

Membranernes fysik

John H. Ipsen, Fysisk Institut – MEMPHYS, Syddansk Universitet

MEMPHYS - *Center for Biomembrane Physics* blev etableret i oktober 2001 med støtte fra Dansk Grundforskningsfond. Der er knyttet ca. 30 medarbejdere til centret, heraf 2 professorer, 5 lektorer og 8 postdocs fordelt på Syddansk Universitet (SDU), Roskilde Universitetscenter (RUC) og Danmarks Tekniske Universitet (DTU). Den daglige ledelse varetages af professor Ole G. Mouritsen (SDU) [1]. Grundforskningscentret MEMPHYS har sit udspring i en forskningsgruppe på DTU af samme navn, som siden midten af 1980'erne primært har arbejdet med karakteriseringen af simple modelsystemer (lipiddobbeltlag) for biologiske membraner ved hjælp af teoretiske beskrivelser, computersimulering og i stigende grad eksperimenter. Denne linie er blevet fortsat i Grundforskningscentret, dog med en væsentlig udvidelse af de eksperimentelle og numeriske aktiviteter og med større fokus på komplekse systemer med relevans for molekylær biologi, farmakologi og medicin. Denne artikel vil give et udpluk af aktiviteter i MEMPHYS omkring membranens fysik.

Kombinationen af fysik og biologi har taget mange former i de senere år. Specielt har integrationen af computerteknologi med traditionelle fysiske metoder, som mikroskopi, Röntgenspredning, massespektroskopi og kernemagnetisk resonans, givet en voldsom udvikling i adgangen til eksperimentel information om fænomener i biologiske celler, og mange fysikere er fulgt med disse teknikker over i nye biologiske discipliner, f.eks. proteomics, strukturel biologi og bioinformatik. Et andet yderpunkt udgøres af teoretiske fysikere, som arbejder med idealiserede modeller af biologiske fænomener, f.eks. kunstigt liv, informationsnetværk og bevidsthed, for om muligt at opnå indsigt i de bagvedliggende principper for de levende systemers opførsel. I forhold til disse nye udviklinger i forholdet imellem biologi og fysik kan tilgangen til forskningen i biologiske processer i MEMPHYS synes noget traditionel, idet der lægges stor vægt på fysikkens dyder som reduktionisme, empirisme og fysikkens grunddiscipliner. Et typisk projekt i MEMPHYS består i at reducere en biofysisk problemstilling til et fysisk-kemisk velkarakteriseret modelsystem, som dog netop har tilstrækkelig kompleksitet til at aspekter af det levende system kan genkendes. Oftest involverer projektet både komponenter af eksperimentel, teoretisk og numerisk beskrivelse af systemet. I beskrivelsen af biomembraner har denne fremgangsmåde været meget frugtbar i den forstand at MEMPHYS over de sidste 15-20 år har været med til at sætte dagsordenen på en række områder af beskrivelsen

af biomembraner, f.eks. sterolers og integrale proteiners opløsningssegenskaber og funktionelle domæner i membraner.

En biologisk membran er bygget op omkring et få nanometer tykt dobbeltlag af lipidmolekyler, hvori der er indlejret og/eller påhæftet proteiner, polypeptider og polysaccharider¹. I vandig opløsning arrangerer lipiderne sig spontant således at de elektrostatisk polære hovedgrupper eksponeres til vandet, mens de fleksible, ikke-polære kulbrintekæder afskærmes fra de polære omgivelser. Dette fænomen benævnes *den hydrofobe effekt*. Lipiddobbeltlaget er et af de mest almindelige lipidaggregater, som livet tidligt gjorde til en helt central byggekloks til opbygning af biologisk struktur. Lipiddobbeltlagets egenskaber på korte tids- ($< \mu\text{s}$) og længdeskalaer ($< 100 \text{ nm}$) kan idag beskrives i detaljer ved hjælp af molekylær dynamik, som vist på figur 1, hvor en vandkanal er indlejret i en membran. Som materiale besidder lipiddobbeltlaget fascinerende egenskaber med en rigdom af forskellige strukturer knyttet til længdeskalaer fra nm til mm, og ligesom i andre bløde materialer råder entropien her. Det er velkendt i andre grene af fysikken, at entropidominans på en gang kan gøre beskrivelsen meget simpel og meget kompleks, f.eks. polymerfysik, kvantefeltteori, reale gasser og kritiske fænomener. Således har det været kendt igennem de sidste 30 år på baggrund af teoretiske overvejelser, at den 3-dimensionale form af overfladen af en flydende *vesikel* – en lipidmembran, der er lukket om sig selv – kan beskrives ved hjælp af en simpel geometrisk, elastisk energifunktion for en flade [2]

$$\mathcal{H} = \frac{K_A A_0}{2} \left(\frac{A - A_0}{A_0} \right)^2 + \frac{\kappa}{2} \oint dA \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} - C_0 \right)^2 + \bar{\kappa} \oint dA \frac{1}{r_1 r_2} \quad (1)$$

