbejde med simple modelsystemer, som f.eks. et syntetisk lipid-dobbeltlag og et lipideret peptid (et lille protein som består af få aminosyrer, syntetiseret af J. Brask og K.J. Jensen, KVL). Peptidets sekvens er: Ac-Asn-Lys-Asn-Cys-(farnesyl)-OMe hvor farnesyl er lipidkæden (figur 3.a). Jeg har undersøgt effekterne af adsorption³ af disse peptider og af selve lipidkæden, farnesol (figur 3.b), til en modelmembran med én komponent (DMPC⁴).



Figur 3. Kemisk struktur af (a) det farnesylerede peptid og (b) farnesol.

Undersøgelserne har gjort brug af en lang række biofysiske teknikker, bl.a. differentiell-skanning kalorimetri (DSC), deuterium kerne-magnetisk resonans (²H-NMR), og VesikelFluktuations Analyse (VFA) [2]. I denne artikel vil jeg kort beskrive nogle eksperimentelle resultater og nogle teoretiske overvejelser om peptiders og farnesols adsorption til en DMPC membran med fokus på membranens termiske og fysiske egenskaber.

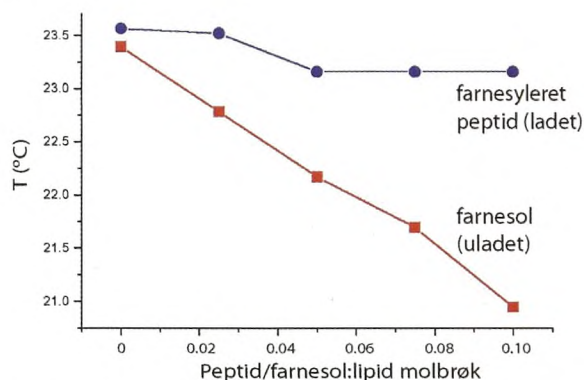
Peptid-membran adsorption – eksperimentelt set

Første skridt i den eksperimentelle karakterisering af farnesylerede peptiders vekselvirkning med membranen består i at undersøge hvorledes lipidkæden farnesol påvirker membranens fysiske egenskaber. Dette kan man bl.a. få et indtryk af ved at betragte hvorledes iblanding af farnesol i en DMPC lipidmembran ændrer membranens gel-fluid faseovergang (smeltning fra gel til fluid-fase). Dette sker ved faseovergangstemperaturen, T_m (24° C for DMPC), og manifesterer sig i DSC-termogrammet ved en markant endoterm top, når fasen ændres fra gel til fluid. Ved tilstedeværelsen af farnesol sænkes og forbreddes faseovergangen jo højere koncentration af farnesol, der er i membranen (figur 4).

Lad os nu se på farnesolkæden forbundet med en lille 'peptid'-hovedgruppe. Peptidets sekvens er inspireret af et farnesyleret protein som findes naturligt i cellekernen. Man skal lægge mærke til at en af aminosyrerne (lysin) er ladet under de betingelser, som vi arbejder med (rent vand, ingen tilsat salt).

Ved kalorimetrisk undersøgelse viser det sig, at T_m reduceres, men langt mindre end det er tilfældet for DMPC-farnesol blandingen (figur 4). Yderligere

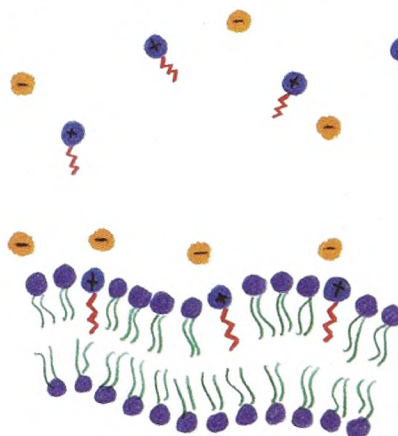
mættes membranens peptidoptagelse ved ~ 5 mol % peptid. Alt dette er tegn på, at ikke alt peptid adsorberes på membranen, men fordeles imellem membranen og vandfasen. For bedre at forstå dette fænomen, er der udviklet en teori for at beskrive elektrostatiske effekters rolle [3, 4].



Figur 4. Faseovergangstemperatur (T_m) bestemt af DSC af DMPC membraner med forskellige koncentrationer af farnesol (nederst, bokse) og ladet farnesyleret peptid (øverst, cirkler).

