



Enkeltmolekyletagfat

Ved hjælp af mekaniske målemetoder kan man nu tage fat i et enkelt molekyle og måle på kraften mellem to molekyler. Det giver forskerne adgang til at studere molekulære processer i levende organismer under mere realistiske forhold.

Af Ole G. Mouritsen, Esben Thormann og Adam Cohen Simonsen

■ I de senere år er det blevet muligt at opfange signaler fra enkelte molekyler, ikke alene med spektroskopiske og optiske teknikker, men også ved brug af mekaniske målemetoder. Det er således blevet muligt at tage fat i enkelte molekyler og måle kraften mel-

lem enkelte molekyler. Princippet i en mekanisk måling er simpelt: det drejer sig "blot" om at finde en passende kraftmåler med en tilstrækkelig blød mekanisk fjeder (en slags fjedervægt), og så få molekylet monteret på måleren. Fjederen kan for eksempel være

en meget tynd bladfjeder eller en blodcelle. Monteringen af molekylet kan foretages ved kemisk binding. Med en sådan fjedervægt kan vi måle kræfter, som er flere tusind gange svagere end en kemisk binding. Måling af kræfter i dette område kan kaste lys over funda-

mentale problemer inden for fysik, kemi, biologi og medicin.

Kræfter i molekylernes verden

I molekylernes verden er alt i bestandig og tilfældig bevægelse, og bevægelserne er mere vold-

Bindingsstyrker og kræfter

Boks 1: Styrken af forskellige typer af bindinger i og mellem atomer og molekyler. C-C er en stærk, kovalent kemisk binding. H·····O er en brintbinding. van der Waals (vdW)-binding er en svag, allestedsnærværende, fysisk binding. Enzym-substratbindingen er mellem en lipase og en fedtstofmembran, og kraften for en molekulær motor svarer til myosin i muskler. Energien er givet i enheder af den termiske energi ved stuetemperatur, $k_B T_{\text{stue}}$, hvor T er den absolutte temperatur (i Kelvin), og k_B er en naturkonstant, Boltzmanns konstant. Den tilsvarende kraft er vurderet som den maksimale kraft, som en binding kan modstå.

Binding	Energi	Kraft
C-C	$\sim 100 k_B T_{\text{stue}}$	~ 4000 pN
H·····O	$\sim 10 k_B T_{\text{stue}}$	~ 200 pN
vdW-binding	$\sim 1 k_B T_{\text{stue}}$	~ 40 pN
enzym-substrat		~ 20 pN

somme, jo højere temperaturen er. Vi taler om Brownske bevægelser og diffusion. Disse bevægelser svarer ved stuetemperatur til en ufattelig lille energi på $4,1 \times 10^{-21}$ J. Denne energi repræsenterer dog et ikke ubetydeligt arbejde i molekylerne verden, hvor typiske afstande måles i nanometer (milliontedele af en mm). For at se, hvilken kraft der i molekylerne verden kan præsteres ved hjælp af denne energimængde, skriver vi energien som et arbejde (kraft x vej). Kræfter måles i Newton (N), og små kræfter i molekylerne verden kan passende udtrykkes i picoNewton ($1 \text{ pN} = 10^{-12} \text{ N}$). Vi finder så, at den termiske energi ved stuetemperatur svarer til $4,1 \text{ pN nm}$.

Den termiske energi ved stuetemperatur kan altså udøve

kræfter af størrelsesorden pN, som virker over afstande af størrelsesorden nm. Betydningen af denne størrelse er, at hvad der bindes sammen af kræfter, som er svagere eller af størrelsesordenen pN, nemt brydes spontant af de termiske bevægelser, hvori mod bindinger, som er væsentligt over pN-området, er mere stabile.

Typiske bindinger i molekylerne verden udviser et stort variationsområde, fra stærke kemiske bindinger til meget svage fysiske bindinger. Som vi ved, vil kemiske bindinger normalt ikke brydes spontant ved stuetemperatur, hvorimod en svag fysisk binding nemt kan brydes, og der skal mange til for at holde en plan overflade og et stykke scotch tape). Da levetiden er eks-

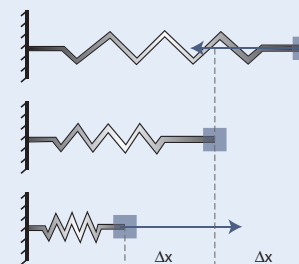
Hookes lov til kraftmåling

Boks 2: Hookes lov for en fjeder, som påvirkes af enten en udtrækkende kraft, ingen kraft eller en sammentrykkende kraft siger, at

$$F = -k\Delta x.$$

F er kraften målt i Newton, k er fjederkonstanten, og Δx det stykke, fjederen bevæger sig.

