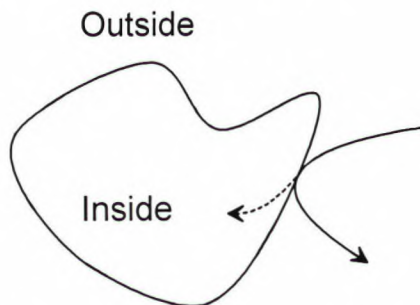


# Biologiske Membraner og ionledende kanaler

Olaf Sparre Andersen, Department of Physiology and Biophysics,  
Cornell University Medical College, New York, NY 10021, USA

Den levende celle er omgivet af en membran, der danner en barriere mellem to væskefaser. Biologiske membraner er lukkede overflader, men topologisk er de ikke nødvendigvis simple. Fælles for dem alle er, at de adskiller "selv" fra "ikke-selv" (Figur 1). Denne artikel handler om de strukturer i membranen der tillader transport af stof mellem cellen og dens omgivelser.



**Figur 1.** Sempelt cellediagram, der illustrerer cellemembranens selektive barriereegenskaber.

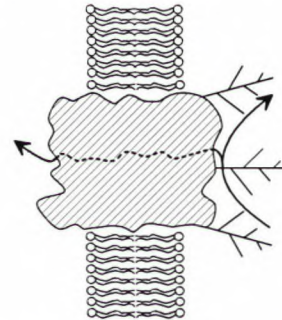
## Membraner som Selektive Barrierer

Funktionelt er biologiske membraner selektive barrierer, i den forstand at de ikke tillader fri bevægelse af materiale mellem de to vandfaser. Men biologiske membraner er ikke kun barrierer, for i så fald ville cellens indre være et lukket system - ude af stand til at vedligeholde det stofskifte der er nødvendigt for at være levende. Det er derfor nødvendigt at cellen kan udveksle materiale og information med omgivelserne. Den biologiske membrans selektive barriereegenskaber opstår ved at membranen er opbygget af et bimolekylært lipidlag (se Ole G. Mouritsens artikel i dette nummer) i hvilket der er indkorporeret membranproteiner, der er i kontakt med væskefaserne på de to sider af membranen (Figur 2).

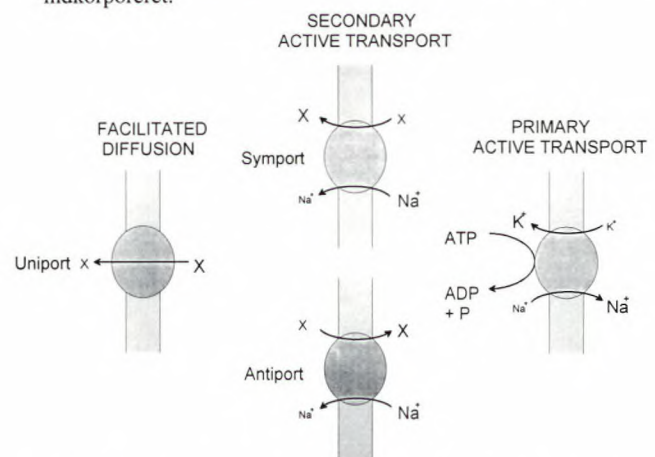
Den bimolekylære lipidmembrans struktur gør at membranen er en god barriere mod passage af polære stoffer, så som små uorganiske ioner, kulhydrater, aminosyrer og proteiner. Membranen er uigennemtrængelig for disse molekyler fordi de er uopløselige i membranens olielignende indre; den tillader fri passage for små ikke polære stoffer som er opløselige i membranens indre f.eks.  $O_2$ ,  $CO_2$ , og mange lægemidler).

Den selektive passage af stof og information gennem membranen finder sted gennem membranproteiner (Figur 2). Det er f. eks. nødvendigt at natriumioner kan passere gennem cellemembranen; denne passage af  $Na^+$  finder sted ved at der er membranproteiner som selektivt binder  $Na^+$  og transporterer den gennem proteinet

fra den ene væskefase til den anden. Andre membranproteiner er specialiseret til at transportere kalium, etc. Disse membranproteiner katalyserer derfor passagen af materiale fra den ene vandfase til den anden. Denne proteinkatalyserede stofpassage er meget selektiv; det er muligt at skelne mellem  $Na^+$  og  $K^+$ . Membranproteiner er derfor selektive protein katalysatorer, eller enzymer.



