

---

# Nanoflottar i cellmembraner: en ny organisationsprincip

KAI SIMONS

---

Allt liv på denna planet består av celler; cellen är livets grundenhet. Det finns organismer som består av en enda cell, som amöbor, eller multicellulära species, som *Homo sapiens* med miljarder celler. Alla eukaryotiska celler är uppbyggda enligt samma principer. Cellen kan förliknas vid en stad med cellkärnan som rådhus. Där lagras den genetiska informationen och därifrån skickas meddelanden ut i form av budbärar-RNA som styr proteinsyntesen i cytosolen.

Cellen är ett nanoteknologiskt underverk där det myllrar av nanomaskiner som består av proteiner som utför all produktion, regulation, metabolism, energiförsörjning, kommunikation, nedbrytning och återanvändning. Det finns kraftverk i cellen: mitokondrier, proteinfabriker för export; det endoplasmatiske retiklet, postanstalter för distribution av proteinpaket till olika adresser; Golgikomplexet, lysosomer för återvinning av avfall osv.

Alla dessa olika organeller i cellen är omslutna av membraner som bildar en barriär kring organellen. Cellmembranet utgörs av ett dubbelskikt av lipider bestående av glycerofosfolipider, sfingolipider och kolesterol och är fullbelamrat med proteiner som flyter omkring i lipiderna och utför olika funktioner bundna till membranet. Ungefär 30 procent av vårt DNA kodar för membranproteiner, och flera icke membranproteiner tillbringar en del av sin livscykel där för att utföra sitt arbete membranbundna. Det betyder att en stor del av alla funktioner i våra celler sker i cellmembraner.

## FÖRFATTAREN

MKD **Kai Simons** har varit professor i biokemi vid Helsingfors universitet 1976–1979. Gruppledare och chef för cellbiologiprogrammet vid European Molecular Biology Laboratory 1975–1998, direktör för Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics i Dresden 1998–2006, sedan 2006 gruppledare vid samma institut.

## Membranforskning förr och nu

Membranforskningen har djupa anor i Finland. En modell med dubbelskikt (bilayer) för biomembraner ställdes upp redan 1925 av Gorter och Grendel och baserades bl.a. på viktiga experiment av vår landsman Rune Collander. Vid denna tidpunkt stod lipiderna i förgrunden. Proteinerna i membranerna kom in i bilden senare. I Singer och Nicolson's membranmodell från 1972 illustrerades för första gången membranernas vätskekaraktär (1). Dubbelskiktet är ett 5 nanomillimeter tunt vätskeskikt där de enskilda lipiderna och proteinerna flyter omkring.

Här kommer våra studier in i bilden. Min forskning har alltsedan tiden på Minerva befattat sig med cellmembraner. År 1988 ställde vi upp en banbrytande hypotes som postulerade att dubbelskiktet av lipider inte bara är en vätska i vilken proteinerna simmar omkring på måfå utan att det i detta fluidum bildas små flottor av sfingolipider som transporterar specifika proteiner (2). Senare fann vi att kolesterol är en viktig beståndsdel i dessa flytande flottor (3). Flottornas vätskeplattformar innehåller lipider i dubbelskiktet och förekommer där tätare packade än i det omgivande vätskeskiktet. En av kolesterolns funktioner är att packa samman de lipider och proteiner som bildar dessa flottor. Det börjar bli klart att en av de viktigaste uppgifterna för kolesterol i vår kropp är att fungera som ett molekylärt lim för att binda ihop flottarna.

Våra arbeten med cellpolaritet i epitelceller gav mig idén till flottarna. Epitelcellerna bildar skikt som täcker alla våra organ och fungerar som en barriär mellan den externa

---

och den kroppsinterna miljön. I till exempel tarmen bildar epitelet ett skyddsskikt där den del av plasmamembranet som vetter mot tarmlumen, det så kallade apikala plasmamembranet, är isolerad från det basolaterala plasmamembranet, riktad mot insidan och blodförsörjningen. Mellan de apikala och de basolaterala membrandomänerna finns en diffusionsbarriär, zonulae occludentes, som också bildar en förbindelsezon mellan cellerna i epitelet. De apikala och den basolaterala membranerna har olika funktioner och därför också olika proteinsammansättning. Även lipiderna är olika apikalt och basolateralt. Glykosfingolipider är starkt anrikade apikalt och bildar en tätt packad skyddsbarriär mot tarminnehållet.