I ligevægt udøver fjederen en lige så stor, men modsatrettet kraft som vist med de blå pile. Hermed kan fjederen bruges som kraftmåler. Når fjederkonstanten er kendt, kan kraften bestemmes ved at måle Δx .



1 Newton er den kraft, der skal

til at accelerere en masse på 1 kg med 1 m pr. sekund²

ponentielt afhængig af bindingsenergien, betyder disse forskelle, at en kemisk binding mellem for eksempel to kulstofatomer i praksis lever uendeligt ved stuetemperatur, hvorimod en brintbinding brydes og dannes på en tidsskala af ns ($1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ sek}$).

Fjedre som kraftmålere

Den simpleste kraftmåler er en fjeder, som kan udvide sig eller trække sig sammen, når den påvirkes af en kraft (se boks). Alle fjedre har en såkaldt fjederkonstant, der er karakteristisk for fjederen og det materiale, den er lavet af (konstanten udtrykkes i N/m). Hookes lov udtrykker sammenhængen mellem den kraft, fjederen påvirkes med, fjederkonstanten og det stykke, fjederen bevæger sig. Hvis vi vil måle kræfter i mole-

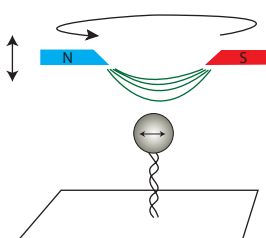
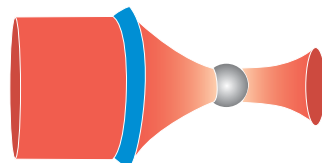
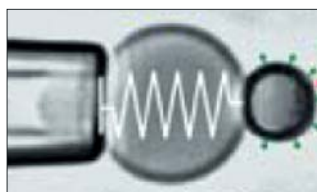
kylerne verden ved hjælp af Hookes lov, må vi altså bruge fjedre med kraftkonstanter i pN/nm-området. Men hvor finder vi sådanne bløde fjedre?

Her kommer de moderne atomar-kraftmikroskoper os til hjælp. Disse mikroskoper er baseret på en kraftmåling mellem spidsen på en ultraspidts metallisk nål og et emne. Det viser sig, at de stænger hvorpå nålen er monteret har fjederkonstanter i størrelsesordenen 10-1000 pN/nm. En lidt blødere fjeder kan fremstilles af en rød blodcelle eller et liposom, som har fjederkonstanter på 0,1-100 pN/nm. Endnu blødere fjedre kan konstrueres med optiske pincetter (fjederkonstanter 0,01-10 pN/nm) eller magnetiske pincetter (fjederkonstanter 0,0001-0,1 pN/nm). Vi kan nu vælge den kraftmåler, som bedst passer til det kraftområde, som vi ønsker at undersøge.

Hemmeligheden bag en kraftmåling i et atomar kraftmikroskop ligger i to forhold: (1) den tynde bladfjeder, der bruges som fjeder, er blød og (2) detektionen af bladfjedrens afbøjning er ultra-følsom; afbøjningen kan bestemmes med stor nøjagtighed ved at måle afbøjningen af en laserstråle, som reflekteres på bladfjedrens overside. Forstærkningen er enorm og proportional med forholdet mellem afstanden mellem bladfjedren og detektoren, og længden af bladfjedren.

Bløde fjedre til kraftmålinger (boks 3)

Fire ultra-bløde fjedre, som kan benyttes til at måle meget svage kræfter i molekulære systemer. Øverst til venstre bladfjedren i et atomar kraftmikroskop og øverst til højre en udspilet, rød blodcelle, som holdes fast med en glaspipette i den ene ende og er påklisteret en lille glasperle i den anden ende. Nederst til venstre en optisk pincet, hvor en lille kugle er fanget i en laserstråle og nederst til højre en lille magnetisk kugle, som holdes fast af et magnetfelt.