**Figur 2.** Biologiske membraner er opbygget som en bimolekylær lipidmembran i hvilken membranproteinerne er indkorporeret.



**Figur 3.** Eksempler på protein-katalyseret stof bevægelse gennem en membran. Til venstre: katalyseret diffusion (også kaldet uniport), hvor passagen af et molekyle (X) finder sted som en "simpel" diffusion gennem proteinet. I midten: sekundær aktiv transport, hvor passagen af X er koblet til  $Na^+$ , der diffunderer fra høj til lav koncentration. Hvis X og  $Na^+$  bevæger sig i samme retning, så taler man om en symport; hvis X og  $Na^+$  går i hver sin retning, så taler man om en antiport. Til højre: primær aktiv transport, hvor transporten af  $Na^+$  og  $K^+$  er koblet til hydrolyse af ATP til ADP og P

Man skelner mellem tre forskellige typer af katalytisk aktivitet (Figur 3). Den simpleste form er katalyseret diffusion (også kaldet faciliteret diffusion), hvor den "drivende kraft" for passagen af et stof (X) udelukkende er betinget af en forskel i den kemiske koncentration og det elektriske potentiale på de to sider af membranen. Koncentrations-

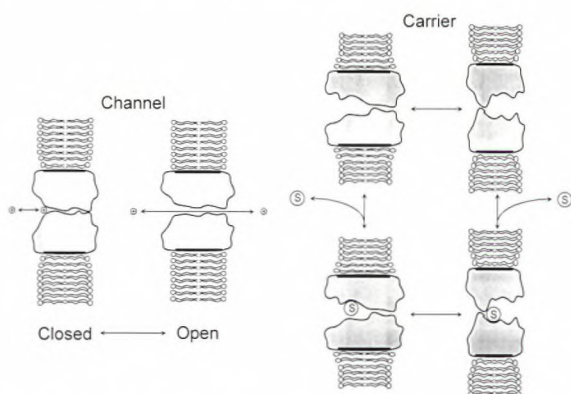
forskellen giver anledning til en diffusion, fra høj til lav koncentration. Potentialforskellen giver anledning til en elektromigration af ladede partikler i det elektriske felt. Stofbevægelsen drives af "simple fysiske kræfter".

I mange tilfælde kan man ikke gøre rede for stofpassagen ud fra sådanne simple overvejelser, hvilket skyldes at transporten af X er drevet af en energikilde - enten en koncentrationsforskel af et andet stof normalt  $\text{Na}^+$  - eller af stofskiftets vigtigste energikilde: Hydrolyse af adenosintrifosfat, ATP, til adenosindifosfat, ADP, + uorganisk fosfat, P. Natrium koncentrationsforskellen over cellemembranen opretholdes af en ATP-drevet  $\text{Na}^+$  transport ud af cellen, der også transporterer  $\text{K}^+$  ind i cellen.

Denne ATP-drevne  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  udveksling medfører at den intracellulære kalium koncentration er højere end den ekstracellulære koncentration. Cellemembranens permeabilitet for  $\text{K}^+$  er meget større end permeabiliteten for  $\text{Na}^+$ . Dette giver anledning til et elektrisk potentiale, der er ca. 60 mV lavere inde i cellen, end i væsken udenfor. For en detaljeret gennemgang af bioelektriske fænomener henvises til Sten-Knudsen<sup>1</sup>.

### Katalyseret Diffusion

På det molekylære plan er der to forskellige diffusionsveje for katalyseret diffusion gennem cellemembranen. En via såkaldte kanalproteiner eller via carrierproteiner.

