

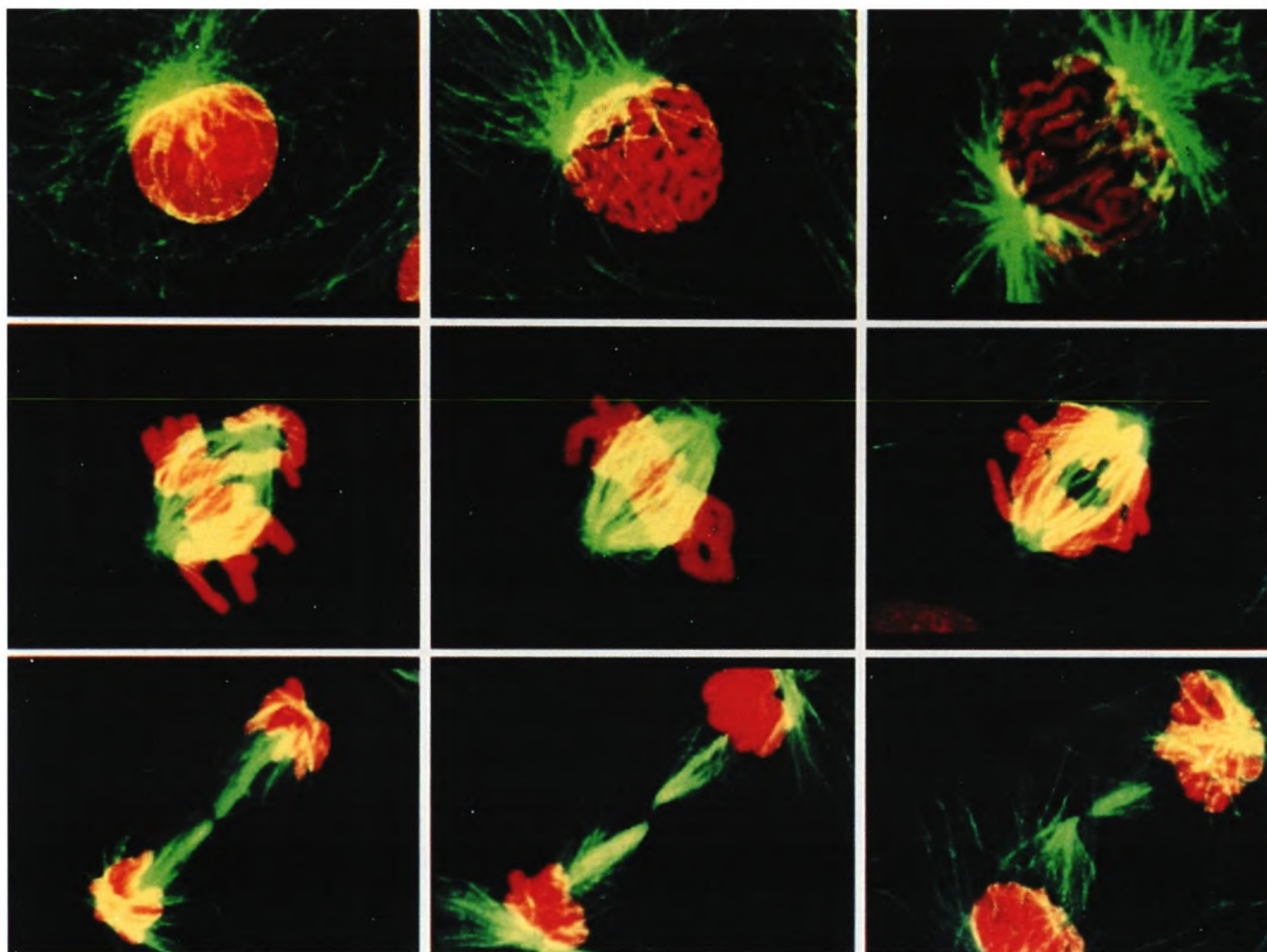
KVANT

Oktober
1995

3

Fysisk Tidsskrift

6. årgang



- TEMA: MOLEKYLÆR BIOFYSIK • FOLDNING • MIKROTUBULI • MEMBRANDYNAMIK •
- IONLEDENDE KANALER • SUPRAPROTEIN •

LØSSALGSPRIS: 35 KR

KVANT

Fysisk Tidsskrift

c/o Ørsted Laboratoriet
Niels Bohr Institutet
Universitetsparken 5
DK-2100 København Ø

Telefax : 35 32 04 60
E-mail : kvant@nbivax.nbi.dk
Giro : 5 84 31 46

Udgives af

Dansk
Fysisk
Selskab



Selskabet for
Naturlærens
Udbredelse



Redaktion

Mads Hammerich (ansv.)
Rungsted Gymnasium
Jørgen Friis Bak
Naturvidenskabeligt fakultet, ÅU
Jørn Christensen
Torsten Freltoft (annoncer)
NKT Research Centre
Mogens Esrom Larsen
Matematisk Institut, KU
Finn Berg Rasmussen
Ørsted Laboratoriet, KU
Ove Østergaard
Silkeborg Amtsgymnasium

KVANT udkommer 4 gange årligt og er medlemsblad for de udgivende selskaber.
Abonnementspris: 135 kr/år (i Danmark).

Annoncepriser

1/1 side	3000 kr
1/2 side	1600 kr
1/4 side	1000 kr
Farvetillæg	1800 kr

Priserne er excl. moms og gælder for reproklart materiale. Henvendelser om annoncer til Torsten Freltoft, NKT Research Centre, telefon 43 48 35 69, telefax 43 63 00 99.

Oplag: 2000

Tryk: P.J.Schmidt, Vojens

ISSN 0905-8893

Indhold:

Fysikken i proteins foldningsklassifikation

Henrik Bohr og Per-Anker Lindgård 3

Det er velkendt at proteiner kan klassificeres efter de aminosyresekvenser de indeholder. Forfatterne beskriver en anden klassifikation - efter proteinets form - der kommer tæt på proteinets biokemiske funktion og på den mekanisme der giver proteinet netop de rette folder.

Mikrotubuli

Henrik Flyvbjerg 8

Mikrotubuli er de bjælker, trækstænger og robotarme, der klarer en del af cellens indre mekanik. Flyvbjerg beskriver de mekanismer som ordner cellekernematerialet under celledeling - med fejlraten: én på 100.000.

Fluktuationer og membranfunktion

Ole G. Mouritsen, 13

Cellemembranen opfattes af mange som en gummiinde med et par ventiler i. Mouritsen beskriver membranen som et uhyre dynamisk todimensionalt medium, der har flydende og faste faser. Membranen organiserer sig selv i en struktur - der kan påvirkes af cellen selv, eller ved at hælde passende kemikalier i kroppen.

Biologiske Membraner og ionledende kanaler

Olaf Sparre Andersen 17

Cellen skal kunne transportere mange stoffer - kontrolleret - ind og ud gennem cellemembranen. Forfatteren fortæller hvordan kanalerne gennem membranen er opbyggede. Og hvordan de kan undersøges eksperimentelt - molekyle for molekyle.

Fra enkelt protein til supraprotein

Rogert Bauer 22

Bauer giver adskillige eksempler på undersøgelser af proteinkomplekser. Fra blodstørkning til osteoproduktion.

Forsiden:

Mikrotubuli! Under celledelingen skal den levende celledens kernemateriale sorteres nøjagtigt i to bunker. Her tillades ingen forfordeling mellem søskende. Mikrotubuli udgår fra to centre, griber og trækker i hver sin halvdel indtil de har fat i hver eneste halvpart - så deles cellen. Kromosomer (røde) og mikrotubuli (gul-grønne) under celledeling. som starter med øverste venstre billede (a), og slutter med nederste højre billede (i). Læs artiklen side 8 for yderligere forklaring. (A. Merdes, E. H. Stelzer, and J. De Mey, *The three-dimensional architecture of the mitotic spindle, analyzed by confocal fluorescence and electron microscopy*, J. Electron Microsc. Tech. **18**, 16-73 (1991).)

Temanummer om molekylær biofysik

Ole G. Mouritsen, Fysisk Kemisk Institut, DTU og Rogert Bauer, Fysisk Institut, KVL

Anvendelse af fundamentale fysiske principper og lovmæssigheder i studier af biologiske systemer og deres funktion er ikke ny, men har gennem mange år med stor succes været foretaget af fysiologer og medicinske biofysikere bla. til beskrivelse af nervefunktion, stoftransport og muskelkontraktilitet. Det er især fysiske discipliner som elektrodynamik, transportteori og kontinuum mekanik, der her har fundet anvendelse. Hvad der imidlertid er nyt, er at mange fysikere i disse år vender sig mod problemstillinger i biologien eller mod fysiske problemer, som er inspireret af specifikke biologiske fænomener. Det er især fysikere med baggrund i højenergifysik, statistisk fysik, faststoffysik og komplekse systemers fysik, som begiver sig ind i biofysikken, især den molekylære biofysik.

Nærværende temanummer om molekylær biofysik forsøger med nogle eksempler at afspejle, hvad fysikken på den ene side kan bidrage til i beskrivelsen af biologiske systemer, og på den anden side hvad biologiske systemer og fænomener kan give af nye og udfordrende fysiske problemer.

I den første artikel, beskriver Henrik Bohr og Per-

Anker Lindgaard ét af de store problemer i moderne biologi, nemlig foldningen af proteiner, og hvorledes dette problem kan undersøges med begreber hentet fra fysikken af polymerer og faste stoffer.

Som en del af deres funktion, associerer proteiner sig med hinanden. Dette er temaet i Rogert Bauers artikel, der gør rede for, hvorledes supramolekulære proteinkomplekser og deres struktur kan studeres med fysiske teknikker som lys- og neutronspreddning. I Ole G. Mouritsens og Olaf Sparre Andersens artikler tager vi endnu et skridt mod mere komplekse, supramolekulære biologiske strukturer, cellemembraner og ionkanaler (se bagsiden). Her bliver det vist, hvorledes disse systemers fysik kan kontrollere deres funktion. Endelig beskæftiger Henrik Flyvbjerg i sin artikel sig med et endnu højere niveau af cellens organisering, som involverer mikrotubuli. Mikrotubuli er lange rør af proteinkrystaller, som bla. medvirker ved deling af cellen (forsidebilledet). Det bliver beskrevet, hvorledes moderne molekylær biologi giver anledning til nogle gode fysiske problemer på små længdeskalaer, hvor grænserne mellem biologi, kemi og fysik bliver flydende.

Transpector søger personlig computer

Transpector er et ny, prisbilligt, højeffektivt og kompakt massespektrometer til gasanalyse, processtyring og læksøgning.

Systemets elektronik og målehoved er en kompakt enhed, mens processtyring og dataregistrering går via PC, Leybold leverer naturligvis passende software.

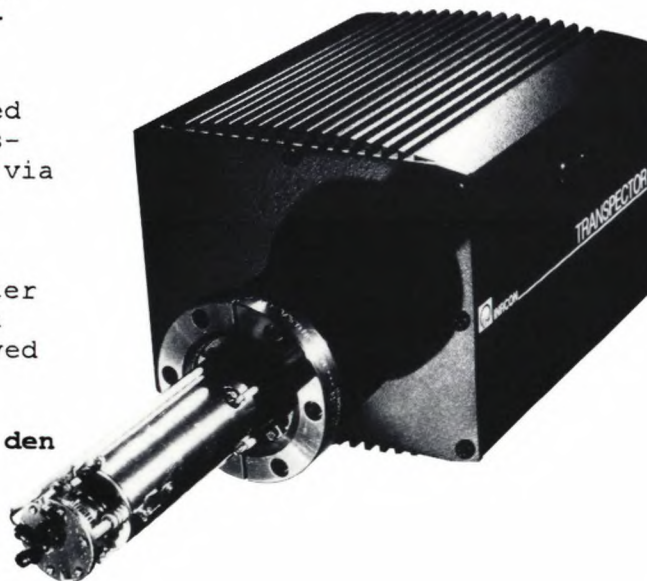
Der findes 7 forskellige varianter af Transpector, bl.a. en kompakt version (0-100Amu med FC målehoved for omkring kr. 40.000,-

Transpector - til enhver opgave den rigtige løsning.

Spørg efter vor skræddersyede Transpector version

LEYBOLD ApS

Roskildevej 342A, 2630 Tåstrup
Tlf.: 43996444



FRA VORT STORE PROGRAM

VARIAN

Turbopumper
Ionpumper
Oliediffusionspumper
Læksøgere
Vacuum måleudstyr
UHV & HV fittings

DCA Instruments

Fremstilling af UHV anlæg til:
Sputterprocesser
MBE
Tyndfilm deponering
Overfladeanalyse
samt kundespecificeret UHV kamre

Lake Shore Cryotronics

Lavtemperatur kontrollere
& sensorer
Elektromagneter & strømforsyninger
Gaussmetre & Hall elementer
VSM (vibrating sample magnetometer)
AC/DC magnetometer - susceptometer

Oxford Applied Research

Reaktive atomkilder
Mini E-beams
Quartz micro vægte
Ioniserede doping
K-celler
Substratholdere i
UHV udførelse
Rheed Guns
Magnetronkilder
Ion cleaning Guns
Fokuserende
elektronkilder
Scanning Ionkilder

Leda - Mass

Quadrupoler / RGA
Windowsbaseret software
Specielt design til
sputterprocesser
ion implantering
tyndfilm
optisk coating
acceleratorer
overfladeanalyse m.m.

APD cryogenics

Close cycle kryostater ned til 6,5 °K
Open cycle kryostater ned til 2 °K
Cryotiger fra 80 °K til 120 °K
Kryopumper

AAGE CHRISTENSEN A/S

Skelmosevej 10, DK-2500 Valby Tlf. 36 44 24 44 Fax 36 44 20 24



Fysikken i proteins foldningsklassifikation

Henrik Bohr, CBS, Fysisk-Kemisk Institut, DTU, Lyngby og
Per-Anker Lindgård, Afdelingen for Faststof Fysik, RISØ Roskilde.

Ifølge det centrale dogme i molekylærbiologien koder DNA molekylet for proteiner, således, at en proteinstruktur er givet ud fra dens tilhørende nukleotidsekvens. Den primære opdeling af proteiner, som man kan foretage på baggrund af sekvenserne, er godt egnet til at fastslå hvor beslægtede forskellige organismer er. Men denne klassifikation siger ikke alt om et protein. Det samme protein kan f.eks. virke på højest forskellige måder alt efter hvilken facon – af mange mulige – molekylet antager. Proteinfoldningen er betragtet som den anden halvdel af den genetiske kode, og decifringen af denne er en milesten indenfor bioteknologi. Der kan konstrueres andre klassifikationer end den primære, der måske – sammen med denne – bedre kan forklare og gruppere proteinerne efter deres funktion. Vi vil i denne artikel beskrive en klassifikation der tager udgangspunkt i en 3-dimensional forestilling om proteinet. Det er en sådan gruppering, vi benævner foldningsklassifikation.

Introduktion

Proteiner er lange polymerkæder af aminosyrer. Disse kæder er lineære og uforgrenede svarende til polyethylen eller polystyrene, men med en langt større forskelligartethed eller variationsmulighed på grund af de meget forskellige typer af aminosyrer, der er involveret. Alle aminosyrer har en aminogruppe og en carboxy gruppe som kemisk kan kobles sammen til en såkaldt peptid binding ved fraspaltning af vand (se fig.1). De 20 forskellige aminosyrer har hver deres karakteristiske sidegruppe som sidder på kulstofatomet, som betegnes C_{α} . Disse peptidled er sammensat til lange lineære kæder, således at carbonylenden (CO) af et peptidled er forbundet til aminoenden (NH) af det næste, og således at den resulterende polypeptid kæde (proteinet uden sidekæder) har en klar orientering. Et proteinmolekyle har derfor en temmelig simpel struktur hvad angår de atomare bestandele. De overskydende atompositioner er fyldt op med brint. Peptidledene er gentaget typisk flere hundrede gange i tilfælde af et middelstort protein, oftest med forskellige aminosyrer, hvis type er dikteret af den DNA-sekvens, som koder for proteinet.

