

Biofysische chemie op computers: simulaties van celmembraan-modellen

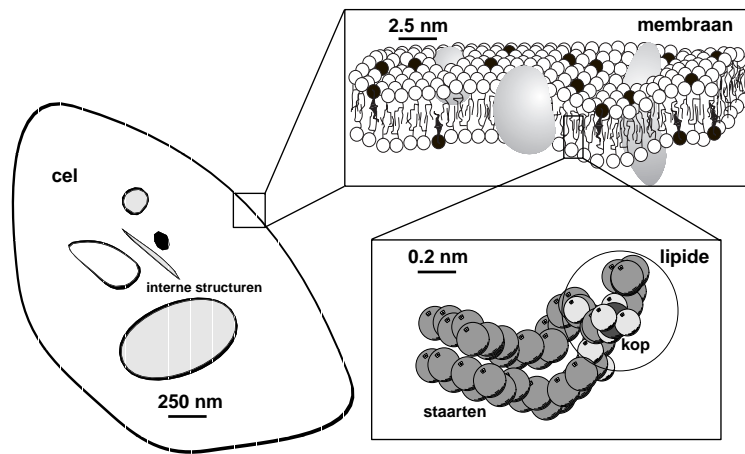
Waar gaat het om?

Levende organismen zijn op verschillende niveaus te bestuderen. Dieren en planten zijn opgebouwd uit organen zoals het hart, de huid, de longen en bladeren. Deze organen zijn op hun beurt samengesteld uit weefsels, die weer opgebouwd zijn uit cellen. Nog een niveau lager vinden we organellen, interne structuren in een cel. In tegenstelling tot hogere planten en dieren bestaan micro-organismen uit een enkele cel. Een enkele cel kan met een sterke microscoop nog goed bekeken worden. De grootte van cellen varieert sterk, maar is van de orde van tien micrometer (een micrometer is een duizendste millimeter).

Op het meest gedetailleerde niveau, op een lengteschaal van nanometers (een nanometer is een duizendste micrometer), worden alle processen in cellen bepaald door moleculen. In biologische systemen komen verschillende klassen moleculen voor. Bij de meeste belangrijke processen worden de hoofdrollen gespeeld door eiwitten, lipiden en suikers. Het doel van veel biochemisch, biologisch en geneeskundig onderzoek op dit moment is het leren begrijpen van de structuren van deze drie typen moleculen en de processen waarin ze een rol spelen.

In mijn onderzoek heb ik me vooral gericht op membranen, de wand om cellen en organellen. De belangrijkste bouwstenen van een celmembraan zijn eiwitten en lipiden (figuur 1). Een groot aantal belangrijke processen speelt zich af rond celmembranen. Twee voorbeelden waarin zowel lipiden als eiwitten een belangrijke rol spelen kunnen dit verduidelijken.

Zenuwsignalen. In ons lichaam vindt voortdurend transport plaats van elektrische signaaltjes via onze zenuwen. Toch lopen er natuurlijk geen koperen leidingen door ons lichaam. Hoe kunnen die signaaltjes elektrisch doorgegeven worden? Er blijkt een heel ingenieus systeem te zijn van zenuwcellen die aan elkaar informatie overdragen, ruwweg op twee manieren: 1. met behulp van “boodschappermoleculen”; 2. via transporteiwitten die elektrisch geladen ionen door membranen kunnen laten stromen, waarbij de membranen zelf als elektrische isolatoren werken. Belangrijke



Figuur 1. Van cel naar lipide. De cel en het membraan zijn schematisch weergegeven. In het lipide is elk bolletje een atoom. Membraan plaatje: *A.J.M Driessen*.

medicijnen als pijnstillers en anti-depressiva beïnvloeden deze boodschappermoleculen en transporteiwitten. Een gedetailleerde kennis van hun werking is van groot belang om bijvoorbeeld de werking van hersenen te begrijpen, maar ook om nieuwe medicijnen te ontwikkelen.