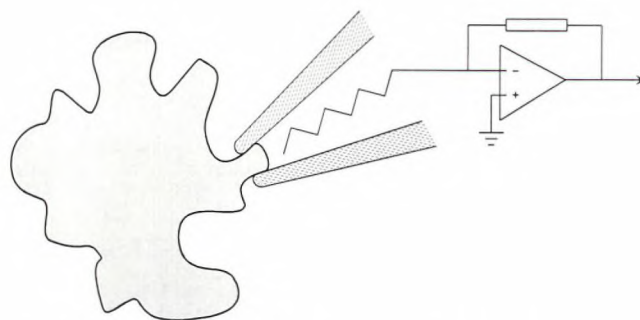


**Figur 4.** Eksempler på faciliteret diffusion: Til venstre: en ionledende kanal, hvor ionbevægelsen finder sted igennem en vandfyldt pore der forbinder de to vandfaser. Kanals funktion er bestemt af ligevægten imellem de forskellige konformationer: lukket og en åben. Til højre: en carrier, hvor passagen af et stof (S) er koblet til konformationsændringer i carriermolekylet.

Den fundamentale forskel mellem kanaler og carryere er, at stofpassage igennem en kanal (Figur 4, til venstre) sker gennem en vandfyldt pore og derfor ikke er koblet til konformationsændringer i proteinet; stofpassage igennem en carrier (Figur 4, til højre) er koblet til sådanne konformationsændringer. Fælles for disse, og alle andre membranproteiner, er, at deres kontaktflade til lipidmembranen er hydrofob (vandskyende), og at der er tæt kobling mellem protein og lipidmembran. Kontaktfladen til de to vandfaser, og til den passage hvor igennem stofbevægelsen finder sted, er polær.

Poren i en ionledende kanal er relativt stabil (rigid) så ionpassagen kan ske meget hurtigt (passagetid  $\approx 10$  ns), og man kan måle ionpassagen gennem kanalen som en elektrisk strøm (se nedenfor). Den meget hurtige ionpassage nødvendiggør, at man kan kontrollere kanalens funktionstilstand, om kanalen er permeabel (åben) eller impermeabel (lukket). Denne transformation mellem lukket og åben kanal er betinget af ændringer i proteinstrukturen.

Elektrofysiologisk kan man måle funktionstilstanden af en enkelt kanal (et enkelt molekyle eller molekylkompleks), da man kan isolere et meget lille del, en *patch* af cellemembranen med en glaspipette (Figur 5). Den elektriske lækage, mellem glas og membran er meget lille ( $< 10$  pS), hvilket gør det muligt at observere ionbevægelser gennem en enkel kanal som en elektrisk strøm i størrelsesordenen af 1 - 10 pA. Denne elektrofysiologiske, *patch-clamp* metode gør det muligt at observere funktionen af cellemembranens kanaler med en tidsmæssig opløsning på 10 - 100  $\mu\text{s}$ , hvilket har været af afgørende betydning for forståelsen af cellulær elektrofysiologi. Erwin Neher og Bert Sakmann fik da også Nobelprisen i fysiologi i 1992 for udviklingen af denne metode.



**Figur 5.** Skematisk patch-clamp måling af den elektriske aktivitet i et lille membransegment. Måleelektroden er en glaspipette fyldt med en passende elektrolyt. Den isolerer en "patch" med et areal på  $\sim 1 \mu\text{m}^2$ . Da den elektriske modstand af "patch'en" er meget højere end resten af membranarealet, kan man ændre potentialet over patch'en ved at ændre potentialforskellen mellem den ekstracellulære vandfase og måleelektroden.

Mens en kanal tillader en fri iontransport så længe den er åben, er det ganske anderledes i en carrier (Figur 4, til højre). Her er stoftransporten uadskillelig fra konformationsændringer i membranprotein. Et molekyle af det substrat der skal transporteres bindes til et bindingssted på carrierprotein, der er i kontakt med den ene vandfase. Carrier-substrat komplekset kan derefter skifte konformation, således at bindingsstedet (og substratmolekylet) kommer i kontakt med den anden vandfase, substratet kan dissociere fra carryeren og diffundere ud i den anden vandfase. Den "tomme" carrier kan nu igen skifte konformation, således at bindingsstedet igen bliver tilgængelig for substratmolekyler fra den første vandfase. Således transporter en carrier hvert enkelt molekyle aktivt gennem membranen.

