

# Fluktuationer og membranfunktion

Hvordan membraners nanoskala-fysik kontrollerer deres funktion

Ole G. Mouritsen, Fysisk Kemisk Institut, DTU

## Molekylær biomembranfysik

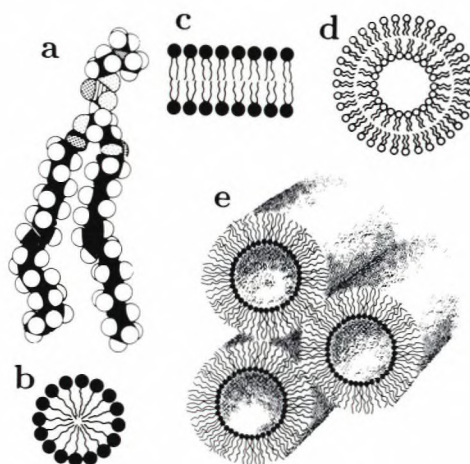
Statistisk fysik beskæftiger sig med, hvorledes molekylære vekselvirkninger i systemer, der består af mange partikler, bestemmer disse systemers egenskaber helt fra de mindste længdeskalaer op til de største. I de sidste par årtier har statistisk fysik i stigende grad været anvendt inden for den molekylære biomembranfysik med henblik på at beskrive membranernes fysiske struktur, dynamik og molekylære organisation. Efter en kort introduktion til membraners struktur skal vi i denne artikel gennemgå et par eksempler på, hvorledes indsigt i fundamentale fysiske egenskaber af en membran — set som et komplekst mangepartikelsystem — kan kaste lys over visse funktioner, der er knyttet til membraner, f.eks. stoftransport og enzymatisk funktion. De fysiske begreber og effekter, vi skal møde i denne sammenhæng, omfatter selvorganisering, faseovergange, strukturerede grænseflader, fluktuationer og nanoskalastruktur.

## Membranstruktur og selvorganisering

Den centrale del af en biologisk membran er det såkaldte lipiddobbeltlag, som består af en bimolekylær tynd film af lipidmolekyler, hvori de membranbundne proteiner er indlejret som vist på bagsiden. Lipider, f.eks. fosfolipider, er amfifiler, dvs. langkædede molekyler, som i den ene ende er vandopløselige og i den anden ende olieagtige og dermed fedtopløselige. I det biologiske opløsningsmiddel vand vil disse amfifiler organisere sig selv i forskellige typer af aggregater som illustreret i Fig. 1b-e. Disse aggregater er alle kendetegnet ved, at amfifilerne danner en fleksibel grænseflade mellem vandfasen og oliefasen. Aggregaterne organiserer sig ofte indbyrdes og kan give anledning til en lang række tredimensionale termodynamiske faser, der både kan være ordnede og uordnede. Én af disse aggregattyper er dobbeltlagsmembranen, Fig. 1c, der har en lamellær symmetri, og som lukker sig i sig selv som vist i Fig. 1d. Denne lukkede form, som biologerne kalder en vesikel eller et liposom, er den simplest tænkelige model for en biologisk cellemembran. Naturlige biologiske membraner består af et stort antal forskellige lipider og proteiner, der som vist på bagsidefiguren er knyttet til et komplekst makromolekylært netværk af polymerer og sukkerstoffer. Vi skal her koncentrere os om lipidmembranens fysiske egenskaber.

Der er tre helt afgørende forhold, man kan bemærke om lipidmembranen. For det første er membranen ekstremt anisotrop: lipiddobbeltlaget har typisk en tykkelse på

omkring 5 nm og en lineær udstrækning, der er  $10^3 - 10^5$  gange større. For en typisk celle vil forholdet være sådan, at hvis cellen var af størrelse som et hus, ville cellemembranen blot være nogle få millimeter tyk. For det andet indgår der ingen kovalente kemiske bindinger. Lipiddobbeltlaget er bundet sammen alene af fysiske kræfter, f.eks. van der Waals kræfter mellem olieæderne, men også af indirekte kræfter af entropisk oprindelse, der er kontrolleret af hydrogenbindingerne i vandfasen (den hydrofobe effekt). For det tredje er overfladespændingen af membranen næsten nul, hvilket betyder, at membranens form i høj grad er bestemt af dens indre elastiske og mekaniske egenskaber. Dette er årsagen til, at man ofte kan betragte den som et blødt materiale,<sup>1</sup> hvis struktur i rummet, på samme måde som en polymer, i vidt omfang er bestemt af dens konformationsentropi.