Antibiotica. Antibiotica hechten zich aan het celmembraan van een bacterie en veroorzaken uiteindelijk de dood van deze bacterie. Om bruikbaar te zijn als medicijn is het belangrijk dat antibiotica alleen de bacteriën vernietigen, niet de menselijke cellen. Dit kan door specifieke interacties tussen antibiotica en moleculen die wel voorkomen in bacteriële membranen (bijvoorbeeld bepaalde eiwitten, een specifieke combinatie van lipiden, of suikers), maar niet in andere cellen. Als precies bekend zou zijn welke interacties belangrijk zijn en hoe bacteriën erin slagen om na verloop van tijd resistent te worden tegen veel medicijnen, zouden we nieuwe antibiotica kunnen ontwerpen.

Beide processen, hoe verschillend ook, hebben gemeen dat ze begrepen kunnen worden op het moleculaire niveau van eiwitten, lipiden en suikers. Een beter begrip van dit soort processen is een algemeen doel van veel onderzoek, inclusief het mijne.

Moleculen zijn te klein om te bekijken met een gewone microscoop. Zelfs een heel celmembraan ziet er onder een microscoop uit als een streepje met bijna geen detail. Er zijn wel allerlei andere, minder directe technieken om moleculen te bestuderen. De meeste experimentele technieken leveren niet zulke gedetailleerde informatie en de weinige technieken die wel gedetail-

leerd zijn, zijn moeilijk toepasbaar op membranen. Daarom proberen we via computersimulaties biologisch belangrijke moleculen in detail te bestuderen. Door de snelle ontwikkeling van computers zijn in korte tijd de mogelijkheden voor dergelijk onderzoek sterk toegenomen. Dit is opmerkelijk: op dit moment zijn simulaties van behoorlijk ingewikkelde systemen zo gedetailleerd dat ze bijna te interpreteren zijn als “echte” laboratoriumexperimenten. Daarnaast kunnen computersimulaties systemen bestuderen die experimenteel niet mogelijk zijn. Het nadeel is dat computermodellen nooit hetzelfde zijn als de werkelijkheid. Het is essentieel dat niet te vergeten.

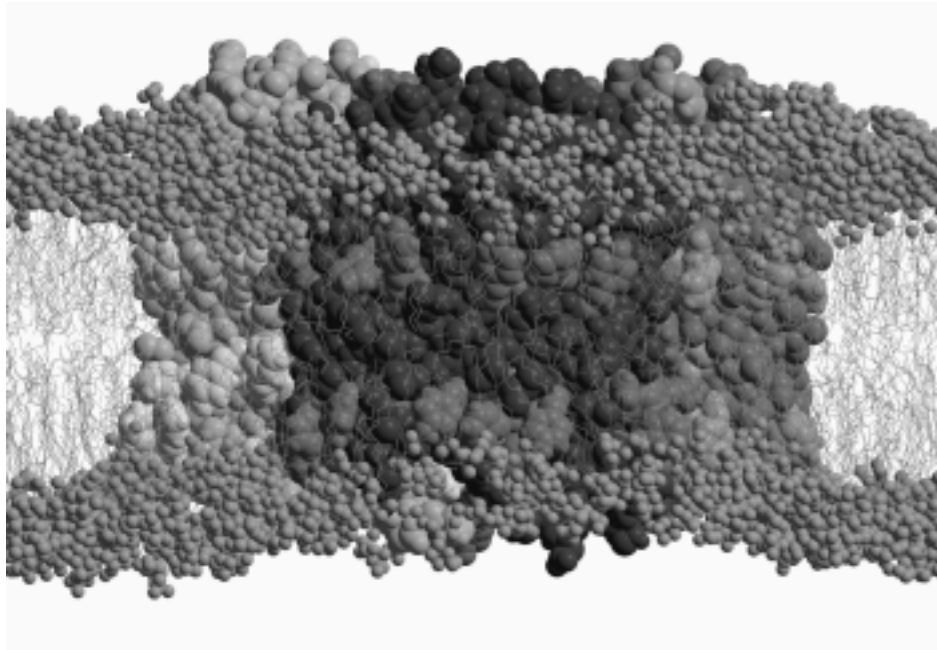
Moleculaire dynamica

De natuurkunde die ik heb gebruikt in mijn computersimulaties is al eeuwen bekend. Newton heeft laten zien dat wanneer we de krachten op een voorwerp precies kunnen beschrijven, we ook exact kunnen uitrekenen hoe dat voorwerp zal bewegen. Voorbeelden hiervan zijn appels die uit bomen vallen, biljartballen die botsen, voetballen die weggeschoten worden en planeten die in banen om elkaar heen draaien. In mijn geval bestudeer ik niet een paar planeten, maar duizenden atomen. De krachten tussen deze atomen zijn op een vrij eenvoudige manier te beschrijven.

