

# Jagten på en ny memb

Med nye mikroskopiteknikker, der kan optage flere tusinde billeder pr. sekund, kan forskerne følge molekylernes bevægelser i cellemembranen. Dette giver et utroligt detaljeniveau, men det er en udfordring at undgå, at de anvendte teknikker påvirker resultatet.

## Forfattere



Mathias Porsmose Clausen, ph.d., postdoc, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford.  
mpclausen@memphys.sdu.dk



Lars Onslev, cand. mag., Institut for Fysik, Kemi og Farmaci, Syddansk Universitet.  
onslev@sdu.dk

**E**t billede siger mere end 1.000 ord. Med en videosekvens kan man derfor fortælle en hel del. Dette gør sig også gældende indenfor forskningen i cellemembraner. Her har de seneste 10-15 års udvikling indenfor nye computer- og mikroskopiteknikker muliggjort brugen af videomikroskopi og ført helt ny viden med sig. Traditionelt indeholder en video ca. 25 billeder pr. sekund, men man kan i dag med højhastighedskameraer komme helt op på 50.000 billeder pr. sekund. Disse kameraer har længe været brugt indenfor forskning i turbulens – den store udfordring har været at knytte teknologien sammen med moderne mikroskoper, hvor der kigges på meget små størrelser.

En af de forskere, der har spillet en meget væsentlig rolle og drevet denne udvikling fremad, er japaneren Akihiro Kusumi. Han fik i begyndelsen af 90'erne samlet et team på over 20 forskere indenfor computerteknologi, fysik, biologi samt optik. Målet var at blive "seende i tid" på nanoskala-niveau. Den teknologi, Kusumi og hans team havde i tankerne, skulle kunne optage sekvenser langt hurtigere end grænserne for almindelig lysmikroskopi – i så lang tid som muligt og så hurtigt som muligt.

Kusumi-teamets banebrydende arbejde med helt nye teknologier har givet resultat og skabt helt nye indsigter og synsvinkler på forskningen i cellemembraner, og har ført en række nye forskningsprojekter med sig. Et af dem finder sted på Memphys – Center for biomembranefysik ved Syddansk Universitet i Odense. Men lad os inden vi når dertil tegne et kort billede af forskningen i cellemembraner.

## Cellemembraner i dag

Biologiske membraner udviser, selvom de blot er to molekyler tykke, en helt utrolig kompleksitet – både i sammensætningen og i måden, de organiserer sig på.

Cellemembraner er opbygget af fedtstoffer (lipider), som har vandelskende hoveder og vandskyende haler. Lipiderne organiserer sig i et dobbeltlag, så de vender de vandskyende haler ind mod centrum og de vandelskende hoveder mod cellens indre og ydre.

Membranen indeholder mange forskellige lipider og desuden en masse proteiner, og det er ikke tilfældigt, at vi bruger det ubestemte "mange", for ingen ved præcist hvor mange. Det er en af membranens mange uløste gåder. Vi ved ikke, hvorfor der er så stor en diversitet af lipider og proteiner, og hvad det betyder. Samtidig ved vi heller ikke, hvordan membranens lipider og proteiner (samlet molekyl) fordeles sig i membranen. Men det er det, vi forsøger at finde ud af, da det er afgørende for at forstå de biokemiske processer, der er knyttet til cellen som fx transport af energi og materiale til cellen og nerveaktivitet.

Membranen definerer cellens afgrænsning og kontrollerer al udveksling af stof og al kommunikation mellem cellens indre og dens ydre omgivelser. Der er tale om en yderst dynamisk struktur. Molekylerne er i konstant bevægelse. Det er således ikke et forskningsobjekt for "fastholdere", da man skal tage højde for denne dynamik.

Traditionelt mente man, at proteinerne kunne bevæge sig frit rundt i lipidmiljøet, der har en viskositet, der er ca. 100 gange tykkere end vand sådan ca. som olivenolie eller som væsken i en lavalampe.