Peptid-membran adsorption – teoretisk set

Vi ved altså, at farnesol har en meget høj fordelingskoefficient - dvs. den hydrofobe effekt driver farnesol ind i membranen. Når farnesol forbindes kovalent med peptidet fungerer den som et anker, så de lipiderede peptider har stor affinitet til membranen. Men ved adsorption af de ladede peptider til membranen opbygges der en overfladeladning og et elektrostatiske potentiale. De ladede peptider er ledsaget af modioner, som er fuldt dissocierede fra peptidet. Modionerne fordeler sig ikke ind i membranen, men er selvfølgelig tiltrukket af den opbyggede overfladeladningen. Samtidig forsøger de at maksimere deres translations-entropi i bulkfasen (vand). I en konkurrence imellem de elektrostatiske kræfter og entropien organiserer modioner og bulk-peptiderne sig i et elektrisk dobbeltlag (figur 5).



Figur 5. Det elektriske dobbeltlag: Modionerne samler sig ved den ladede overflade.

³adsorbere = evnen til at fastholde eller koncentrere en væske eller luftart på en overflade.

⁴DMPC = Dimyristoylfosfatidylcholin – en hyppigt anvendt kunstig lipid, der skifter fra fluid-fase til gel-fase ved ca. 24° C.

For at beskrive peptid-membran bindingen i dette system er det nødvendigt at modellere peptiderne både i bulk og på membranen. De to populationer er karakteriserede ved en middel arealfraction af peptider på overfladen (membranen) (ϕ_o^+) og en middel volumenfraktion af peptider i bulk langt fra overfladen (ϕ_b^+). Middelfeltteori⁵ for ligevægtsfordelingen af peptider og modioner kaldes Poisson-Boltzmann (PB) teori; ifølge PB teori kan det elektriske dobbeltlagspotentiale (ψ) beregnes ved hjælp af følgende differentialligning:

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} = \frac{-4\pi e}{\epsilon} \left(\frac{\phi_b^+ e^{(-e\psi/k_B T)}}{(a^+)^3} - \frac{\phi_b^- e^{(e\psi/k_B T)}}{(a^-)^3} \right) \quad (1)$$

Her er ϵ den relative dielektricitetskonstant i vand ($\epsilon \sim 80$), e er elementarladningen, a^+ er peptidets diameter, og a^- er modionens diameter. [Elektrostatikken er her formuleret i c.g.s. enheder.] Ved de udvalgte randbetingelser, benytter vi PB ligningen (1) til at udregne den fri energi, både for overflade og bulk subsystemer.

Den fri energi for de ladede peptider (og modioner) indeholder både entropiske og elektrostatiske bidrag; udfra det kan de kemiske potentialer udledes. Det kemiske potentiale i bulk og ved overfladen er ens i termisk ligevægt, så vi kan udtrykke adsorptionsisotermen, som beskriver relationen mellem hvor meget peptid, der sidder på overfladen og bulkpeptid koncentrationen:

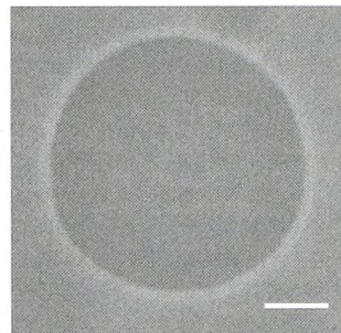
$$\phi_o^+ = \frac{\phi_b^+}{e^{-(\alpha + \beta\phi_o^+ - e\psi_o)/k_B T} + \phi_b^+} \quad (2)$$

Denne ligning kaldes Davies' adsorptionsisoterm [5]. Peptid-membran bindingsenergien er beskrevet af parameteren α , som afspejler lipidkædens (farnesols) affinitet for membranen⁶. β parameteren repræsenterer den laterale vekselvirkning imellem peptider som er adsorberede til overfladen og i det lave koncentrationsregime er dette led meget lille. Det elektrostatiske bidrag kan ses i $e\psi_o$, hvor ψ_o er overfladepotentialet (bestemt af ϕ_o^+) som kan beregnes ved hjælp af Poisson-Boltzmanns ligning. Hvor der ingen ladninger er ($\psi = 0$), består den fri energi udelukkende af entropiske bidrag og adsorptionsisotermen (ligning 2) reduceres da til Frumkins adsorptionsisoterm. Vi kan bruge dsorptionsisotermen til at estimere mængden af adsorberet peptid/farnesol og farnesylerede peptider (med og uden ladninger). Det næste skridt består i at bestemme hvorledes de adsorberede farnesol og farnesylerede peptider påvirker membranens form og fleksibilitet.