Het berekenen van de bewegingen van atomen op basis van een beschrijving van de krachten op deze atomen heet *moleculaire dynamica*. Hoewel de principes simpel zijn, zijn de berekeningen te lang en ingewikkeld om met pen en papier te doen. Het gebruik van computers is daarom onvermijdelijk. Naarmate er meer atomen in het systeem zitten dat bestudeerd wordt, zijn er krachtiger computers nodig. Historisch gezien is er dan ook een duidelijk verband tussen de ontwikkeling van computers en de complexiteit van de systemen die bestudeerd worden:

systeem	jaar	auteurs	aantal atomen
harde bollen	1953	Alder en Wainwright	108
water	1972	Rahman en Stillinger	648
een eiwit in vacuüm	1977	McCammon e.a.	580
fosfolipiden met water	1988	Egberts en Berendsen	5408
een membraaneiwit	1995	Edholm e.a.	18384
porine (hoofdstuk 3)	1998	Tieleman en Berendsen	65898

Het belangrijkste resultaat van de computerberekeningen is een bestand met de posities van alle atomen, op elk moment in de simulatie. Deze informatie is te vergelijken met een filmpje van de baan van een voetbal, of met de



Figuur 2. Een voorbeeld van een computermodel: de porine uit hoofdstuk 3. Vergelijk deze figuur met figuur 1. De kleine bolletjes zijn atomen in de kop van de lipiden. De lijntjes in het midden zijn de staarten van de lipiden. De massa in het midden is het eiwit porine, dat uit drie delen bestaat.

stroboscopische foto's van slingers en vallende kogels uit natuurkundeboeken van de middelbare school. Vervolgens kunnen de ruwe data op allerlei manieren bewerkt worden, om uiteindelijk interessante (of niet) resultaten te verkrijgen. In principe kan uit een simulatie elke eigenschap van het systeem die afhangt van de posities, snelheden of krachten van de individuele atomen uitgerekend worden. Soms kan dit heel direct, door op het beeldscherm van de computer naar een filmpje van de bewegingen van de atomen te kijken, maar meestal maken we gebruik van computerprogramma's die informatie uit de ruwe data halen. In veel gevallen worden daarbij relaties uit de statistische mechanica gebruikt, een tak van natuurkunde die een verband legt tussen individuele atomen en eigenschappen van een groot systeem. Met behulp van statistische mechanica kan een model van duizenden atomen iets zeggen over eigenschappen van systemen, die in werkelijkheid een aantal atomen bevatten, dat met tientallen nullen geschreven wordt (ongeveer 20 nullen voor een druppel water, bijvoorbeeld).

Inhoud van dit proefschrift

Hoofdstuk 1

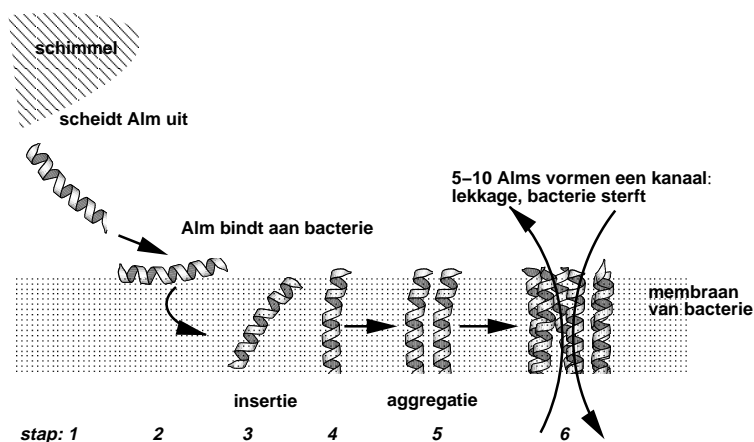
Het eerste hoofdstuk is een gedetailleerde beschrijving van hoe moleculaire dynamica werkt, wat de aannames en beperkingen van deze techniek zijn en hoe ze door anderen gebruikt is om lipiden en membraaneiwitten te bestuderen. Daarnaast beschrijf ik beknopt hoe men zelf simulaties van membraanmodellen zou kunnen opzetten.