Den kemiske aktivitet af et proteinmolekyle er for det meste kontrolleret af de forskellige sidekæders elektrostatik. De 20 almindeligt forekommende aminosyrer kan deles op i nogle, der er elektrostatisk polære, og andre der er ikke-polære, hvor de polære enten er positivt ladede (basisk hydrofile), negativt ladede (surt hydrofile) eller neutrale, mens de ikke-polære er mere eller mindre hydrofobe. Det faktum, at sidekæderne er enten hydrofile eller hydrofobe viser sig at være en vigtig dynamisk faktor i den foldningsprocess, gennem hvilket proteinet opnår sin

naturlige grundtilstand.

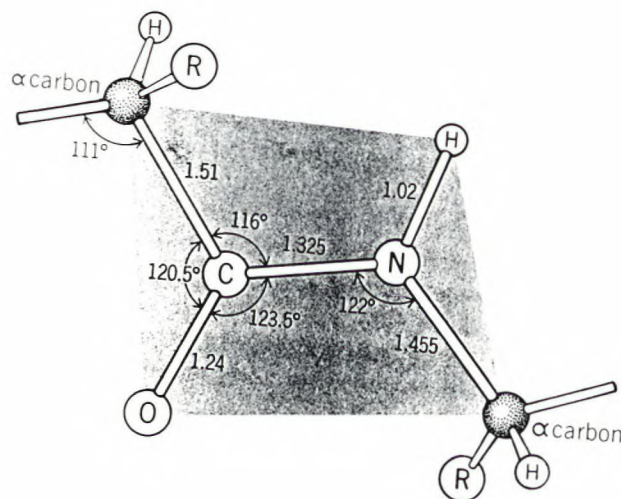
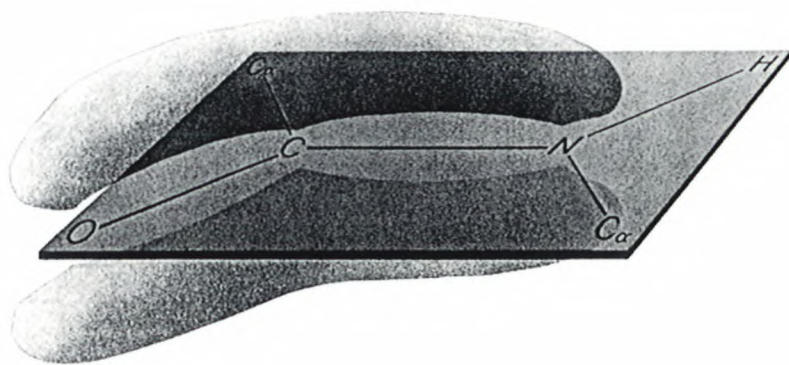
Proteindynamik

De forskellige aminosyrer, som er blevet brugt til at samle et protein, har i proteinets foldede form deres sidekæder stikkende ud fra peptidkæden i et stort udbud af forskellige vinkler, som muligvis er blevet dikteret af proteindynamikken. Et givet protein med et bestemt indhold af forskellige aminosyrer vil ofte være i stand til at virke i et stort antal forskellige konformationelle tilstande takket være proteinatomernes vekselvirkning med de omgivende molekyler, og disse tilstande er karakteriseret ved specifikke sidekædeorienteringer, som er vigtige for proteinets funktionalitet. En analyse af et proteins dynamik kan enten have til formål at forstå foldningsprocesserne eller at studere, hvilke konformationelle ændringer det aktive protein kan veksle mellem.

De 20 forskellige aminosyrer giver mulighed for at samle et protein på et enormt antal måder. Tag for eksempel et protein i gennemsnitsstørrelse på 150 aminosyrer. Da der er 20 aminosyrer at vælge imellem på hver position, giver det en variabilitet på 20^{150} konfigurationer og dertil kommer så de mange forskellige konformationer (faconer), hvert protein kan antage. Det giver et antal, der er mange størrelsesordner større end antallet af atomer i universet, der skønnes at være ca. 10^{80} for det synlige stof.

I praksis foregår en proteinfoldning på sekunder. Og denne foldning foregår ind i én bestemt konfiguration. Dette rejser spørgsmålet om hvorledes proteinet finder sin form? Man kunne tro at molekylet simpelthen søgte mod den form der giver den laveste energi, ligesom anslåede små molekyler normalt gør. Det gør det måske også. Men ikke ved blot at forsøge sig frem. Det energilandskab som termdigrammet for er så kompliceret at molekylet udvikler sig til, har uhørt mange lokale minima. Og det viser sig, at skulle molekylet forsøge sig blindt frem, ville det tage en astronomisk tid at nå frem til den rette konfiguration. Dette kaldes Levinthal's paradox. Der må altså findes nogle regler for formning der styrer molekylet ind i sin facon. Vi foretrækker at tænke på disse regler som et nyt emne for fysikere. Og måske kan nye måder at klassificere proteinfoldningerne på bringe os på sporet af de styrende mekanismer, på samme måde som det skete ved opstillingen af grundstoffernes periodiske system.

For at kunne forstå det dynamiske udfaldsrum i proteinfoldningsprocesser og proteins konformationelle ændringer, skal vi lige kigge lidt på de forskellige kemiske bindinger, der optræder i et proteinmolekyle. De fleste bindinger mellem de enkelte atomer er simple kovalente



Figur 1. a: π -bindingen hen over peptidplanet. b: Bindingslængder og vinkler i peptidplanet.

bindinger, hvilket giver mulighed for rotation omkring de forskellige orbitalakser. Imidlertid er bindingen mellem hvert peptidled af delvis dobbeltbundet art, π -binding, hvilket giver peptidkæden den for proteiner så karakteristiske stivhed omkring peptidbindingsleddet (se figur 1), således at hvert nitrogenatom, det tilhørende brintatom og carboxylgruppen, alle vil ligge i samme plan. Dette fænomen, der ofte betegnes som en "resonans" mellem de dobbeltbundne C=O elektroner og de enkeltbundne C-N elektroner, vil delokalisere de dobbeltbundne elektroner til at danne en π -type orbital, der strækker sig over alle tre atomer i kæden O-C-N. Denne udstrakte π -binding vil stærkt begrænse antallet af frihedsgrader ned til i hovedsagen to variable for hver aminosyre, de såkaldte dihydrals vinkler.

Proteinklassifikation

Mange proteinstrukturer er bestemt, dog måske kun en lille del af den samlede biologiske protein "pool", og der er oprettet en database på Brookhaven (Brookhaven-databank), der løbende bliver opdateret og indeholder den indsamlede information. Der er nu, hovedsageligt ved hjælp af røntgendiffraktion, strukturbestemt flere hundrede proteinstrukturer. Proteiner synes at forekomme som medlemmer af store familier med visse karakteristika, men indeholdende mange varianter. Mest slående er dog nok kompleksiteten og uoverskueligheden af formerne. Et godt eksempel herpå er CAP-proteinet (se fig. 2). En entydig klassifikation er af stor vigtighed. I eksemplet med grundstoffernes periodiske system var det f.eks. muligt at give et bud på antallet af mulige elementer og – vigtigere endnu – at udpege og karakterisere, hidtil uopdagede elementer der manglede i systemet. En lignende klassifikation af biologiske dimensioner blev foretaget af Linné. Det lykkedes Linné, på en præcis måde, at løse homologipro-

blemet: Hvornår er to planter ens uden at være identiske, og hvornår er de i familie eller ej? Dermed kunne han med stor succes klassificere planter i botanikken. Linné's klassifikation er entydig, men er ikke særlig funktionelt anvendelig - den siger ikke noget om egenskaber som giftighed, spiselighed, farve osv. - egenskaber som for nogle er nok så vigtige. Problemstillingen er meget nær op ad den, vi her betragter for proteinklassifikation.

Ifølge den gængse opfattelse i dag i biologien skyldes de biologiske arters forskellighed, at deres proteiner (gener) er forskellige. Pattedyrs DNA rummer således omkring tre milliarder basepar. Af disse adskiller omkring 100 millioner sig fra hinanden når vi kigger på forskellige arter. Mens nærmeste slægtninge som f.eks. søskende adskiller sig på ca. 10 millioner basepar. At klassificere proteiner kan altså føre til at klassificere biologiske arter og i og for sig også mennesker indbyrdes. Den nemmeste måde at klassificere på er derfor, at tage generne parvis og skridt for skridt checke hvilke nukleotidbaser, der matcher hinanden. Denne metode med at klassificere ud fra sekvenssimilaritet er meget brugt indenfor evolutionsstudier.

En klassifikation af proteiner kan imidlertid søges ud fra homologi på et andet af de fire proteinniveauer der ofte betragtes: Primær struktur (sekvens), sekundær struktur (helix, plader etc.), tertiær struktur (3 dimensional rumlig form) og til tider også en kvarternær form, der er en 3-dimensionel del-enhed forening (se fig. 2). De sidste to former har en biokemisk funktion. Sekundærstruktur-homologi kunne simpelthen være, hvor stor en procentdel af et protein, der består af α -helix i forhold til et andet protein. Klassifikation af proteiner ud fra deres funktion har indtil for nogle år siden været den gængse fremgangsmåde og følger ret nøje klassifikationen ud fra sekvensbetragtninger, således at proteiner med sekvens-

lighed som regel også har samme funktion, mens det omvendte ikke nødvendigvis er tilfældet. Inddelingen af proteiner efter funktion giver en række funktionelle familier som for eksempel, cytochromer, proteaser og immunoglobuliner. Indenfor disse familier er der ofte store strukturelle forskelle.

Interessen for proteinfoldningsproblemet er affødt af vigtigheden af at kunne aflæse et proteins rumlige struktur ud fra dets sekvens af aminosyrer og dernæst også forstå sammenhængen mellem struktur og funktion. Der har derfor været fornyet interesse for at klassificere proteiner efter deres rumlige tertiære struktur. Imidlertid består en proteinstruktur af en sammenbygning af flere understrukturer (domæner), således at det er formålstjenligt at starte med klassifikationer af domæner, som typisk indeholder 10 til 20 sekundære strukturer. De sekundære strukturer var allerede påpeget af Linus Pauling som vigtige byggestene. De vigtigste er den såkaldte α -helix, som er af form som en lille stiv spiralfjeder bestående af ca. ti aminosyrer, og dernæst de såkaldte β -plader, som består af flere parallelle, i det væsentlige retlinede proteinstumper, kaldet β -strenger også bestående af ca. ti aminosyrer, pakket så de danner et lag. Et klassisk modelerings arbejde over disse strukturer blev udført af Linderstrøm Lang et al allerede i 1950-erne. Disse sekundære strukturer, α -helices og β -plader er forbundet med uregelmæssige tråde (løkker). Derfor er også retningen af disse elementære strukturer af betydning. Endelig er formerne ikke så ideelle som en fysiker kunne ønske sig, men vredet og drejet på karakteristisk biologisk maner.

Foldningsklassifikation

I det følgende vil vi koncentrere os om foldningsklasseindelingen som en mulig 3-dimensional strukturklassificering, i modsætning til en simpel 1-dimensionel opremning af rækkefølgen af de forekommende sekundære strukturer. En proteinfoldning er en struktur i et afgrænset domæne med en distinkt topologi, som proteinpeptidkæden, eller en del af denne, har udstukket i det 3-dimensionale rum, f.eks. beskrevet i et 3-dimensionalt gitter. Således har bl.a. cytochromefamilien flere karakteristiske foldninger, som f.eks. 4 α -helix bundtet (se fig. 3). Der er idag identificeret ca. 100 karakteristiske foldninger ud af de ca. 400 kendte krystallografiske proteinstrukturer. Det ville nu være afgørende, om man kunne sige noget om hvor mange mulige foldningsklasser, der findes. På basis af mængden og hastigheden med hvilken informationsmængden vokser i Brookhaven-data-bank vovede Chothia i 1992 et skøn over hvor mange foldningsklasser, der burde være - og foreslog ca. 1000, hvilket, omend det er et stort antal, ikke er afskrækkende stort.

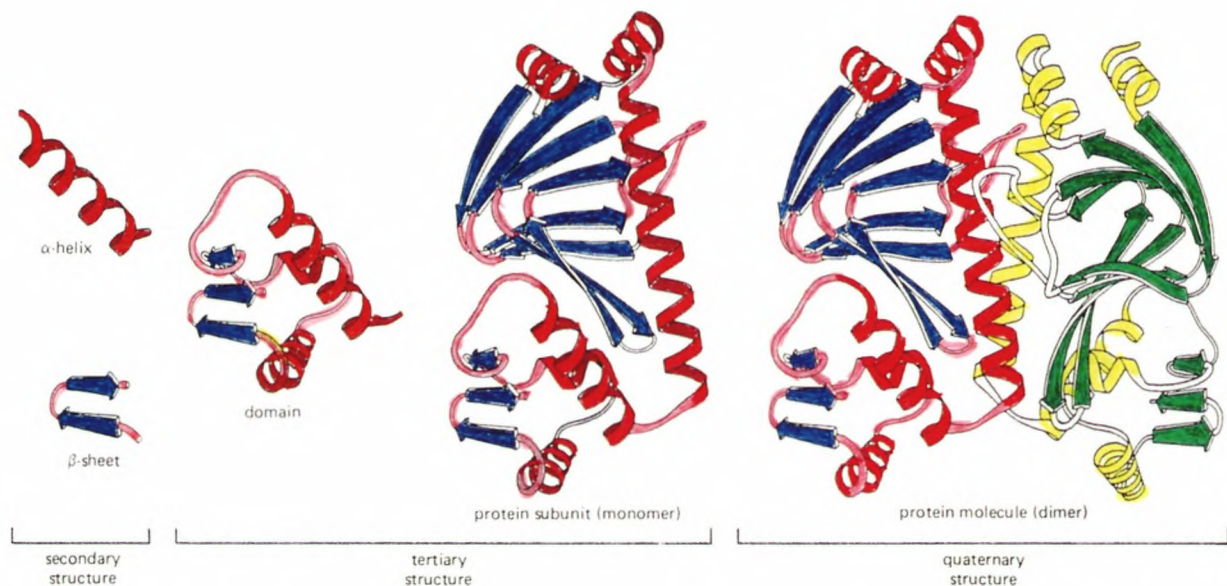
Hamilton-model

For at forsøge at anslå antallet af klasser på en mere fun-

damental måde og yderligere være i stand til at beskrive foldningsdynamikken, har vi konstrueret en meget simplificeret Hamilton-beskrivelse for proteinfoldningen (d.v.s. en beskrivelse med en energi funktion, der skal minimeres). Vi betragter et protein, efter at det har udviklet sine sekundære strukturer - α -helix og β -strenger. Selvom proteinstrukturene ser meget komplicerede ud kan man *lokalt* betragte to naboelementer som nogenlunde parallelle og disse er forbundet med en uregelmæssig løkke. Den direkte forbindelseslinie kan derimod antages at være nogenlunde vinkelret på de to elementer. Det vil sige at ved at gå *lokalt* frem kan vi projicere den komplicerede struktur på et simpelt kubisk gitter. Dette skærer effektivt igennem homologiproblemet. Ved at tage eksempler fra Brookhaven-data-bank viser det sig at virke i praksis. Et simpelt eksempel for 4- α -helix bundtet er vist på fig. 3. Lignende gittermodeller er tidligere blevet undersøgt på det primære niveau, men ikke for sekundærstrukturer, hvilket naturligvis er langt mere slagkraftigt. Vi behøver nu blot den simple observation, at de fleste proteiner synes at være tættest mulig pakket i en vandig opløsning i deres "native" tilstand for at beregne antallet af klasser.

