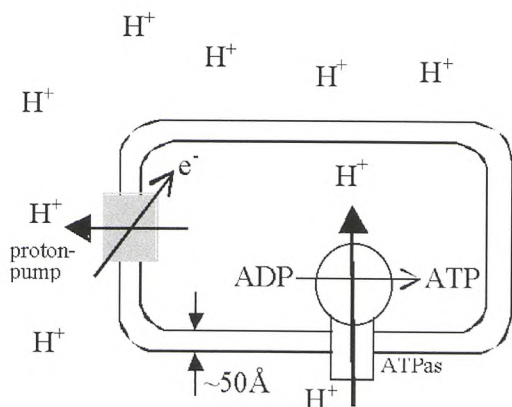


Biofysik – livets molekyler, biologiska membraner och molekylära maskiner

Peter Brzezinski, Stockholms universitet.

Vad händer när en ljusfoton träffar ett grönt blad? Hur omvandlas ljusenergin till en energiform användbar för växtens livsprocesser? Hur kontrollerar en levande cell förbränning av föda med hjälp av luftens syre?

Detta är några frågor som biofysiker kan försöka besvara. Att exakt definiera ämnesområdet biofysik är svårt. Biofysiker arbetar på många olika nivåer, från enskilda molekyler till hela organ i levande organismer, vilket klart framgår om man tittar på vilken bakgrund medlemmar i "American Biophysical Society" har. Bland dessa kan nämnas biokemister, molekylärbiologer, fysiker, cellbiologer, fysiologer, fysikaliska kemister m.fl. Att ta upp exempel från alla dessa områden skulle kräva alltför mycket utrymme. Jag skall därför i denna artikel koncentrera mig på det ämnesområde som jag själv närmast identifierar med benämningen *biofysik – problemställningar associerade med förståelse av biologiska processer och fenomen på molekylär nivå i termer av fysikaliska mekanismer*.



Figur 1. Ett flöde av elektroner (t.ex. från förbränning av föda) driver pumpning av protoner över en biologisk membran. Koncentrationsgradienten driver bildning av ATP från ADP i ATPaset.

Själv studerade jag teknisk fysik vid Chalmers tekniska högskola och doktorerade sedan i fysik, även om själva forskningsprojektet utfördes vid en biokemi/biofysikinstitution. Utan ett intimt samarbete med biokemister är det lönlöst för en fysiker att bedriva forskning i biofysik, framförallt därför att förutsättningen för framgångsrika studier är tillgången på rena, väldefinierade biologiska preparat, dvs kunskaper om reningsmetoder och metoder att karakterisera biologiska prover behövs. Dessutom måste man på ett kontrollerat specifikt sätt kunna modi-

fiera biologiska molekyler för att undersöka deras struktur-funktionsrelation. I min forskargrupp arbetar doktorander och postdoktorer med bakgrund från kemi, fysik och molekylärbiologi. Vi använder dagligen både fysikaliska tekniker såsom t.ex. tidsupplöst optisk spektroskopi i kombination med ultrasnabba blandningstekniker för att studera laserblixinducerade elektron- och protonöverföringsreaktioner, och biokemiska tekniker såsom t.ex. molekylärbiologi för att modifiera enskilda byggstenar i proteiner.