Hoofdstuk 2

Om een bruikbaar basismodel te krijgen voor het bestuderen van membraaneiwitten, heb ik in dit hoofdstuk kritisch gekeken naar een aantal belangrijke parameters uit een eenvoudig model. In ons simpelste model bestaat een membraan alleen maar uit fosfolipiden en water. Toch zitten hier al verschillende technische haken en ogen aan. Het bleek bijvoorbeeld dat een fout in één van de parameters van het model ervoor kan zorgen dat de fosfolipiden een volstrekt verkeerde structuur aannemen. Uiteindelijk leverde dit hoofdstuk het basismodel op voor de rest van dit proefschrift.

Hoofdstuk 3

Sommige bacteriën hebben twee celmembranen, een binnen- en een buitenmembraan. Het buitenmembraan is een soort eerste verdedigingslinie tegen de, voor de bacterie, onvriendelijke buitenwereld. Maar een bacterie heeft bouwstoffen, voedsel en een manier om overtollige stoffen kwijt te raken nodig. Daarom bevat het buitenmembraan grote eiwitten, *porines*, die als enige functie hebben het vormen van een kanaal om kleine moleculen door het buitenmembraan heen te loodsen, terwijl ze grote (potentieel gevaarlijke) moleculen buiten houden. Hoe dat precies in z'n werk gaat is interessant om te weten. Transportkanalen komen voor in alle levende cellen. Het bestuderen van porine, een specifiek transporteiwit, levert ook algemene inzichten op in andere transporteiwitten. Een aantal resultaten uit dit hoofdstuk, onder andere over het gedrag van water in een nauw kanaal, zijn waarschijnlijk algemeen geldig. Omdat porines een groot deel van de buitenkant van ziekteverwekkende bacteriën bedekken worden ze veel bestudeerd. Misschien kunnen porines gebruikt worden als aanhechtpunt voor medicijnen. Er is een nauwkeurig model voor de structuur van porines, wat ze een goede eiwitten maakt om mee te beginnen in een computersimulatie. Het enige nadeel is het formaat van het eiwit: een computermodel van dit eiwit is vreselijk groot (en vergt dus veel rekentijd). Voor zover ik weet is het model uit hoofdstuk 3 het grootste model van een biologisch systeem dat ooit gepubliceerd is.



Figuur 3. Schematisch overzicht van het afwerpen van een bacteriële aanval door een schimmel. Van links naar rechts: de schimmel scheidt een giftige stof uit, die zich hecht aan de bacterie, een gat in de buitenkant van de bacterie veroorzaakt en uiteindelijk de bacterie doodt.

Hoofdstuk 4 en 5

Als er geen precieze structuur bekend is van een membraaneiwit moeten we werken met minder nauwkeurige modellen. Door gebruik te maken van zoveel mogelijk incomplete informatie, waarover als het ware gemiddeld wordt, kunnen vaak toch bruikbare modellen gemaakt worden. Zo'n werkwijze maakt het mogelijk een veel groter aantal membraaneiwhitten te onderzoeken dan die paar eiwhitten waarvan een kristalstructuur bekend is. In hoofdstuk 4 en 5 heb ik het eiwitje *alamethicine* (Alm) bestudeerd.

Alm is om verschillende redenen een interessant eiwitje. Het wordt uitgescheiden door een schimmel als verdediging tegen bacteriële infecties (figuur 3). Alm heeft de vorm van een *helix*, voor te stellen als een cylinder met schroefdraad. Eerst gaat Alm van de schimmel naar het buitenste membraan van de bacterie. Daar bindt het aan de lipiden en kan het zowel op het membraan liggen als er in steken. Als er genoeg Alm-moleculen bij elkaar komen kunnen ze een kanaal vormen, dwars door het membraan van de bacterie heen. Door dit kanaal lekken belangrijke stoffen weg, waardoor de bacterie dood gaat. Op zichzelf is dit een interessant proces om te bestuderen, omdat veel antibiotica op deze manier werken.

