

TØ 17 – Lipider og cellemembraner

Table of contents

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Opgave 1. Membransammensætning | 2 |
| 1.1 | Sammenlign membransmeltetemperaturer | 2 |
| 1.2 | Forudsig fedtsyresammensætning ved temperatur | 2 |
| 1.3 | Sammenlign hopanoider og kolesterol | 2 |
| 1.4 | Forudsig hopanoidernes membraneffekt | 3 |
| 2 | Opgave 2. Helical wheel | 4 |
| 2.1 | Beregn hydrofob membranbredde | 4 |
| 2.2 | Fortolk helical wheel-plot | 4 |
| 2.3 | Analysér amfipatisk helix | 4 |
| 2.4 | Vis prostaglandins ligander i PyMOL | 5 |
| 2.5 | Analysér elektrostatisk membranlokalisering | 5 |
| 2.6 | Analysér TM-helicernes elektrostatik | 5 |
| 3 | Opgave 3. Hydropatiplot | 6 |
| 3.1 | Analyser hydropatiplot | 6 |
| 3.2 | Vurdér analysens usikkerheder | 6 |
| 4 | Opgave 4. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) | 7 |
| 4.1 | Identificér TM-helicer i BCRP-hydropatiplot | 7 |
| 4.2 | Anslå antal og placering af TM-helicer | 8 |
| 4.3 | Find ATP-bindende kassette i sekvens | 8 |
| 4.4 | Tegn BCRP-topologi i membran | 8 |
| 4.5 | Angiv mulige N-glykosyleringssites | 8 |
| 4.6 | Fortolk glykosyleringsanalysen | 9 |
| 5 | Opgave 5. 5'-Nucleotidase | 10 |
| 5.1 | Beskriv 5'-nucleotidasens reaktion | 10 |
| 5.2 | Forklar detergentens rolle i oprensning | 10 |
| 5.3 | Bestem kvarternær struktur | 10 |
| 5.4 | Forklar interfaselokalisering | 10 |
| 5.5 | Lokalisér fragmenter i sekvensen | 12 |

1 Opgave 1. Membransammensætning

1.1 Sammenlign membransmeltetemperaturer

For to membransystemer, hvor den ene er sammensat af phospholipider med mættede acylkæder på 20 kulstofatomer og den anden af kæder af samme længde men med *cis*-dobbeltbindinger på både C-5, C-8, C-11 og C-14, hvilke forskelle i smeltetemperatur vil du så forvente?

Bakterier med visse mutationer er ikke i stand til at syntetisere fedtsyrer og inkorporerer derfor fedtsyrer fra mediet i deres membraner.

1.2 Forudsig fedtsyresammensætning ved temperatur

Antag at du har to kulturer, der hver indeholder en blanding af forskellige typer lige-kædede fedtsyrer, nogle mættede og andre umættede og med varierende kædelængde fra 10-20 kulstofatomer. Hvis den ene kultur fastholdes ved 18°C og den anden ved 40°C over flere generationer, hvilke forskelle vil du så forvente at opleve i sammensætningen af de to kulturers cellemembraner?

1.3 Sammenlign hopanoider og kolesterol

Hopanoider er pentacykliske molekyler, der findes i bakterier og visse planter. En typisk hopanoidstruktur er vist nedenfor. Sammenlign strukturen med kolesterol.

