

Naturens nanopumper fanget på film

Avancerede mikroskoper tillader observation af enkelte molekylers bevægelser. Det er lykkedes en dansk forskningsgruppe at filme det protein, der transporterer Ca^{2+} ud af cellen, imens det pumper. På sigt kan disse enkelt-molekyle målinger bidrage til at forstå sygdomsforårsagende mutationer.

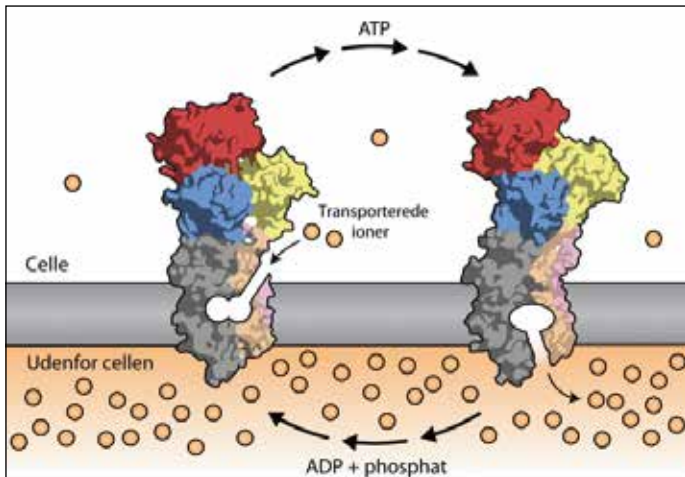
Af Mateusz Dyla og Magnus Kjærgaard, Aarhus Universitet

Levende organismer er langt fra ligevægt. Cellemembraner på et par nanometers tykkelse adskiller koncentrationsforskelle af ioner, der kan være på flere tusinde-fold. Disse gradienter gør det enormt favorabelt at transportere en ion fra en høj til en lav koncentration. Dette udnyttes overalt i biologien til at drive ufavorable biologiske processer.

Mange processer drives af ion-gradienter, men vores laboratorie er primært interesseret i hjernens signalering. Celler sender kemiske signaler til hinanden ved hjælp af molekyler, som kaldes neurotransmittere. Når den modtagende celle har opfanget signalet, skal neurotransmitteren fjernes hurtigst muligt. Dette sker ved hjælp af en gruppe af membranproteiner, som kobler optagelsen af neurotransmitteren med optagelsen af en natrium-ion. Det er mere favorabelt at optage natrium-ionen end det er ufavorabelt at optage neurotransmit-



Figur 1. Enkelt-molekyle mikroskoper bruger laserstråler som kraftige lyskilder. Her er et af instrumenterne fra iNANO ved Aarhus Universitet.



Figur 2. Ionpumper kan opbygge store koncentrationsforskelle henover en celledækkende membran ved at gennemgå en cyklus af strukturaendringer, der skiftevis åbner en ion-bindingslomme til inder- og ydersiden.

teren, og derfor kan processen forløbe uden yderligere forbrug af energi.

I den modtagende nervecelle vil neurotransmitteren oftest aktivere en ionkanal. Ionkanalen er et membranprotein, der fungerer som en midlertidig passage for en bestemt type ioner. På grund af den store koncentrationsforskel vil ionerne hurtigt strømme ind i cellen. Nogle typer ioner som for eksempel calcium, binder til proteiner i cellen og igangsætter dermed en

række biokemiske processer. Andre ioner, som for eksempel natrium og kalium, løber over membranen i så stort antal, at de midlertidigt ændrer den elektriske spænding hen over membranen. Denne spændingsændring kan forplante sig igennem celler og er hjørnestenen i nervesystemets kommunikation.

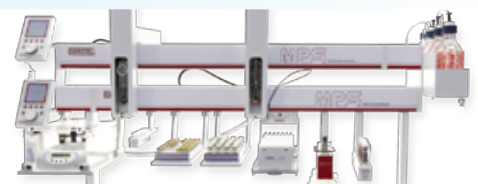
Alle disse processer lader ioner løbe fra høj til lav koncentration. Dermed nedbryder de langsomt koncentrationsforskellene over membranen. Det svarer til en utæt jolle, der konstant tager vand ind. Den kan kun holdes oven vande ved konstant at øse vand ud. På samme måde er cellen konstant nødt til at pumpe ioner ud. Og ligesom den utætte jolle koster det meget energi.

Molekylære pumper

Jens Chr. Skou opdagede et protein, der transporterer natrium ud og kalium ind i cellen. En opdagelse, der i 1997 blev belønnet med Nobelprisen i kemi. Siden har man opdaget, at denne pumpe blot er et medlem af en stor familie af membranproteiner, der transporterer metal-ioner, protoner og endda lipider.