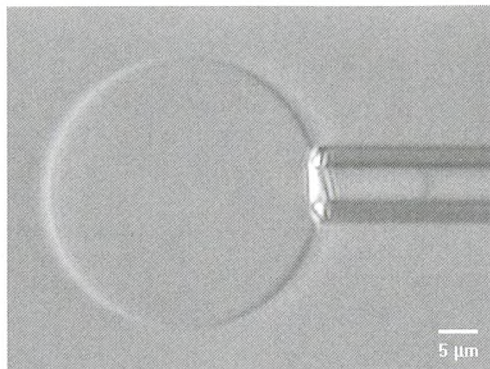
hvor A og A_0 er hhv. arealet og ligevægtsarealet af vesikelen, mens r_1 og r_2 er de lokale principale krumningsradier. C_0 repræsenterer den spontane middelkrumning, som f.eks. kan skyldes, at der er forskel på de to monolag. De elastiske konstanter $K_A \sim 0.1 - 1 \text{ J/m}^2$ og $\kappa \sim 10^{-20} - 10^{-18} \text{ J}$ er hhv. den laterale ekspansionskoefficient og bøjningsstivheden. Det sidste led er proportionalt med Eulerkarakteristikken for fladen. Værdien af κ er så lille ($\sim 1 - 100 \cdot k_B T$) at termiske

¹lipid = fedt, polypeptid = kæde af aminosyrer og saccharid = sukker.

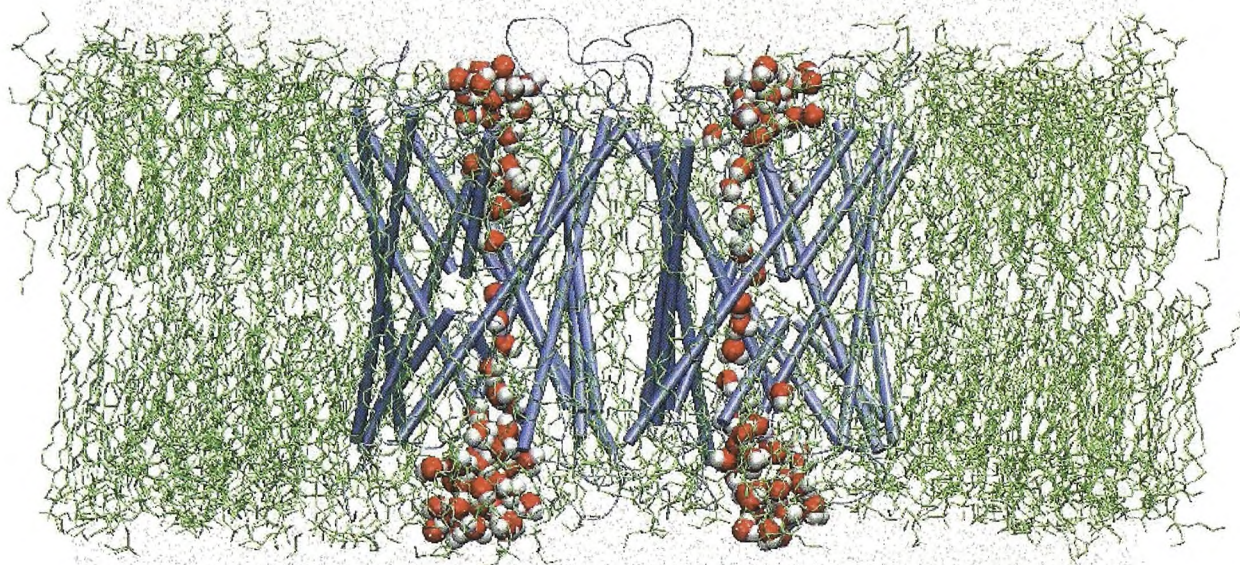
excitationer får formen af en fritstående membran til at fluktuere voldsomt.