Antallet af tilfældige konfigurationer for en kæde på N elementer er enormt stort: $N_{\text{tilf.}} \sim z^N = 4^N \approx 10^{11}$, hvor $N = 18$ er et typisk tal for antallet af vendepunkter (spin) og $z = 4$ er antallet af mulige drejninger (koordinationstallet). Det gælder for et domæne med ti sekundære elementer, inkluderende de forbindende løkker. Problemet er at finde hvor mange, der er tættest pakket. Kvadratet på ende-ende afstanden, R_f , kan vises at skalere som $R_f \propto N^{0.6}$. For at proteinet skal være tæt pakket må enderne ihvertfald være nær hinanden, det reducerer antallet drastisk til $N_{\text{nær}} \propto \bar{z}^N / R_f^d$, hvor $d = 3$ er dimensionen og $\bar{z} = z - \epsilon$, hvor $\epsilon = 0.32$ korrigerer for evt. senere sammenstød af kæden med sig selv. Vi ønsker yderligere pakning og forlanger at proteinet skal opholde sig i et volumen givet ved en kvadrat-middel-radius, som skalerer som $\langle r^2 \rangle \propto N$, hvilket giver en yderligere reduktion med $N^{\frac{3}{2}}$. Yderligere ønsker vi at elementer, der udgør β -plader er nær i rummet, hvilket kan vurderes som en kombinatorisk reduktionsfaktor. Alt-i-alt giver det et skøn for antallet af forskellige, tættest mulige konfigurationer eller klasser på $N_{\text{foldningsklasser}} \sim N_{\text{tæt},\beta} \sim \bar{z}^N / N^{d(\nu+\frac{1}{2})} \times n!m!/(n+m)!$, hvor $n \approx m$ er antallet af α -helix og β -elementer. Dette giver $N_{\text{foldningsklasser}} \sim 4000$. Der findes en anden metode, hvor man med grafteori kommer frem til omtrent 1000 foldningsklasser. Vi har foretaget en præcis optælling med computer og finder faktisk $N_{\text{foldningsklasser}} \sim 4000$ i overensstemmelse med vores estimat. Det væsentlige er at antallet, 4000, er voldsomt reduceret i forhold til 10^{11} og at vi kan vurdere det med vores simplificerede model. Antallet er lidt større end Chothia's, og det er fremkommet på en helt anden måde. Skulle både vi og Chothia have ret, er det faktisk også vældig interessant, idet det naturligvis ikke er givet, at naturen under evolutionen har benyttet sig af alle muligheder, men måske kun ca. en fjerdedel af dem.

De fundne strukturer kan beskrives entydigt som



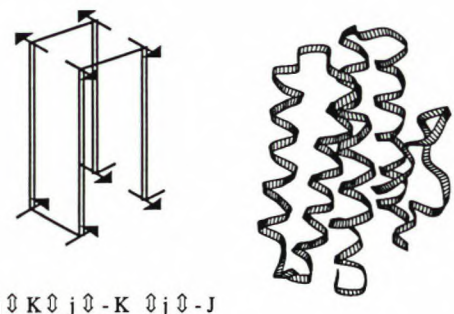
Figur 2. Den 3-dimensionale struktur af et protein er her beskrevet ved de forskellige niveauer, a, b, c, d, som opbygger foldningen. Hvert af niveauerne er konstrueret fra det tidligere på en hirarkisk måde. Det opbyggede komplekse protein er Det Katabolitiske Aktiverende Protein (CAP) og fig. a: viser de to almindelige typer af sekundære strukturer, α -helix og β -plade. Fig. b: viser et under-domæne af den tertiære struktur, fig. c: viser den fulde tertiære struktur og fig. d: den komplette kvarternære struktur er i dette tilfælde en dimerisation, der er lavet ved spejling.

en spin Hamilton-model. Vi betragter kæden af sekundære proteinelementer, forbundet med løkker. Hvert forbindelsespunkt mellem et element og en løkke opfattes som et hængsel hvorom elementet kan dreje sig. I hvert hængsel sættes nu et spin der kan vekselvirke med nabospin eller næstnabospin. Nu kan vi spadserer ned gennem kæden. To parallelle spin for enderne af det i -te element giver vekselvirkningskonstanten J_i mens antiparallelle giver $-J_i$. Tilsvarende kaldes vekselvirkningskonstanterne for løkkerne j_i . Ortogonale spin tildeles vekselvirkningskonstanter $\pm K_i$ og $\pm k_i$ hvor fortegnet er givet ved krydsproduktets retning i et koordinatsystem der ikke er globalt for proteinet, men afhænger af nabo og næstnabo-spin.

En given rækkefølge af vekselvirknings konstanter angiver nu entydigt en mulig tættest pakning. Der er altså fundet et unikt navn. Et eksempel på dette ses i figur 3 hvor 4- α bundtet er karakteriseret. Hvordan kan det nu være en klassebetegnelse? For det første vil flere beslægtede, forvredne strukturer ved den foretagne projektion blive identiske. Dernæst vil en given peptidsekvens-information blive reduceret til et spørgsmål om en ud af de 16 forskellige måder to strenge kan sættes på et element. Vi har hermed de væsentligste elementer nødvendige for en klassifikation: Et entydigt navn, en reduktion af data, en entydig recept til at identificere data. Endelig, på basis af hvor store domæner vi ønsker at beskrive, kan vi beregne hvor mange mulige klasser der er, nemlig ca. 4000, og hvordan de tilhørende foldninger ser ud.

Hamiltonformalismen har yderligere den fordel, at det

er muligt at studere dynamikken af en foldning idet en forkert foldning koster en vis energi givet ved energien for at bøje et hængsel forkert. Den grundlæggende idé er, at vi antager, at proteinet først finder sine sekundære elementer. Dernæst hjælper hængslerne proteinet til at folde i de rigtige retninger (omend kun svagt). Til sidst limes det hele sammen med brintbindinger mellem alle elementer. Vi undersøger denne simple model med Monte Carlo simuleringer på en computer. Det er vores tese at naturen løser Levinthals paradox ved at konstruere og arbejde med større og større byggestene.



J $\updownarrow$ j $\updownarrow$ K $\updownarrow$ j $\updownarrow$ -K $\updownarrow$ j $\updownarrow$ -J

Figur 3. a: Kæde repræsentation af 4-helix bundt proteinet. b: Det rigtige protein i en bånd repræsentation.

Forudsigelse af foldningsklasser

Endeligt skal det nævnes, at det er af stor vigtighed at kunne udtale sig skønsomt om hvilken en 3-dimensional struktur en given sekvens giver anledning til, idet der sekventeres meget mere gendata end der bestemmes proteinstrukturer, og derfor vil mange stå i den situation, at de intet aner om, hvad deres fundne gen koder for. Derfor har vi fundet det vigtigt at konstruere et mail-server system², der kan give en forudsigelse om hvilken foldningsklasse en given proteinsekvens tilhører. Der er selvfølgelig ikke tale om en detaljeret 3-dimensional struktur forudsigelse, men om en overordnet topologisk pakningsstruktur. Systemet er konstrueret ud fra en viden-

baseret computermethodik, der er afprøvet på alle kendte foldningsklassetilfælde med en træfsikkerhed på ca. 84% korrekthed for at ramme en ud af ca. 50 mulige foldningsklasser.

Referencer:

- 1) P. A. Lindgård og H. Bohr, "How many fold classes are to be found" in Protein Folds, Eds. H. Bohr and S. Brunak, CRC Press, Orlando (1995).
- 2) M. Reczko and H. Bohr, Nucleic Acid Research **22**, 3616 (1994).

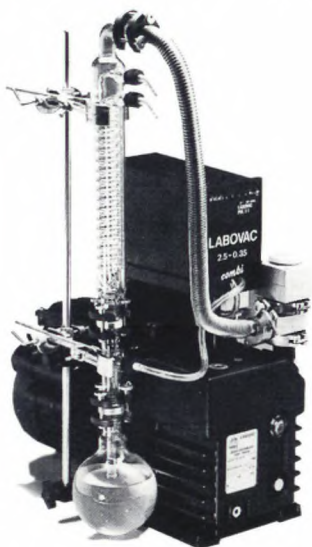


Per-Anker Lindgård er seniorforsker og dr. scient. Ansat i afdelingen for faststoffysik ved RISØ. Arbejder med: Statistisk fysik, magnetiske og strukturelle faseovergange og eksitationer, magnetiske klynger, overflader og polymerfysik.



Henrik G. Bohr er forskningslektor på Fysisk Kemisk Institut og forsker i protein struktur og foldning i Center for Biologisk Sekvens Analyse gruppen.

MODERNE VAKUUMTEKNIK TIL FORSKNING OG INDUSTRI



SASKIA HOCHVAKUUM- UND LABORTECHNIK GmbH I ILMENAU er et succesrigt resultat af øst-vest genforeningen i Tyskland. SASKIA's et- og to-trins finvakuumpumper fra 4 til 200 m³h⁻¹ har rotor-skiver af et nyt PTFE materiale som sænker støjniveauet med ca. 3 dBA og tillader pumperne at arbejde konstant ved højt tryk eller med aggressive gasser. Med en frekvensregulering kan pumpehastigheden fordobles, så man f.eks. hurtigt kan evakuere et anlæg og derefter anvende pumpen som holdepumpe ved lav hastighed. SASKIA's kemisk resistente membran-pumper har liniærdrevne membraner, hvilket sikrer en lang levetid og lavt effektforbrug. En membranpumpe på ca. 30 W kan med de store afgifter på brugsvand hurtigt tjene sig ind, hvis den erstatter en vandstrålepumpe. SASKIA's TOWER pumpestande er kemipumpestande kombineret med kondensatorer og med instrumentering for indstilling af trykket. SASKIA leverer oliefri pumpestande kombineret med turbomolekularpumper i et handy design og rootspumpestande op til 20.000 m³h⁻¹.

ALLE FORMER FOR OLIEFRI & OLIESMURTE ROTATIONSVAKUUMPUMPER • FEDTSMURTE TURBOMOLEKULAR- SPIRO- & HYBRIDPUMPER • DIFFUSIONS- & CRYOPUMPER • VAKUUMMÅLEINSTRUMENTER, VENTILER, HV & UHV FITTINGS • HELIUMLØKSØGERE & MASSESPEKTROMETRE • SPUTTER- ELEKTRONKANON & ÆTSEANLÆG • RF & HV STRØMFORSYNINGER • RUSTFRI SPECIALKAMRE & DELE • OMBYGNING AF VAKUUMANLÆG

**WENZEL VAKUUM TEKNIK APS • NYBROVEJ 283 • DK-2800 LYNGBY • TLF. 45 87 97 35
SHOWROOM, SERVICE, LAGER • NYBROVEJ 193 • BIL 30 42 63 00 • FAX 45 93 32 93**

Mikrotubuli

Henrik Flyvbjerg

HLRZ, Forschungszentrum Jülich, D-52425, Tyskland

Biologisk celledeling er en kompliceret proces. I komplicerede processer opstår let fejl. Celler benytter derfor specielle mekanismer, som minimerer, korrigerer eller helt undgår fejl. Et godt eksempel er modercellens fordeling af de dupliserede kromosomer med nøjagtig én kopi til hver af de to datterceller. Denne proces må nødvendigvis udføres fejlfrit. Fejlraten er målt for gærceller til cirka én fejl pr. 100.000 delinger. Denne 99,999% præcision skal ses i forhold til, at processen så at sige udføres i blinde:

Inden celledeling duplikeres kromosomerne til par af sammenhæftede *søster-kromatider*. Disse ruller sig sammen på sindrig vis, så de er håndterlige og kan separeres uden at blive viklet ind i hinanden. Derved får de det velkendte udseende, som let ses i et lys-mikroskop; se f.eks. forsidebilledet af dette nummer af KVANT. Selvom vi sagtens kan se kromosomerne, har cellen ikke det samme overblik over sit indre. Den er derfor udstyret med en mekanisme, som både kan *finde* kromosomerne, kan *konstatere* om de *alle* er fundet, og, når dette er bekræftet, kan *skille dem ad* på en måde, så én og kun én søster-kromatid ender i hver af de to datterceller, der dannes umiddelbart efter adskillelsen.

Denne mekanisme og dens forskellige bestanddele er under aktiv udforskning, mest af biologer og læger, selvsagt, men også af fysikere, da emnet indeholder flere fysiske problemstillinger. Eksempler gives i denne artikel.

Mikrotubuli

Celler, som ikke er i færd med at dele sig, har lige ved siden af cellekernen et center, *centrosomet*, hvorfra tynde, stive rør stråler ud i alle retninger til cellemembranen, og giver cellen dens form. Disse små rør, *mikrotubuli*, er polymerer dannet af et enkelt protein, *tubulin*. Navnet dækker over flere, meget nært beslægtede, kugleformede proteiner med en diameter på ca. 4 nm. To af dem, α - og β -tubulin, binder godt til hinanden, og udgør tilsammen en stabil *hetero-dimer* som polymeriserer til mikrotubuli. Elektronmikroskopi viser, at tubulinet i en mikrotubulus danner et to-dimensionalt, cylinderformet "krystalgitter," med en omkreds på typisk 13 hetero-dimerer. Cylinderen har en ydre diameter på ca. 25 nm og en indre diameter på ca. 14 nm; se fig. 1. Så mikrotubuli er altså krystaller, om man vil.

Fra et ingeniørsynspunkt hæfter vi os ved, at hvis man vil forme en stang med maksimal stivhed med et minimalt forbrug af materiale, så er rørformen en optimal løsning. Mikrotubuli er da også det stiveste "bygnings-element" man finder i celler. De fungerer som universelt design-element, for så vidt som at overalt i celler, hvor der er brug for en stiv konstruktion, benyttes mikrotubuli.

Større, stivere strukturer dannes ved at forbinde flere mikrotubuli, indtil flere hundrede ved siden af hinanden.



Figur 1. En mikrotubulus er en polymer af proteinet tubulin, som danner en cylinderisk "krystal" af hetero-dimerer i et spiralformet arrangement. (Grafik: I. Jánosi)

Celledeling

Inden en dyrecelle deler sig, opløses dens skelet af mikrotubuli, mens centrosomet deler sig i to; se fig. ab på forsiden af dette nummer af KVANT. Fra hvert af de to nye centrosomer vokser derefter igen mikrotubuli ud i alle retninger, se fig. bc. Man mener det er vekselvirkning mellem disse mikrotubuli, som skubber de to centrosomer bort fra hinanden. Man formoder, at skubbe-arbejdet udføres af motor-molekyler som *kinesin*, der kan spadserer langs mikrotubuli.

Dernæst opløses hinden omkring cellekernen, som holdt sammen på kromosomerne, og mikrotubuli'ene fra de to centrosomer forsøger at finde kromosomerne—som en blind persons søgende fingre—ved at polymerisere i forskellige retninger, og "vende om" ved at depolymerisere, når intet findes i en given retning—for derefter at forsøge i en ny retning. Sådan ser det ud, i det mindste, for en tolkende iagttager. For når enden på en mikrotubulus tilfældigvis finder et af to bestemte punkter midt på et par af søster-kromatider, ophører denne mikrotubulus med sin "søgende adfærd," og hiver i stedet parret hjem til det centrosom, som denne mikrotubulus voksede fra; se fig. d.