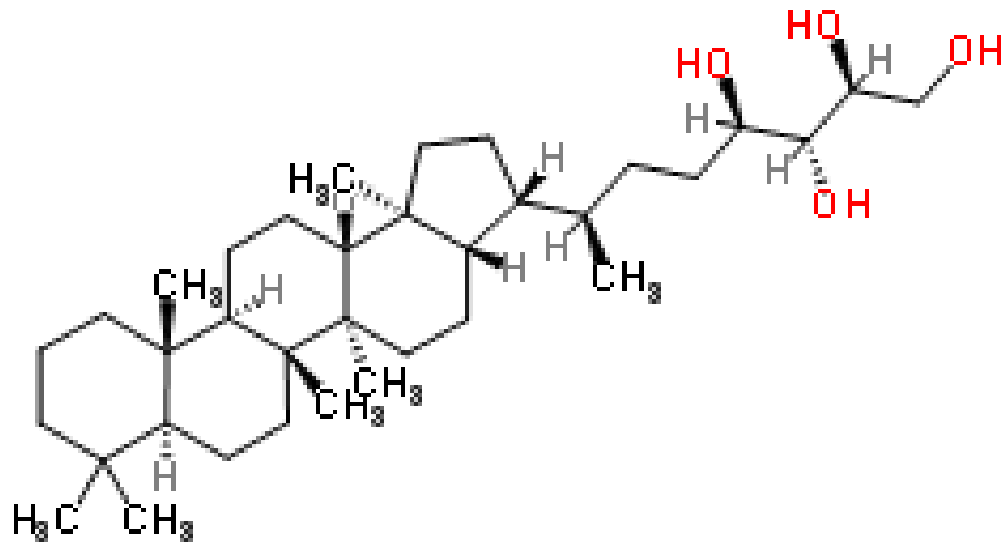
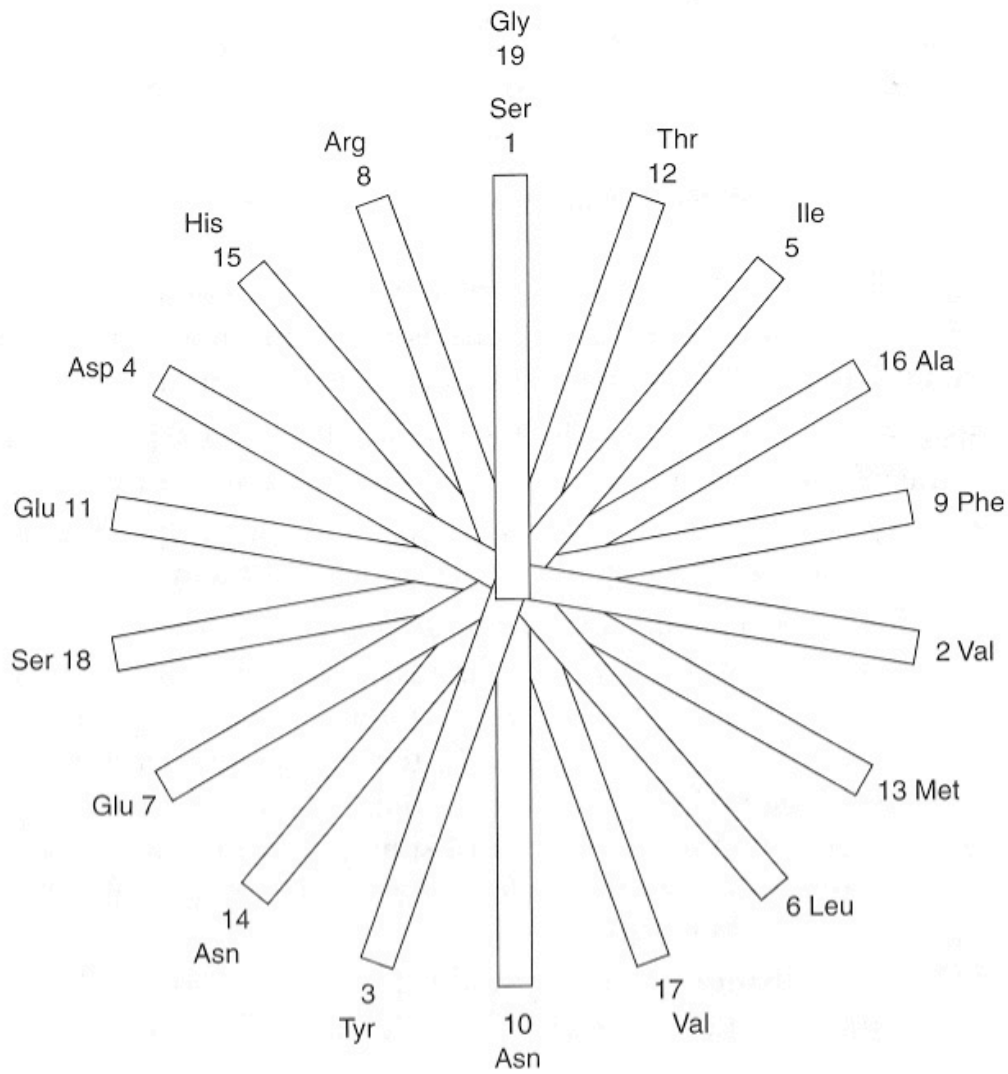


