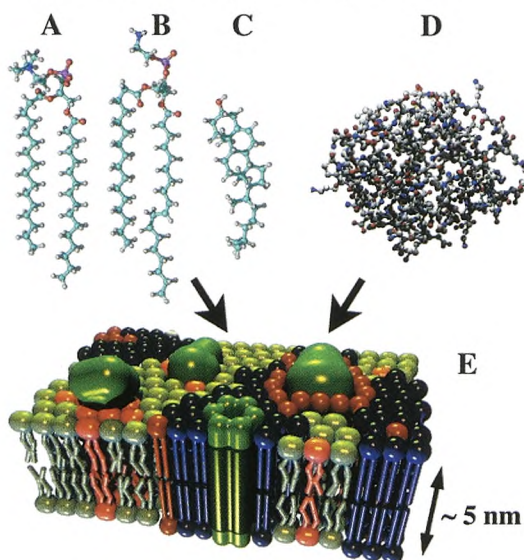


Selvorganisering i biomembraner

Thomas Heimburg og Martin Gudmand, Niels Bohr Institutet, Membrane Biophysics Group. Med bidrag fra Heiko Seeger og Matthias Fidorra.

Indledning

Celler er de primære byggeblokke i såvel primitive som højere organismer. Hos planter og dyr indeholder cellerne organeller, dvs små kamre med forskellige specielle funktioner. Nogle organeller kan f.eks. være små kraftværker, hvor sukker omdannes, mens andre kan have til opgave at syntetisere proteiner.



Figur 1. Lipider (A, B og C) og proteiner (D) udgør størstedelen af komponenterne i biologiske membraner. C er kolesterol.

Hvert organel er omgivet af en enkelt- eller dobbelt-membran. Membranernes primære formål synes at være at afgrænse reaktionskamre for biokemiske processer, og dermed bestemme den lokale koncentration af molekyler i celler og organeller. Membraner består af lipider og proteiner (figur 1).

Lipiderne som udgør membranmatrixen er, i modsætning til proteiner, relativt simple små sæbelignende molekyler (figur 1). De består oftest af to hydrofobe kulbrintekæder og en hydrofil hovedgruppe. Når lipider kommer i kontakt med vand dannes spontant dobbeltlagsstrukturer, hvor de hydrofobe kulbrintekæder skjæres fra, og de hydrofile grupper vendes mod den vandige grænseflade (figur 1). Lipider har umiddelbart mindre variation i deres struktur end proteiner, f.eks. har nogle lipider umættede kulbrintekæder, dvs. de indeholder dobbeltbindinger mellem to kulstofatomer, nogle har ladede hovedgrupper, mens andre igen er uladede. Et atypisk, men meget vigtigt lipid, er det meget stive molekyle vi kender som kolesterol. Biologiske membraner er ekstremt mangfoldige med hensyn til deres sammensætning, og hvert organel

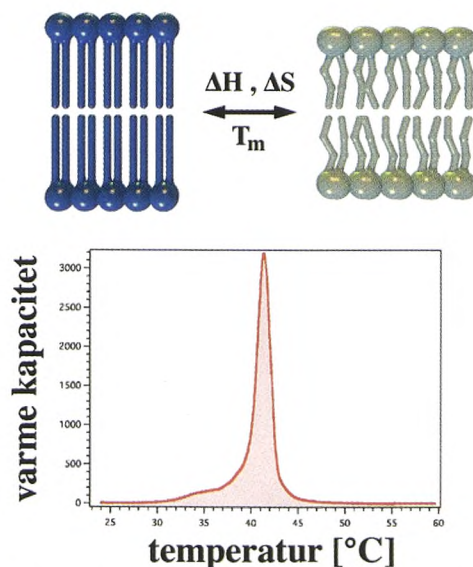
i cellen har forskellig lipidsammensætning. Grunden til denne mangfoldighed er stadig ikke særligt godt forstået.

Proteinerne er vigtige funktionelle molekyler. De er ansvarlige for transport af ioner på tværs af membranen, for at opfange lys, lyd og smag samt mange andre vigtige formål.

Mangfoldigheden af proteins funktion og makromolekylære struktur har medført et stærkt ønske om at undersøge disse molekyler på enkelt-molekylniveau, et ønske som har medført et sandt boom indenfor nanovidenskabelige discipliner.