⁵I middelfeltteori antages det, at de lokale omgivelser sætter et effektivt elektrostatiske felt op bestemt af tætheden af ioner i en elektrolyt opløsning. Ved høje ladningstætheder bryder denne antagelse sammen idet termiske korrelationseffekter spiller en stor rolle. Idet vi arbejder med små koncentrationer, giver middelfeltteori en god beskrivelse.

⁶Udfra eksperimenter, estimeres $\alpha \sim 10 k_B T$ for farnesol [6].

⁷Prøv og se på spontan krumning med et stykke papir. For et fladt stykke papir som ligger på bordet er $H_o = 0$. Hvis vi kommer lidt vand på den ene side af papiret, vil det naturligt krumme. Idet der nu er en forskel i sammensætning imellem de to sider af papiret, opstår der spontan krumning.



Figur 6. En stor unilamellar vesikel. Fluktuationer i konturen af denne vesikel kan analyseres og ved brug af fluktuations-dissipations teoremet, kan membranens bøjningsstivhed, k_c , udtrækkes.

Membranens elasticitet

Membranens form kan beskrives ved hjælp af Helfrichs frie energi [7]:

$$\mathcal{F} = \sigma A + \frac{k_c}{2} \int_A dA \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} - 2H_o \right)^2 \quad (3)$$

Her er A membranens areal og σ den laterale spænding. De principale radier, r_1 og r_2 , beskriver membranens form. H_o kaldes den spontane krumning, som afspejler membranens naturlige tendens til at krumme, f.eks på grund af forskellig sammensætning af de to monolag i dobbeltlaget⁷. Bøjningsstivheden, k_c , har dimension af energi og afspejler hvor meget energi det koster at bøje eller krumme membranen – jo lavere k_c , jo nemmere kan membranen deformeres. For lipidmembraner kan k_c variere fra få til få dusin $k_B T$. Det betyder at en vesikel udfører små termiske formfluktuationer (Brownske bevægelser), som kan observeres i et mikroskop (figur 6) og analyseres ved teknikken Vesikelfluktuationsanalyse, VFA.

Lad os nu kigge på bøjningsstivheden for DMPC-membranen og effekterne af iblandning af farnesol. Ved tilsætning af 5 mol % farnesol, sænkes k_c til $31,3 \pm 0,9 k_B T$. Disse værdier er ikke så forskellige, når vi tager hensyn til forsøgsfejl. Og dog, ved en lille mængde af ladet peptid (≤ 1 mol %), bliver k_c meget større: $40,2 \pm 0,7 k_B T$. På trods af at koncentrationen af peptid på overfladen er meget lille.

Boks 1: Vigtige elektrostatiske parametre

Afstanden, hvor elektrostatiske effekter dør ud på grund af afskærmning af modioner/bulkpeptider, kaldes

Debye-længden: $\kappa^{-1} = 1 / \sqrt{8\pi e^2 \phi_b^+ / \epsilon k_B T (a^+)^3}$.

Peptider og modioner som ligger udenfor afstanden $\frac{1}{\kappa}$ kan ikke mærke overfladeladningen.

Afstanden, hvor den elektrostatiske energi imellem to ladninger er lig med den termiske energi, kaldes

Bjerrum længden: $l_B = \frac{e^2}{\epsilon k_B T}$. Bjerrum-længden i vand ved 20° C er $l_B = 7\text{\AA}$.

Disse længdeskalaer er bundet sammen via bulk-tætheden af peptider, der kan bestemmes selv-konsistent af ligningssystemet (2) og (5).