Den kvalitative forskel mellem en kanal og en carrier er, at carriermolekylet besidder en form for *molekylær hukommelse*, i den forstand at man, umiddelbart efter et substratmolekyle er dissocieret fra carrier-substrat komplekset, ved, hvilken væskefase bindingstedet er i kontakt med. Hukommelsen skyldes at den katalytiske aktivitet er betinget af proteinets konformationsændring. I en ionledende kanal er der ikke en tilsvarende hukommelse da den katalytiske aktivitet er uafhængig af konformationsændringer i kanalen.

Carriermolekylets hukommelse er stor af betydning, da den ligger til grund for den eksperimentelle identifikation af carrier-medieret stofpassage. Hvis hukommelsen er dårlig, hvis konformationsændringen er så lille at et substratmolekyle kan snige sig igennem carrieren uden en konformationsændring finder sted, så bliver det vanskeligt at skelne mellem en kanal og en carrier. Der er højst sandsynligt en glidende overgang mellem den klassiske kanal (Figur 4, til venstre) og den klassiske carrier. (Figure 4, til højre).

### Gramicidinkanaler

Mange spørgsmål vedrørende ionledende kanalers funktion kan belyses uden at man kender den tredimensionale struktur; men egentlig mekanistisk viden kræver at man kender molekylstrukturen. Den bedst kendte kanal er gramicidinkanalerne der er dannet af et polypeptidantibiotikum, gramicidin A:

Formyl-L-Val---Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-

1        2        3        4        5

-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-

6        7        8        9        10        11

-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-ethanolamine.

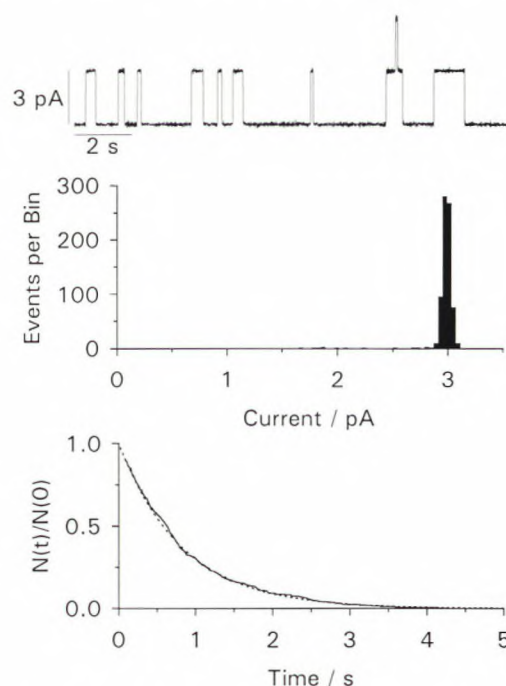
12        13        14        15

Bagsidefiguren viser gramicidinkanalens tre-dimensionale struktur, bestemt ved hjælp af to-dimensionale kernemagnetisk resonans af A. Arseniev og V. Bystrov (Shemyakin-Instituttet, Moskva).

Den alternerende L-D-sekvens tillader aminosyrernes sidekæder at stikke ud til kun den ene side af en helix der dannes af peptidgrupperne. Denne helix har 6.3 aminosyrer per omgang og er stabiliseret af intramolekulære brintbindinger; den kaldes en  $\beta^{6.3}$ -helix. Kanalen er en antiparallel dimer, hvor de to monomere mødes i formyl-NH-enderne og danner intermolekulære brintbindinger. Denne struktur gør at kanalen er forbausende robust, med meget veldefineret funktion. Gramicidinkanalen er kation-selektiv,  $\approx 25$  Å lang med en pore diameter på  $\approx 4$  Å, hvilket svarer til diameteren af et vandmolekyle eller en alkali metalion. Ioner og vandmolekyler kan derfor ikke passere hinanden i kanalen – stofpassage gennem kanalen foregår i gåsegang.

Ionpassagen meget hurtig, og man kan måle strømmen igennem den enkelte kanal.