Den frie tilfældige bevægelse af molekylerne opstår på grund af termisk energi, dvs. Brownske bevægelser (se box næste side). Men allerede i 70'erne og 80'erne vidste man godt, at frie Brownske bevægelser og billedet af cellemembranen som et ensartet hav med frit flydende proteiner ikke var dækkende. Foruden strukturer er der heller inden koordination, så hvordan skulle cellen kunne kommunikere med omverden uden at give modstridende signaler? Spørgsmålet er nu, hvordan samles de nødvendige proteiner til disse processer, og hvilke kræfter ligger der bag denne selektive dynamik? Ved hjælp af bl.a. atomar kraftmikroskopi og fluorescensmikroskopi har man fundet meget små domæner med en anden viskositet end den typiske i cellemembranen. Domænerne har et forhøjet indhold af kolesterol og andre lipider, og er dermed lidt tykkere end resten af cellemembranen.

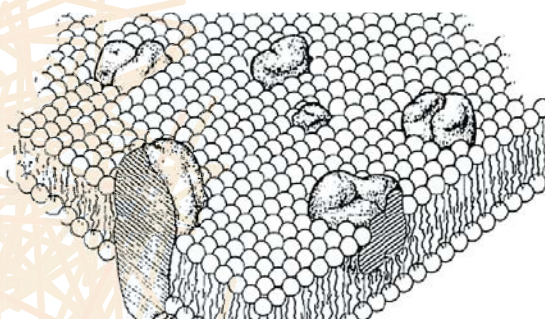
# Membranmodel

Meget kort fortalt mener man, at disse domæner tiltrækker den rette sammensætning af membranproteiner, som igen muliggør de mange forskellige processer, hvor cellerne modtager signaler og koordinerer deres kommunikation og respons mellem det interne og eksterne miljø. Det betyder, at vi ikke blot har almindelig Brownsk diffusion, men flere forskellige typer af diffusionsmønstre.

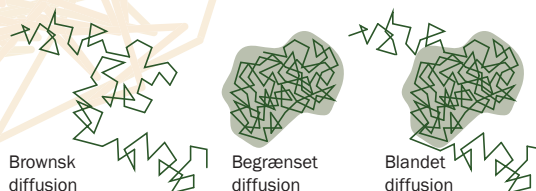
Der er forskellige bud på domænerne størrelse og varighed, men i et studie fra 2009 publiceret i *Nature*, taler forskerne om domæner med en størrelse på 20 nanometer, hvor membranproteinene opholder sig i omtrent 10-20 millisekunder.

## Hopdiffusion

Og nu kan vi så vende tilbage til Kusumi og hans 50.000 billeder i sekundet. Med adgang til disse



Den Singer-Nicholsonske membranmodel fra 1972. Plasmamembranens lipider og proteiner flyder frit mellem hinanden uden nogen overordnede strukturer.



Plasmamembranens molekyler kan diffundere forskelligt afhængigt af membranens struktur. I Brownsk diffusion diffunderer molekylerne tilfældigt uden at være påvirket af nogen membranstruktur. I begrænset diffusion er molekylernes bevægelse afgrænset til en del af membranen (det mørke område). I blandet diffusion diffunderer molekylerne frit i nogle områder, mens det i andre områder er midlertidigt begrænset.

## Brownske bevægelser

Molekyler i en vandig opløsning bevæger sig passivt rundt i alle retninger som en dans helt uden regler eller rytme. De skubbes af de omgivende molekyler. Disse bevægelser ses i form af et zig-zag-mønster, som skyldes vandets termiske bevægelser. Her ved skubber vandmolekylerne til de observerede molekyler, og de mange sammenstød resulterer i dette bevægelsesmønster, også kaldet Brownske bevægelser.