Molekyle-fiskeri

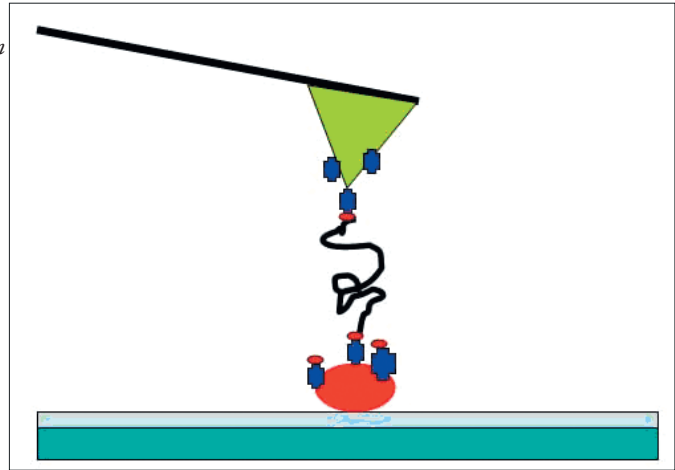
Vi kan tænke på den tynde bladfjeder i et atomart kraftmikroskop som en slags fiskestangsfjeder. På samme måde som på en almindelig fisketur kan vi ikke se de fisk, vi gerne vil fange. Men i modsætning til en vellykket fisketur, kan vi heller ikke se og identificere de "fisk", som vi har fanget i mikroskopet. Fangsten skal alene bedømmes på fiskestangens opførsel. Desuden er det ofte nødvendigt at bruge en særlig slags madding for at få en bestemt slags fisk til at bide på. Der kan dog være noget, som bider på, eller sætter sig fast, hvis vi bare smider kroge ud uden madding. Bundbid, grene eller en gammel cykel. En sådan uspecifik binding vil også kunne optræde, når vi fisker efter molekyler med vores kraftmåler. For eksempel viser det sig, at man kan trække visse proteiner ud af biologiske cellemembraner ved en sådan uspecifik binding.

For at sikre en mere specifik binding er det imidlertid nødvendigt at foretage en kemisk funktionalisering af spidsen og eventuelt af det molekyle, som vi ønsker at fiske op. Vi skal bruge en form for molekylært klister (se figur 1). På den måde er det for eksempel muligt at binde den ene streng af et DNA-molekyle til spidsen, mens den anden streng er bundet til en fast overflade. Ved at trække i bladfjederen kan vi så måle den kraft, der skal til for at rive de to strenge fra hinanden. Hermed kan vi måle bindingsstyrken af DNA-molekylet. Målingen kan eventuelt foregå under tilstedeværelse af et lægemiddel, som binder til DNA-molekylet og ændrer bindingsstyrken.

På fisketur

Lad os sige, at vi har fået et molekyle, en ligand, til at sidde fast på spidsen, og et andet molekyle, en receptor, til at sidde fast på en overflade (se boks 4). Vi er nu klar til at fiske. Da vi ikke ved, hvor de enkelte molekyler, som vi vil fiske op, sidder på overfladen, må vi svinge fiskestangsfjederen mange gange op og ned. Vi vil gerne sikre os, at hvis det lykkes at binde til noget

Figur 1. Kemisk molekylært klister: Ved en passende kemisk modifikation af de forskellige dele, dvs. spidsen, molekylet og en overflade med passende molekyler, kan man montere molekyler i en kraftmåler.



Enkeltmolekyle-tagfat (boks 4)

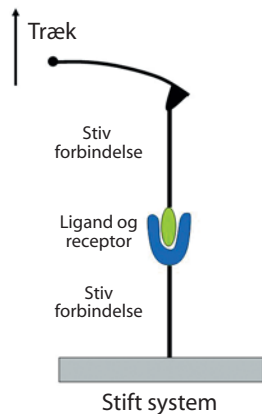
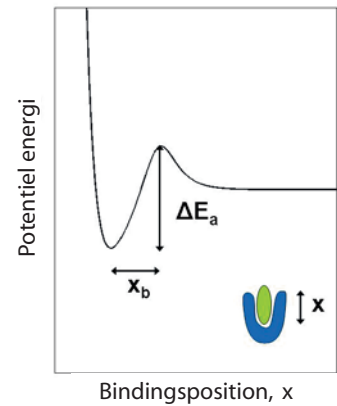
Enkeltmolekyletagfat mellem ligand og receptor. Øverst er vist den potentielle energi i bindingen mellem en ligand (grøn) og en receptor (blå). For at bryde bindingen, skal der krydses en energibarriere.