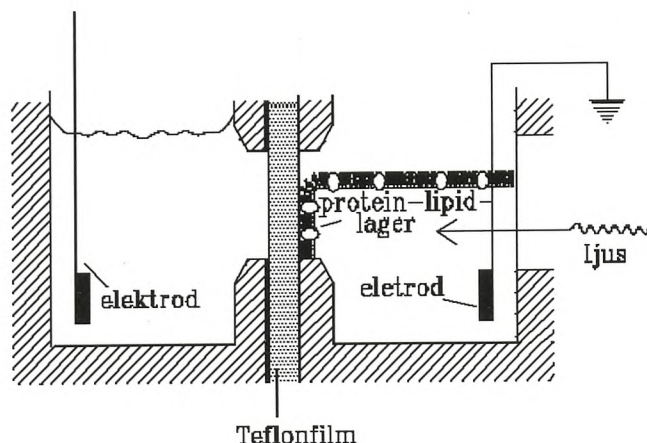
Bioenergetik och biologiska membraner

Speciellt arbetar vi med bioenergetik, dvs frågeställningar rörande omvandling av olika energiformer i biologiska system. Sådana processer följer en generell princip i alla levande organismer på jorden. Denna princip formulerades av Peter Mitchell som den sk. kemiosmotiska teorin (Nobelpris 1978) och bygger på att proteiner (enzym), bundna i biologiska membraner inne i den levande cellen, använder ett flöde av elektroner till att skapa en koncentrationsgradient av vätejoner över membranerna. Vätejongradienten kan liknas vid ett "uppladdat batteri" vars energi driver produktionen av adenosintrifosfat (ATP), en energirik molekyl som kan användas för många livsprocesser och utgör den universella "energivalutan" (se fig. 1). Hos fotosyntetiserande organismer drivs elektronflödet med hjälp av solljus, medan den hos andra organismer drivs via förbränning av föda t.ex. med hjälp av luftens syre (cellandning).

Fotosyntes

Karakteristiskt för fotosyntetiserande organismer är att dessa kan ta tillvara solens ljusenergi och binda den i kemiska föreningar som är stabila (t.ex. socker). Infångningen av fotoner sker i sk. reaktionscentra, som är membranbundna proteiner, och resulterar i att en klorofyllmolekyl avger en elektron, som överförs mycket snabbt ($< 10^{-7}$ s) från ena till andra sidan av reaktionscentrumet. Resultatet är en laddningsseparation – en positiv laddning på en sida av reaktionscentrumet och en negativ på den andra. Systemet har en verkningsgrad som är nära 100 %, dvs varje foton som fångas in ger upphov till en laddningsseparation. Denna laddningsseparation driver sedan pumpning av protoner från ena till andra sidan membranerna (jfr fig. 1). Förståelse av hur dessa biologiska "fotoceller" är uppbyggda och fungerar förväntas ge oss möjligheter att konstruera mer effektiva artificiella system för energi-

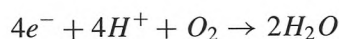
omvandling. Vi har nyligen konstruerat en biologisk "fotocell" med hjälp av reaktionscentra adsorberade till en modifierad guld eller Teflonyta (fig. 2). Denna cell levererar en liten spenningsändring vid belysning [1,2].



Figur 2. Experimentuppställning för mätningar av laddningsförflyttningar över biologiska membraner. T.ex. fotosyntetiska reaktionscentra sätts in i en membran, som sätts fast på en yta. Belysning resulterar i en spänning, som kan mätas över elektroderna. Notera att bilden inte är i skala (Teflonfilmen och protein-membran-lagret är 6 μm respektive 5 nm tjocka, hela cellen är 5 cm lång) [1,2]

Respiration

Andra organismer, som själva inte kan använda solljuset direkt utnyttjar för sina livsprocesser den energi som är "bunden" i t.ex. socker. När socker förbränns reagerar det med syret i luften varvid värme frigörs. I levande organismer måste denna förbränning ske under kontrollerade former så att energin inte blir till värme utan omvandlas till en form som kan användas av organismen. Hos flercelliga organismer sker denna omvandling inne i cellens mitokondrier i den sk. elektrontransportkedjan. Här driver en ström av elektroner, som härrör från nedbrytning av föda (reducerande föreningar), en ström av protoner över membranen (jfr fig. 1). Den slutliga reaktionen med syre i denna kedja sker i ett enzym som heter cytokromoxidas (fig. 3) [3-5]. Det bör påpekas att drygt 90 % av det syre som förbrukas av levande organismer på jorden förbränns av just cytokromoxidas. Enzymet är en "molekylär maskin", som använder energin från reaktionen

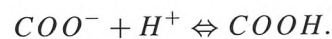


till att pumpa protoner från ena till andra sidan av membranen. Ett av våra huvudprojekt syftar till att kartlägga kopplingen mellan elektron- och protontransporten i cytokromoxidas [5-7].