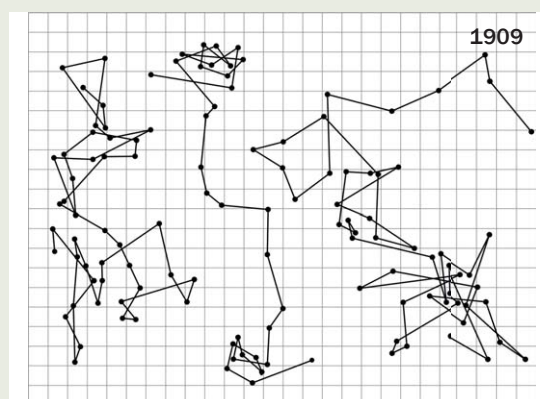
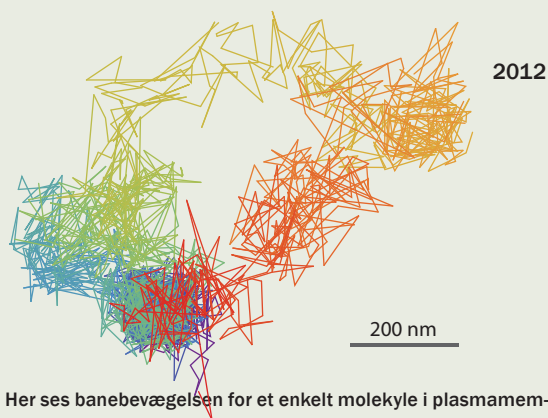
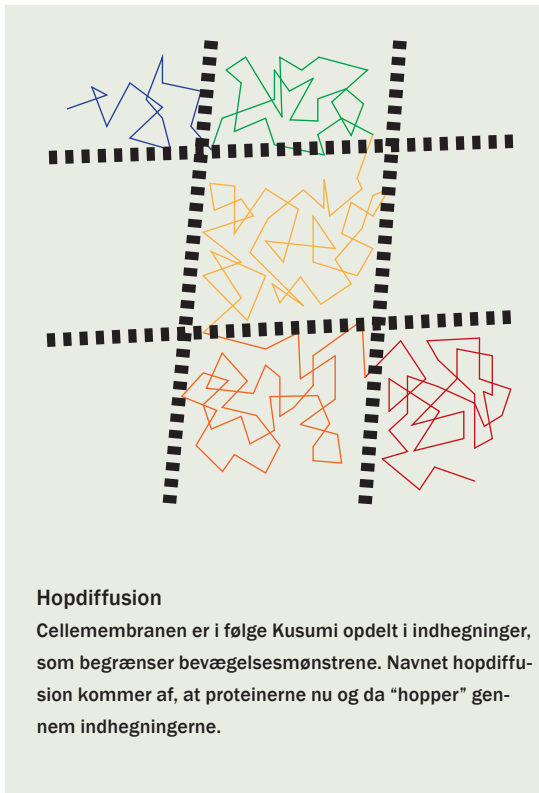


Illustration fra Jean Baptiste Perrin, *Les Atomes*. Molekyler er fulgt under mikroskopet og deres positioner er markeret hvert 30. sekund og føjet sammen med enkle linjer. Perrins måde at repræsentere Brownske bevægelser var blot én af mange, men det var det den mest brugbare og blev anvendt i stort set alle grene af naturvidenskaben, og den anvendes stadigvæk.



Her ses banebevægelsen for et enkelt molekyle i plasmamembranen af en levende celle. Banen er optaget over cirka 1,5 sekunder og indeholder knap 3.000 bestemmelser af molekylets placering. Farven indikerer tiden og går fra violet til rød. Som det ses, dannes der områder af samme farve, hvilket svarer til tider, hvor molekylet er indhegnet i et begrænset område. Der er med andre ord tale om hopdiffusion.

(Fra Mathias P. Clausen og Christoffer Lagerholm, *NanoLetters*, 2013)



nye og ekstreme tidslige opløsninger, opdagede Kusumis team helt nye og ukendte diffusionsmønstre og konkluderede, at molekylerne i cellemembranen generelt bevæger sig på en helt anden måde end hidtil antaget. Det betød også, at domæner af kolesterol og andre lipider ikke nødvendigvis er svaret på, hvordan cellen skaber proteinstrukturer. I hvert fald ikke den eneste.

Cytoskelettet danner ifølge Kusumi ganske små indhegninger i cellemembranen, der kan forklare hopdiffusion.

De proteiner og lipider, Kusumi undersøgte, var nemlig alle altid kortvarigt begrænsede i deres bevægelser til meget små områder. De kunne dog undslippe disse indhegninger, men blot for at blive

begrænset i en ny tilsvarende indhegning. Ifølge Kusumi undslap molekylerne enten ved at springe over forhindringen eller gennem kortvarige åbninger. Vi kan derfor føje et nyt diffusionsmønster til de allerede kendte, nemlig såkaldt hopdiffusion.