Lipidsmeltning

Ved siden af de ovenfor nævnte forskelle i den kemiske struktur mellem lipider og proteiner, kan der ske forandringer i lipidernes fysiske tilstand. Ved lave temperaturer er kulbrintekæderne ordnede (*gel fase*), mens de ved højere temperaturer er uordnede (*fluid fase*, figur 2).

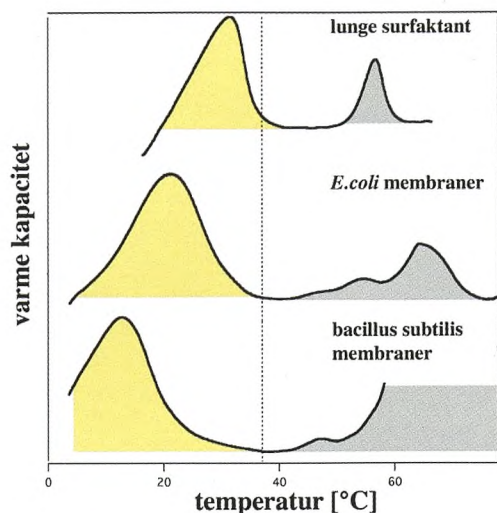


Figur 2. Skematisk fremstilling af smeltningen af lipid-membraner. Øverst: Skematisk tegning af smelteprocessen. Nederst: Smelteprofilen for en ren DPPC-membran.

Indenfor det fysiologiske temperaturområde undergår lipider en smelteovergang, med tilhørende entalpiændringer og entropiændringer. Smelteovergangen giver sig til kende som et smalt maksimum (en skarp spids) i varmfylden, som vist i figur 2. Denne skarpe profil viser, at der ved faseovergangen sker en kraftig tilvækst i systemets entropi og entalpi.

I figur 2 ses smelteprofilen for dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC) som smelter ved 41° C. DPPC

er et lipid som findes i rige mængder i lungesurfaktant, en overfladefilm i lunger der har til opgave at reducere overfladespændingen på lungealveolernes meget store overflade. Med det store indhold af DPPC er det derfor næppe overraskende, at lungesurfaktant også har smelteovergang meget tæt ved kropstemperaturen (figur 3). I figur 3 ses det, at lungesurfaktants smelteovergang er lige under kropstemperatur.



Figur 3. Biologiske membraners smelteprofiler [1]. Områderne til venstre (gule) angiver lipidsmeltetoppe, mens områderne til højre (grå) angiver proteinendatureringstoppe. Den stiplede linje angiver 37° C. svarende til krops- eller væksttemperatur.

For biomembraner synes smeltetemperaturer lige under den fysiologiske temperatur at være et gennemgående tema i naturen, f.eks. som vist for *E.coli* og *bacillus subtilis* (figur 3). Begge viser smelteovergange lige under deres væksttemperatur. Hvis bakterien dyrkes ved lavere temperatur, skifter smelteovergangen nedad. Det betyder altså, at bakterier tilpasser sig således at smelteovergangen altid befinder sig i nærheden af den fysiologiske temperatur. Det er derfor nærliggende at antage at smelteprocessen i sin helhed må have en fysiologisk betydning.

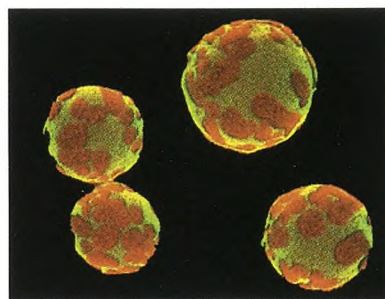
Desuden kan man i biomembraner også se proteinendatureringstoppe i smelteprofilen. Disse findes typisk noget over kropstemperatur.