Hvorfor bliver membranen stivere på grund af de ladede peptider? Der er igennem de sidste 20 år blevet udviklet teorier om, hvordan elektrostatiske effekter øger bøjningsstivheden [8]. Disse teorier bekræfter den form, som man når frem til ved hjælp af simple dimensionsbetragtninger,

$$k_c = k_o + k_{el} \quad (4)$$

hvor

$$\frac{k_{el}}{k_B T} \simeq \frac{\phi_o^{+2} l_B}{\epsilon (a^+)^2 \kappa^3} \quad (5)$$

Beskrevet i ord, er k_o bøjningsstivheden uden elektrostatiske effekter ($k_c = k_o$) og k_{el} afspejler bidraget fra det elektrostatiske dobbeltlag, som ca. har tykkelsen en Debye længde, $\frac{1}{\kappa}$ (se boks 1). Kompressionen af modionerne i det elektriske dobbeltlag hæmmer de termiske formfluktuationer og øger k_c med k_{el} – dvs. det koster mere energi at bøje membranen. For mindre end 1 mol % peptid på overfladen findes let et betragteligt bidrag, $k_{el} \sim 3-4 k_B T$, hvilket er i god overensstemmelse med de eksperimentelle resultater (VFA).

Hvad betyder det for livet?

Vi kan ikke med dette supersimple to-komponentsystem forklare hvordan cellen er organiseret. Men det kan hjælpe os til at forstå noget om protein-membran vekselvirkninger:

1. En farnesolkæde har en høj affinitet for membranen. Derfor har farnesylerede proteiner en større tendens til at befinde sig på membranen *uden* at ændre membranens mekaniske egenskaber i fluidfasen (når ladninger ikke spiller nogen rolle).
2. Adsorption af ladede, lipiderede peptider er følsom over for overfladeladning (se adsorptions-isotermen). Derfor kan elektrostatiske være en simpel mekanisme til at regulere mængden af adsorberede peptider/proteiner.
3. Adsorption af ladede, lipiderede peptider til membranen kan påvirke hvor meget energi som

skal til for at bøje membranen. Membranens formstabilitet er vigtig ved budding, vesikulering og formdannelse af organeller og celler.

4. I kroppen er solventet ikke bare vand – der er en masse forskellige salte. Da salt afskærmer elektrostatiske ladninger, kan Coulombkræfterne imellem ladningerne ikke så let mærkes og ψ spiller en mindre rolle. Derfor kan vi forvente, at elektrostatiske spiller en mindre rolle ved tilsætning af salt. Det betyder at biologiske processer kan moduleres ved at ændre saltkoncentrationen eller pH. På denne måde kan både mængden af adsorberede peptider samt mekaniske effekter reguleres.

Så man må konkludere at vores peptid-membran modelsystem kan lære os lidt mere om de fundamentale vekselvirkninger, som spiller en rolle ved organisering af cellen på det molekylære niveau.

Tak til John H. Ipsen og Per L. Hansen for læsning og kommentar ved artikelskrivieriet. Økonomisk støtte kommer fra Natural Scientific and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (ACR) og Danmarks Grundforskningsfond (MEMPHYS – Center for Biomembrane Physics).

Litteratur

- [1] J.R. Silvius (2002), *Current Topics in Membranes*, **13**: 371.
- [2] A.C. Rowat, J. Brask, T. Sparrman, K.J. Jensen, G. Lindblom og J.H. Ipsen (2004), *Eur. Biophys. J.*, **33**: 167; A.C. Rowat, J.H. Davis (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1661:178; A.C. Rowat, D. Keller, J.H. Ipsen (2005), *Biochim. Biophys. Acta*, 1713:29.
- [3] A.C. Rowat, P.L. Hansen og J.H. Ipsen (2004), *Europhys. Lett.*, **67**: 74.
- [4] H. Diamant og D. Andelman (1996), *J. Phys. Chem.*, **100**: 13732.
- [5] J. T. Davies (1958), *Proc. R. Soc. A*, **245**: 417.
- [6] JR Silvius, F l'Heureux (1994), *Biochemistry*, **33**: 3014.
- [7] W. Helfrich (1973), *Z. Naturforsch.*, **28**: 693.
- [8] D. Andelman (1995), in *Handbook of Biological Physics*, eds. R. Lipowsky & E. Sackmann. Elsevier Science B.V.: Amsterdam.



Amy C. Rowat var tidligere ph.d.-studerende hos MEMPHYS – Center for Biomembran Fysik, Fysisk Institut, Syddansk Universitet.