Nu er der imidlertid to punkter midt på et kromatid-par, hvor en mikrotubulus kan få fat; ét punkt på hver kromatid, placeret modsat hinanden. Så mikrotubuli fra det andet centrosom kan gribe fat i par, som det første cen-

trosom allerede har fat i, og gør det også før eller siden, for den blinde søgen fortsætter simpelthen indtil opgaven er løst, og alle par er fundet af mikrotubuli fra begge centrosomer. Mens denne søgeproces står på, foregår en voldsom puffen og masen af kromatid-par mellem hinanden, når der trækkes i dem fra to sider, og de som følge heraf alle prøver at placere sig midt mellem de to centrosomer; se fig. de.

Når alle kromatid-par er fundet af mikrotubuli og placeret midt mellem de to centrosomer (fig. e), skilles alle par ad samtidigt, som på kommando, og hver halvdel hives hurtigt over til hvert sit centrosom (fig. f), mens cellemembranen snøres sammen bag dem (fig. g). De to datterceller er dermed dannet. Hinder gendannes om hver af de to nye cellekerner, og de to nye celler danner hver et skelet af mikrotubuli (fig. hi). Cyklen er fulendt.

I hurtigt formerende dyre- og planteceller tager det kun 1–2 timer at kondensere kromosomerne, finde og separere dem, og dele cellen i to, mens hele cyklen varer 16–24 timer. Så den delikate delingsproces afvikles tilsyneladende effektivt, og udgør ikke nogen flaskehals i cyklen.

Vi har lige set, at cellen ikke behøver at "vide," eller kunne "se," hvor kromosomerne befinder sig. Den finder dem med en tilfældig søgeproces, som er effektiv, fordi der søges i alle retninger samtidigt. Men hvordan "ved" cellen så, hvornår alle kromosomer er fundet af begge centrosomer, og hvori består "kommandoen," som udløser sidste fase i celledelingen?

Svaret er enkelt: Det punkt på hver kromatid, som mikrotubuli'ene leder efter, udsender et kemisk signalstof, med mindre der trækkes i det. Dette kemiske signal fungerer som et input til en logisk *and-gate*: Så længe der ikke trækkes i *alle* kromatid-par fra *begge* sider, vil de, der ikke er udsat for træk, udsende signalstoffet, og søgeprocessen fortsætter. Først når alle par er "bragt til tavshed," opfattes denne tavshed som kommandoen om deres deling, og celledelingen løber til ende.

At det forholder sig således, ses i forsøg: Hvis man, når alle forbindelser mellem søster-kromatider og centrosomer er skabt, knækker en enkelt forbindelse, så sker delingen af parrene ikke. Søgeprocessen fortsætter derimod indtil en ny forbindelse er skabt, og først da sker delingen. At det er træk i det enkelte kromatid, som er afgørende, ses af, at man i den netop beskrevne situation kan narre cellen til fortsat deling ved bare at trække i det afknækkede stykke mikrotubulus, som har fat i kromatidet.

To spørgsmål

Celledeling er en udpræget livsproces. Den forløber via mange delprocesser, heriblandt mikrotubulis søgen efter kromosomerne. Er det så også en livsproces? Det er ikke et særligt meningsfuldt spørgsmål. Grænsen mellem levende og død materie bliver diffus, når vi stiller skarpt på den. Men hvad er mekanismen bag mikrotubulis skiftevis polymerisering og depolymerisering?

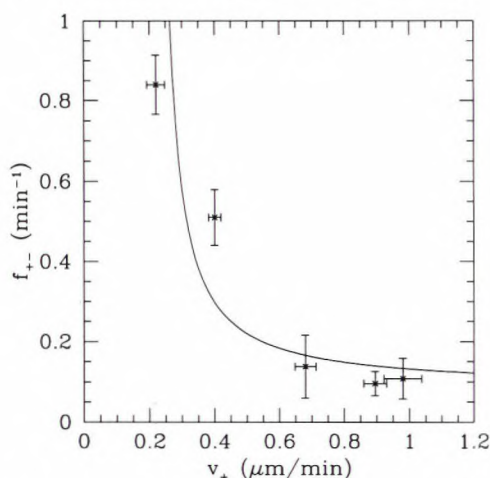
En anden mekanisme er interessant, fordi den kunne

forventes at optræde, men ikke gør det, og dette også er formålstjenligt: Når cellen indeholder tubulin i koncentrationer, som medfører vedvarende polymerisering af mikrotubuli, hvorfor vokser de så kun fra centrosomet? Hvorfor dannes mikrotubuli ikke også spontant i celleplasmaet?

Svar på disse spørgsmål detaljerer vores forståelse af livets mekanismer. Men der er ikke nødvendigvis langt fra erkendelse til praktisk anvendelse: Flere typer cancermedicin standser løbsk cellevækst ved specifikt at påvirke mikrotubulis dynamik.

Vækst af mikrotubuli – modstridende eksperimenter?

Man ved at polymerisering af mikrotubuli koster energi i form af GTP (guanosin-tri-fosfat). Kun dimerer forbundet med to GTP-molekyler kan polymerisere. Man ved også, at kort efter en dimer er indgået i en voksende mikrotubulus' krystalgitterstruktur, hydrolyseres et af disse GTP-molekyler til GDP (guanosin-di-fosfat). Man siger at tubulin-t er blevet til tubulin-d. Man forestiller sig derfor, at enden på en polymeriserende mikrotubulus består af tubulin-t, omtalt som en *GTP-hætte*, og at denne hætte udgør forskellen på de to tilstande, polymeriserende og depolymeriserende. På trods af meget eksperimentelt og teoretisk arbejde, er dette billede kontroversielt. Eksperimenterne synes at modsige hinanden:

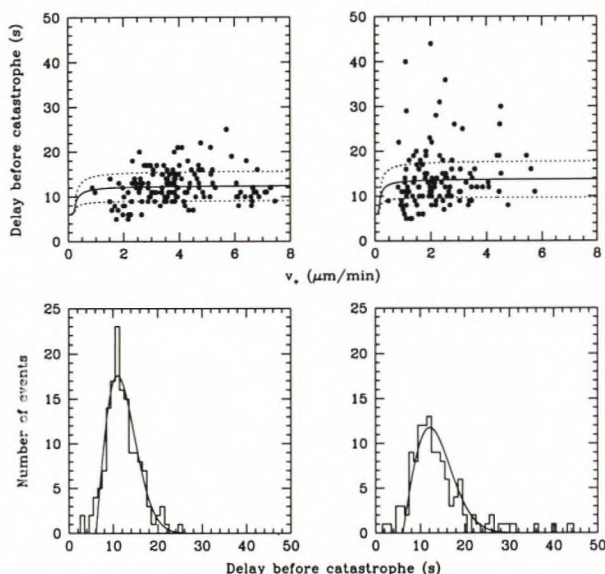


Figur 2. Katastrofe-raten som funktion af polymeriseringshastigheden ¹.

Chancen for at en mikrotubulus, som vokser ved polymerisering, skifter til depolymerisering indenfor et givet tidsrum, er mindre jo hurtigere mikrotubulus'en vokser; se fig. 2. Tilstandsskiftet kaldes meget manende en *katastrofe*, og katastroferatens aftagen med væksthastigheden forklares ved at hættens på én gang vokser med mikrotubulus'en ved polymerisering af tubulin-t og afkortes ved hydrolyse af sådan tubulin-t til tubulin-d. Begge processer er stokastiske, så hvis den sidste indhenter den første ved en tilfældighed, er hættens væk, og "katastrofen" indtruffet. Sandsynligheden for at dette sker aftager med hættens størrelse, og hættens er større, jo hurtigere mikrotubulus'en

vokser ved tilføjelse af nyt tubulin-t, så dermed synes katastroferatens aftagen med væksthastigheden forklaret, i det mindste kvalitativt.

Men hvis hurtigt voksende mikrotubuli har større GTP-hætter end langsomt voksende, må deres større hætter også være længere om at hydrolyseres bort i en situation hvor eksperimentator pludseligt standser væksten ved at skylle tubulin-opløsningen bort. Studerer man nu en enkelt mikrotubulus under mikroskop, må man altså forvente at se en ventetid fra væksten standses ved udskylning til mikrotubulus'en begynder at afkortes ved depolymerisering som følge af at hættens er væk. Man må også forvente, at denne ventetid afhænger af væksthastigheden inden udskylning, og vokser med den.



Figur 3. Øverst: Hvert punkt angiver en måling af ventetiden fra polymerisering med hastigheden v_g standses ved udskylning til depolymerisering starter. Kurverne angiver teoriens middelværdi og standardafvigelse for ventetiden som funktion af v_g . Nederst: Fordelinger af samme ventetider. Der er forskel på de to ender af mikrotubuli, da de dannes af *hetero*-dimerer. Venstre: Resultater for *plus*-enden. Højre: Resultater for *minus*-enden.

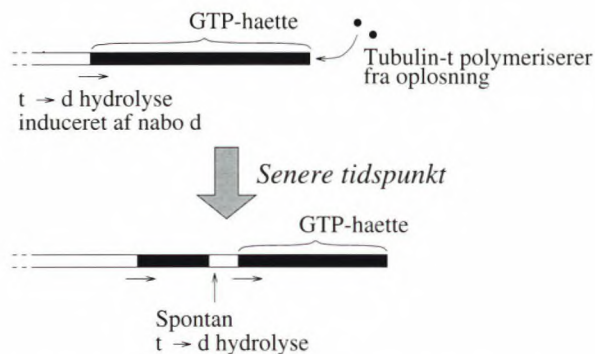
Dette simple eksperiment er med megen tålmodighed foretaget masser af gange i forskellige koncentrationer af tubulin-t, og deraf følgende forskellige væksthastigheder. Resultatet overraskede: Dels var der overhovedet ingen sammenhæng mellem tubulin-koncentrationen, man benyttede, og den ventetid, man observerede. Dels viste ventetiden sig at være en stokastisk størrelse: Ved én og samme koncentration observerede man vidt forskellige ventetider.

Figur 3 viser de målte ventetider. Samme figur viser, hvad en forholdsvis simpel, ny teori forudsiger for ventetidernes fordeling, og denne fordelings afhængighed af koncentrationen. Hver af de to fordelinger er fittet til data med kun én parameter, fordelingernes gennemsnit. Derudover er et fælles effektivt nulpunkt på tidsaksen fittet. Resten er bestemt af teorien. Samme simple teori giver samtidigt kurven gennem datapunkterne i fig. 2, og giver altså en samlet forklaring på eksperimenterne, som syntes

i modstrid med hinanden.

Effektiv teori

Teorien, som giver de viste fits, er en *effektiv* teori: Den tilstræber at beskrive data med så få og simple antagelser og så få parametre, som muligt. Uden hensyn til at virkeligheden sikkert er mere kompleks. Teorien antager, at der er en GTP-hætte af længde x på en voksende mikrotubulus. Denne hætte vokser stokastisk i den ene ende ved tilføjelse af tubulin-t dimerer, og afkortes stokastisk ved hydrolyse fra den modsatte ende, hvor tubulin-t er nabo til tubulin-d i krystalgitteret; se fig. 4. Derudover antages, at tubulin-t dimerer inde i hættens også hydrolyserer tilfældigt, men med langt lavere rate end de, der har tubulin-d naboer. Men *når* en enkelt dimer inde i hættens er hydrolyseret, har dens naboer pludseligt en tubulin-d nabo, hvorefter de hydrolyserer med den hurtigere rate, og en "plet" af tubulin-d breder sig rundt om mikrotubulus'en, så hættens effektivt kortes af til hvor pletten befinder sig; se fig. 4. Hyppigheden, denne afkorting af hættens sker med, er proportional med hættens længde, fordi processen lige gerne starter i en hvilken som helst tubulin-t dimer i hættens. Som følge heraf bliver hættens aldrig rigtig lang. For jo længere den er, desto hurtigere vil den kortes af. Dens længde, x , udfører et 'biased random walk' mod større værdier, men afkortes som beskrevet til en vilkårlig brøkdel af sig selv med hyppighed proportional med x . Når x tilfældigvis bliver 0 ved en kombination af afkorting og random walk, er hættens borte, og vi har en "katastrofe."



Figur 4. Mikrotubulus vokser ved polymerisering af tubulin-t (sort) som hydrolyseres til tubulin-d (hvid).

Teorien beskrevet her er så simpel, at den kan løses analytisk¹. Men dette at essensen af et fænomen eventuelt kan beskrives med en simpel effektiv teori, som henviser fænomenets detaljer til at udtrykke sig samlet gennem nogle få parametre, det er ingen simpel ide, og ikke en tankegang, som er almindelig udenfor fysikken.

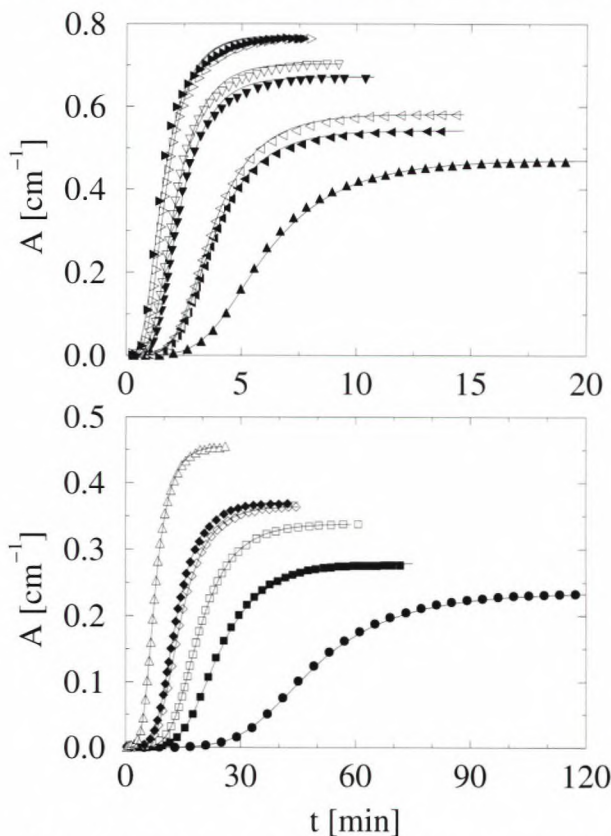
Det hører med til historien, at mens denne teori blev udarbejdet, blev GTP-hætter for første gang set i mikroskop i et elegant eksperiment, som gjorde enkelte

ikke-hydrolyserbare tubulin-t dimerer synlige ved at gøre dem fluoriserende. Man kunne derved tælle dem og regne sig til størrelsen af den mindste hætte, som ville kunne forhindre katastrofe: 40 dimerer måtte den bestå af.²

Uvidende herom, blev de tre parametre i ovenfor beskrevne teori bestemt ud fra de viste data. Disse data er resultat af eksperimenter, der kun kunne opløse længden af mikrotubuli. Hætten var et rent teoretisk begreb. Men teorien forudsagde dens minimumsstørrelse—til 40 dimerer!¹

Spontan dannelse af mikrotubuli

Spontan dannelse af mikrotubuli fra opløsning ses ikke i celler. Men processen kan studeres in vitro. Den er interessant for forståelsen af cellers kontrol over den, men også som et model-eksempel på biologisk *self-assembly*, d.v.s. den proces hvorved proteiner samler sig til større strukturer uden brug af anden information end deres egen karakteristiske form. Det er processens første del, som er interessant: Hvordan *begynder* tubulin-molekylerne på det cylinder-formede krystalgitter? Efter dette er dannet, er der blot tale om gentagen addition af molekyler til den eksisterende struktur.



Figur 5. Turbiditet som funktion af tiden for 13 forskellige tubulin koncentrationer³.