Syntes av ATP

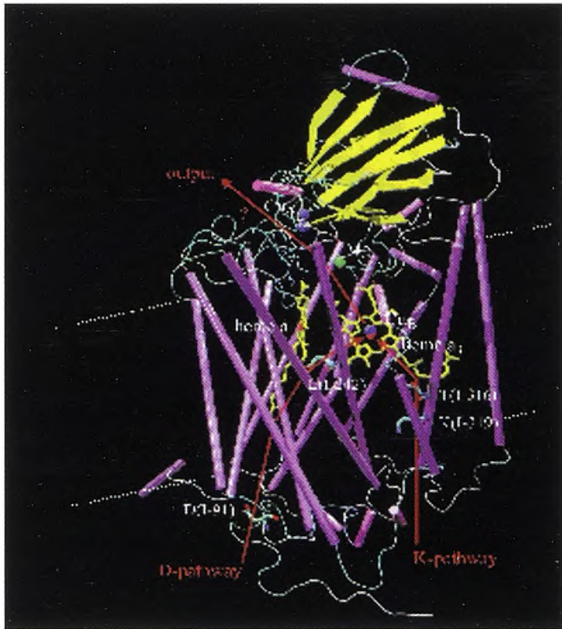
Syntesen av ATP sker i det så kallade ATP-syntetaset (ATPas) [8]. Proteinet består av ett stort antal subenheter som bygger upp två huvudstrukturer vilka bildar två funktionella enheter, F_0 och F_1 (fig. 4). Den första är ett transmembrant protein som innehåller en protonkanal som leder från ena till andra sidan membranen. Den andra delen (F_1) består av en ca. 80 Å hög ringformad struktur av sammanlagd sex enheter som sitter bundna till varandra som klyftorna i en apelsin (3α - och 3β - enheter). I nedre delen av denna struktur finns en ca. 50 Å lång "axel" (γ), som sitter förankrad i F_1 . Bestämningen av F_1 -enhetens struktur, samt utforskning av ATPasets funktion belönades med förra årets Nobelpris i kemi. ADP och fosfat (P_i) binds till speciella bindningssäten i F_1 där det modifieras till ATP, varefter denna produkt frisätts. Energin för omvandlingen av ADP till ATP tillförs genom strukturändringar ("mekanisk energi") i bindningssätena. Vi vet idag att dessa strukturändringar sker genom att den "axel" (γ) som är ansluten till F_1 roterar. Den kan liknas vid en molekylär kamaxel, som förmedlar den fria energin från protonflödet genom F_0 till konformationsändringar i F_1 . Själva F_1 -enheten sitter förankrad på membranytan (se b fig. 4). Rotationen demonstrerades nyligen elegant av en japansk grupp (fig. 5) [9]. De utnyttjade det faktum att ATPaset, som normalt omvandlar en protongradient till ATP, även kan fungera "åt andra hållet", dvs tillsats av ATP resulterar i pumpning av protoner. De satte fast F_1 uppochner på en yta, dvs γ -axeln stack uppåt (fig. 5). På axeln satte de fast en mycket lång fluorescerande fiber. Tillsats av ATP resulterade i rotation av fibern, vilket kunde filmas med en videokamera – en molekylär maskin.

Hur fås då axeln att rotera, dvs hur driver en protongradient produktionen av ATP? Den exakta mekanismen är inte känd idag, men en mycket trolig och intressant modell har formulerats [10] (fig. 6). Den del av axeln som sitter förankrad i F_0 har 12 protonerbara grupper ordnade i en ring. Dessa kan vara antingen oladdade (H) eller negativt laddade ($-$):