Figure 1: bacteriohopanetetrol

1.4 Forudsig hopanoidernes membraneffekt

Hvilken effekt vil du forvente at hopanoid har på den bakterielle cellemembran?

2 Opgave 2. Helical wheel



Membranspændende helicer består typisk af 18 to 20 aminosyrer.

2.1 Beregn hydrofob membranbredde

Beregn bredden af den hydrofobe del af cellemembranen baseret på dette.

2.2 Fortolk helical wheel-plot

Sekvensen af sådan en helix kan plottes i et såkaldt **helical wheel**, der viser positionen af hver aminosyrerest rundt om helicens akse.

Forklar hvilke egenskaber ved transmembrane helicer, der kan forudsiges på baggrund af et **helical wheel**-plot.

2.3 Analysér amfipatisk helix

I eksemplet nedenfor, analysér positionen af de hydrofobe og hydrofile aminosyrerester. Hvordan stabiliseres de hydrofile sidekæder inde i membranen?

Ser-Val-Tyr-Asp-Ile-Leu-Glu-Arg-Phe-Asn-Glu-Thr-Met-Asn-His-Ala-Val-Ser-Gly

2.4 Vis prostaglandins ligander i PyMOL

Lav en scene, kaldet F1, der viser prostaglandin (PDB-ID: 1PTH). Hvilke ligander er bundet? Hvilke tror I findes i den native struktur og hvilke er produkt af krystalliseringsmetoden?

2.5 Analysér elektrostatisk membranlokalisering

Analyser den elektrostatiske overflade af prostaglandin. Lav en scene, kaldet F2, der viser dette. Hvordan er prostaglandin lokaliseret til membranen - forklar ud fra det beregnede elektrostatiske potentiale?