Der er vist tre situationer, hvor bindingsstyrken prøves i en kraftmåler bestående af en bladfjeder med en spids. Tre forskellige forankringsstrategier er benyttet. I de to første fungerer kraftmåleren som en

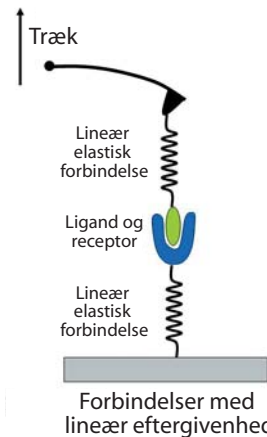
fjeder, hvor kraften varierer lineært med strækningen (Hookes lov).

I den sidste (til højre) bevirker de indsatte polymermolekyler, at fjederen ikke følger Hookes lov, fordi polymererne opfører sig som entropiske ikke-lineære fjedre.

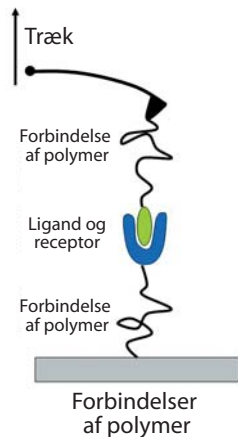
Fori den termiske energi er en betydningsfuld medspiller på molekyler skala, viser det sig, at både trækkehastigheden og forankringsstrategien er af betydning for brydningskraften.



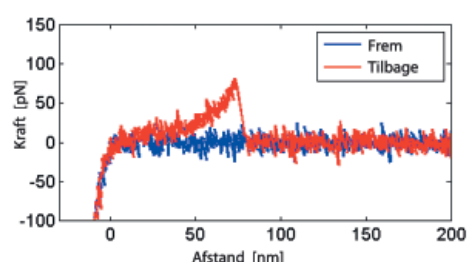
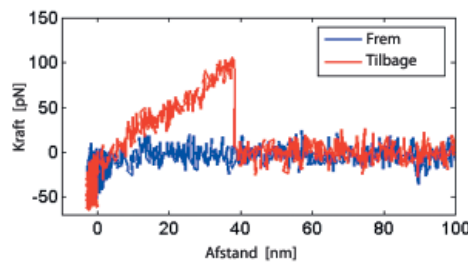
Stift system



Forbindelser med lineær eftergivenhed



Forbindelser af polymer



Der opbygges en kraft indtil et vist punkt, hvor bindingen sprænges, og kraften igen bliver nul. Et specielt forhold ved kræftmålinger på molekulære systemer er, at den målte brydningskraft både afhænger af trækkehastigheden og af eftergivenessen af forbindelseseledene. Den bløde polymer-forbindelse (th) giver en lavere brydningskraft end systemet med den lineære eftergivenhed (tv).

Mindre og mindre (boks 5)

Videnskabens søgen efter at "se" mindre og mindre objekter i større og større detaljer er kulmineret i de sidste årtier ved fremkomsten af nye mikroskopiske teknikker, som muliggør billedannelse af enkelte molekyler og atomer. Linien hertil går helt tilbage til omkring 1595, hvor en opfindsom hollandsk brillemaker nok var den første til at konstruere et optisk mikroskop ved hjælp af nogle linser. Vi ved, at den engelske naturforsker Robert Hooke (1635-1703) selv konstruerede et sådant mikroskop, hvormed han i 1660'erne som den første (i et stykke korb) observerede nogle små strukturer, som han kaldte celler. Forstørrelsen i disse tidlige mikroskoper var typisk 10x.

Princippet i et optisk mikroskop har siden været det samme, selv om vi i dag har avancerede optiske mikroskoper, hvis opløsning alene er begrænset af diffraktionsgrænsen.