Figur 5 viser tidsserier fra 13 forskellige forsøg i hvilke man som funktion af tiden målte tubulinopløsningers turbiditet ("uklarhed") ved 350 nm. Ved denne bølgelængde er turbiditeten proportional med den samlede masse af dannede mikrotubuli. Den eneste forskel på de 13 for-

søg er mængden af tubulin til stede. I alle tilfælde var al tubulin i opløsning og ingen mikrotubuli til stede til tid 0. Men ved brat at hæve temperaturen fra 0°C til 37°C til tid 0, begyndte mikrotubuli at dannes spontant. Disse mikrotubuli vokser indtil de har opbrugt al tubulin i opløsningen, hvorefter der ikke sker mere. "Katastrofer" forekommer ikke; mekanismen er "slået fra" ved at komme glycerol i opløsningen.

Gør man nu forsøgsvis den rimelige antagelse, at mikrotubuli altid dannes ved samme mekanisme, så må de viste tidsserier indeholde megen information om denne mekanisme. Indeholder de nok til at vi kan finde mekanismen? Det ville være interessant, for kemiske processer i opløsning kan jo ikke følges i mikroskop. Det kan elementarpartiklers processer heller ikke, men det forhindrer ikke partikelfysikere i at finde mekanismerne fra produkterne. Endvidere har matematiske fysikere helt klarlagt under hvilke betingelser man kan regne baglæns og entydigt fastlægge et potential ud fra viden om hvordan potentialet afbøjer passerende partikler. Så hvorfor ikke formulere et tilsvarende såkaldt *inverst problem* for ikke-ligevægts reaktionskinetik?

Inverst problem

Man kan faktisk fastlægge en kinetisk model for spontan dannelse af mikrotubuli ud fra de viste eksperimentelle tidsserier. Resultatet er vist som kurver gennem de eksperimentelle datapunkter i fig. 5, og ses at stemme med dem. Vi giver ikke beviset, men smagsprøver fra det:

Første trin i analysen benytter slet ingen teori: Man konstaterer bare at de eksperimentelle tidsserier alle har samme s-form, og viser sig at *scale* til en meget god approksimation—d.v.s. de kan alle gengives med én og samme funktion med en s-formet graf, f , ved at skrive dem som

$$A_i(t) = A_i(\infty)f(t/t_i). \quad (1)$$

Her er $A_i(t)$ turbiditeten af den i te tidsserie som funktion af tiden t , og t_i er en karakteristisk tid for denne serie—f.eks. tiden, det tager for turbiditeten, at vokse til 1/10 af sin slutværdi, $A_i(\infty)$. Yderligere viser det sig at

$$t_i \propto A_i^{-3}(\infty) \quad (2)$$

med al ønskelig præcision.

Den simple form af disse 100% fænomenologiske resultater tyder stærkt på at mekanismen, vi ønsker at afdække, er simpel. Resultaterne er også præcise matematiske betingelser, som en model for mekanismen skal opfylde. Det giver håb om at den kan findes.

Næste trin består i at nedskrive et generelt sæt kinetiske ligninger, som indeholder så få antagelser, som overhovedet muligt. Vi kræver dernæst af disse ligninger at deres løsning opfylder lign. (1) og (2). Dette viser sig at være et meget stærkt krav, som definerer en snæver klasse af ligninger, der tilmed viser sig løsbare. Derefter er kun tilbage at fitte et heltal og to reelle reaktionsrater til data. Resultatet ses i fig. 5.

Det fremgår af den fundne model, hvorfor mikrotubuli kan polymerisere fra specielle centre i en celle, uden at nye mikrotubuli dannes spontant: Mængden af tubulin, som i et givet tidsrum polymeriserer på den første måde, er proportional med tubulin-koncentrationen. Mængden, som polymeriserer på den anden måde, viser sig at være proportional med koncentrationen opløftet til 16. potens! Hvis et positivt tal ikke er valgt med særlig omhu, vil dets 16. potens enten være forsvindende lille, eller meget stor. Så denne potens-afhængighed fungerer som en "kontakt," der enten er tændt eller slukket. I celler er den slukket.

Modellen viser samtidigt, at en nydannet mikrotubulus skal indeholde $16 - 1 = 15$ dimerer, før tilføjes af yderligere dimerer bliver en simpel gentagelse af samme proces. Dette antal er besnærende tæt på de 13-14 protofilamenter, som en sådan spontant dannet mikrotubulus typisk indeholder. Man kan forestille sig, at en mikrotubulus starter som kun én dimer lang og 13-14 dimerer i omkreds. Men dette billede er en overfortolkning af modellen. Den giver kun et tal, 15, og siger ikke noget om sådan en ringform. På den anden side er sådanne ringe kendte fra elektronmikroskopi af tubulin-opløsninger hvori mikrotubuli dannes. Men deres rolle er uklar. Elektronmikroskopi kræver, at motivet fryses, så man ved ikke hvordan det, man ser, ville have udviklet sig i tid. Men at en nydannet mikrotubulus skal indholde 15 dimerer, før den polymeriserer ligesom længere mikrotubuli, synes at være et robust resultat: En helt anden eksperimentel metode, som målte hvor hurtigt nye mikrotubuli dannes ved andre koncentrationer og temperaturer, fandt værdien 12 ± 2 for dette tal ⁴.

Konklusion

Det tilfældige element i mikrotubulis søgen efter kromosomer kan forklares som resultat af en konkurrence mellem to simple stokastiske processer i GTP-hætten, vækst og hydrolyse. Fraværet af spontan dannelse af nye mikrotubuli under forhold, hvor eksisterende mikrotubuli villigt polymeriserer, kan forklares med nydannelsens voldsomme koncentrationsafhængighed.

De to problemstillinger beskrevet her er eksempler på hvordan moderne molekylær-biologi afføder gode fysiske problemer. Det sker dels fordi man studerer systemer på så kort en længdeskala, at grænserne mellem biologi, kemi og fysik bliver uskarpe, og dels fordi man benytter fysiske målemetoder, som i kraft af måledatas mængde og nøjagtighed gør matematisk modellering mulig, men også gør den nødvendig for overhovedet at kunne tolke data.

Referencer:

- 1) H. Flyvbjerg, T. E. Holy, and S. Leibler, *Stochastic Dynamics of Microtubules: A Model for Caps and Catastrophes*, Phys. Rev. Lett. **73**, 2372 (1994).

- 2) D. A. Drechsel and M. W. Kirschner, *The minimum GTP cap required to stabilize microtubules*, Current Biology **4**, 1053 (1994).
- 3) H. Flyvbjerg, E. Jobs, and S. Leibler, *Kinetics of Self-assembling Microtubules: An "Inverse Problem" in Biochemistry*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), to appear (1995).
- 4) D. Kuchnir Fygenson, H. Flyvbjerg, K. Sneppen, A. Libchaber, and S. Leibler, *Spontaneous nucleation of microtubules*, Phys. Rev. E **51**, 5058 (1995).



Henrik Flyvbjerg er dr.scient. og leder af biofysikgruppen ved det tyske super-computer-regnecenter HLRZ i Jülich. Interesserer sig for matematisk modellering, især teoretisk biofysik.

balzers

**Gasanalyse til særdeles
god pris pr. ydelse**

Restgasanalyse i vakuum-
processer, procesgas-
kontrol, tæthedskontrol, etc.
Kvalitetssikring og
forebyggelse af utilsigtede
driftstop

Prisma™

Nordiska Balzers AB
Baunegårdsvej 7 L
DK-2820 GENTOFTE
Tel. 39 68 32 61
Fax 39 68 22 55

Nordiska Balzers AB
Box 10412
S-434 24 KUNGSBACKA
Tel. +46 0300 710 80
Fax +46 0300 172 85

K049dk1

Fluktuationer og membranfunktion

Hvordan membraners nanoskala-fysik kontrollerer deres funktion

Ole G. Mouritsen, Fysisk Kemisk Institut, DTU

Molekylær biomembranfysik

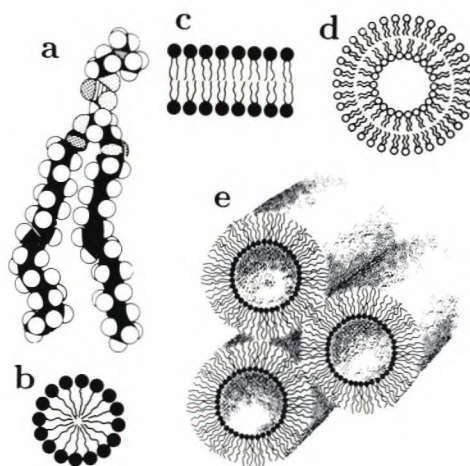
Statistisk fysik beskæftiger sig med, hvorledes molekylære vekselvirkninger i systemer, der består af mange partikler, bestemmer disse systemers egenskaber helt fra de mindste længdeskalaer op til de største. I de sidste par årtier har statistisk fysik i stigende grad været anvendt inden for den molekylære 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,¹ hvis struktur i rummet, på samme måde som en polymer, i vidt omfang er bestemt af dens konformationsentropi.

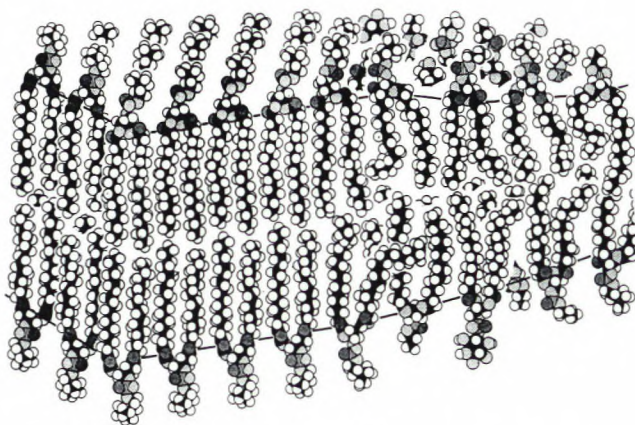


Figur 1. Fosfolipidmolekyle (a) og de lipidaggregater (b-e), som dannes i vand. (a): Fosfolipid med vandopløseligt hoved og olieopløselig hale i form af to kulbrintekæder. (b): Lipidmicelle. (c): Lipiddobbeltlag. (d): Lukket lipiddobbeltlag: en vesikel. (e): Heksagonal lipidfase.

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.

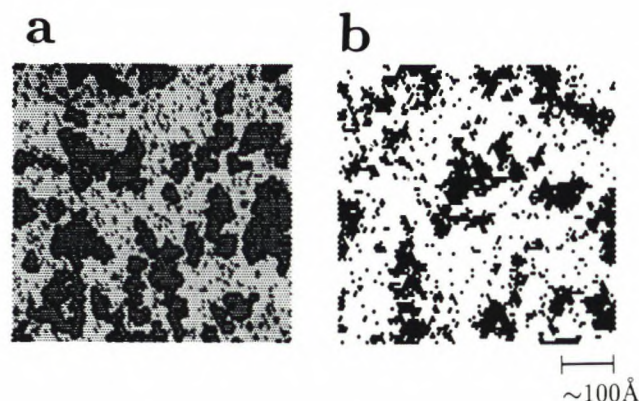
membranens plan. I væskefasen er lipidmolekylernes olie kæder uordnede. Den faste fase er en to-dimensional krystal, hvori lipidmolekylerne er indbyrdes ordnede, og olie kæderne har en høj grad af molekylær orden. Smeltningen af lipiddobbeltlaget er en faseovergang af 1. orden, dvs. at der er forskel 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

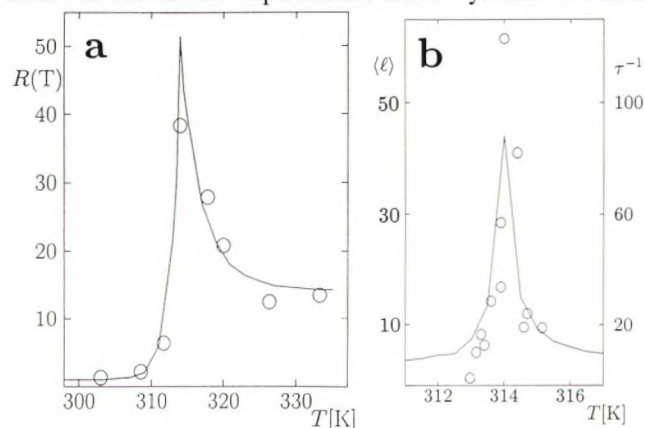


Figur 3. Nanoskopisk struktur af lipidmembran set overfra. (a): Lipiddomæner af fast fase i en membranvæskefase (computersimulering). (b): Lipiddomæner i en binær lipidblanding i væskefase (computersimulering).

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 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 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 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, κ . Bøjningsstivheden er helt afgørende for den lukkede membrans konformation og topologi² og dermed for cellers form. Den heterogene membranstruktur og fluktuationerne i membranens plan betyder, at den effektive bøjningsstivhed ændrer sig med temperaturen. κ undergår en såkaldt termisk renormalisering, som er et karakteristisk træk ved bløde materialer.¹ For eksempel finder man, at bøjningsstivheden renormaliseres til

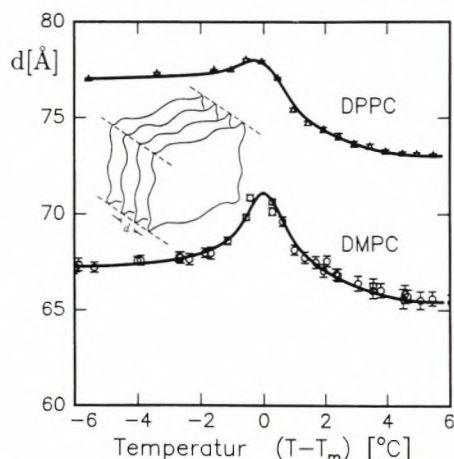
$$\kappa \rightarrow \kappa[1 - r^2/K(T)]$$

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 neutronspreddning³ 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).



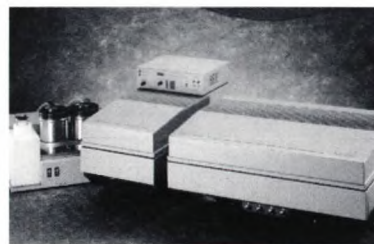
Ole G. Mouritsen er dr.scient., professor i fysisk kemi ved Danmarks Tekniske Universitet, Lyngby. Arbejder med statistisk fysik og computersimulering anvendt på områderne membraner, komplekse væsker, faseovergange i faste stoffer og på overflader, ordningsprocesser og systemer fjernt fra ligevægt.



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

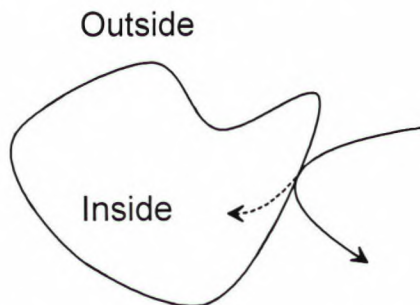
Fax: 3543 8334

E-mail: optilas@inet.uni-c.dk

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. Sænk model, der illustrerer celledens selektive barriereegenskaber.

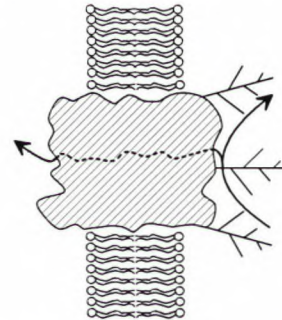
Membraner som Selektive Barrierer

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).