Når ingen har opdaget hopdiffusion i cellemembranen før Kusumi, skyldes det, at man med almindelige videooptagelser højst har kunnet tids- og stedfæste en eller to positioner i hver indhegning. Bevægelsen er dermed kommet til at se mere fri ud end den egentlig er, når man har undersøgt et større område pga. statistikkens udjævning. Kusumis indhegninger er nemlig ekstremt små og molekylerne er der kun i kort tid, og som han smilende siger, så kan der ske rigtig meget på 10 millisekunder – især i den molekylære verden.

Hvad skaber så denne hopdiffusion? Kusumis videooptagelser og hans fortolkning af dem er, at domænerne opstår på grund af cellens cytoskelet. Cytoskelettet er et netværk af fibre, der understøtter membranen indefra og giver cellen dens facon. Cytoskelettets opbygning og struktur svarer størrelsesmæssigt til de indhegninger, der blev fundet i Kusumis forsøg.

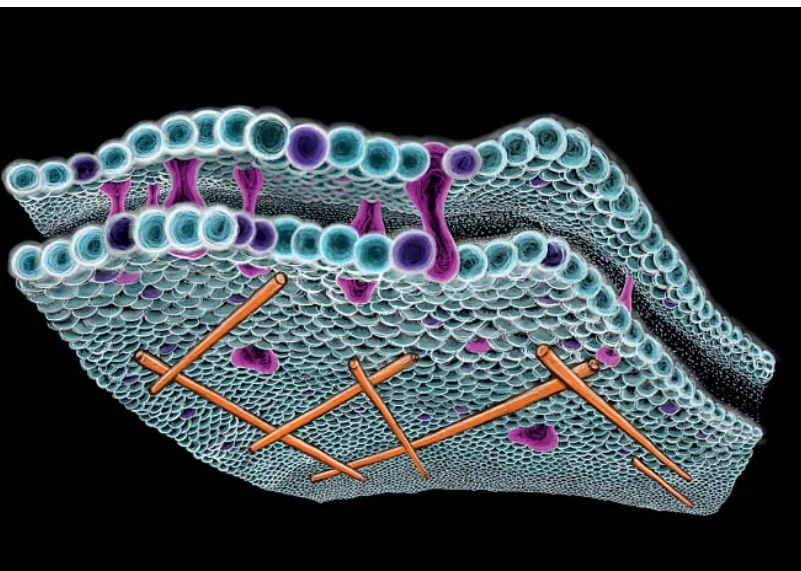
### Forskning på kanten af det mulige

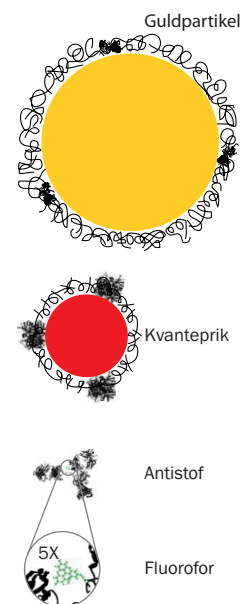
Kusumis hopdiffusion er blot en af mange nye hypoteser, som har sin rod i tre afgørende forhold:

- 1) Vi kan mærke enkelte molekyler med forskellige farvestoffer og bruge dem som visuelle prober, og på den måde følge deres dans gennem cellemembranen.
- 2) Vi har de nødvendige fintfølede optiske instrumenter, som gør det muligt at følge de mærkede molekyler i ekstremt høje rumlige og tidslige opløsninger.
- 3) Vi har fået sofistikeret software, som gør det muligt at behandle de enorme datamængder og repræsentere dem visuelt overskueligt og dermed fortolke dem.

Men den hastige udvikling betyder også, at det er nødvendigt at øge fokus på metoderne og samarbejdsformerne. Der bliver forsket på kanten af det mulige. Både rumlige og tidslige forhold udsættes for høj grad af fortolkninger på grund af måleinstrumenterne, proberne, optikken og softwaren.

Vi påvirker et miljø, cellemembranen, i en grad så det sandsynligvis har en stor indflydelse på det målte: Hvordan ser vi – hvad er virkeligt og hvad er såkaldte artefakter, og repræsenterer vi det, vi ser, rigtigt med vores software?