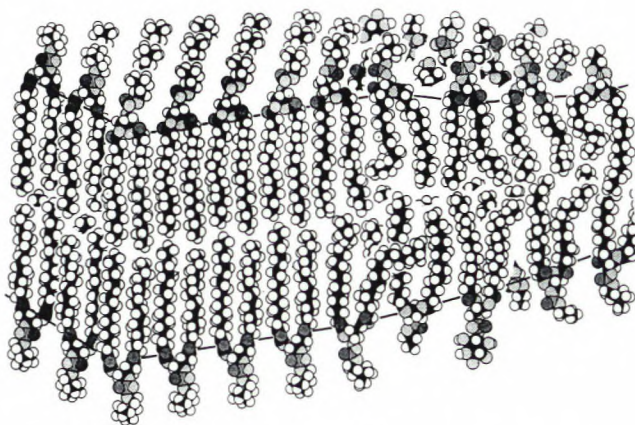


**Figur 1.** Fosfolipidmolekyle (a) og de lipidaggregater (b-e), som dannes i vand. (a): Fosfolipid med vandopløseligt hoved og olieopløselig hale i form af to kulbrintekæder. (b): Lipidmicelle. (c): Lipiddobbeltlag. (d): Lukket lipiddobbeltlag: en vesikel. (e): Heksagonal lipidfase.

## Faseovergange

De forskellige aggregattyper vist i Fig. 1 er forbundet af faseovergange, f.eks. er der en lamellær-heksagonal faseovergang (d→e), som menes at have betydning for cellefusion og levedygtigheden af visse simple organismer (mycoplasmer). En anden vigtig faseovergang fra en fast fase til en væskefase foregår inden for selve dobbeltlaget, som illustreret i Fig. 2.

Fysiologisk aktivitet forudsætter, at membranen er i sin væskefase, hvor molekylerne frit kan bevæge sig i



**Figur 2.** Lipiddobbeltlag som i venstre side er i en fast fase og i den højre side i en væskefase.

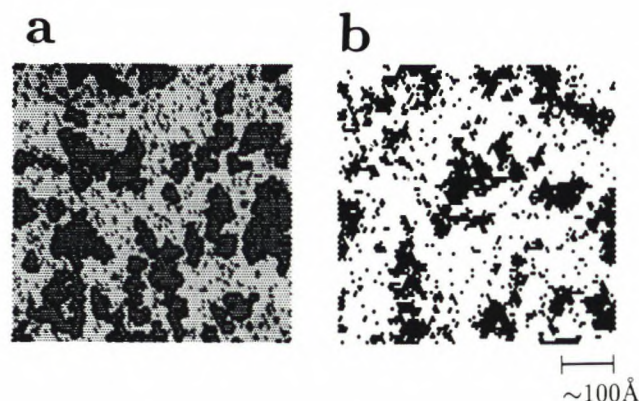
membranens plan. I væskefasen er lipidmolekylernes olie kæder uordnede. Den faste fase er en to-dimensional krystal, hvori lipidmolekylerne er indbyrdes ordnede, og olie kæderne har en høj grad af molekylær orden. Smeltningen af lipiddobbeltlaget er en faseovergang af 1. orden, dvs. at der er forskel på tæthederne i den faste og flydende fase, og der er knyttet en smeltevarme til overgangen. Overgangen sker imidlertid ganske tæt på et kritisk punkt, hvor tætheden ville variere kontinuert. Nær ved det kritiske punkt er der stærke tæthedsfluktuationer svarende til, at domæner af fast fase hele tiden dannes og smelter igen.