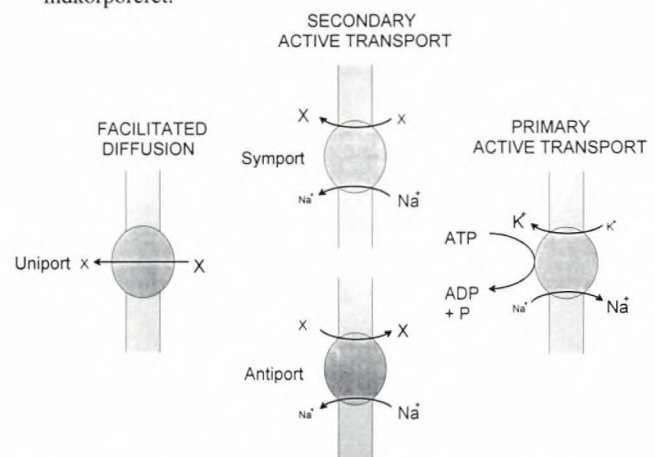
Den bimolekylære lipidmembrans struktur gør at membranen er en god barriere mod passage af polære stoffer, så som små uorganiske ioner, kulhydrater, aminosyrer og proteiner. Membranen er uigennemtrængelig for disse molekyler fordi de er uopløselige i membranens olielignende indre; den tillader fri passage 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 celledens membran; 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-

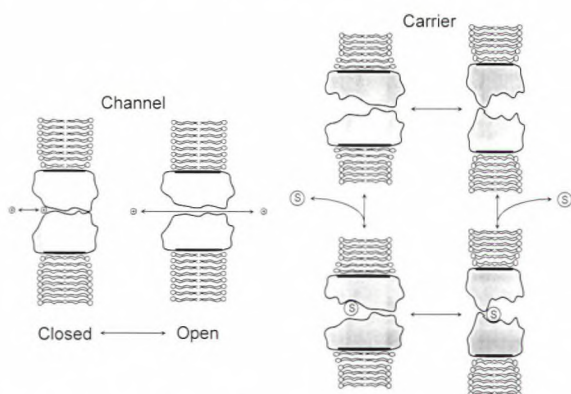
forskellen giver anledning til en diffusion, fra høj til lav koncentration. Potentialforskellen giver anledning til en elektromigration af ladede partikler i det elektriske felt. Stofbevægelsen drives af "simple fysiske kræfter".

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 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 Na^+ transport ud af cellen, der også transporterer K^+ ind i cellen.

Denne ATP-drevne Na^+ , K^+ udveksling medfører at den intracellulære kalium koncentration er højere end den ekstracellulære koncentration. Cellemembranens permeabilitet for K^+ er meget større end permeabiliteten for 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-Knudsen¹.

Katalyseret Diffusion

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

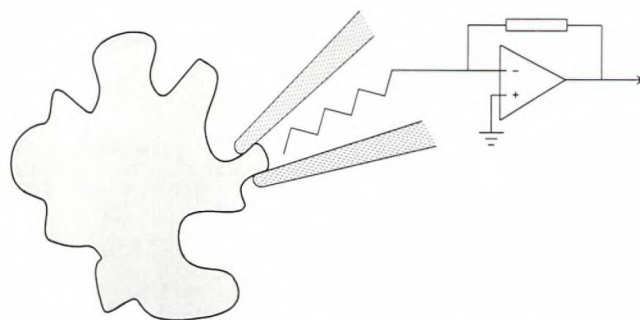


Figur 4. Eksempler på faciliteret diffusion: Til venstre: en ionledende kanal, hvor ionbevægelsen finder sted igennem en vandfyldt pore der forbinder de to vandfaser. Kanals funktion er bestemt af ligevægten imellem de forskellige konformationer: lukket og en åben. Til højre: en carrier, hvor passagen 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 ≈ 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 μs , 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 dissociert 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.

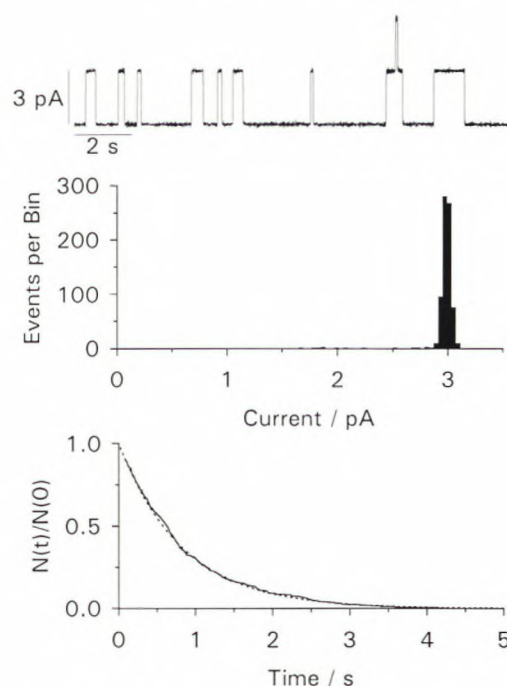
12 13 14 15

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, ≈ 25 Å lang med en pore diameter på ≈ 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 grundlinjen 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 (ΔG_{def}^0).

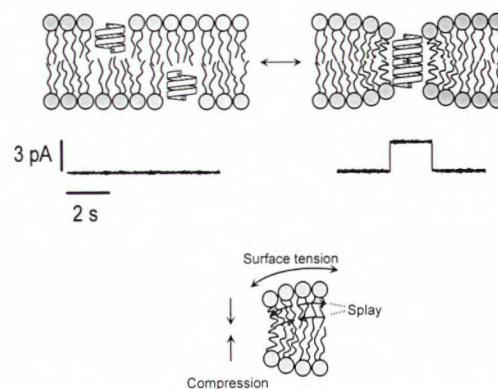
Det mekaniske misforhold mellem kanalens længde og membranens tykkelse giver mulighed for at bestemme membranens mekaniske egenskaber, da mono(M)-dimer(D) ligevægtkonstanten, K , der bestemmes af kanal-frekvensen og middellevetiden (se Figur 7), afhænger af deformationsenergien:

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

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

hvor ΔG_{int}^0 er det membran-uafhængige bidrag til ΔG^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 ændringene i deformationsenergien.



Figur 8. Gramicidinkanaler som kraftmålere. Øverst: Når en gramicidkanal 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 δ 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 (Δ) på 1.6 Å. Man kan bestemme de relative koncentrationer af de forskellige kanaltyper ud fra de relative kanalfrekvenser (f) og middellevetider (τ), 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 δ_0 angiver membrandeformationen for den blandede kanal. $\Delta\Delta G^0$ er målt, Δ er kendt, og A kan beregnes til at være ~ 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

Fra enkelt protein til supraprotein

Rogert Bauer, Institut for Matematik og Fysik,

Den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole, Thorvaldsensvej 40, DK-1871 Frederiksberg C

Blødt og hårdt materiale.

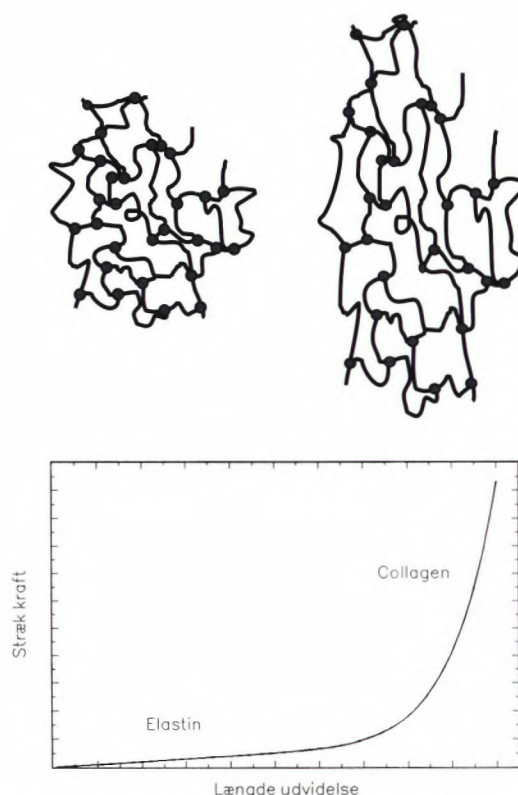
Dyr og planter består af både blødt og hårdt materiale. For dyr må knogler betragtes som hårdt materiale og hud som blødt materiale. I planter er veddet i træer hårdt materiale og blade blødt materiale. De bløde konstruktioner er en særlig klasse indenfor de faste stoffer. De består af makroskopiske proteinkomplekser, hvor byggeklodserne, de enkelte proteiner, er meget små (nogle få nm). En biologisk struktur, såsom hud eller en karvæg, er så sat sammen som en polymer af et eller flere proteiner. Ethvert protein er i sig selv en lille polymer af en eller flere peptid kæder (se Bohr og Lindgårds artikel i dette nummer af KVANT). Studiet af strukturen, dvs. sammensætningen af proteiner, i et såkaldt supraprotein-kompleks (kæmpeaggregat/netværksstruktur/polymer) ligger således indenfor området polymerfysik.

En meget stor forskel på bløde materialer og for eksempel en hård struktur som et metal er, at for førstnævntes vedkommende er der mange mulige strukturer, hvorimod et metal som regel er krystallinsk og derved eksisterer i kun en struktur.

Det er jo kendt, at ved opvarmning udvider stort set alle stoffer sig og modsat ved køling. Ikke desto mindre blev det observeret allerede i 1806, at gummi skrumper ved opvarmning. Årsagen ligger i gummis netværksstruktur, som det har til fælles med mange proteinkomplekser. De mange mulige tilfældige strukturer for netværket bliver delvist tabt ved udvidelse, hvorved entropien mindskes, i modsætning til en luftart hvor entropien (mulige tilstande) øges ved opvarmning.

Det klareste eksempel på en biologisk konstruktion, der har elastiske egenskaber, som gummi, er karvægge hos pattedyr. To centrale elementer i en karvæg er proteinerne elastin og collagen. På figur 1 er vist strukturen af elastin i normal og udstrakt tilstand. Antallet af mulige faconer af kæderne mellem knudepunkter reduceres drastisk fra den ustrakte til den strakte tilstand. Dette giver anledning til en svag elastisk kraft, der ligesom for gummi er af entropisk karakter. I modsætning hertil udviser collagen stor modstand mod udvidelse (figur 2). Elastin fremstår som et "blødt" elastisk stof, hvorimod collagen er "hårdt". Tænk på de egenskaber karvægge skal have. De skal både være let udvidelige i forbindelse med pulserende blod og modstandsdygtige overfor brud. Udvidelse af elastin foregår ligesom i et indkøbsnet: Indtil det er fuldt udstrakt, er der stort set ingen tiltrækkende kræfter, der skal overvindes. For elastin er det kun tab af entropi, der således giver elastisk modstand. I modsætning hertil er den treflattede struktur (triple helix) af collagen meget svær at strække ud hvilket gør karvæggen stærk overfor store udvidelser.

Ovenstående er to eksempler på supraprotein-komplekser, hvor elastin er en krydsbundet "tilfældig" struktur og collagen en opsnoet lineær struktur. En lineær proteinstruktur er også, af forståelige grunde, til stede i hår. Hud er også et supraprotein-kompleks, som har helt enestående elastiske egenskaber: Prøv selv at se hvor meget man kan trække hud ud og noter, hvor perfekt det falder tilbage. Denne egenskab har hud tilfælles med gummi, men ikke med mange bløde plastikstoffer. Prøv selv at strække en plasticpose.



Figur 1: Øverst til venstre ses en model af et elastin netværk bestående af tynde kæder med tilfældig struktur bundet sammen i knudepunkter. Til højre ses det samme netværk strakt. Nederst ses hvordan et netværk med både elastin og collagen reagerer overfor en strækkraft.

Funktion af α helices

Et særligt fremtrædende element i mange proteinstrukturer er α -helices. En lang række af lineære strukturer indeholder tre peptidkæder hver i en α -helix og yderligere snoede om hinanden (se collagen i figur 2). I collagen kan længden af disse snoede α -helices være op til flere μm . Selvom der er en sammenhæng mellem graden af α -helix og linearitet i proteiner og proteinkomplekser forefindes

der α helix i utroligt mange proteiner, som slet ikke er lineære. Det er sandsynligt at α -helices har betydning for mange strukturelle elementer i proteiner udover det ovenfornævnte lineære aspekt. Det måske væsentligste er at undgå udfoldning af proteinstrukturen ved vores kropstemperatur. Overgangen fra den intakte foldede struktur af et protein til den ufoldede (ufunktionelle) sker ved at hæve temperaturen og ligner en faseovergang. Dette skyldes i høj grad α -helices i proteiner, idet der for at bryde en α helix kræves samtidig brydning af mange bindinger. Konsekvensen er, at udfoldningen af et protein sker over et meget snævert temperaturinterval således at bare vores kropstemperatur er et par grader under overgangstemperaturen er der stort set ikke noget denatureret protein. Derimod går det galt, når vi har høj feber.



Figur 2. Model for collagen (grundelement i sener), hvor tre peptid kæder i hver sin α helix, er yderligere snoet rundt om hinanden.

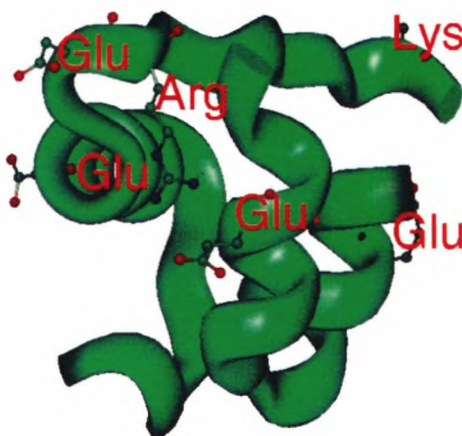
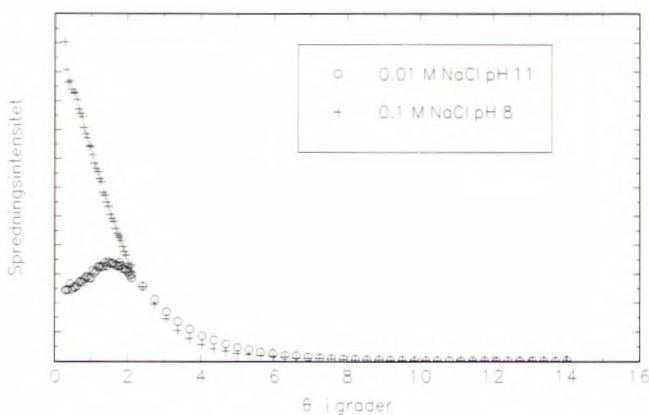
Betydning af elektrisk ladede aminosyrer

Når vi vil se på vekselvirkninger mellem proteiner er overfladen af proteinet det væsentlige i strukturen. Et protein er en eller flere peptidkæder foldet op i en bestemt struktur. Det har vist sig overordentlig vanskeligt om ikke umuligt at forudsige et proteins struktur udfra sammensætningen af aminosyrer. Et strukturelt aspekt fremstår dog klart, nemlig at de ladede aminosyrer sidder på overfladen af proteinet. Det skyldes at ladede aminosyrer vekselvirker kraftigt med vand. Alene dette har store konsekvenser for proteiners vekselvirkning. Der er normalt ikke lige mange positivt og negativt ladede aminosyrer ved fysiologisk pH (ca 7.5) førende til, at proteinet er netto enten positivt eller negativt ladet. Dette vil alt andet lige forøge deres opløselighed, da de vil frastøde hinanden. Tilsvarende gælder, at når man ændrer pH til den værdi, hvor nettoladningen er nul, er tiltrækningen mellem proteinerne ofte så stærk så de aggregerer, førende, som regel, til et hvidt bundfald. Mælk ved neutralt pH er et godt eksempel, idet mælkenes proteiner normalt er i opløsning; men hvis mælken bliver sur, så klumper proteinerne sammen. Det skyldes at mælkeproteinernes isoelektriske pH (det pH hvor proteinet har nettoladning nul) er ca. 5.5

Hvordan "ser" vi proteinstrukturer?