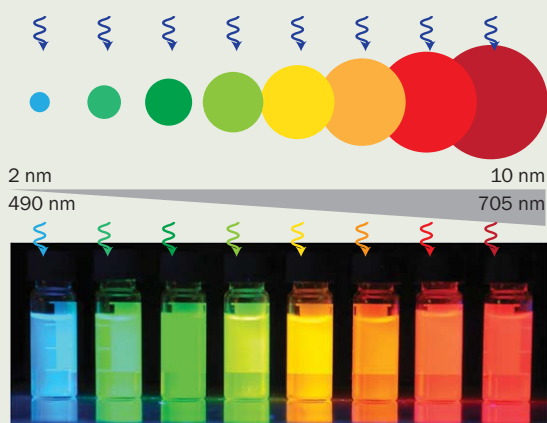




Relative størrelsesforskelle mellem de forskellige typer prober anvendt i Kusumis forsøg og forsøgene ved Memphys.

Mathias forklarer fotografen om hopdiffusion og STED-mikroskopi.

### Kvanteprikker afslører bevægelse



Teknikken Single Particle Tracking går ud på, at man gør partikler (i dette tilfælde i cellemembranen) selvlysende og derefter følger deres bevægelser gennem et særligt mikroskop. Der findes flere måder at mærke cellerne på. På Memphys har forskerne brugt kvanteprikker (på engelsk: quantum dots), som er nanokrystaller, der kan fluorescere – altså udsende lys. Man kan sætte kvanteprikkerne fast på enkelte lipider

eller proteiner i membranen, og på den måde kan man følge molekyleerne i et mikroskop.

For at få det fluorescerende farvestof til at lyse, skyder man energi ind i kvanteprikkernes elektroner. Man kalder det at excitere dem, og det gøres ved at lyse på dem med blåt lys fra en kviksølv-lampe eller laser. Når elektronerne exciteres, kommer de op på et højere energiniveau i forhold til deres grundtilstand, men her bliver de ikke længe. Snart falder elektronerne tilbage til grundtilstanden, og når de gør det, udsender de et fluorescerende lys. Med et fluorescensmikroskop kan man opfange lyset, og på den måde kan man følge kvanteprikkernes bevægelser i cellemembranen.

En stor fordel ved at bruge disse kvanteprik-prober er muligheden for at lave multifarveeksperiment, hvor man kan følge forskellige typer af molekyler simultant, idet de mærkes med signifikant forskellige farver. Multifarveeksperiment er vigtige, fordi lipiderne og proteinerne danser i mange forskellige tempi i cellemembranen, og påvirker hinanden konstant. Jo flere molekyler, vi kan følge, jo mere indsigt får vi i de forskellige bevægelsesmønstre.

## Kvanteprikkerne på Memphys

Her kommer forskerholdet fra Memphys på Syd-dansk Universitet ind i billedet. Kusumis forskning er utrolig spændende, men rejser også en del spørgsmål, især på grund af metoderne.

### Læs mere

*Ole Mouritsen:* Model answers to lipid membrane questions, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011 (frit download her: <http://csh-perspectives.cshlp.org/content/3/9/a004622.full.pdf>).

*Alison Abbott:* Hopping fences, Nature, vol. 433, 17. feb. 2005, s. 680-682.

*Akahiri Kusumi:* A Slide Show on the Membrane Skeleton Fence Structure and Function in the Plasma Membrane, <http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp/lab/slides/1/index.html>.

*Mathias P. Clausen og B. Christoffer Lagerholm:* Visualization of Plasma Membrane Compartmentalization by High-Speed Quantum Dot Tracking, NanoLetters, 2013, 13(6), s. 2332-1337.

For at kunne opnå den store opløsning og de mange billeder pr. sekund, har Kusumi benyttet fotostabile guldpartikler med en størrelse på ca. 50 nanometer. Det er en del større end de prober, man normalt bruger, som er nærmere 10-20 nanometer. Spørgsmålet er derfor, om observationen af hopdiffusion i virkeligheden skyldes guldpartiklernes vekselvirkning med membranens egne molekyler.