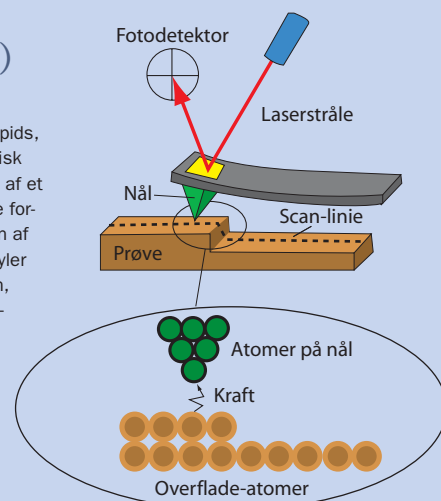
Diffraktionsgrænsen er sat af bølgelængden af det lys, vi bruger. Det betyder, at man med et optisk mikroskop kan se detaljer i μm -området ($1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$), og den bedste opløsning er typisk nogle få hundrede nanometer ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$) svarende til det blåviolette lys. Med den nyeste udvikling inden for optisk mikroskopi er det muligt at bryde diffraktionsgrænsen og opnå en opløsning på omkring 50nm.

Et af de helt store spring fremad skete i 1931, hvor de tyske forskere Ernst Ruska og Max Knoll konstruerede det første elektronmikroskop. Opløsningen er her begrænset af elektronens bølgelængde, som typisk er under 0,1 nm, og det blev hermed i princippet muligt at se enkelte atomer og molekyler.

Det næste store spring blev foretaget i 1981 af de schweiziske fysikere Gerd Binnig og Heinrich Rohrer, som opfandt et såkaldt skanning tunnelmikroskop, der ved hjælp af en tynd

bladfjeder med en ultra-spids, metallisk nål rent mekanisk kunne skanne overfladen af et emne og under passende forhold billedanne konturen af enkelte atomer og molekyler på en overflade. Metoden, som bygger på en kvantemekanisk effekt og det, at der løber en strøm mellem nålen og emnet, blev i 1986 af Binnig og Rohrer videreudviklet til at være en ren kraftmåling mellem spidsen og emnet.

Denne udvidede metode, som kaldes atomarkraftmikroskopi (AFM), har den fordel, at den fungerer i vand og kan bruges på alle typer af overflader. Dermed var der pludselig åbnet op for en hel verden af nye anvendelser, nemlig kemiske reaktioner i vand og studier af levende biologisk materiale, som jo altid er i vandig fase. Atomarkraftmikroskopi gør det muligt at måle kræfter, der er så svage som en titusindedel



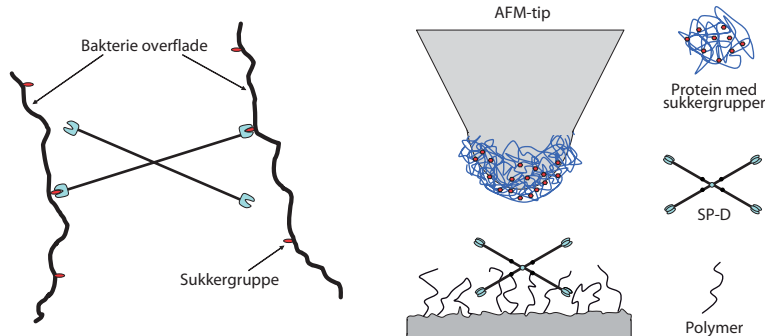
Princippet i et atomarkraftmikroskop.

af en stærk (kovalent) kemisk binding. Dermed er det muligt at studere fysiske vekselvirkninger mellem enkelte molekyler, f.eks. mellem to DNA-molekyler, mellem forskellige proteiner, eller mellem en receptor og et lægemiddel. Ruska, Binnig og Rohrer modtog sammen i 1986 Nobelprisen i fysik for deres arbejde med at se atomer og molekyler.