Vi var intresserade av hur nysyntetiserade proteiner och lipider transporteras apikalt och basolateralt. Hur klarar cellen av detta sorteringspussel? För att alla funktioner ska fungera normalt byter cellen ständigt ut sina beståndsdelar genom nysyntes, precis som delar i ett flygplan ersätts. För att förklara hur apikala proteiner och glykolipider skickas ut i paket från postanstalten i cellen, Golgikomplexet, postulerade vi att dessa lipider tillsammans med sina proteinpassagerare bildar plattformar i Golgimembranet, dvs. flottor för apikal transport. Först trodde vi att det här enbart var ett fenomen i epitelceller, men det visade sig att flottorna var generella och utgjorde en allmänt funktionerande princip i våra celler. De hade inte bara transportfunktioner utan var verksamma i ett flertal membranprocesser, t.ex. signalering och metabolism.

Vår nya modell var tekniskt svår att påvisa och ledde länge till meningsskiljaktigheter och kontroverser. En orsak var att flottorna med sina lipider och proteiner visade sig vara svårösliga i detergentia. Denna påvisningsmetod började användas som ett bevis för att demonstrera att en membranprocess skedde i sfingolipid-kolesterinflottor. Plötsligt uppkom en trend att utföra dessa enkla detergentexperiment och ibland manipulera resultatet så att proteinet blev svårösligt(4). Det ledde till en uppsjö av publikationer vars tillförlitlighet var svår att bedöma (5).

Denna fas är nu förbi. Nya sofistikerade metoder har gjort sitt intåg på fältet. Framst är det fråga om att avancerad singelmolekylmikroskopi och spektroskopisk teknik har revolutionerat forskningen. Dessa metoder har visat att membranflottorna är dynamiska strukturer. De dissocierar och associerar i millisekundhastighet (6). Vidare har det visats

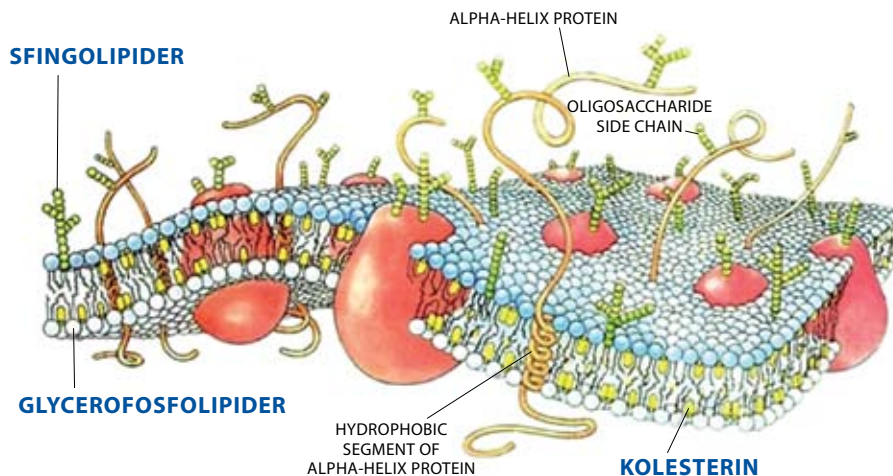
att dessa fluktuerande nanoflottor kan stabiliseras för att bilda mera hållbara plattformar som fungerar i membrantrafik, cellsignalering och många andra membranprocesser.

Ett exempel för en process där dessa flottor spelar en viktig roll är T-cellssignaltransduktion. När en T-cell möter en antigenpresenterande cell bildas mellan dessa celler en kontaktzon – en immunologisk synaps – där T-cellsreceptorn binder till antigenet i MHC-proteinet (7). Denna process leder till en anhopning av nanoflottor med T-cellsreceptorer som smälter ihop till en synaps där ett komplicerat maskineri av proteiner aktiverar T-cellen för att åstadkomma ett specifikt immunsvår.

### Lipidforskning i framtiden

Ett område som har kommit på efterkälken i den snabba utvecklingen av genomik och proteomik är lipidanalytiken. Utvecklingen av nya metoder har revolutionerat analysmetodiken i molekylärbiologin. Och nu gör masspektrometrin sitt intåg i lipidanalytiken och kommer att revolutionera lipidologin. Vårt Max-Planckinstitut i Dresden har varit en banbrytande pionjär på detta område, och med den metodologi vi där har utvecklat kan vi analysera de hundratals olika lipider som utgör byggstenarna i cellmembraners lipiddubbelskikt och dessas flottor. I ett samarbete med Thomas Harders forskargrupp i Oxford har vi isolerat T-cellssynapsen och demonstrerat att lipider som vi postulerat ska finnas i membranflottorna i själva verket anrikas i synapsen (8). Efter alla kontroverser speciellt på detta område är det ett synnerligen tillfredsställande resultat för vår forskning. Flottorna används som funktionsprincip i flera olika immunologiska processer, bland annat också i B-cellsimmunsvår och allergiska reaktioner.