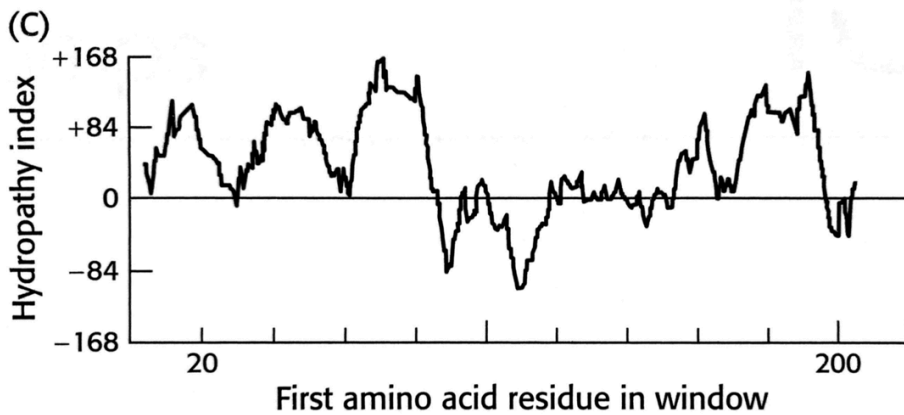
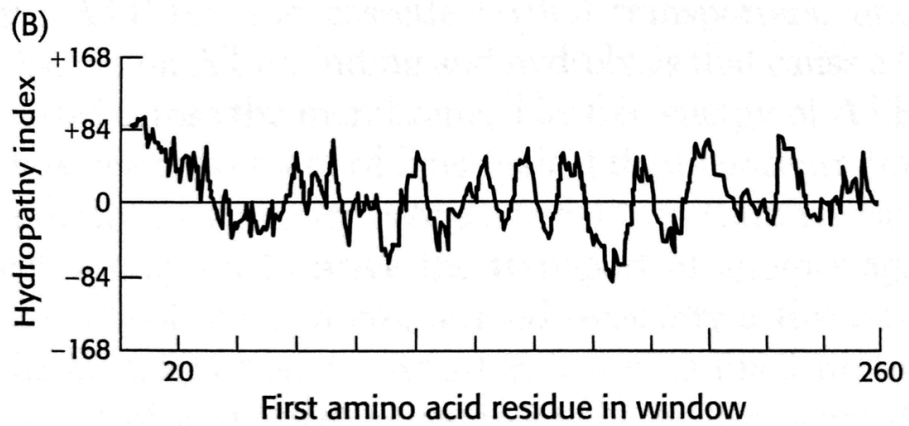
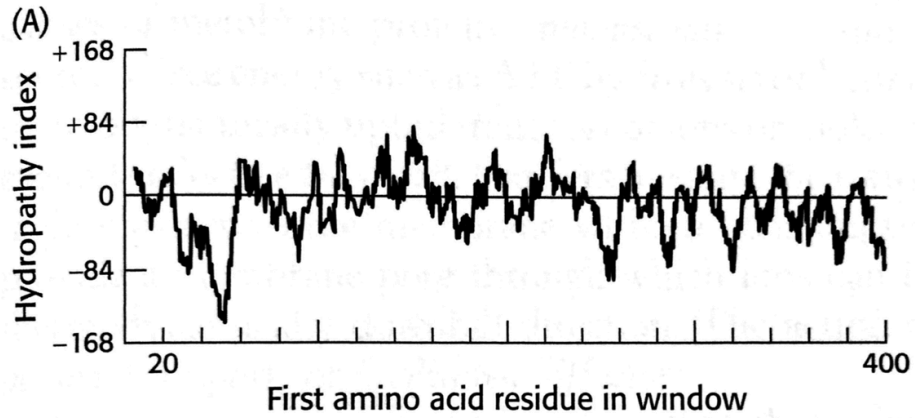
2.6 Analysér TM-helicernes elektrostatik

Kig nærmere på alphahelicerne mellem rest 74 og 124 og undersøg deres elektrostatiske overflade. Hint: Lav alphahelicerne et objekt. Analyser de enkelte helices ligesom I gjorde med helix-wheel plottet. Stemmer det overens med det forventede?

3 Opgave 3. Hydropatiplot

3.1 Analyser hydropatiplot

Analysér nedenstående hydropatiplot for tilstedeværelse af transmembrane segmenter:



3.2 Vurdér analysens usikkerheder

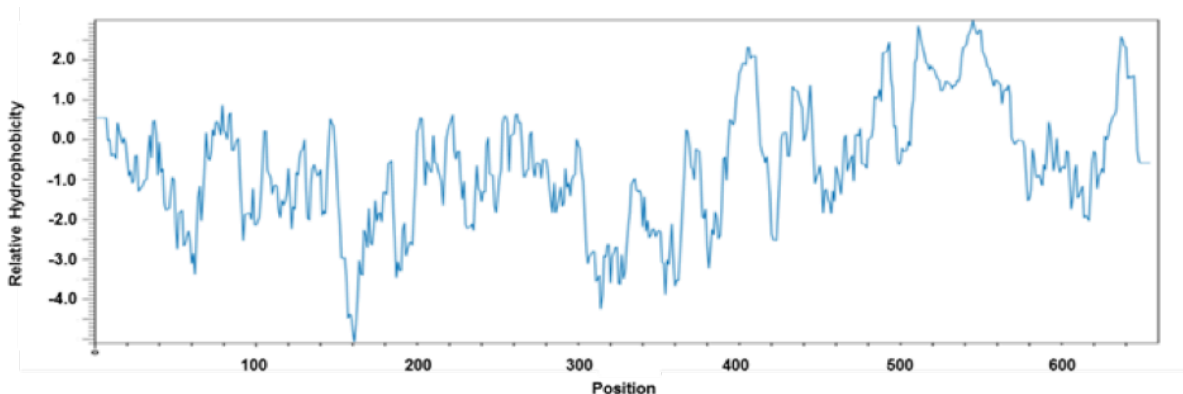
Hvilke usikkerheder ligger der i analysen?