Graden af kædeorden i væskefasen er bla. kontrolleret af cellens indhold af kolesterol, der er en 'stiv' amfifil, som indlejres i membranen. Kolesterol virker på en måde som en antifrostvæske ved at nedbryde den krystallinske membranfase. Da kolesterol er et stift molekyle, vil det bringe en vis orden i væskefasens hydrofobe olie kæder. Hermed ændres væskefasen, så den bliver mere mekanisk stiv, samtidig med at den bevarer sin væskekarakter. Kolesterol virker dermed som membranforstærker og giver membranen stor mekanisk styrke og modstandigdygtighed mod træthedsbrud. Alle dyreceller af højere organismer (eukaryoter) indeholder store mængder kolesterol i deres ydre cellemembran. F.eks. indeholder humane røde blodceller omkring 30% kolesterol.

På samme måde som der i lipiddobbeltlag med én slags lipidmolekyler vil kunne optræde stærke tæthedsfluktuationer nær faseovergangen, vil der i dobbeltlag, som består af flere forskellige slags lipidmolekyler, kunne optræde stærke koncentrationsfluktuationer. Dette svarer til, at den lokale molekylære sammensætning kan afvige fra den globale.

### Membraners nanoskalastruktur

Denne variation i tæthed og sammensætning er afgørende for visse af membranens funktioner. Variationen finder

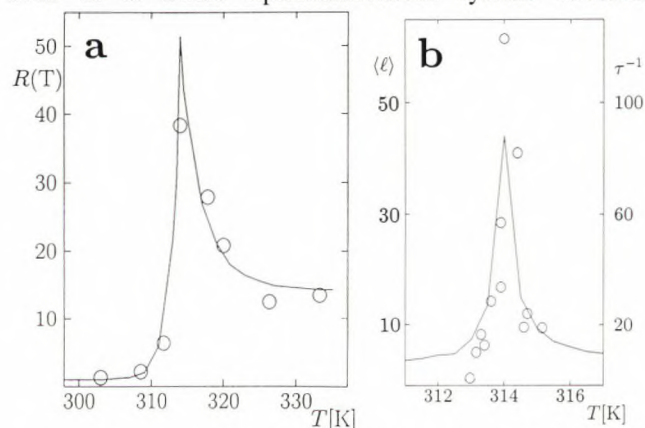


**Figur 3.** Nanoskopisk struktur af lipidmembran set overfra. (a): Lipiddomæner af fast fase i en membranvæskefase (computersimulering). (b): Lipiddomæner i en binær lipidblanding i væskefase (computersimulering).

sted på en længdeskala af få nanometer så vi taler om nanoskopisk heterogenitet. Et mål for denne heterogenitet kan være det samlede areal af en smal randzone udenom domænerne i forhold til membranens areal. To eksempler på organisationen af simple lipid dobbeltlag er vist i Fig. 3, som illustrerer resultater af modelberegninger. Figur 3a viser tæthedsfluktuationer i ét-komponent lipiddobbeltlag i væskefasen. Tæthedsfluktuationerne viser sig ved, at der dannes små dynamiske lipiddomæner af fast fase i membranens væskefase. Sådanne domæner af fast fase har været observeret i spermatozoers membraner og menes at være vigtige for cellefusionen i befrugtningprocessen. I Fig. 3b er vist nanoskalastrukturen i en lipidmembran, der består af en blanding af to slags lipidmolekyler, som har forskellig kædelængde. Strukturen skyldes dynamiske kompositionsfluktuationer i den binære væskeblanding, som ellers termodynamisk set er i en enkelt, blandet fase.