Når et proteinkompleks er tilstrækkeligt stort, kan vi se det med vores øjne (hud og hår for eksempel). Huds

blødhed og hårs evne til ikke at knække kan vi selv konstatere. Men at indse, hvordan proteinstrukturen danner grundlag for en sådan funktionalitet, kræver derimod mere end vores normale sanser. Selv et lysmikroskop er kun til begrænset hjælp, da de fleste strukturelle detaljer i proteiner har dimensioner der er mindre end lysets bølgelængde. Røntgendiffraktion og elektronmikroskopi har derimod givet os stor indsigt i strukturen af små proteiner (røntgen diffraktion) og store proteinkomplekser op til celledørrelse (elektronmikroskopi).



Figur 3: Nederst insulins struktur med fremhævelse af de fire ladede aminosyrer ved fysiologisk pH. Øverst ses neutronspredning fra insulin i en koncentration på 20 g pr. liter.

Ligeegyldigt om det er lys, røntgen, elektroner eller neutroner vi "ser med", er den grundlæggende proces spredning af enten partikler eller stråling. Når øjet ser, skyldes det spredning af lys der følger geometrisk optik. Forudsætningen for geometrisk optik er, at det vi ser er meget større end den bølgelængde vi ser ved, altså for lys ca mellem 400 og 700 nm. I princippet gælder det samme for elektron-, røntgen- og neutronspredding. Det vil sige, at vil vi have normale "billeder" af et protein med et elektronmikroskop, må vi blot vælge en bølgelængde for elektronerne der er meget mindre end det studerede proteins størrelse. For proteiner har det i praksis vist sig meget vanskeligt at få detaljerede billeder af deres strukturer med elektronmikroskopi. Dette er derimod opnået ved hjælp af røntgendiffraktionsstudier på protein-krystaller.

I røntgendiffraktion er det spredning af elektromagnetisk stråling på elektronerne i et protein, der fører til at vi kan "se" hvordan et protein ser ud. Bølgelængden af røntgenstrålingen i typiske apparater er 0.1 nm hvilket er meget passende for at studere proteiner ned til atomare dimensioner. Spredningen på hver elektron kan betragtes som en forstyrrelse af strålingen, der kommer til som koncentriske bølger ligesom ringe på vandet. Hvis der er mere end en elektron, skal amplituden af disse koncentriske bølger adderes, hvorved der opstår interferens.

Først og fremmest er spredningen proportional med antallet af atomer i molekylet d.v.s. at lysspredningen er proportional med det spredende molekyle's masse. For meget små molekyler i forhold til bølgelængden bliver spredningen isotrop, hvorimod store molekyler spreder lyset fremad, i en meget lille vinkel tæt på lysstrålingens oprindelige retning.

Der er alt for lidt spredt stråling fra ét molekyle og normalt er der i en opløsning utroligt mange molekyler. Flere molekyler spreder hver for sig, men vil der ikke komme interferens mellem spredningen fra flere molekyler? Jo, men hvis de ligger i alle mulige afstande fra hinanden, som de gør ved lave koncentrationer, vil interferensen mellem dem midle ud. Interferens kommer derimod ind når koncentrationen øges, idet stigende koncentration tvinger molekylerne til at ordne sig. Denne orden giver anledning til toppe i fordelingen af det spredte lys. Lysintensiteten ved helt små vinkler falder, samtidig med at der kommer maxima i intensiteten ved lidt større vinkler. Ud fra topens placering, facon og højde kan man få oplysninger om den typiske afstand som molekylerne ordner sig i, og den grad af orden der hersker.

En perfekt orden eksisterer i en krystal, og her forsvinder spredningen helt undtagen for flere skarpe toppe ved vinkler, der er reciprokke til gentagne afstande i krystallen. Intensiteten i disse kan bruges til at bestemme strukturen af krystallens byggesten. Dette er i meget stort omfang blevet brugt til at bestemme den tredimensionelle struktur af proteiner. Det er derimod nærmest umuligt at forestille sig store proteinkomplekser ordne sig i en krystal struktur. Det vil også være umuligt med røntgenkrystallografi at studere selve dannelsen af disse komplekser. De er normalt så små at vi heller ikke kan se dem i lysmikroskop.

Suprakomplekser opløst i en væske er tilfældigt orienteret i forhold til hinanden, og selvom de hver især spreder i et distinkt mønster, får vi totalt et spredningsmønster, som er midlet over alle orienteringer. Det vil sige, at mange forskelligt formede molekyllstrukturer kan give den samme spredningsprofil. For spredning på molekyler i opløsning får man altså ikke fuldstændig information om molekylet. Til gengæld kan man studere dem i mere naturlige omgivelser end ved røntgendiffraktion.

Eksempler på supraprotein komplekser

I det følgende skal vi i tre eksempler se, hvordan proteiner kan samle sig i aggregater og netværk. Og hvordan vi kan studere denne dannelse ved hjælp af neutron- og

lysspredning og ved elektronmikroskopi.

Aggregering af insulin

Insulin er et hormon, som regulerer blodsukkeret. Det er et meget lille protein bestående af kun 51 aminosyrer. Det er sammensat af to peptidkæder, som er knyttet sammen med svovlbroer. Strukturen ses på figur 3. Her er også vist de grupper der er ladede ved fysiologisk pH. Det er fire negativt ladede glutaminsyrer og to positivt ladede, henholdsvis en lysin og en arginin, hvilket giver en netto ladning på minus 2. Det isoelektriske pH for insulin er 6.5. Det er kendt, at insulin ved fysiologisk pH (ca 7.5) i stor koncentration og ved den høje saltkoncentration, der er i blodet, har en tendens til at aggregere. Derfor er insulins aggregering ved forskellige pH og saltkoncentrationer blevet undersøgt ved hjælp af neutronspreddning. Her er neutronspreddning at foretrække fremfor lysspredning fordi bølgelængden af neutroner (ca. 0.3 nm) passer langt bedre til de små insulin molekyler end bølgelængden for lys (ca. 500 nm). Når man øger pH bliver flere aminosyrer ioniseret og den negative nettoladning af insulin stiger fra 2 ved pH 8 til 6 ved pH 11. Betydningen af saltkoncentrationen kan forstås ved at de positive natrium ioner reducerer den elektriske frastødning mellem insulin molekylerne. Spredningskurverne ved pH 11, 10 mM NaCl og pH 8, 100 mM NaCl for koncentreret insulin opløsninger er vist på figur 3. Der skulle således være kraftig frastødning mellem insulin molekylerne ved pH 11 når saltkoncentrationen er så lav som 10 mM.

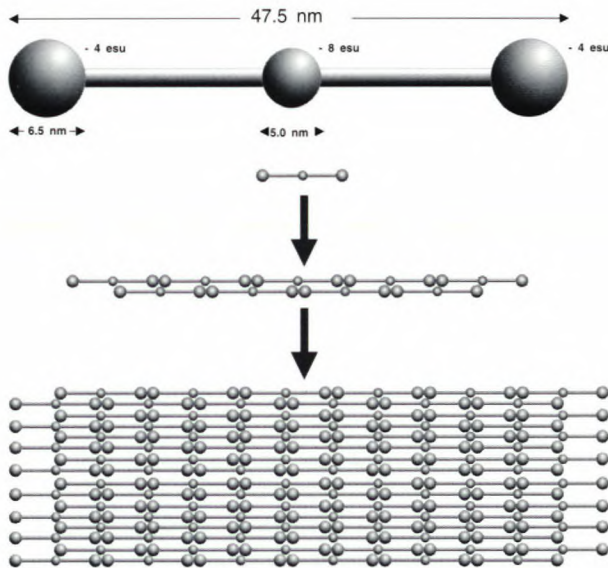
Minimaet i kurven for høj pH og lav salt koncentration kommer fra ordningen af insulin på grund af ladningsfrastødning. Rent elektrostatisk koster det for meget energi at bringe nogle af insulin molekylerne tæt på hinanden. Et kompromis er så, at der er næsten samme afstand mellem molekylerne altså øgning af ordenen. Interferens fra store afstande i opløsningen, hvilket vil sige interferens fra det ene molekyle til det andet, giver bidrag til spredning ved små spredningsvinkler, hvorimod ved store spredningsvinkler bidrager kun de indre afstande i insulin. Det er så klart, at når insulin er kraftigt ladet, observeres der enkeltmolekyler, som holder hinanden i skak på store afstande hvorimod, når insulin har en mindre ladning, så begynder molekylerne at klumpe sammen til store aggregater. Dette sidste, som ses på kurven for pH 8 100 mM NaCl, må betyde, at der mellem insulin molekyler også eksisterer tiltrækkende kræfter, som så blot bliver udkonkurreret når insulin er kraftigt ladet.

Proteinnetværk

Når insulin aggregerer er det svært at se noget biologisk formål med det, idet insulin som hormon fungerer ved koncentrationer langt under dem, som forårsager aggregering. Derimod findes der talrige eksempler på protein-aggregering, som er funktionelt betinget. To proteiner er i den forbindelse særligt vigtige actin og tubulin (mere om tubulin i Henrik Flyvbjergs artikel i dette nummer).

Netværksdannelse ved blodkoagulering

Her er formålet med netværket at forstærke størkningen af blod ved blødning. Det foregår ved hjælp af et protein kaldet fibrinogen, som vi har ret meget af i vores blod (ca 2g/l blod). I forbindelse med netværksdannelse er strukturen af fibrinogen ret så interessant. Fibrinogen består af seks peptidkæder som tilsammen består af ca. 3000 aminosyrer. En detaljeret tredimensional struktur kendes endnu ikke, men den generelle consensus om fibrinogens struktur er skitseret på figur 4.

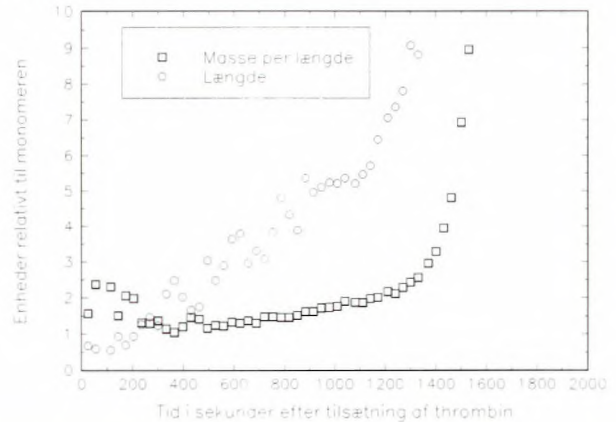


Figur 4: Øverst en skematisk model af fibrinogen. Derunder en model af fibrin, der ved overgangen har fået ændret ladningen på midterområdet fra negativ til positiv. Først danner fibrin lange tynde fibre med en masse pr. længde på to gange værdien for fibrinogen, hvorefter tykke fibre dannes.

De to tynde områder består af tre peptid kæder snoet op i en triple helix ligesom for collagen. De tre kompakte områder er ved fysiologisk pH negativt ladede, hvilket forklarer fibrinogens store opløselighed. Dette er rimeligt heldigt, da vi nødtigt ser, at al vores blod størkner. Det er således ikke fibrinogen i sin oprindelige form, der danner et netværk ved blødning, men derimod fibrinogen med nogle af dets aminosyrer fraspaltet. Ved blødning starter en lang kaskade af reaktioner, som ender med, at et lille protein, prothrombin, får fraspaltet en del af sin peptidkæde, som har beskyttet mod dette proteins evne til at fraspalte dele af fibrinogen molekylet. Det er ikke meget af fibrinogen molekylet, der bliver fraspaltet, og alt tyder på at dets facon stort set er uændret. Ladningen er dog ændret. Det tykke midterdomæne hvor thrombin har klippet er blevet positivt ladet. Fibrinogen spaltet med enzymet thrombin kaldes fibrin. Tidsforløbet af aggregeringen af fibrin har været studeret ved hjælp af lysspredningsforsøg med en opløsning af fibrinogen tilsat thrombin¹

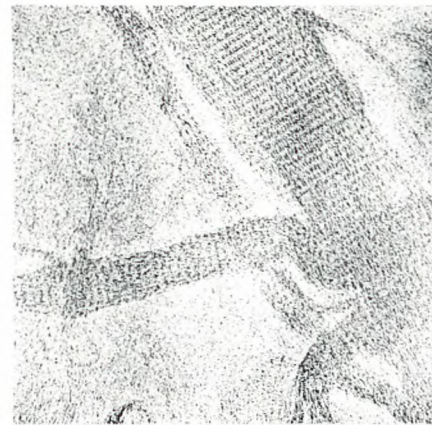
I lysspredningsforsøg kan vi få oplysning om længden af fibrene ved at måle de tidlige fluktuationer af lysspredningen. Vi kigger derved på størrelsen af de Brownske

bevægelser, der er afhængig af fibreens størrelse. Massen per længde dukker også ud af disse forsøg. Fibrene bliver meget længere end lysbølgelængden, så den gennemsnitlige størrelse af lysspredningen afhænger hovedsageligt af deres tykkelse dvs af deres masse per længdeenhed.



Figur 5: Resultater fra lysspredning på thrombin aktiveret aggregering af fibrinogen.

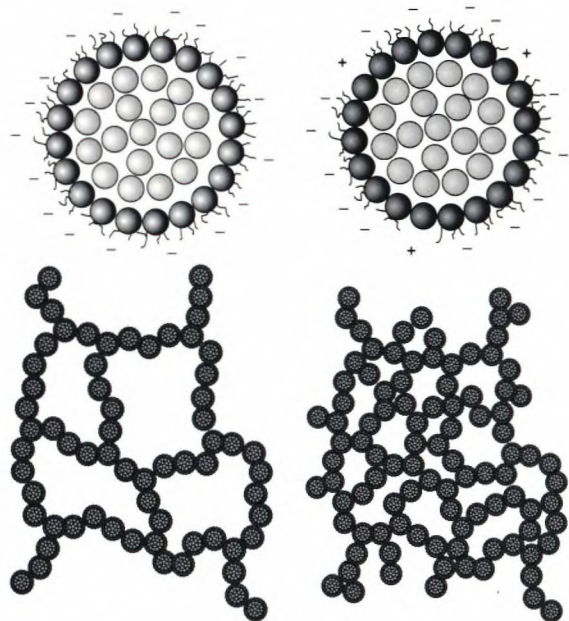
Resultater fra lysspredningsforsøgene er vist på figur 5. Aggregeringen er helt tydeligt delt ind i to faser. Indtil 1400 sekunder stiger længde og tykkelse langsomt, ja tykkelsen stiger faktisk kun til det dobbelte mens længden ved slutningen af denne periode er ca 10 gange fibrins længde. Denne fase passer med at fibrin lægger sig i en tostrengt fiber.



Figur 6. Elektronmikroskopi billede af de tykke fibrin fibre. Afstanden mellem båndene er 23 nm.

Efter den første fase med kun svag stigning for massen per længde, sker der en meget hurtig forøgelse af tykkelsen af fibrene (figur 5). Forklaringen på hvordan dette kan ske så hurtigt kendes ikke, men et forslag ville være at det er en slags faseovergang ligesom en spontan krystallisering. Hvis man kigger på det elektron mikroskopiske billede af de dannede tykke fibre (figur 6), så ser man faktisk også et gentagende mønster mindende om den periodiske struktur i en krystal. Striberne har en afstand på 23 nm, præcist det halve af fibrin molekylets længde. Det vil passe fint med den halvt overlappende model vist i figur 4

og striberne repræsenterer så de tykke domæner i fibrin. Forslaget om en overgang magen til den, der sker ved krystallisation, kan retfærdiggøres ved ladningsvekselvirkning. De dannede lange fibre vil ligesom legoklodser have mange kontaktpunkter. To lange legokonstruktioner kan jo i een operation sættes sammen og fordoble tykkelsen.