Røntgenkrystallografi har afsløret mange detaljer om, hvordan pumperne fungerer på molekylært plan. Krystallografi kan lave en 3D-model, hvor man kan se hvert af de ca. 15.000 atomer i proteinet. Denne type studier har vist, at pumperne virker ved at åbne en ion-bindingslomme skiftevis indad og udad. Når pumpen bryder de energirige bindinger i ATP, forårsager det strukturelle ændringer i pumpen, der samtidigt åbner bindingslommen og ændrer styrken af pumpens ion-binding. Når disse strukturelle ændringer sker i den rigtige rækkefølge, flyttes ioner over membranen i en retning.

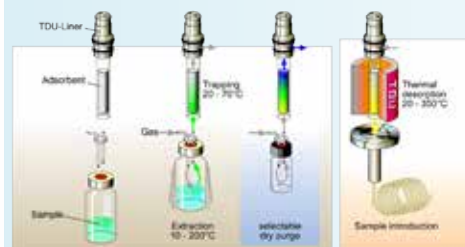
GERSTEL



Automatiseret

Dynamisk HeadSpace

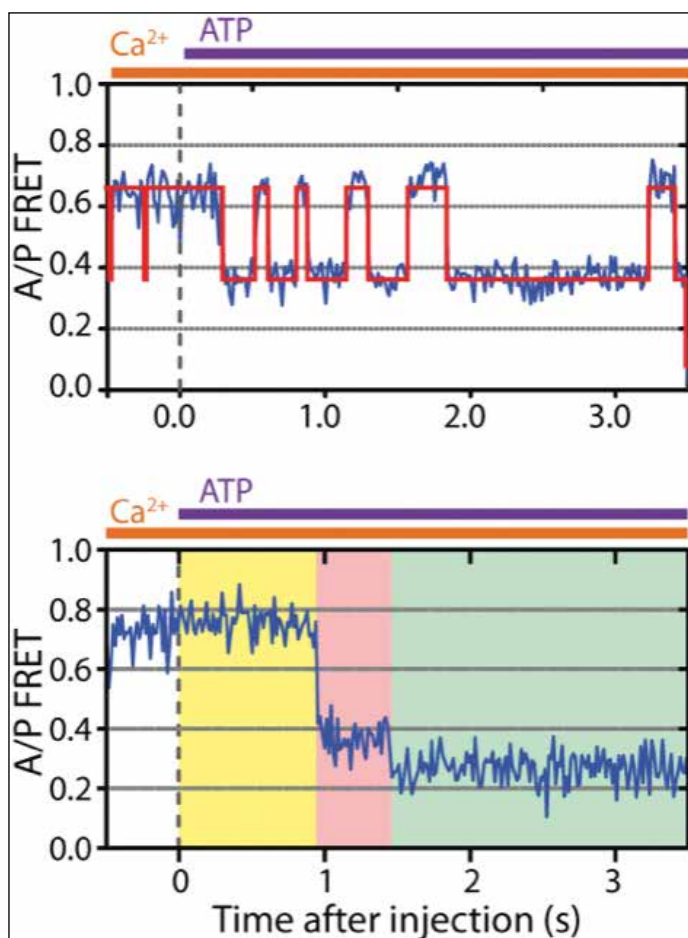
- til GC og GCMS
- ppt niveau
- følsomhed 50 x statisk headspace
- følsomhed 10 x SPME
- DHS - large volume
- mulighed for DHS-FE



MSCi Bøgesvinget 8 DK-2740 Skovlunde +45 44 53 93 66 info@msconsult.dk www.msconsult.dk

Der er dog en grundlæggende begrænsning ved at studere proteiners mekanisme ved hjælp af krystallografi: Man kan kun lave modeller, hvor proteinet står stille. Hvis man forestiller sig en gammeldags vandpumpe, så svarer det til, at man kan tage et billede, når håndtaget er oppe eller nede. Men man kan aldrig få en video, mens der pumpes. For pumper er det bevægelserne, der definerer funktionen, og derfor kan den beskrives meget bedre ved en video frem for enkeltbilleder.

Forudsætningen for at se et molekyles bevægelser direkte er, at man har en teknik, der er følsom nok til at se enkelte molekyler. De fleste eksperimentelle teknikker måler på milliarder af molekyler samtidigt. Da molekylerne ikke bevæger sig i takt, vil sådanne gennemsnitsmålinger udviske informationen om bevægelsen. Fluorescensmikroskopi er følsomt nok til at "se" et enkelt molekyle, og kan bruges til at måle bevægelser i et enkelt molekyle. Fornyligt har vi brugt denne teknik til at filme ionpumper, imens de pumper [1].