4 Opgave 4. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)

Kvinder med brystkræft udvikler af og til resistens mod et bredt spektrum af cytotoxiske medikamenter brugt i kemoterapien. Baggrunden for dette synes at ligge i en opregulering af ekspresion af en række multidrug-resistance proteiner tilhørende gruppen af membranassocierede ABC-transportere. BCRP er en sådan transporter, hvis aminosyresekvens udledt fra cDNA er vist nedenfor.

```
1           20           40           60
MSSSNVEVFI PVSQGNTNGF PATASNDLKA FTEGAVLSFH NICYRVKLKS GFLPCRKPVE
           80           100          120
KEILSNINGI MKPGLNAILG PTGGGKSSLL DVLAARKDPS GLSGDVLING APRPANFKCN
           140          160          180
SGYVVQDDVV MGTTLVRENL QFSAALRLAT TMTNHEKNER INRVIQELGL DKVADSKVGT
           200          220          240
QFIRGVSGGE RKRTSIGMEL ITDPSILFLD EPTTGLDSS T ANAVLLLLKR MSKQGRTIIF
           260          280          300
SIHQPRYSIF KLFDSLTLA  SGRLMFHGPA QEALGYFESA GYHCEAYNNP ADFFLDIING
           320          340          360
DSTAVALNRE EDFKATEIIE PSKQDKPLIE KLAEIYVNAS FYKETKAELH QLSGGEKKKK
           380          400          420
ITVFKEISYT TSFCHQLRWV SKRSFKNLLG NPQASIAQII VTVVLGLVIG AIYFGLKNDS
           440          460          480
TGIQNRAGVL FFLTTNQCFS VSAVELFVV EKKLFIHEYI SGYYRVSSYF LGKLLSDLLP
           500          520          540
MRMLPSIIFT CIVYFMLGLK PKADAFFVMM FTLMMVAYSA SSMALAIAG QSVVSVATLL
           560          580          600
MTICFVFMMI FSGLLVNLT IASWLSWLQY FSIPRYGFTA LQHNEFLGQN FCPGLNATGN
           620          640
NPCNYATCTG EEYLVKQGID LSPWGLWKNH VALACMIVIF LTIAYLKLLF LKKYS
```

Hydrofobicitetsanalyse af BCRP giver desuden følgende resultat:



4.1 Identificér TM-helicer i BCRP-hydropatiplot

Hvilke egenskaber af hydropatiplottet understøtter idéen om at BCRP indeholder transmembrane helicer?

4.2 Anslå antal og placering af TM-helicer

Anslå antallet og den omtrentlige placering af de transmembrane helicer i BCRP.

4.3 Find ATP-bindende kassette i sekvens

ABC-transportere indeholder en såkaldt ATP-bindende kassette og benytter energien fra ATP til selve eksportprocessen.

Foreslå hvilken del af sekvensen ovenfor, der indeholder den ATP-bindende kassette.

4.4 Tegn BCRP-topologi i membran

For at forstå foldningen af membranproteinet indsatte man et peptid med sekvensen YPYDVDPDYA på 12 forskellige positioner i BCRP-sekvensen. De resulterende konstrukter (samt vildtype BCRP og en negativ kontrol) blev herefter transfekteret i epithelceller og analyseret for evnen til at binde et radioaktivt mærket antistof rejst mod YPYDVDPDYA-sekvensen. Resultatet af analysen er vist i tabellen nedenfor.

| Konstrukt | Substitution (position fra-til) | Radioaktiv mærkning |
|-----------------|------------------------------------|---------------------|
| vildtype | | - |
| negativ kontrol | | - |
| N-term | 2 - 10 | - |
| 1 | 405 - 413 | - |
| 2 | 416 - 424 | ++ |
| 3 | 450 - 458 | - |
| 4 | 455 - 463 | - |
| 5 | 475 - 483 | - |
| 6 | 485 - 493 | - |
| 7 | 498 - 506 | + |
| 8 | 540 - 548 | - |
| 9 | 570 - 578 | ++ |
| 10 | 635 - 643 | - |
| C-term | 655 - 663 | - |

Topologisk analyse af BCRP. ++ stærk, + medium og - ingen mærkning.