Det er særlig vigtigt at forstå, hvorledes den nanoskopiske struktur kan moduleres fysisk af specielle kemiske og farmakologiske stoffer, som ændrer cellers fysiologiske funktion gennem påvirkning af membranen. Eksempler på sådanne stoffer er bedøvelsesmidler og insektgifte. Det er blevet vist både ved eksperimenter og gennem beregninger på molekylære modeller, at et bedøvelsesmiddel som halothan og en insektgift som lindan begge opløses i lipidmembranens olie kæder, og dette fører til en dramatisk ændring i den molekylære organisation, således at der dannes flere lipiddomæner med en mere uregelmæssig grænseflade. Stofferne virker tilsyneladende som grænsefladeaktive stoffer inde i membranen. Den molekylære virkningsmekanisme for stoffer til totalbedøvelse er endnu ukendt, og det vides ikke, om stofferne virker direkte gennem specifik binding til specielle receptorer i nervemembranerne, eller de virker indirekte gennem strukturelle ændringer af lipidmembranen, som så ændrer koblingen til membranbundne receptorer. Der er imidlertid flere eksempler på, at der er en sammenhæng mellem

en række stoffers farmakologiske virkningsgrad og deres evne til at ændre lipidmembranens fysiske struktur.



**Figur 4.** (a): Permeabilitet af  $\text{Na}^+$  ioner gennem lipidmembran som funktion af temperaturen.  $\circ$  er eksperimentelle data, og — er resultatet af en computersimulering. (b): Membranheterogenitet ( $\langle \ell \rangle$ ) bestemt ved computersimulering sammenlignet med den eksperimentelt målte aktivitet af en fosfolipase ( $\circ$ ) på en lipidmembran.

### Permeabilitet og enzymaktivitet

Lad os nu se på to helt konkrete eksempler på, hvorledes den nanoskopiske membranstruktur er med til at kontrollere en membranfunktion. Det ene eksempel omhandler en passiv funktion, nemlig diffusiv gennemtrængning (permeabilitet) af stoffer, f.eks. ioner, gennem lipid-dobbeltlaget. Det andet eksempel omhandler en aktiv funktion, der er knyttet til en stor klasse af enzymer, fosfolipaser, der er aktive på membraners overflade.

Som omtalt i Olaf Sparre Andersens artikel i dette nummer har cellen en række protein- og enzymesystemer, f.eks. ionpumper, der virker aktivt for at opretholde de nødvendige gradienter af stof og ladning hen over membranen. I en ren lipidmembran uden disse aktive transportsystemer opfører den passive permeabilitet sig på en måde, der tyder på, at den er bestemt af membranens fysiske struktur. I Fig. 4a er vist eksperimentelle data for temperaturafhængigheden af  $\text{Na}^+$  permeabiliteten gennem et fosfolipiddobbeltlag. Permeabiliteten har en top ved en temperatur, der svarer til faseovergangen mellem membranens faste og flydende fase. Membranen bliver altså læk nær faseovergangen. Tilsvarende toppe finder man for permeabiliteten af andre ioner og en lang række andre både små og store molekyler.

Man kan beskrive temperaturafhængighed af permeabiliteten ved en meget simpel antagelse uden at bekymre sig om de mikroskopiske detaljer: Vi tager udgangspunkt i, at membranstrukturen er heterogen nær faseovergangen som illustreret i Fig. 3a og antager nu, at sandsynligheden for, at en ion, efter den har ramt membranen, vil trænge igennem membranen, er meget større i grænsefladerne mellem lipiddomænerne og den omgivende baggrunds-fase, end den er noget andet sted i membranen. Det fysisk fornuftige i denne simple antagelse er, at grænsefladerne er områder med dårlig molekylær pakning og derfor

gode transportveje for de diffunderende ioner. Af antagelsen følger, at temperaturafhængigheden af permeabiliteten skal være givet ved temperaturafhængigheden af mængden af grænseflader. At dette faktisk er tilfældet ses af Fig. 4a, som sammenligner de eksperimentelle data for  $\text{Na}^+$  med resultaterne af teoretiske beregninger der bygger på computersimuleringer af faseovergangen og den tilhørende nanoskopiske membranheterogenitet.