Figur 3. Enkelt-molekyle målinger af afstande internt i et enkelt molekyle vha. FRET. De abrupte ændringer i FRET-værdien svarer til skift imellem tilstande, hvor pumpen er åben indad og udad.

Pump fiction

Vi ville gerne bruge enkelt-molekyle-studier til at besvare en række uafklarede spørgsmål omkring pumpernes funktion. Først og fremmest ville vi gerne forstå, hvordan de pumper i en retning. Da pumperne skal kunne opbygge koncentrationsforskelle på flere tusinde fold, ville det være ødelæggende, hvis de kører en lille smule i den forkerte retning.

Vi forventede, at pumpens retning var bestemt af kløvnin-gen af den energirige binding i ATP. Det viste sig dog ikke at

holde stik. Til vores store overraskelse viste det sig, at proteinet kan kløve bindingen i ATP for derefter at genskabe den igen. Proteinets kan dermed genskabe sit kemiske brændstof, hvilket svarer til en motor, der laver benzin ved at køre baglæns! I stedet bliver pumpens cyklus irreversibel i det øjeblik, den giver slip på det brugte ATP.

Vi kender flere mellemstadier i pumpernes cyklus, men det er umuligt at se, om man har beskrevet alle tilstande, før man ser, hvordan proteinet bevæger sig. For eksempel var det blevet foreslået, at proteinet ventede i et stadie, hvor det hverken var åbent indad eller udad, hvilket dog aldrig var blevet observeret direkte. Ved at sænke pumpens hastighed kunne vi se dette stadie direkte i vores målinger. Dette mellemstadium svarer til det sidste punkt i cyklussen, hvor pumpen stadig kan vende om og køre baglæns.

Hvor ofte en celle kan sende signaler, afhænger blandt andet af, hvor hurtigt den kan re-etablere sine ion-gradienter. Derfor var det også vigtigt at forstå, hvad der begrænser, hvor hurtigt pumpen kan køre. Det er det langsomste trin i processen, der afgør, hvor hurtigt pumpen kan køre. Ved at følge pumpens bevægelser kunne vi måle, hvor længe hvert trin tager, og dermed bestemme, hvad der er det begrænsende trin. Overraskende nok sker de store ændringer af molekylets struktur næsten øjeblikkeligt. I hvert fald hurtigere end vores kamera kan følge med til. Vi fandt, at det begrænsende trin rent faktisk var kemien i overførslen af en fosfat-gruppe fra ATP til pumpen.

"Og hvad kan man så bruge det til?"

Vi er alle født med omkring 50 nye ændringer i vores genom oveni dem, vi arver fra vores forældre. Af og til rammer sådanne mutationer et gen, som indeholder instruktionerne til et vigtigt protein som for eksempel en ionpumpe. En enkelt mutation kan ødelægge pumpen, så den ikke kan pumpe rigtigt. Dette kan ændre ionbalancen i vores celler og forstyrrer dermed indirekte alle processer, der udnytter ion-gradienter.

Fornyligt er det blevet opdaget, at muterede ionpumper er skyld i flere genetiske sygdomme som for eksempel halvsidig migræne og en aggressiv form for Parkinsons. Hvis man havde et lægemiddel, der kunne rette op på pumpens funktion, så kunne det være en effektiv behandling. Forudsætningen for kunne udvikle sådan et molekyle er, at vi præcist forstår, hvilken effekt mutationerne har. Vi håber, at enkelt-molekyle-målinger af ionpumper kan bidrage til at forstå, hvordan mutationer påvirker pumpernes egenskaber.

Før vi kan teste effekten af mutationer, har vi dog et stykke grundvidenskabeligt arbejde foran os. Af tekniske årsager blev vores første enkelt-molekyle målinger lavet på en calciumpumpe fra bakterien *Listeria*. For at vi kan teste effekterne af sygdomsmutationer, bliver vi først nødt til at kunne lave samme type målinger i de tilsvarende proteiner fra pattedyr. Samtidig vil vi gerne kunne måle på flere forskellige typer af pumper. Derfor arbejder vores forskningsgruppe i øjeblikket på at udføre samme type forsøg på forskellige typer af pumper.

Enkelt-molekylestudierne blev startet i grundforskningscenteret Pumpkin, og videreført med støtte fra blandt andet Lundbeckfonden og Det Frie Forskningsråd.

E-mail:

Magnus Kjærgaard: magnus@inano.au.dk

Originalartikel

1. Dyla, M. et al. *Nature* 551, 346–351 (2017)