Domænedannelse

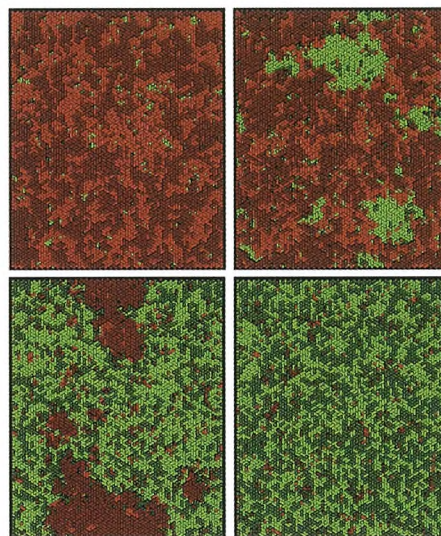
I temperaturområdet hvor membranerne smelter findes både ordnede (*gel*) og uordnede (*fluid*) lipider på samme tid. Som vist skematisk i figur 2 er ordnede lipiders konfiguration reelt længere end uordnede lipiders. Da lipider med forskellige hydrofobe længder har en ufavorabel kontaktvekselvirkning, medfører det en inhomogen fordeling af ordnede og uordnede lipider i membranen, hvorved domæner dannes. Denne selvorganiseringsproces afhænger af flere faktorer, såsom lipidernes kemiske egenskaber, koncentration og individuelle smeltepunkter. Da nogle af lipidene tillige har ladede hovedgrupper, afhænger processen også af

koncentrationen af protoner (pH) og andre ioner i opløsningen.

For en simpel blanding af to lipider (dilaurylphosphatidylcholin, DLPC, og dipalmitoylphosphatidylcholin, DPPC) er domænedannelsen ved smelteovergangen vist i figur 4. Den type domæner i dobbeltlagsmembraner blev først påvist eksperimentelt i 1999 [2]. Det skyldes udviklingen indenfor konfokal mikroskopi, som gjorde det muligt at optage billeder af fluorescensmærkede molekyler med høj tredimensional opløsning. For at optage de billeder der er vist i figur 4 tilsatte vi to forskellige fluorescerende markører til membranerne; en med præference for ordnede domæner, og en anden med præference for uordnede domæner. De to markører har forskellige emissions-bølgelængder, således at ordnede domæner fremstår i rødt, og uordnede i grønt. Vesiklerne (de kugleformede dobbeltlagsstrukturer) som er vist her er sæbeboblelignende med en gennemsnitlig størrelse på 30 μm .



Figur 4. Billeder optaget med konfokalmikroskopi af lipid-vesikler (DLPC-DPPC blanding) ved smelteovergangen. Røde regioner angiver ordnede domæner, mens grønne regioner er uordnede domæner. Se også forsiden.



Figur 5. Computersimulering af DMPC-DSPC membraner ved temperaturer under, ved og over smelteovergangen. Hvert punkt svarer til et enkelt lipidmolekyle. Mørkerød og mørkegrøn angiver hhv. ordnede og uordnede DSPC-molekyler. Lys rød og lys grøn angiver hhv. ordnede og uordnede DMPC-molekyler. Domænedannelse ses tydeligt at være temperaturafhængig.

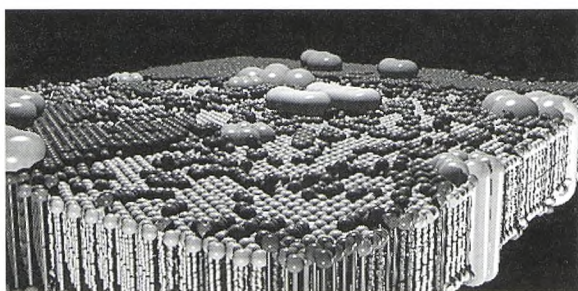
Ved hjælp af computersimuleringer kan data fra kalorimetriske målinger benyttes til at modellere et mere detaljeret billede af lipidsmeltningen.

I figur 5 er der vist fire 'snap shots' fra en computersimulering af en binær lipidblanding (dimyristoyl phosphatidylcholin, DMPC, og distearoyl phosphatidylcholin, DSPC), som er sammenlignelig med mikroskopibillederne i figur 4. Farveangivelsen er ligesom i figur 4; ordnede domæner er røde og uordnede er grønne. En triviell opdagelse er, at de uordnede domæners areal øges med stigende temperatur. En mere interessant ting der ses er, at selv indenfor den ordnede fase (ved lav temperatur) og den uordnede fase (ved høj temperatur) blandes de to lipider ikke homogent. Derfor foregår der også domænedannelse i de rene faser udenfor temperaturområdet hvor membranerne smelter.