Figur 7 viser en karakterisation af gramicidin A kanaler i en syntetisk bimolekylær lipidmembran.



**Figur 7.** Karakterisation af gramicidin A kanaler. Øverst: Enkelt-kanal strømme gennem en fosfolipidmembran i tilstedeværelse af gramicidin A. De rektangulære strømspring svarer til at en kanal dannes, ved at to monomere mødes, og falder fra hinanden igen. I midten: et amplitude histogram, hvor man ser at  $>95\%$  af strømspringene har en meget veldefineret størrelse. Nederst: Fordelingen af kanallevetider, der kan beskrives ved en simpel eksponential fordeling. Fordelingen af åbningsintervaller kan ligeledes beskrives ved en simpel eksponential fordeling.

Membranen adskiller to elektrolytopløsninger, og måleopstillingen ligner den i Figur 5. Det vil sige man isolerer et lille membransegment og måler strømmen igennem dette. Membranens modstand er ca.  $10^{12} \Omega$ , man kan derfor måle strømmen igennem en enkelt kanal. I dette eksempel (Figur 7, for oven) er strømmen 3 pA, hvilket svarer til en nettoflux på  $2 \cdot 10^7 \text{ Na}^+/\text{s}$ . De enkelte strømspring, fra grundlinien til det ledende niveau og tilbage igen, svarer til at to  $\beta^{6.3}$ -helices danner den dimer, der udgør kanalen, og dissocierer igen. Til højre i figuren ses et dobbelt strømspring. Det opstår fordi to kanaler dannes – først en og så en til et andet sted i membranen, hvilket giver anledning til endnu et strømspring.

De enkelte strømspring har nogenlunde samme højde. I dette forsøg er de enkelte kanaler med andre ord meget ens. Det kan kvantiseres ved at opbygge amplitudehistogrammer af strømspringene (Figur 7, i midten); næster alle strømspringene har den samme højde.

I modsætning den snævre fordeling af strømspringene så er levetiden af de enkelte kanaler meget forskellig. Det skyldes at sandsynligheden for at de to monomere i kanalen dissocierer fra hinanden er konstant per tidsenhed. Fordelingen af kanallevetider kan derfor beskrives som en enkel-eksponential fordeling (Figur 7, nederst).

Den kendte struktur og relativt simple funktion gør gramicidinkanalerne velegnede til at undersøge mange problemer vedrørende ionledende kanaler: hvorledes kanalfunktionen afhænger af aminosyresekvensen; og hvorledes funktionen påvirkes af ændringer i den omgivende lipidmembran. Derudover kan man også klargøre hvorledes kanalstrukturen påvirkes af ændringer i de kanaldannende molekylers aminosyresekvens. Det er muligt fordi enkeltkanalmålinger kan betragtes som en form for spektroskopi. Hvor amplitudehistogrammet giver et spektrum af kanalernes ionpermeabilitet. Tilsvarende er der fuld ækvivalens mellem levetidsfordelingen i Figur 7 (nederst) og levetidsfordelingen i et konventionelt spektroskopisk forsøg.

Gramicidinkanalerne kan også bruges til få almene fysisk-kemiske oplysninger om stofpassagen i elektrolytter og om bimolekylære lipidmembraners mekaniske egenskaber. Jeg vil kort beskrive et eksempel på dette.

### Måling af membraners deformationsenergi.

De strømspring man ser i tilstedeværelse af gramicidin *A* skyldes kinetikken i monomer-dimer livvægten, hvor en monomer fra hvert monolag danner kanalen. Kanalens længde er kortere end gennemsnitstykkelsen af den omgivende lipidmembran, som illustreret i figur 8 medfører kanaldannelsen derfor en membrandeformation.

Denne deformation øger membranens overfladeareal og mindsker det volumen der er til rådighed for fosfolipidernes fedtsyrekæder. Man skelner mellem tre forskellige komponenter i deformationen: en kompression, hvor lipidernes fedtsyrekæder presses mod hinanden; en forøgelse af overfladearealet; og en bøjning (eller *splay*) i de to monolag. De vigtigste bidrag er kompressions- og bøjningsenergien, der hver bidrager med ca 50% til deformationsenergien ( $\Delta G_{def}^0$ ).