Det andet eksempel omhandler en gruppe af enzymer, fosfolipaser, der fungerer f.eks. i maven ved nedbrydningen af fedtstoffer (lipider). Fosfolipaserne virker ved at de 'klipper' den ene olie-kæde af lipidmolekylet. Figur 4b viser eksperimentelle data for aktiviteten af en fosfolipase som funktion af temperaturen. Som man ser, sker der en stærk forøgelse af aktiviteten nær membranens faseovergang. I Fig. 4b er også givet resultaterne af en teoretisk beregning af graden af heterogenitet. Sammenligning af de to sæt data viser kvalitativt, at enzymaktiviteten følger graden af nanoskopisk membranheterogenitet.

### Entropiske kræfter mellem membraner

Afslutningsvis skal vi omtale et fysisk membranfænomen, der optræder på mesoskopisk og makroskopisk niveau, og som kontrolleres af membranens nanoskala-fysik. På grund af dens endelige tykkelse, har en membran en bøjningsstivhed,  $\kappa$ . Bøjningsstivheden er helt afgørende for den lukkede membrans konformation og topologi<sup>2</sup> og dermed for cellers form. Den heterogene membranstruktur og fluktuationerne i membranens plan betyder, at den effektive bøjningsstivhed ændrer sig med temperaturen.  $\kappa$  undergår en såkaldt termisk renormalisering, som er et karakteristisk træk ved bløde materialer.<sup>1</sup> For eksempel finder man, at bøjningsstivheden renormaliseres til

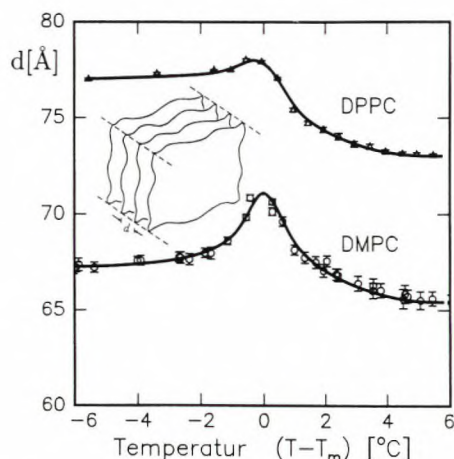
$$\kappa \rightarrow \kappa [1 - r^2 / K(T)]$$

nær faseovergangen på grund af tæthedsfluktuationerne, som beskrives ved hjælp af arealkompressibilitetsmodulet,  $K(T)$ , der bliver lille nær faseovergangen.  $r$  er en materialkonstant, som angiver, hvor stærk koblingen er mellem fluktuationerne og den lokale middelkrumning af membranen.

Membranen bliver altså 'blød' og stærkt undulerende nær faseovergangen. Dette har en dramatisk konsekvens for den måde, hvorpå membranen vil vekselvirke med sine omgivelser, f.eks. faste overflader eller andre fluktuerende membraner. Undulationerne giver membranen en ekstra entropi. Hvis to undulerende lag nærmer sig hinanden, vil undulationerne blive undertrykt, hvilket leder til et tab i entropi. Tabet i entropi mærkes som en effektiv frastødningskraft mellem lagene. Effekten er indlysende, når man bemærker, at den effektive fysiske kraft,  $F$ , mellem makroskopiske objekter ikke blot er minus gradienten af et potential,  $U$ , som vi lærer i klassisk mekanik, men minus gradienten af den fri energi,  $G$ , f.eks.

$$F = - \left( \frac{\partial G}{\partial r} \right) = - \left( \frac{\partial U}{\partial r} \right) + T \left( \frac{\partial S}{\partial r} \right),$$

som jo også indeholder entropien,  $S$ . Dette betyder f.eks., at den effektive kraft mellem to overflader, hvor atomerne på det mikroskopiske plan tiltrækker hinanden, under passende omstændigheder kan skifte fortegn og blive frastødende pga. den entropi, der ligger i fladenes fluktuationer. Det koster simpelthen entropi at skubbe fladerne mod hinanden, fordi de dermed undertrykker hinandens fluktuationer.