Domæners rolle i biologiske membraner

Selvorganiseringen i membraner afhænger kraftigt af lipidernes kemiske egenskaber, pH, ionstyrke, tryk og temperatur. I biologiske celler findes endvidere enzymer (katalytisk aktive proteiner) som er i stand til at ændre strukturen af lipidene. Dermed vil aktiviteten af disse enzymer også kunne ændre strukturen af den selvorganiserede membran. Det bør i øvrigt påpeges, at den selvorganisering som lipider og proteiner gennemgår, er en generel egenskab som mange typer blandinger har og altså ikke en egenskab som er forbeholdt biokemiske systemer.

For nyligt er opdagelsen af en speciel type små domæner blev et varmt emne. Disse små domæner der ofte har en indholdsmæssig overvægt af kolesterol, sphingolipider og specielle proteiner er blevet døbt 'lipid rafts' (lipidtømmerflåder). Navnet indikerer, at mange videnskabsmænd opfatter dem som faste strukturer der bevæger sig rundt i lipidmatrixen. Dette er sandsynligvis ukorrekt, eftersom man kan observere, at disse 'rafts' varierer både i størrelse og sammensætning.



Figur 6. Skematisk fremstilling af en biologisk membran indeholdende forskellige lipiddomæner (ordnede og uordnede) og tilhørende membranproteiner. Her er blå, hvide og gule proteiner ikke lokaliserede i de samme domæner og sandsynligheden for at de vekselvirker er derfor reduceret. Se også billedet på forsiden af bladet.

Man skal yderligere huske på, at mange vigtige processer i biologiske membraner består af reaktionskaskader mellem mange forskellige proteiner. Hvis disse proteiner findes i forskellige faste domæner

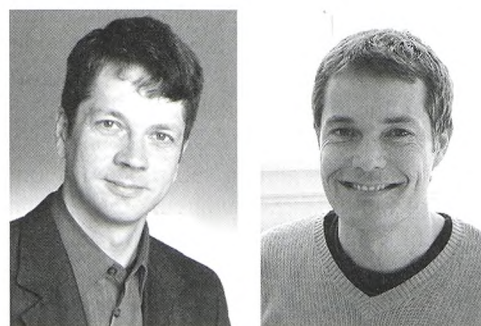
i membranen, så forhindres deres vekselvirkning, og dermed kædereaktionen. Et typisk eksempel på en kædereaktion er respirationskæden i mitokondria. I den reaktion katalyseres nedbrydelsen af sukker og dannelsen af ATP simultant. Kaskaden involverer adskillige vekselvirkende membranproteiner. Derfor vil opløseligheden af membranproteinerne i de forskellige domæner have en afgørende indflydelse på kaskadereaktionen.

Såfremt denne domænestruktur bliver ændret ved påvirkning fra enzymer, ændringer i pH eller temperatur, så ændres kaskadereaktionen altså. Dette sker vel at mærke uden at ændre biokemien i de enkelte membranproteiner (figur 6), sådan som mange enkeltmolekyle videnskabsmænd synes at mene.

Domænedannelsesprocessen kan på den anden side forstås ud fra rene fysiske egenskaber, og siden principperne beskrevet ovenfor er mangemolekyleegenskaber, opstår der en ny mængde fænomener. Fænomener som involverer vekselvirkninger som ikke kan forstås på enkeltmolekyleneiveau. Disse fænomener inkluderer kontrol af membranernes elastiske konstanter, og deri den mulige kontrol over strukturændringer og spontan poredannelse til at kontrollere transport gennem membranen. Vi har for eksempel for nyligt beskrevet hvordan nerveimpulser muligvis er en densitetspuls langs nervecellens axon, en egenskab som er en konsekvens af kooperative fluktuationer i membranen. Fluktuationer som typisk er særligt stærke i temperaturområder hvor der er udpræget domænedannelse.

Litteratur

- [1] Heimburg, T., and Jackson, A. (2005), "On solitons propagation in biomembranes and nerves". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, bind **102**: side 9790-9795.
- [2] Korbach, J., Schwille, P., Webb, W.W., Feigenson, G.W. (1999), "Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, bind **96**: side 8461-8466.



Thomas Heimburg (t.v.) har været leder af 'Membrane Biophysics Group' ved Niels Bohr Institutet (Københavns Universitet) siden 2003. Martin Gudmand (t.h.) er ph.d.-studerende ved Nano-Science Center (H.C. Ørsted Institutet, Københavns Universitet) og 'Membrane Biophysics Group'.