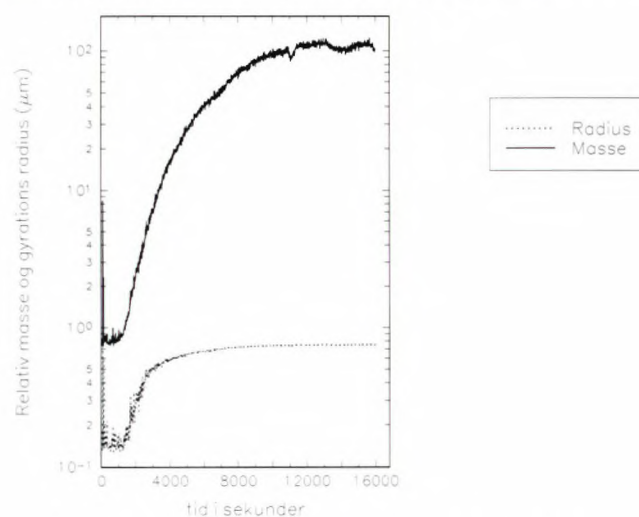
Figur 7. Til venstre model af en kasein micelle hvor de lyse kugler forestiller α og β kasein og de mørke kugler κ kasein. De lange tynde tråde med tilfældig struktur sidder på κ kasein og er negativt ladet. Til højre er nogle af de tynde tråde klippet af chymosin hvorved ladningen lokalt kan blive positiv. Dette kan føre til dannelse af et løst netværk. Når flere tråde er klippet af ender kasein micellerne med at have netto ca nul ladning hvorved det løse netværk kan fyldes ud.

Mælkekoagulering

Hvis man ser på en mælkekarton er der ca 34 gram protein per liter, heraf er de 24 gram forskellige varianter af et protein kaldet kasein. Det er kasein, der er årsag til den kraftige spredning af lys fra skummetmælk og hermed den hvide farve. 24 gram kasein, hver med en størrelse på ca. 4 nm, opløst i en liter vand giver dog ikke nogen synlig lysspredning. Forklaringen på den kraftige lysspredning fra mælk, er at kasein ikke eksisterer som enkelt molekyle i opløsning, men derimod i store aggregater med mange tusinder kasein molekyler. Disse protein ansamlinger kaldes kasein miceller og har en diameter på ca 200 nm. Så store molekyler vil ikke alene sprede lyset meget kraftigt, men også kraftigt fremadrettet. I mælk spreder disse store miceller imidlertid lyset så voldsomt, at den samme foton bliver spredt mange gange, hvilket får lysspredning fra mælk til at se ud som isotrop spredning. Det er derimod muligt at se lyset blive spredt fremadrettet, hvis man sender lys ind i en stærk fortyndet mælkeopløsning.

Fordelingen af de forskellige varianter af kasein i micellen er interessant. Kun κ kasein har en nævneværdig

nettoladning som er negativt α og β casein sidder inde i midten af micellen og κ casein sidder på overfladen med den konsekvens, at kasein miceller er stærkt negativt ladede på overfladen (figur 7). De frastøder derfor hinanden og sikrer at mælk kan have så høj en protein koncentration i opløsning. Nu kunne man hurtigt finde på en måde at få micellerne til at aggregere og dermed lave tykmælk. Man kunne nemlig gøre mælken sur, således at nettoladningen bliver nul (isoelektrisk pH). Hvis man får bakterier til at gøre arbejdet bliver mælken til yoghurt. En anden metode er at klippe en del af det negativt ladede κ casein af, så vi på den måde hæver det isoelektriske pH. Det ligner lidt det, der foregår ved blodkoagulering. Kalve producerer et enzym der hedder chymosin eller på dansk, osteløbe. Ved tilsætning af dette enzym til mælk får vi dannet ost. Kalven benytter dette enzym til at få mælken til at blive en gel således at mælken opholder sig lang nok tid i dens mave til at blive fordøjet. På figur 7 er en tegning af kasein miceller før og efter behandling med chymosin og to stadier af aggregeringsprocessen efter kasein micellerne er blevet klippet af chymosin.



Figur 8: Resultater fra lysspredning på fortyndet skummetmælk. Gyrations radius er et mål for størrelsen af aggregaterne, og er for kugler 0.8 gange radius.

At udføre lysspredningsforsøg på mælk er ikke særlig nemt. Forestil dig at lyset skal passere 1 cm mælk, hvori lyset skal spredes. Der kommer simpelthen ikke noget igennem. Det er derfor nødvendigt at benytte en beholder hvor lysvejen er fra 0.05 til 0.1 mm. Problemerne stopper ikke her. Der er nemlig en fundamental forskel på lysspredning, som vi her omtaler det, og så den måde vores øjne ser lys spredt på omgivende materiale. Små molekyler spreder lyset isotropt. Dette gælder når størrelsen af molekylerne er meget mindre end lysets bølgelængde. Når vi spreder lyset på større og større molekyler bliver lyset mere og mere fremadrettet spredt grænsende til at lyset går lige igennem (molekylerne bliver gennemsigtige). Når de bliver endnu større så følger de geometrisk optik og en del passerer lige igennem en vinkelret flade og en del bliver tilbagespredt. Diffus spredning (gælder for proteiner op til en diameter på ca. 0.5 μ m) og geometrisk

Complete Optical Answers



Optics is providing the answers for many of today's new technologies and applications. Melles Griot's Application Engineers are trained to help you find those answers with our versatile range of optical tools. Answers that translate into working, valuable, real-life products.

Our carefully specified range of optical components — lasers, opto-mechanical hardware, and instrumentation; plus our complete line of optical tables, breadboards, and workstations — are all designed

to work together, with metric and inch systems equally supported.

All components are integrated into a versatile family of optics and support equipment designed with your requirements in mind.

From small-scale, non-linear devices to high performance imaging systems, from the infrared to the near UV, our products provide the reliable quality and dependable performance that you can rely on.

For the OEM we provide large volumes of custom components and sub-systems optimized for your specific needs — with major North American, Asian and European optical fabrication and coating facilities for worldwide support.

Warehouses around the world provide prompt shipment of our standard products and our toll free telephone makes us easy to reach. Just part of the reason why Melles Griot should be your source for complete optical answers.

MELLES GRIOT

OPTICS • LASERS • RESEARCH EQUIPMENT

MELLES GRIOT DANMARK
Stenagervej 13
DK-4100 RINGSTED

Phone +45 53 61 50 49
Fax. +45 53 61 60 49

optik (gælder for genstande ned til ca 10 μm) er "simpel" at udregne. Overgangsområdet (mellem 0.5 og 10 μm) kræver derimod bidrag fra højere ordens led hvilket gør beregningerne noget mere komplicerede.

Ved at fortynde mælken kan man rimeligt nemt få noget at vide om hvordan strukturen af aggregaterne før gel dannelsen er. Geldannelsen må man derimod afstå fra at få oplysninger om idet mælk fortyndet mere end 10 gange ikke danner nogen gel.

Hvis vi kigger på figur 8 ser vi, at der det første stykke i tid ingen ændring sker, hverken i radius eller masse (i modsætning til fibrin aggregering hvor fiberlængden øges lige fra starten men stort set ikke tykkelsen af fibre). Efter denne stille periode ændrer både massen og radius sig voldsomt. Kigger man på kurverne, følges de pænt ad, hvilket udtrykker, at en åben struktur er under dannelse (en kompakt struktur såsom en kugle, der vokser i størrelse får massen til at vokse med tredje potens af radien. Længere henne i forløbet (efter ca. 4000 sekunder) ændrer radien sig meget lidt i modsætning til massen som stadig stiger meget. Når massen stiger men ikke størrelsen må det fortolkes som det åbne netværk der langsomt fyldes ud med flere og flere barberede kasein miceller og bliver mere og mere kompakt (figur 8).

Hvis overfladen af kasein micellen efter tilsætning af chymosin langsomt barberes, så kan man forestille sig at kasein micellerne først kan aggregere når, der er mere end

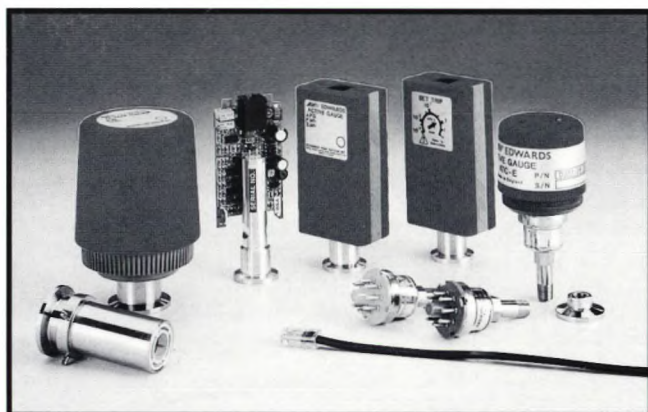
50 procent af overfladen der er klippet. Når aggregeringen så starter, endnu før micellerne er helt klippet, kan der kun bindes to eller højst tre klippede miceller til hinanden, hvilket vil føre til et meget "luftigt" netværk som skitseret nederst til højre. på figur 7. Senere når micellerne er helt klippet kan mange miceller binde til hinanden og således kan det løse netværk blive fyldt ud og derved blive mere kompakt som vist øverst til højre på figur 7.

Referencer:

- 1) Rogert Bauer, *Laserlys og størkning af blod*, Naturens Verden no. 7 side 256 til 266, 1992.



Rogert Bauer, dr. scient.
Professor i fysik ved Den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole. Arbejder med eksperimentel molekylær biofysik. Interesserer sig især for aggregering af proteiner, membran-protein vekselvirkning og samspil mellem metalioner og proteiner.



Active gauges er et nyt koncept til vakuummåling. Målehovedet indeholder hele elektronikken til måleudstyret og kræver derfor kun en standard DC strømforsyning. Udgangssignalet er 0 - 10V DC. Udlæsningen kan foregå på et almindeligt måleinstrument, PLC eller på en computer. Derved er der bedre mulighed for dokumentation ved f.eks. produktionskontrol. Fordelen ved denne konstruktion er bl.a., at man ikke behøver at have målehoved og måleudstyr i nærheden af hinanden. Kabler kan leveres i længder på op til 100 meter.

Pris pr. målehoved fra kr. **2.540,-** ex. moms

EDWARDS

Rotationsvakuumpumpe type RV er en ny oliepumpe, som både er en et- og to-trins pumpe, da der er mulighed for med en drejeknap at øge luftgennemstrømningen. Denne mulighed er der ingen andre vakuumpumper på markedet der har. Pumpen leveres i 4 størrelser 3,7 - 5,8 - 9,7 - 14,2 m³/h.

Edwards RV pumper er velegnet som kemipumpe til f.eks. geltørring, centrifugering og frysetørring. Er også velegnet til rene systemer, hvor der kræves lavt sluttryk. I laboratoriet vil man også påskønne det meget lave støjniveau på kun 48 dBA.



Buch & Holm A/S

Marielundvej 36 - 2730 Herlev ☎ 42 91 75 11 Fax 44 92 31 00



VACUUM GENERATORS

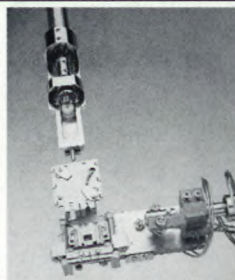
The New VACUUM GENERATORS CATALOGUE IS NOW AVAILABLE

- 380 PRICED PAGES IN FULL COLOUR
- OVER 256 LINE & 3D DRAWINGS
- MORE THAN 230 PHOTOGRAPHS
- 14 SEPARATE COLOUR CODED SECTIONS
- SECTION INDEXES COLOUR CODED INCLUDING FOR Microtech, Quadrupoles, Surface Systems, Synchrotrons, Chambers, UHV Components

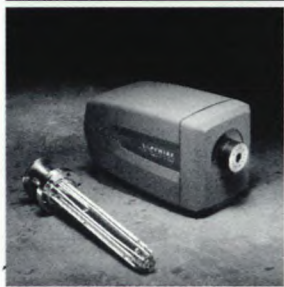
PRODUCTS INCLUDING:



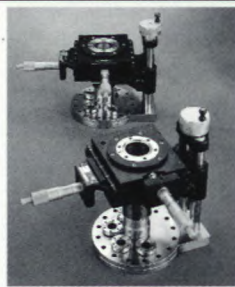
**THE
CLAM 4
COMPONENT
HEMISPHERICAL
SECTOR
ANALYSER**



**XL25
SAMPLE
HANDLING
SYSTEM**



**SAPPHIRE
THE
SMART
HEAD
RGA**



**THE
XYZ SERIES
PRECISION
SAMPLE
TRANSLATOR**

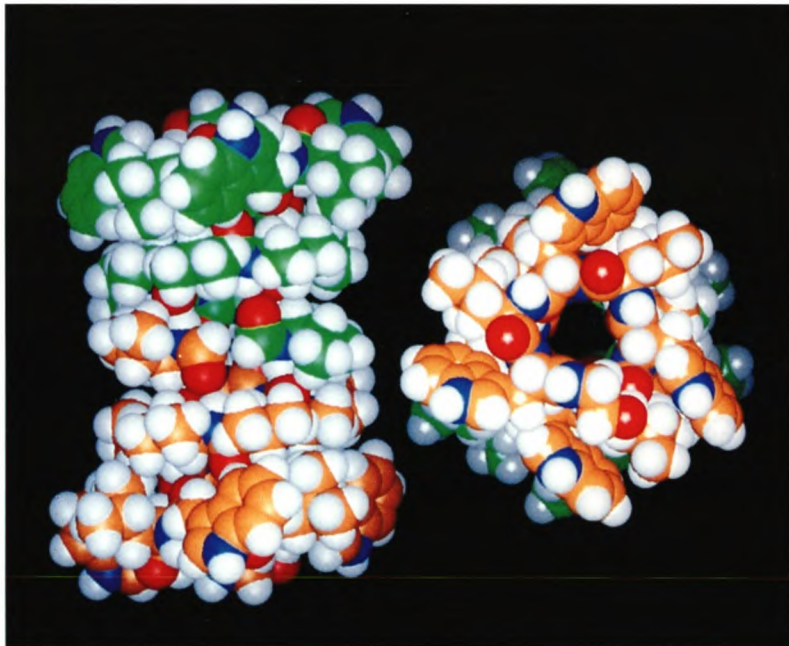
FOR MORE INFORMATION CONTACT US AT:

FISONS
Instruments

E-mail: kennet.joelsson@fisons-instruments.se
WWW: <http://www.surface.fisons.co.uk>

Fisons Instruments AB

Dalvagen 14
PO Box 1176
17123 Solna
Sweden
Tel: ++41 56 454 145
Fax: ++44 56 454 951



Til venstre: Den tre-dimensionelle struktur af gramicidin A kanalen. Til venstre fra siden (kontaktfladen med membranen). Til højre: forfra (kontaktfladen mod vandfasen) der viser poren hvor ioner og H_2O går igennem. Kanalen er en dimer, hvilket er vist ved at farve kulstofatomerne i den ene monomer grønne og i den anden monomer orange. Brint er hvid, ilt er rød, og kvælstof er blå. Se artiklen side 17. (Tak til: Roger E. Koeppe II, University of Arkansas).

Nederst: Skematisk billede af biologisk membran. I midten ses lipiddobbeltlaget, der består af amfile molekyler med et vandopløseligt hovede (blåt) og en kulbrintekæde. I og på membranen er indlejret proteiner og polypeptider. På membranens yderside er en skov af sukkerstoffer. På indersiden findes et komplekst netværk af polymerer. Se side 13.