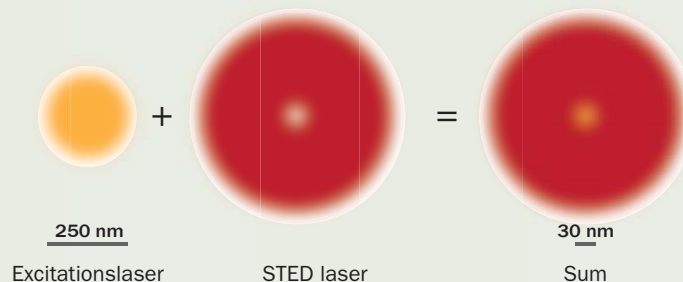
For at svare på det spørgsmål, har forskerne på Memphys benyttet små fluorescerende nanokrystaller (såkaldte kvanteprikker), der i sig selv ikke er mere end 2-10 nanometer store, afhængig af den farve de udsender. Men for at få dem til at virke hensigtsmæssigt i biologiske omgivelser er de dog beklædt med yderligere lag, så de er blevet 10-20 nanometer store. Håbet er selvfølgelig, at de ikke påvirker miljøet og molekylerne i samme grad som Kusumis guldpartikler. Prisen er her, at der ikke kan optages 50.000 billeder pr. sekund, men det er lykkedes forskerne at stedfæste de mærkede molekyler knap 2.000 gange i sekundet, hvilket er en kraftig forbedring i forhold til tidligere optagelser med lignende prober.

Resultaterne viste, at også med disse mindre prober finder der hopdiffusion sted, omend studiet også understreger, at der ved nogle af Kusumis målinger er introduceret fejl. Blandt andet overvurderer Kusumi hastigheden af membranens molekyler pga. de store guldpartikler. Ikke desto mindre ser det altså ud til, at membranens molekyler hopper deres vej gennem membranen. Samtidig giver begge studier ophav til nye spørgsmål. Hvordan kan det fx være, at både proteiner og lipider, der er placeret sådan i cellemembranen, at de ikke kommer i kontakt med cytoskelettet, fordi de befinder sig på ydersiden af cellemembranen, også hopper? Måske er cytoskelettet som direkte fysisk barrierer ikke hele forklaringen på hopdiffusion. Andre aspekter som cellens 3-dimensionelle topografi og molekyllære bindinger spiller nok også en stor rolle, og må undersøges nærmere.

## Uvurderlig indsigt

Jagten på en ny membranmodel er fascinerende at følge med i, og med den enorme hastighed i udviklingen af nye billeddannende teknikker og dygtige forskeres fokus på området, er vi formentlig tæt på et meget mere nuanceret billede af den måde, cellerne kommunikerer med omverdenen på. Det er en indsigt, der er helt uvurderlig inden for fx udviklingen af biomedicinske præparater, hvor det er en nødvendighed, at medikamentene enten virker direkte på cellemembranen eller krydser den for at virke inde i cellen. ■

## STED - fremtidig forskning



I den fortsatte jagt på at bestemme cellemembranens organisering anvender forskerne ved Memphys sig nu af en nyligt udviklet teknik kaldet STED-mikroskopi. STED-mikroskopi er en elegant og smart måde at omgå lysets diffraktionsgrænse på. Diffraktionsgrænsen medfører, at strukturer på under ca. 250 nanometer ikke kan opløses.

Med STED-mikroskopi kan man tage billeder af strukturer med en opløsning helt ned til 20 nanometer og dermed se udsnit af cellemembranen i endnu større detalje end tidligere. Det har man ganske vist kunnet i mange år med elektronmikroskopi, men her kan man kun kunnet kigge på døde præparater – ikke levende celler.

Som i alle andre former for fluorescerende mikroskopi exciteres molekylerne med laserlys. Men problemet ved almindelig mikroskopi er, at laserlyset exciterer for mange molekyler til, at vi kan se enkelte molekyler. Derfor anvender man i STED-mikroskopi endnu en laser, der de-exciterer molekylerne i en donut-formet struktur. Kun de udvalgte molekyler i midten af donuten forbliver exciteret, og opløsningen er derfor meget bedre. Ved at kombinere STED-mikroskopi med såkaldt FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), kan man samtidig måle dynamikken af membranmolekylernes bevægelse med en nøjagtighed på under et millisekund. Foreløbige resultater giver yderligere bevis for, at membranmolekyler er kortvarigt begrænsede pga. cellens cytoskelettet.