Daarnaast zijn de cylinderstructuur en het vormen van een kanaal bestaande uit helices veel voorkomende eigenschappen van membraaneiwhitten. Onder andere een groot aantal transporteiwhitten en eiwhitten die verant-

woordelijk zijn voor de transmissie van zenuwimpulsen lijken in veel opzichten op het simpele Alm. Dit maakt Alm een soort model systeem voor ingewikkelder eiwitten, die weliswaar belangrijker zijn, maar ook veel lastiger te bestuderen.

In hoofdstuk 4 wordt het gedrag van een alamethicine molecuul in water (de eerste stap in figuur 3) en in een membraan (de vierde stap) bestudeerd. In hoofdstuk 5 heb ik gekeken naar de eigenschappen van een kanaal, dat gevormd is door zes alamethicine helices (de laatste stap in figuur 3). De andere stappen in figuur 3 worden momenteel nog verder onderzocht.

Hoofdstuk 6

Eën van de aardigste conclusies van mijn onderzoek is dat moleculaire dynamica simulaties zo nauwkeurig kunnen zijn dat simulaties als experimentele techniek gebruikt kunnen worden. In de biochemie wordt veel aandacht besteed aan de interacties tussen lipiden en eiwitten in membranen. In sommige gevallen zijn die interacties uit te rekenen met een computermodel. In dit hoofdstuk heb ik berekend hoe de aanwezigheid van eiwitten van verschillende lengte en grootte de naburige lipiden beïnvloedt. Het blijkt dat de invloed van eiwitten op naburige lipiden heel logisch en systematisch is: als een eiwit kort is vergeleken met de lipiden er omheen, gaan de lipiden scheef liggen om zich aan te passen aan de lengte van het eiwit. De lipiden rekken zich uit als een eiwit langer is dan de lipiden. Als een eiwit ongeveer even lang is als de lipiden, maar heel groot, gaan alle naburige lipiden ook scheef liggen.

Hoofdstuk 7

Meestal maken we gebruik van reeds bekende gegevens om nieuwe informatie over een bepaald eiwit of een bepaalde theorie te vinden. Maar het is ook mogelijk om zelf "eiwitten" te ontwerpen, vervolgens zo'n eiwit ook inderdaad te maken (synthetiseren), te bestuderen en te vergelijken met eiwitten die in de natuur voorkomen. Er zijn al verschillende "gewone" eiwitten (eiwitten die goed oplossen in water) ontworpen en gemaakt, met soms spectaculaire resultaten. In de praktijk blijkt het echter om technische redenen heel moeilijk te zijn om membraaneiwitten te maken. De vraag in hoofdstuk 7 is of simulaties van een eiwitontwerp iets kunnen zeggen over de waarschijnlijkheid dat zo'n ontwerp inderdaad experimenteel gemaakt kan worden. Als een simulatie kan aantonen dat een ontwerp voor een eiwit niet klopt, betekent dat dat het geen zin heeft om te proberen het eiwit te synthetiseren. Dit kan veel tijd en tienduizenden guldens besparen. Volgens mij is MEMBUN een goed ontwerp, maar we zullen het pas zeker weten als iemand er in slaagt MEMBUN experimenteel te maken en de structuur te bepalen.

Hoe nu verder?

Mijn onderzoek kan op vele manieren worden uitgebreid. Moleculaire dynamica kan als experimentele techniek gebruikt worden om specifieke vragen over membraaneiwitten te beantwoorden. Dit wordt interessanter naarmate er meer informatie over membraaneiwitten beschikbaar komt. Moleculaire dynamica simulaties kunnen ook gebruikt worden bij het verfijnen van structuren die alleen in grote lijnen bekend zijn. Hoofdstukken 5 en 7 zijn hier voorbeelden van, maar we hebben met dit doel ook simulaties uitgevoerd van een eiwit uit het griepvirus en van een transporteiwit uit menselijke cellen.