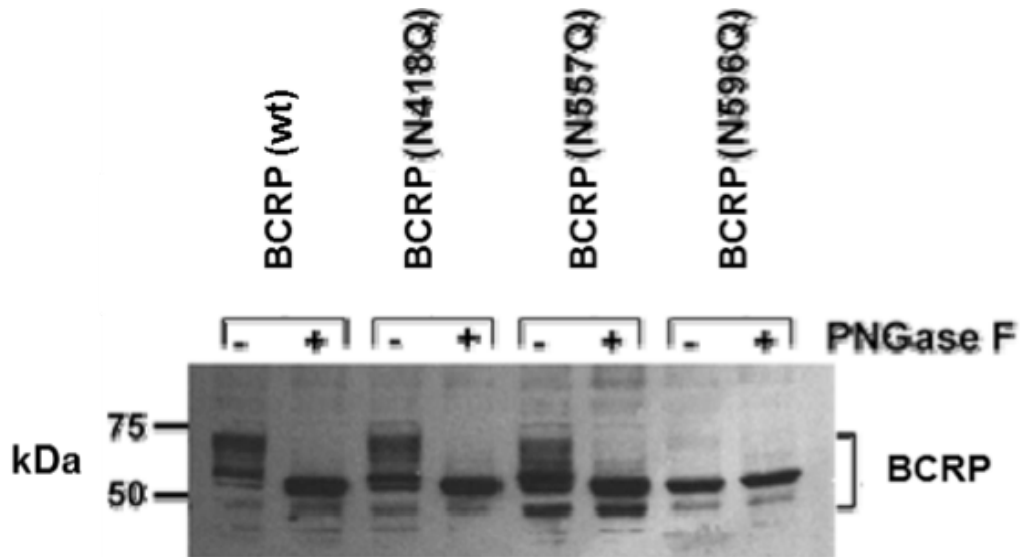
Lav en skitse af BCRP som det er indlejret i cellemembranen. Er N- og C-terminalerne placeret på samme eller modsatte side af membranen?

4.5 Angiv mulige N-glykosyleringssites

Angiv mulige N-glykosyleringssites i sekvensen for BCRP.

4.6 Fortolk glykosyleringsanalysen

For at undersøge om BCRP er glykosyleret, muterede man desuden specifikke asparaginrester. Proteinekstrakter fra celler transfekteret med mutant BCRP blev derefter analyseret ved SDS-PAGE før og efter behandling med PNGase F. Resultatet af analysen vises nedenfor.



Hvad fortæller analysen om glykosyleringerne i BCRP? Begrund dit svar.

5 Opgave 5. 5'-Nucleotidase

Enzymet 5'-nucleotidase (5'-ribonucleotide phosphohydrolase) er et glycoprotein, der findes associeret med plasmamembranen i mange celler. Enzymet kan forholdsvis let isoleres fra placenta ved brug af detergenter og har en masse på 71 kDa som bedømt med SDS-PAGE.

5.1 Beskriv 5'-nucleotidasens reaktion

Hvilken type reaktion antyder navnet at 5'-nucleotidase udfører?

5.2 Forklar detergentens rolle i oprensning

Ved gelfiltrering af det ekstraherede enzym på Sephacryl S-300-søjle under tilstedeværelse af 0.1% Triton X-100 (en detergent), eluerer enzymet svarende til et 150 kDa protein. Uden detergent eluerer enzymet i void-volumen som vist nedenfor.