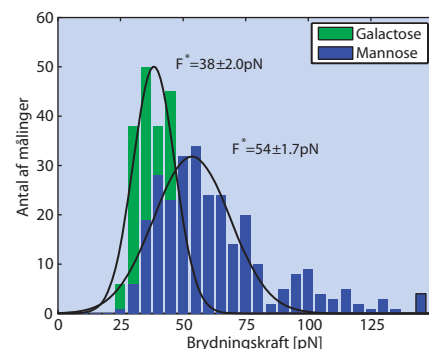
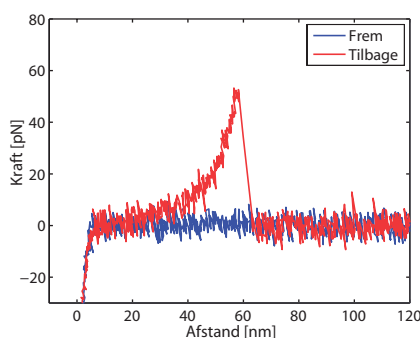
Kraftmåling og lungesygdomme (boks 6)

Lungen har en enorm indre overflade, som er udsat for bestandige angreb af bakterier og mikroorganismer (patogener). Som en del af det medfødte immunforsvar har lungevævet et særligt protein, SP-D (surfaktantprotein D), der binder specifikt til sukkergrupper på disse uønskede organismers celleoverflader. Proteinets fire arme, som kan genkende visse sukkergrupper, virker til at binde et eller flere af sine domæner til overfladen af et patogen og andre domæner til et andet patogen. Hermed klumpes de små patogener sammen i større klumper, som bedre kan udskilles fra lungens slimlag. Spørgsmålet er nu, hvorledes SP-D kan kende forskel på overflader, som er dækket af forskellige slags sukkergrupper, f.eks. mannose og galactose. Dette kan vi afgøre ved hjælp af et molekylært kraftmålingseksperiment, hvor vi kan bestemme forskellen på SP-Ds binding til de forskellige sukre. Studier af denne type kan medvirke til en dybere forståelse af specificiteten af den immunologiske respons og dermed muligvis anviser veje til behandling af sygdomme, som skyldes defekter i immunresponsen.

Grafen tv viser en typisk kraftkurve for proteinet SP-Ds binding til galactose. Kurven giver en bindingsstyrke på omkring 60 pN, og repræsenterer måleresultatet for én binding for ét bestemt par af molekyler. Efter mange målinger laves der statistik på målingerne, og ud fra et helt kraftspektrum bestemmes middelværdien og den mest sandsynlige bindingskraft for galactose som vist på grafen th. Derefter måles for andre sukre, f.eks. mannose, og som figuren viser, er bindingen af SP-D til mannose stærkere end bindingen til galactose.



SP-D (surfaktantprotein D) har fire arme, og for enden af hver arm er der et domæne, som kan genkende visse sukkergrupper. Forskellen på SP-Ds binding til de forskellige sukre kan bestemmes ved et molekylært kraftmålingseksperiment. Sukret bindes til spidsens på kraftmåleren og proteinet til en passende funktionaliseret overflade.



af det, vi har sat på overfladen, så har vi fat i ét og kun ét molekyle. Det er derfor nødvendigt, at afstanden mellem disse molekyler er ret stor, ligesom der skal være langt mellem de molekyler, som er vedhæftet til spidsen. Disse forhold betyder så til gengæld, at der sjældent er bid.

Vi bringer nu spidsen i kontakt med overfladen og trækker den derefter tilbage. Hvis der er bid, vil det afsløres ved, at der opbygges en kraft indtil et vist punkt, hvor bindingen sprænges, og kraften igen bliver nul. Kraften bestemmes af afbøjningen af bladfederen og Hookes lov. Målinger af denne type giver som resultat kraften som funktion af afstanden (se boks 4), og vi kan konstatere at kraften vokser lineært med afstanden som forudsagt af Hookes lov.

Det viser sig nu, at det ofte kan være vanskeligt at få en ligand til at binde til en receptor, hvis de hver for sig sidder fast for tæt på spids og overflade. For at ligan- den bedre kan afsøge, hvorledes den finder ind i bindingsstedet på receptoren, kan vi indsætte et fleksibelt mellemstykke (se boks 4). Et sådant mellemstykke kan med fordel være et langt, fleksibelt molekyle, en polymer, som selv er funktionaliseret, så den kan binde til f.eks. spids i den ene ende og ligand eller receptor i den anden ende. Polymeren vil nu selv virke som en fjeder, som vil blive strakt under fiskeeksperimentet. En polymer er det, man kalder en entropisk fjeder, og som et gummibånd er den mere udstrakt ved lave temperaturer end høje temperaturer. Der må derfor tages højde for polymeres specielle fleksibilitet ved fortolkningen af de målte kraftkurver, som nu ikke længere er lineære, men krumme.