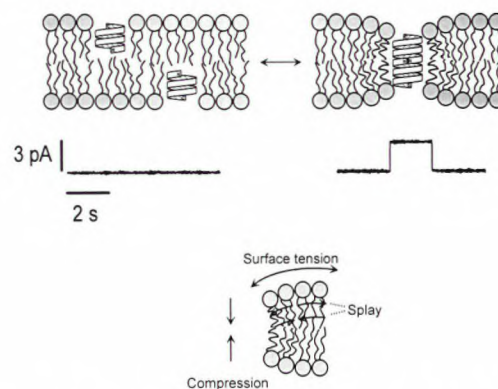
Det mekaniske misforhold mellem kanalens længde og membranens tykkelse giver mulighed for at bestemme membranens mekaniske egenskaber, da mono(M)-dimer(D) ligevægtkonstanten,  $K$ , der bestemmes af kanal-frekvensen og middellevetiden (se Figur 7), afhænger af deformationsenergien:

$$K = \frac{[D]}{[M]^2} = \exp \left\{ \frac{-\Delta G^0}{RT} \right\}$$

$$\Delta G^0 = \Delta G_{int}^0 + \Delta G_{def}^0,$$

hvor  $\Delta G_{int}^0$  er det membran-uafhængige bidrag til  $\Delta G^0$ . For en given deformation vil en "stiv" membran, med en høj kompressibilitets- eller bøjningsmodulus, have en høj deformationsenergi og en lille ligevægtskonstant for monomer-dimer ligevægten. Størrelsen af disse materialekonstanter er bestemt af variationen i de intermolekylære kræfter langs membranens lipider, fra de polære grupper til de hydrofobe fedtsyrekæder. Det er derfor muligt at ændre membrandeformationsenergien farmakologisk, ved at adsorbere overfladeaktive stoffer på membranen

og at måle ændringerne i deformationsenergien.



**Figur 8.** Gramicidinkanaler som kraftmålere. Øverst: Når en gramicidinkanal dannes sker der en deformation af den omkringliggende lipidmembran. I midten: Man kan måle ligevægten mellem monomer og dimer ved at bestemme sandsynligheden for at observere en ionledende kanal. Nederst: de tre komponenter (overflade ændring, kompression, og bøjning) i den totale membrandeformation.

En videre forståelse kræver detaljeret viden om lipidmembraners mekaniske egenskaber. Blandt de uløste problemer er, blandt andet, hvordan man beskriver protein/lipid grænsefladen, og om man kan bruge materialekonstanter der er målt på makroskopiske systemer (med lille spontan krumning) til at beskrive membrandeformationen omkring et enkelt proteinmolekyle. Det er derfor nødvendigt at have eksperimentelle data for deformationsenergien i et veldefineret system, gramicidinkanalerne er velegnede til dette formål.

Lipidmembranens mekaniske egenskaber kan måles ved at approximere membranen ved en lineær fjeder:

$$\Delta G_{def}^0 = A \cdot \delta^2 \quad (1)$$

hvor  $A$  er en fænomenologisk fjederkonstant, som varierer med membranens materialekonstanter, og  $\delta$  er ændringen i membrantykkelsen. I denne approximation kan størrelsen af  $A$  bestemmes ved at måle stabiliteten af gramicidinkanaler af forskellig længde. Den mest præcise bestemmelse får man i et elegant eksperiment hvor man blander modificerede gramicidiner af forskellig længde i sin membran. Derved kan monomere af samme eller forskellig længde kombineres til gramicidinkanaler af forskellige længder. Man kan for eksempel tage en gramicidin analog med 14 aminosyrer og en med 16 aminosyrer og indkorporere dem begge i membranen, så vil man kunne observere kanaler der er 28, 30, og 32 aminosyrer lange. Kanalens længde varierer med 0.8 Å/aminosyre, så man har tre kanaler med veldefineret længdeforskel ( $\Delta$ ) på 1.6 Å. Man kan bestemme de relative koncentrationer af de forskellige kanaltyper ud fra de relative kanalfrekvenser ( $f$ ) og middellevetider ( $\tau$ ), der bestemmes ud fra levetids- og intervallfordelingerne (Figur 7). Man kan således måle den fri energi ( $\Delta \Delta G^0$ ) for kanaler med 30 aminosyrer relativt til kanalerne bestående af to ens monomere med