Der er en lang række fænomener af biologisk relevans, som er afledt af disse fluktuationer, som f.eks. entropi-induceret frastødning imellem membraner, Casimir-kræfter imellem proteiner og 'crumpling' af membraner – det fænomen, at hyperfleksible membraner danner forgrenede strukturer [4]. Skønt funktionen (1) er meget simpel, er de statistiske mekaniske beregninger af dets konsekvenser meget vanskelige. Størrelsen af de elastiske konstanter er afhængige af lipiddobbeltslagets sammensætning, f.eks. kan små mængder af antibiotiske peptider, ~ 1 mol %, reducere κ dramatisk og lede til mekanisk kollaps af vesiklen. Derfor er der stor interesse i at kunne kvantificere disse størrelser tilfredsstillende. Det har imidlertid vist sig at være en meget vanskelig opgave, idet vidt forskellige estimater for κ er rapporteret for tilsyneladende identiske membraner. I 2004 lykkedes det i MEMPHYS efter væsentlige forbedringer af to mikromekaniske teknikker, VFA (Vesicle Fluctuation Analysis) hvor

det statiske spektrum for de Brownske bevægelser af membranen bestemmes, og mikropipette-teknik, hvor den entropiske elasticitet karakteriseres ved at aspirere en vesikel i en pipette ved små tryk ($\sim 1 \cdot 10^{-3}$ Pa), se figur 2, at få samstemmende estimater fra disse helt forskellige teknikker [5].



Figur 2. Lipidvesikel i mikropipetteopsætning observeret i lysmikroskop (med Hoffmann optik).



Figur 1. Snapshot fra MD-simulering af POPE-membran (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) i vand. I membranen er indlejret vandkanalen Aquaporin Z fra den velkendte bakterie E. Coli (Escheria Coli). Simuleringen demonstrerer bl.a. den detaljerede mekanisme for transporten af vand (to af de fire kanaler per Aquaporin er fremhævet) igennem kanalen [3].

Som eksempel på et resultat af den forbedrede måleteknik for de elastiske parametre kan nævnes at for en serie steroler (kolesterol, ergosterol og lanosterol), som er væsentlige membrankomponenter i specifikke klasser af organismer og med meget forskellig effekt på den molekulære orden i en lipidmembran, har der vist sig en underliggende universel afhængighed imellem den molekulære orden og de elastiske parametre [6]. Således er $K_A(S_{\text{mol}}, x) = K_A(S_{\text{mol}})$ og $\kappa(S_{\text{mol}}, x) = \kappa(S_{\text{mol}})$, hvor S_{mol} er et mål for lipidkædeordenen, mens x er sterolens molbrøk i membranen. De elastiske konstanter er med andre ord godt beskrevet ved ordensparameteren alene.

En sådan universel sammenhæng afspejler entropiens dominans i lipiddobbeltslaget, hvor lipidkæderne danner en orienteret polymersmelte med høj konformationsentropi. Et af de store mysterier i membranbiofysikken er hvorledes levende organismer bærer sig ad med at regulere membranens materialeegenskaber, når der indgår hundreder af forskellige lipider. Denne reguleringsopgave reduceres betydeligt, hvis sådanne universelle lovmæssigheder kan bringes i anvendelse. Disse mikromekaniske teknikker for vesikler er under stadig udvikling og ventes ved hjælp af nye teoretiske landvindinger, at kunne anvendes til at måle friktions-

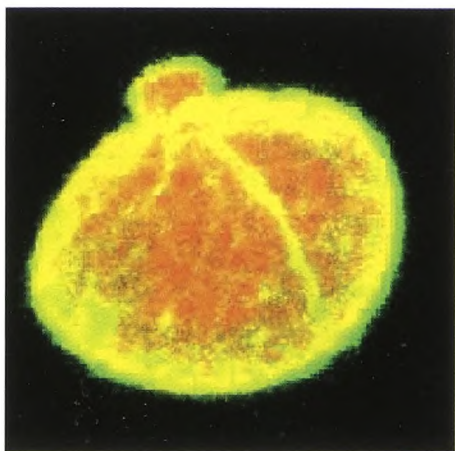
koefficienter i membranen [7] og aspekter af membranproteineres funktion [8].