Betydningen af trækkehastigheden

Et specielt forhold ved kraftmålinger på molekulære systemer er, at den målte brydningskraft afhænger af, hvor hurtigt man trækker i båndet. Jo større trækkehastighed, jo større brydningskraft vil der blive målt, og i jo kortere afstand vil bindingen blive brudt. Forklaringen herpå



Foto: Ole G. Mouritsen

Adam Cohen Simonsen ved det atomare kraftmikroskop (AFM).

er indviklet og er relateret til det forhold, at der ved brydningen af båndet skal krydses en energibarriere. Systemet kan imidlertid selv komme spontant over barrieren uden kraftpåvirkning og bryde båndet, hvis der gives tid nok. Dette skyldes, at systemet kan udnytte den termiske energi, som altid er til stede.

Denne komplikation kan vendes til en fordel, fordi det giver en mulighed for, ved at foretage eksperimenterne ved forskellige trækkehastigheder, at måle et helt energilandskab for bindingen og f.eks. afsløre eventuelle lokale minima, der kan være af stor betydning for kinetikken af bindingsreaktionen. Det betyder også, at der ikke kun er én bestemt bindingsenergi, men et helt spektrum som funktion af den hastighed, hvormed man tilfører energi til bindingen i et forsøg på at bryde den. Man taler derfor om dynamisk kraftspektroskopi og refererer til dynamiske bindingsstyrker.

Faggrænser ophæves

Enkeltmolekyletagfat og målinger af bindinger mellem enkelte molekyler er ved at åbne for et

helt nyt vindue til biokemien og den molekulære biofysik af levende systemer. Der venter en masse udfordringer og store spørgsmål, fordi vi nu får adgang til den dynamiske opførelse af kemiske og biokemiske processer under indvirkning af ydre kræfter.

Det er interessant at bemærke, at den sædvanlige biokemiske beskrivelse af affiniteter og bindinger i biologiske systemer oftest refererer til laboratoriebetingselser, f.eks. i et reagensglas, hvor systemerne er i ligevægt. Imidlertid er de realistiske betingelser i et levende system, f.eks. inde i en celle, fjernt fra ligevægt, og de forskellige biokemiske processer forløber under indvirkning af kræfter, som f.eks. skyldes bevægelse af molekulære fibre, motorer og forskellige transportpartikler. Ved hjælp af dynamisk kraftspektroskopi bliver der nu adgang til at studere alle disse processer under mere realistiske omstændigheder. Dette studium er et eksempel på et område, hvor grænserne mellem fysik, kemi eller biologi er godt på vej til at blive ophævet. ■

Om forfatterne



Ole G. Mouritsen er professor ved Institut for Fysik og Kemi, SDU samt leder af Center for Biomembranfysik, Danmarks Grundforskningsfond.

Tlf.: 6550 3528

e-mail: ogm@memphys.sdu.dk



Esben Thormann er ph.d. og postdoc ved Dep. of Chemistry, Surface Chemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm. e-mail: esben.thormann@surfchem.kth.se



Adam Cohen Simonsen er ph.d. og lektor ved Institut for Fysik og Kemi, SDU.

Tlf.: 6550 3527

e-mail: adam@memphys.sdu.dk

www.memphys.sdu.dk

Videre læsning

E. Thormann, P. L. Hansen, A. C. Simonsen, and O. G. Mouritsen (2006): *Dynamic force spectroscopy on soft molecular systems. Colloid Surf. B* 53, 149-156.

E. Thormann, A. C. Simonsen, L. K. Nielsen, and O. G. Mouritsen (2007): *Ligand-Receptor interactions and membrane structure investigated by AFM and time-resolved fluorescence microscopy. J. Molec. Recognit.* 20, 554-560.

E. Thormann, J. K. Dreyer, A. C. Simonsen, P. L. Hansen, S. Hansen, U. Holmskov, and O. G. Mouritsen (2007): *Dynamic strength of the interaction between lung surfactant protein D (SP-D) and saccharide ligands. Biochemistry* 46, 12231-12237.