Det fascinerande i all denna komplexitet som möter oss i dag i den biomedicinska forskningen är att grundprinciperna trots allt är relativt enkla, medan den kemiska sammansättningen är komplicerad. Den molekylära diversitet som vi påträffar i naturen är enorm. Tänk bara på alla olika slags proteiner som finns i olika organismers proteom! Men genom att denna komplexitet har uppstått under evolutionen från en enda urcell kan vi spåra släktskapet på all nivåer i biologin. Inte bara det genetiska språket, kodat i våra geners DNA, är identiskt i alla levande organismer. Många andra släktdrag kan också påvisas om vi bara tränger tillräckligt djupt i våra analyser.



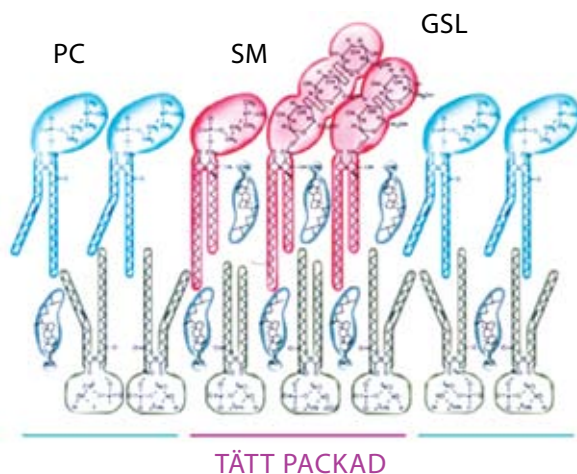
Figur 1. Singer och Nicolson's membranmodell. Här ser vi proteinerna simma omkring i ett lipiddubbelskikt av fosfolipider, sfingolipider och kolesterol.

Det gäller också för vår modell för dynamisk membrankompartimentalisering. Den grundar sig egentligen på fassetparering, det fenomen som får olja och vatten att separera i två olika faser. När nanoflottarna i cellmembranen smälter ihop till större plattformar bildas ett mera tätpackat men flytande dubbelskikt som skiljer sig från det omgivande membranet. En vätske-vätske imiscibilitet formulerade att antalet faser i ett slutet system i jämvikt förenklat uttryckt är  $n-1$  där  $n$  är antalet kemiska komponenter i systemet. Det skulle betyda att ett cellmembran som innehåller över 1 000 lipid- och proteinkomponenter kunde uttrycka bortåt 1 000 olika faser. Men så är det inte! Vi har visat att vi, om vi producerar "ballonger" av plasmamembraner från celler, kan inducera en fassetparation i plasmamembranet som vi kan iaktta i mikroskop: en fas där flottarna har smält samman och en annan fas där membranets andra beståndsdelar har flutit ihop. Dessa båda faser är segregerade från varandra (9). Med andra ord uppför sig plasmamembranets kemiska komponenter som två kollektiv. Det kunde betyda att membranets lipider och proteiner under evolutionstrycket har utvecklats så att egenskaper med förmågan att fassetparera har fokuserats på två eller ett fåtal kemiska grupperingar som gör det möjligt för cellen att med en obetydlig energiinsats dynamiskt kompartimentalisera sina membraner för att genomföra olika funktioner. Trots den molekylära komplexitet som är nödvändig för att upprätthålla alla membranfunktioner är grundprincipen för membrankompartimentalisering i princip därför rätt enkel. Flottarna

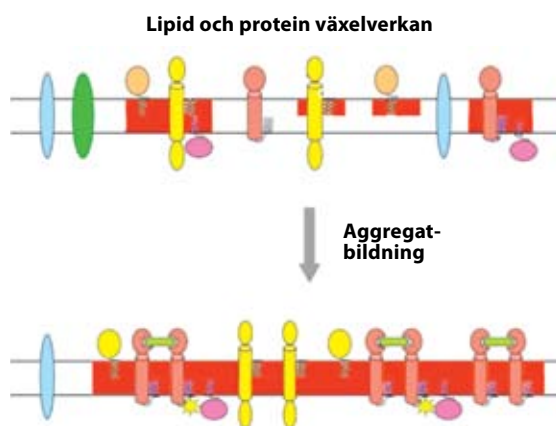
möjliggör att parallella processer samtidigt kan äga rum i samma cellmembran; plattformarna skapar separerade reaktionsrum för olika cellulära processer. Dessa konstruktionsprinciper för dynamisk membranarkitektur har också stor betydelse i patogenesen för olika sjukdomsprocesser. Lipidnivåerna, inte bara kolesterinkoncentrationen, måste regleras exakt för att kroppen ska fungera normalt. Vi vet att denna homeostas tar en avsevärd del av vårt genom i anspråk.