henholdsvis 28 og 32 aminosyrer:

$$\Delta\Delta G^0 = -\frac{RT}{2} \cdot \ln \left\{ \frac{f_{30}^2}{f_{28} \cdot f_{32}} \cdot \frac{\tau_{30}^2}{\tau_{28} \cdot \tau_{32}} \right\}$$

hvor subskriptene angiver de forskellige kanaltyper. Eksperimentelt finder man at  $\Delta\Delta G^0 \approx -1.5$  kJ/mol. Hvis man antager at  $\Delta\Delta G^0$  udelukkende skyldes mekaniske påvirkninger mellem kanalerne og den omgivende lipid membran, så kan  $\Delta\Delta G^0$  bestemmes ud fra ligning 1:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G^0 &= A \cdot \{(\delta_0)^2 - [(\delta_0 + \Delta)^2 + (\delta_0 - \Delta)^2] / 2\} \\ &= A \cdot \Delta^2, \end{aligned}$$

hvor  $\delta_0$  angiver membrandeformationen for den blandede kanal.  $\Delta\Delta G^0$  er målt,  $\Delta$  er kendt, og  $A$  kan beregnes til at være  $\sim 110$  kJ/mol, i god overensstemmelse med den beregnede fjederkonstant. Det vil sige, at det skulle være muligt at bruge "makroskopiske" materialekonstanter til at beskrive de mikroskopiske membran deformationer.

### Konklusion

De biologiske membrans selektive barriereegenskaber gør det muligt at måle funktionen af enkelte molekyler ved hjælp af elektrofysiologiske metoder. Disse metoder bruges først og fremmest til at beskrive funktionen af et molekyle, eller en celle. De kan også bruges til at studere molekylstruktur, for eksempel hvorledes aminosyresekvensen koder et membranproteins (en ionledende

kanals) struktur. Derudover giver elektrofysiologiske målinger på ionledende kanaler generelle oplysninger om bimolekylære lipidmembraners materialeegenskaber (og om stoftransport i elektrolytopløsninger). Vi er derfor ved at nå et punkt, hvor biologien ikke kun drager fordele af de fremskridt der sker i fysik og fysisk kemi, men også begynder at bidrage til en øget forståelse af fysiske problemer.

### Referencer:

- 1) O. Sten-Knudsen, Stoftransport, Membranpotentialer og Elektriske Impulser over biologiske membraner Akademisk Forlag (1995).



*Olaf Sparre Andersen* er professor i fysiologi og biofysik ved Cornell University Medical College (New York, NY, USA). Han er interesseret i problemerne omkring ionledende kanalers struktur og funktion, specielt hvorledes aminosyresekvensen og lipidmembranens mekaniske egenskaber bestemmer kanalernes struktur og funktion.

## Vacuum Generators introduces its WWW Pages on the Internet!

To find out what is going on in the World of Ultra High Vacuum (UHV), please log on to the Vacuum Generators World Wide Web Pages. Using your WWW browser, simply log onto :

**<http://www.surface.fisons.co.uk/vacgen/>**

and see what we can do for you! Our WWW pages are FREE and include the following:

Up to the minute information on New Products.  
Up to minute information on our Special Offers & Promotions.  
Access to important Health and Safety information.  
Find out about which Exhibitions we will be attending close to you.  
Newsletters with examples of user applications.  
Help with Communicating within Vacuum Generators.  
Download Demo software.  
Easy access to Technical Support and Customer Care.  
1995 Vacuum Generators UHV Components on-line catalogue.

For further information, please contact Kennet Joelsson at Fisons Instruments Nordic AB, tel. +46-8-730 02 95, fax +46-8-730 42 42 or email : [kennet.joelsson@fisons-instruments.se](mailto:kennet.joelsson@fisons-instruments.se)