Daarnaast zijn er verschillende logische nieuwe toepassingen waarvoor de methode nog verder ontwikkeld moet worden. Hoewel onze modellen voor veel toepassingen niet zo gek zijn, zijn ze in sommige gevallen te beperkt.

In echte cellen ondervindt het celmembraan een sterk elektrisch veld. Dit veld is cruciaal voor de werking van cellen en veel membraaneiwitten. Het kan bijvoorbeeld het transport van geladen deeltjes, *ionen*, door membraaneiwitten reguleren. Het is nog niet duidelijk hoe een elektrisch veld op te nemen is in onze computermodellen.

Er zijn ook processen die te langzaam zijn om met een computer en de methodes die ik gebruik heb uit te rekenen. Het transport van ionen bijvoorbeeld is zo langzaam dat een computer meer dan een jaar zou moeten rekenen om een enkel ion door een transporteiwit te zien kruipen. Toch zijn er wel technieken om naar dit verschijnsel te kijken. Het ligt voor de hand die ook toe te voegen aan de modellen.

Simulaties bevatten op dit moment tienduizenden atomen, waarvoor de computer allemaal krachten uit moet rekenen. Omdat we slechts geïnteresseerd zijn in een beperkt aantal atomen zou het nuttig zijn als het overige deel op een manier gesimuleerd kon worden die minder rekentijd kostte. Dit is heel gebruikelijk in theoretisch werk: probeer te versimpelen wat niet echt belangrijk is, zodat de aandacht gericht kan worden op die delen die wel van belang zijn. Zo'n versimpeling is meestal niet gemakkelijk, maar het zou het mogelijk maken om veel langzamere processen te volgen dan ik nu gedaan heb.

Op dit moment is het onderzoek door middel van computersimulaties nog van tamelijk fundamentele aard. Het draagt bij aan een beter begrip van belangrijke moleculen, maar is praktisch gezien nog van weinig belang voor toepassingen in bijvoorbeeld de farmacie. Gezien de snelle ontwikkelingen in de laatste paar jaar denk ik dat simulaties aan membraanmodellen in de nabije toekomst steeds interessanter zullen worden, zowel voor fundamenteel als voor toegepast onderzoek. Ik heb er in elk geval drie jaar lang met (meestal) veel plezier aan gewerkt!

Dankwoord

Ik wil iedereen bedanken die in de loop der jaren heeft bijgedragen aan mijn proefschrift. Een aantal mensen wil ik met name noemen: Herman voor zijn soepele manier van begeleiden en zijn vertrouwen in mijn zelfstandigheid; David, Berk en Anton voor hun hulp met Gromacs; Frans voor zijn goede ideeën op het gebied van visualisatie en het bereidwillig in en uit elkaar schroeven van de oude Gromacs machine; Bert voor zijn essential dynamics programma's; Siewert-Jan voor zijn tijdverslindende projecten en wilde ideeën; en alle leden van de MD groep voor een leuke werkomgeving en nuttige discussies.

I'm grateful to Steve for many things. It has been a pleasure to share an office with you. I would like to thank Christin for introducing me to the field of protein design and the interesting struggles with MEMBUN; Mark, Lucy, and the other group members for enjoyable stays in Oxford and a pleasant collaboration; Murray, Alison and Josh for being a source of welcome distraction on internet.

Mijn ouders hebben in de laatste acht jaar, waarin ik steeds vreemdere dingen ben gaan bestuderen, steeds geprobeerd om op de hoogte te blijven. Ik heb hun belangstelling en hun commentaar zeer gewaardeerd. Het was leuk om met Irene aan onderzoek te werken en ervaringen uit te wisselen. Heerko ben ik bijzonder dankbaar voor de tekeningen aan het begin van elk hoofdstuk en voor zijn hulp bij het maken van de omslag. Ik hoop dat jullie allebei verder kunnen in de richtingen die jullie gekozen hebben. Tenslotte heb ik het grote geluk gehad mijn tijd als Aio te delen met Hadewych, die een belangrijke rol heeft gespeeld bij alles wat er in de laatste jaren is gebeurd. Ik hoop dat we in de toekomst een balans kunnen vinden in onze keuzes.