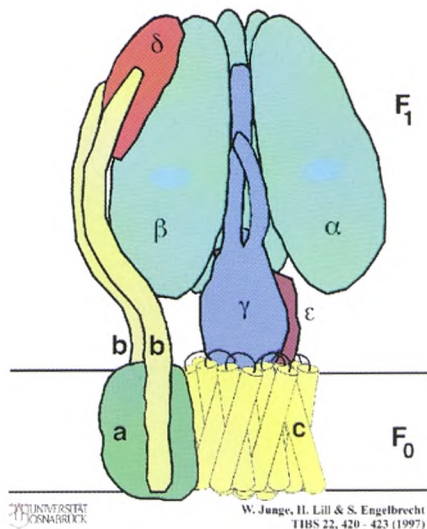


Miljön i/runt den membranbundna F_0 är huvudsakligen hydrofob, vilket gör att COOH formen är mer stabil där. Den del av F_0 som innehåller protonkanalen (a) är dock mer hydrofil (polär) vilket gör att COO^- formen är mer stabil där. Den del av axeln som är i kontakt med den hydrofila modulen där denna är i kontakt med den högre protonkoncentrationen (a_h) kommer att vara mer protonerad än den del som är i kontakt med den lägre protonkoncentrationen (a_l). Eftersom den protonerade formen inte "trivs" i den hydrofila delen (och den oprotonerade (laddade) formen inte "trivs" i den hydrofoba delen), kommer axeln att flyttas i pilens riktning. Med andra ord kommer gruppen vid a_h att protoneras, axeln rör sig ett steg medurs, samtidigt som gruppen

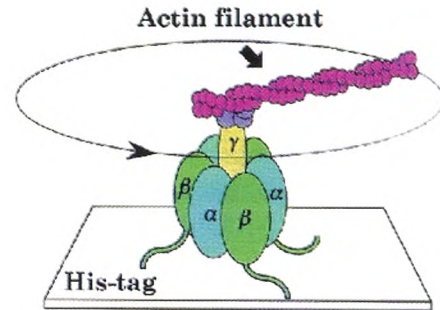
vid a_i avger sin proton. På detta sätt används en protongradient till att generera en rotation av axeln – en entropidriven motor.



Figur 3. En schematisk bild av cytokromoxidas från mitokondrie (från kohjärta). En elektron från ett vattenlösligt protein, cytokrom c (ej med på bilden), som binder nära Cu_A överförs till Cu_A . Elektronen går sedan vidare till hem a och hem a_3/Cu_B , där syre binds och reduceras till vatten, samtidigt som protoner tas upp genom två protonvägar (D och K). Energin från förbränningen driver dessutom pumpning av protoner från ena till andra sidan membranen. Det är inte känt var protonerna kommer ut. Den streckade linjen indikerar membranens position. Bilden är gjord av M. Karpfors (modifierad från [3]).

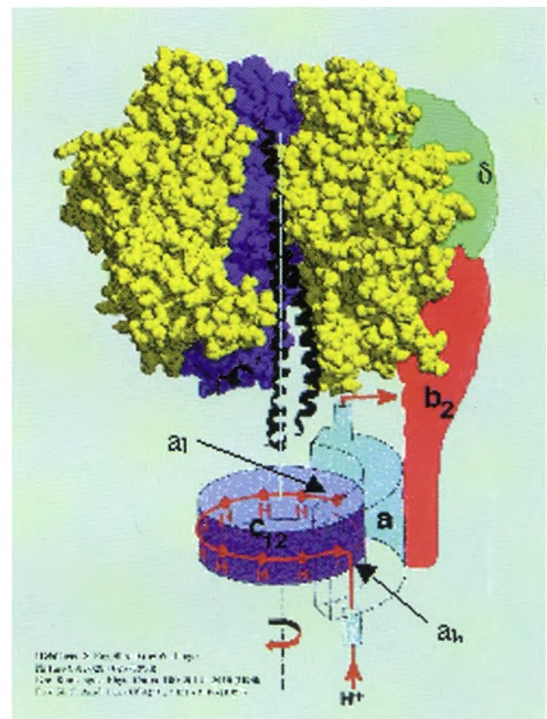


Figur 4. Schematisk struktur för F_1F_0 -ATPaset. F_0 -subenheten är membranbunden. Strukturen för F_1 bestämdes nyligen med hjälp av röntgenkristallografi. Bilden är från [8].



W. Junge, H. Lill & S. Engelbrecht
TIBS 22, 420 - 423 (1997)

Figur 5. Direkt observation av rotation i ATPaset [9]. F_1 sattes fast på en yta upphöjning. En fluorescerande fiber ("actin filament") sattes fast på γ -subenheten (se fig. 4). Tillsats av ATP resulterade i rotation av fibern.