### Mebranflottar

Vi har studerat en sjukdom där membranflottarna spelar en viktig roll, nämligen Alzheimers sjukdom. Vi vet att familjär alzheimer orsakas av genetiska mutationer som gäller APP (amyloid precursor protein). Detta membranprotein spjälkas av två protolytiska enzymer, beta- och gammasekretas, i ett fragment – beta-amyloid. Beta-amyloid är svårösligt och kan avlagras i hjärnan om produktionen blir för hög. Denna amyloid är också toxisk för neuroner. Vi har visat att beta-sekretasspjälkningen äger rum i endosomer, det kompartment som bildas genom endocytos från plasmamembranet. Där sker produktionen av beta-amyloid genom en sammansmältning av sfingolipid-kolesterinflottar som är bärare av både beta-sekretas och en minoritetspopulation av APP (10). Beta-amyloid produceras under hela vårt liv i stort sett i alla celler i kroppen, men vid någon tidpunkt efter ca 65 års ålder blir belastningen för stor för de patienter som får alzheimer, och hjärnan klarar inte av renhållningen av



Figur 2.  
En schematisk bild av sfingolipid (röda) – kolesterolinmembranflottor – utan proteiner. Flotten flyter i ett dubbelskikt av omättade fosfolipider (blå).



Figur 3.  
Schematisk bild av en plasmamembran där dynamiska nanoflottor (röda) med proteiner (gula och lätt röda) flyter omkring. Dessa flottor kan aktiveras genom att oligomerisera proteiner eller lipider i flottor så att dessa nanoflottor smälter samman till en stabilare plattform (röd) där t.ex. en T-cellsreceptor aktiverar en signalprocess som förs vidare in i cellen.

beta-amyloid. För patienter som har ärftlig alzheimer uppträder sjukdomen redan i åldern 40–50 år för att produktionen av beta-amyloid är genetiskt förhöjd.

För närvarande finns inga verksamma läkemedel för patienter med Alzheimers sjukdom. Om man kunde inhibera beta-sekretasenzymet åtminstone partiellt, vore en alzheimertterapi potentiellt möjlig. Än så länge existerar inga effektiva beta-sekretasinhibitorer på marknaden. Ett problem är att en beta-sekretasinhibitor måste passera två cellmembraner för att nå sitt mål. Först måste

läkemedlet transporteras genom plasmamembranet och sedan måste det nå endosomens inre genom endosomens membran. Vi håller på att utveckla en ny strategi för att finna en lösning på detta problem. För att underlätta transporten till endosomerna och för att slussa in inhibitor i endosomflottarna har vi försett en beta-sekretasinhibitor som biter på isolerat enzym men som inte är aktiv i cellförsök med ett ankare som består av ett kolesterolinderivat. Och det fungerar! Genom att förankras inne i plasmamembranet åker inhibitor snålskjuts in i cellen rakt till endosomen där den via sitt sterolankare också inkorporeras i APP-sekretasplattformen för att inhibera proteolysen (11). Nu söker vi efter vägar att slussa in en sådan förankrad inhibitor i hjärnan. Vi hoppas att på detta sätt kunna använda den kunskap vi har vunnit genom våra biokemiska och cellbiologiska experiment till att utveckla nya strategier för läkemedelsutveckling.

Prof. Kai Simons  
Max Planck Institute  
for Molecular Cell Biology and Genetics  
Pfotenhauerstrasse 108  
01307 Dresden  
Tyskland  
simons@mpi-cbg.de

## Referenser

1. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175(23):720–731.
2. Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 1988;27(17):6197–202.
3. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387(6633):569–72.
4. Lingwood D, Simons K. Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat Protoc* 2007;2(9):2159–65.
5. Munro S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 2003;115(4):377–388.
6. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, et al. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 2009;457(7233):1159–62.
7. He HT, Marguet D. T-cell antigen receptor triggering and lipid rafts: a matter of space and time scales. *Talking Point on the involvement of lipid rafts in T-cell activation. EMBO Rep* 2008;9(6):525–530.
8. Zech T, Ejsing CS, Gaus K, de Wet B, Shevchenko A, Simons K, et al. Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *Embo J* 2009;28(5):466–476.
9. Lingwood D, Ries J, Schwillie P, Simons K. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(29):10005–10.
10. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 2003;160(1):113–123.
11. Rajendran L, Schneider A, Schlechtingen G, Weidlich S, Ries J, Braxmeier T, et al. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science* 2008;320(5875):520–523.