**Figur 5.** Afstand,  $d$ , mellem lipiddobbeltlag i en stak af fluktuerende membraner (indsats) vist som funktion af temperaturen,  $T$ , for to forskellige lipidmaterialer, DMPC og DPPC.  $T_m$  er faseovergangstemperaturen.

Det er muligt ved hjælp af f.eks. småvinkel neutronspreddning<sup>3</sup> at studere effekten af de entropiske repulsionskræfter, der virker mellem en stak fluktuerende membraner eller lipiddobbeltlag, som vist i Fig. 5.

I denne stak er der en periodicitet,  $d$ , i retningen vinkelret på membranoverfladen, og denne periodicitet kan bestemmes ved spredningseksperimentet. Figuren viser data for to forskellige lipidmaterialer, DMPC og DPPC, som adskiller sig ved, at DMPC har kortere lipiddkæder end DPPC. Det ses at periodiciteten for DMPC har en tydelig top nær faseovergangen, hvorimod ingen eller kun en meget lille top findes for DPPC. Forklaringen herpå er, at materialet DMPC er tættere på et kritisk punkt og derfor udviser kraftigere tæthedsfluktuationer end DPPC. Dermed udvikler DMPC membranerne kraftigere heterogenitet ved faseovergangen, og renormaliseringen af deres bøjningsmodul er mere effektiv. Dette fører til en kraftigere repulsionskraft og dermed en større afstand mellem lagene. Entropisk repulsion er vigtig for kontrol af cellers adhæsion til hinanden og til overflader.

#### Referencer:

- 1) O. G. Mouritsen and M. J. Zuckermann, Bløde faste stoffers fysik, KVANT 2.årg., nr.4, 10-13 (1991).
- 2) J. H. Ipsen and C. Jeppesen, Computersimulering af fluktuerende flader i bløde materialer, KVANT 4.årg., nr.3, 26-28 (1993).

- 3) T. Hønger, K. Mortensen, J. H. Ipsen, J. Lemmich, R. Bauer, and O. G. Mouritsen, Anomalous swelling of multilamellar lipid bilayers, *Phys. Rev. Lett.* **24**, 3911-3914 (1994).



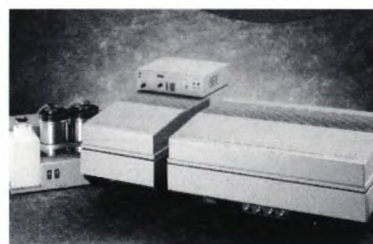
Ole G. Mouritsen er dr.scient., professor i fysisk kemi ved Danmarks Tekniske Universitet, Lyngby. Arbejder med statistisk fysik og computersimulering anvendt på områderne membraner, komplekse væsker, faseovergange i faste stoffer og på overflader, ordningsprocesser og systemer fjernt fra ligevægt.



**Optilas Danmark, den lokale internationale leverandør med specialer indenfor:**

#### Optik og lasere til forskning og industri

Continuum, Inc. - Corion Corp. - CVI Laser Corp. - Ion Laser Technology, Inc. - Labsphere, Inc. - Laservision - Optical Surfaces Ltd. - Physical Optics Corp. - Research Electro Optics - Santa Fe Laser Co. - Synrad, Inc. - m.fl.



#### Spektroskopisk udstyr

Chromex, Inc. - McPherson Milton Roy - Photek Ltd. m.fl.



#### Elektronik

Directed Energy, Inc. - Maxwell Laboratories, Inc. - Quantum Design, Inc. - Stanford Research Systems, Inc. - Trek, Inc. - m. fl.

#### Optilas Danmark

Billedvej 2

DK-2100 København Ø

Telefon: 3543 0133

Fax: 3543 8334

E-mail: [optilas@inet.uni-c.dk](mailto:optilas@inet.uni-c.dk)