Membranens egenskaber er ikke alene bestemt af lipiddobbeltlaget men også af de umiddelbare omgivelser, hvilket i stigende grad er blevet et forskningsområde i MEMPHYS med introduktionen af nye overfladesensitive teknikker som Atomic Force Microscopy (AFM), Soft Probe Spectroscopy og Neutronreflektometri. Mange af de biologiske membraner er kompositstrukturer, hvor lipidmembranen er arrangeret i lag med filamenter af sukkerstoffer (glycocalix) og polypeptider som actin og forskellige former for intermediært filament. I MEMPHYS er der bestræbelser på at etablere sådanne kompositstrukturer med membranen syntetisk for at karakterisere deres fysiske egenskaber og studere mere sammensatte membranstrukturer under velkontrollerede forhold (figur 3) [9].



Figur 3. Polymer-membran komposit på fast overflade. Sådanne strukturer danner modelsystemer for komplekse biologiske membraner med glycocalix eller membranskelet. Polymerlaget kan mekanisk stabilisere lipidmembranen og samtidigt give plads til membranproteiner og iondiffusion på begge sider af membranen [9]

Endvidere karakteriseres cellernes egne kompositter, som f.eks. kernehylsteret, som omgiver kernen og bl.a. består af to lipidmembraner og et netværk af intermediært filament (Lamin) på indersiden. For nylig er det blevet påvist, at kernehylsteret udgør en sammenhængende elastisk skal, som minder noget om en tynd gummifilm (figur 4) [10]. Dette understøtter forestillingen om at kernehylsteret tjener til beskyttelse af det genetiske materiale i cellekernen.



Figur 4. Cellekernen fra en HeLa-celle i mikropipette observeret i konfokalmikroskop. Laminstrukturen (grøn/gul) i kernehylsteret og DNA (rød) har her fået forskellige fluorescerende markører. Analyse af fluorescensintensiteten ved deformation af kernen i mikropipetten kan give information om strukturen og de mekaniske parametre.

Membranbiofysik er kommet i fokus blandt molekylær- og cellebiologer i de senere år, idet det er blevet klart, at membranerne spiller en meget aktiv rolle i mange livsprocesser på cellulært niveau, så der er potentielt store muligheder i udvikling af området i samarbejde med biologer. Der venter en stor udfordring for os fysikere i at kunne bidrage til at beskrive livsprocessernes natur, ikke blot med en hjælpedisciplin, men helt centralt med teoridannelser og fysikkens metodik.

Litteratur

- [1] [www@memphys.sdu.dk](http://www.memphys.sdu.dk)
- [2] W. Helfrich (1973), "Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments". *Z. Naturforsch.* **28c** 693-703.
- [3] M.Ø. Jensen & O.G. Mouritsen, "Single-Channel Water Permeabilities of E. Coli Aquaporin Water Channels AqpZ and GlpF" (preprint).
- [4] D. Nelson, T. Piran & S. Weinberg (eds.) (2004), *Statistical Mechanics of Membranes and Surfaces*, Second Edition. World Scientific Publishing.
- [5] J. Henriksen & J.H. Ipsen (2004), "Measurement of membrane elasticity by micro-pipette aspiration". *Eur. Phys. J.* **14** 149-167.
- [6] J. Henriksen, A.C. Rowat, E. Brief, Y.W. Hsueh, J.L. Thewalt, M.J. Zuckermann & J.H. Ipsen, "Universal behaviour of membranes with sterols" (indsendt til *Biophys. J.*).
- [7] L. Miao, M.A. Lomholt & J. Kleis (2002). "Dynamics of shape fluctuations of quasi-spherical vesicles revisited". *Eur. Phys. J. E.* **9** 143-160.
- [8] M.A. Lomholt, P.L. Hansen & L. Miao (2005). "A general theory of non-equilibrium dynamics of lipid-protein fluid membranes". *Eur. Phys. J. E.* **16** 439-461.
- [9] T. Gutberlet, B. Klösgen, R. Krastev, R. Steitz (2004), "Neutron Reflectivity as method to study in-situ adsorption of phospholipid layers to solid-liquid interfaces". *Adv. Eng. Mat.* **6** 832-836.
- [10] A.C. Rowat, L.J. Foster, M.M. Nielsen, M. Weiss & J.H. Ipsen (2005), "Characterization of the elastic properties of the nuclear envelope". *J. R. Soc. Interface* **2** 63-69.



John Ipsen arbejder teoretisk og eksperimentelt med termodynamik, mekanik og dynamik af biologiske og syntetiske lipidmembraner.