Figur 6. Förslag på modell för ATPsets funktion. En protonström genom F_0 driver en rotation hos γ -subenheten (se fig. 4), relativt membranen.

Slutord

Den molekylära bioeneretikforskningen befinner sig just nu i en mycket spännande och expansiv fas. Tack vare utveckling av nya metoder har det på senare år blivit möjligt att i detalj bestämma strukturen för enzymer som spelar en central roll i energiomvandlingen. Samtidigt har utvecklingen av biofysikaliska tekniker, teoretiska modeller t.ex. för elektron och protonöverföringsreaktioner i biologiska system samt moderna biokemiska metoder gjort det möjligt att börja kartlägga mekanismer i detalj för funktionen av dessa enzymer.

Referenser:

- [1] Brzezinski, P., Paddock, M. L., Okamura, M. Y. & Feher, G. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1321**, 149-156.
- [2] Brzezinski, P., Messinger, A., Blatt, B., Gopher, A. & Kleinfeld, D. (1998) *J. Membrane Biol.* **165**, 213-225.
- [3] Brzezinski, P. & Ädelroth, P. (1997) *J. Bioenergetics and Biomembranes* **30**, 99-107.
- [4] Ferguson-Miller, S. & Babcock, G. T. (1996) *Chemical Reviews* **96**, 2889-2907.
- [5] Karpefors, M., Ädelroth, P., Aagaard, A., Sigurdson, H., Svensson Ek, M. & Brzezinski, P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 159-169.
- [6] Ädelroth, P., Sigurdson, H., Halln, S. & Brzezinski, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12292-12297.
- [7] Karpefors, M., Ädelroth, P., Zhen, Y., Ferguson-Miller, S. & Brzezinski, P. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13606-13611.
- [8] Junge, W., Lill, H. & Engelbrecht S. (1997) *TIBS* **22**, 420-423.
- [9] Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita Jr., K. (1997) *Nature* **386**, 299-302.
- [10] Sabbert, D., Engelbrecht, S. & Junge, W. (1996) *Nature* **381**, 623-625.

Referenser 3, 4, 5, 8, 9 är översiktsartiklar. Denna artikel är publicerad i *Fysik-Aktuellt*, Nr. 4, december 1998, som distribueras till alla medlemmar af Svenska Fysikersamfundet.



Peter Brzezinski är professor i Biokemi vid Stockholms universitet.

Nyt fra Selskabet for Naturlærens Udbredelse

Selskabet for Naturlærens Udbredelse

Direktionen for SNU udgøres af:

Professor Dorte Olesen (formand)

UNI-C

Vermundsgade 5

2100 København Ø

Lektor Jørn Johs. Christiansen (sekretær)

Aakjærs Alle 24 B

2860 Søborg

Tlf. 39 69 58 18

Lektor Finn Berg Rasmussen

Lektor Erik Schou Jensen

Professor Erik W. Thulstrup

Lektor Malte Olsen

Direktør Ole Mørk Lauridsen

Virksomhedsbesøg hos Brüel & Kjær Medical, dyrerækkernes opståen samt generalforsamling

Selskabet for Naturlærens Udbredelse har den 10. februar arrangeret et foredrag, hvor lektor Jens Martin Knudsen fortalte om jagten på liv udenfor Jorden, og den 3. marts fortalte lektor Minik Rosing om livets tidligste historie her på Jorden.

Det næste arrangement bliver et virksomhedsbesøg hos Brüel & Kjær Medical, som afholdes **onsdag den 24. marts 1999**. Nærmere oplysninger om dette arrangement kan fås hos Bente Egaa, tlf. 35 87 88 04 eller e-mail Bente.Egaa@uni-c.dk.

Desuden afholder Selskabet et foredrag ved professor Reinhardt Møbjerg Kristensen fra Zoologisk Musæum med titlen:

Opstod alle kendte dyrerækker i Prækambrium eller Kambrium?"

Foredraget holdes på Geologisk Musæum **onsdag den 21. april 1999 kl. 19.30**. Efter foredraget er der generalforsamling.

Indmeldelse i Selskabet kan ske ved at benytte kuponen på side 31 i dette nummer af Kvant.