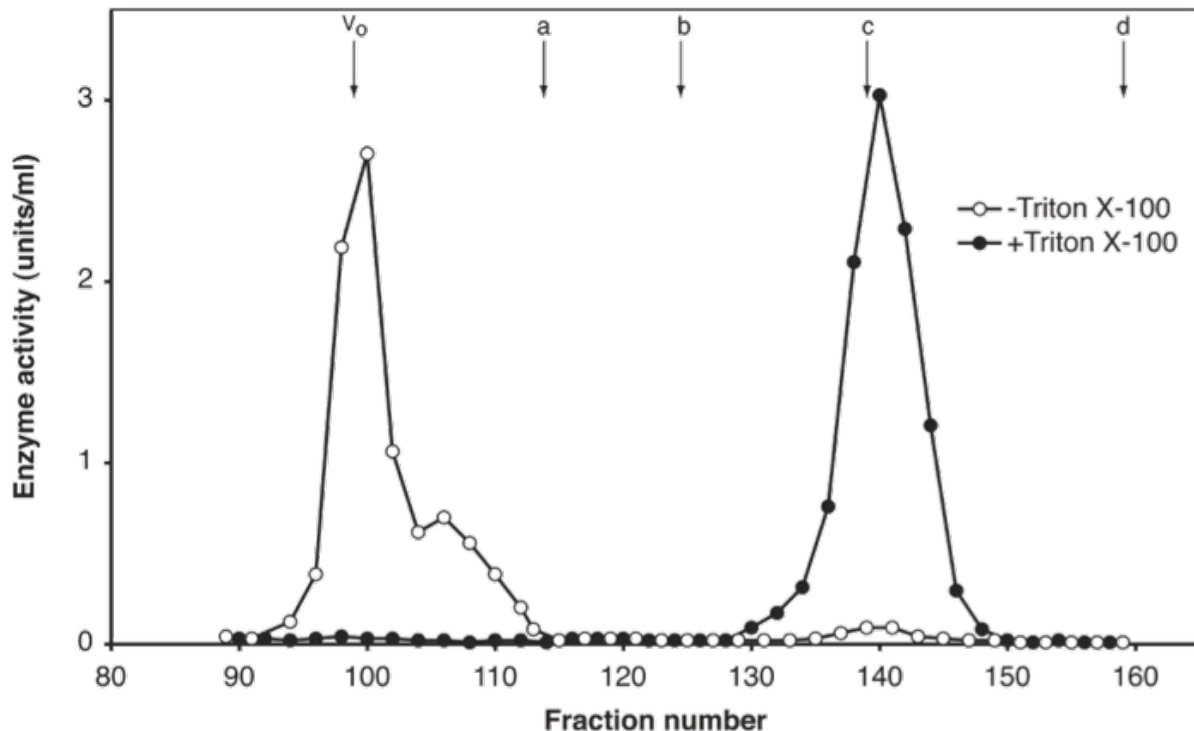


Figure 2: Gelfiltrering af 5'-nucleotidase med (fyldte cirkler) eller uden (hule cirkler) Triton X-100 til stede. Pilene angiver positionen af (a) thyroglobulin (670 KDa), (b) ferritin (440 KDa), (c) immunoglobulin G (160 KDa) og (d) serum albumin (68 KDa). V_0 er søjlens void-volumen.

Beskriv den rolle, detergenten spiller i oprensningen.

5.3 Bestem kvarternær struktur

Hvad er den mest sandsynlige kvarternære struktur af enzymet, når det er bundet til cellemembranen?

5.4 Forklar interfaselokalisering

Aminosyresekvensen af human placental 5'-nucleotidase afledt fra cDNA er vist nedenfor. Enzymet syntetiseres med et signalpeptid på 26 rester samt et stærkt hydrofobt område umiddelbart før stopkodon.

```

1                               30                               60
MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSSESSK CVNASRCMGG
                               90                               120
VARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
                               150                              180
DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPGDEV VGIVGYTSKE
                               210                              240
TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLTN NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV
                               270                              300
GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIIVTSD DGRKVPVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
                               330                              360
ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM
                               390                              420
GNLICDAMIN NNLRHTDEM FWNHVMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT
                               450                              480
FDLVQLKGST LKKA FEHSVH RYQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCR
                               510                              540
VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP
                               570
AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ

```

For at forstå enzymets associering med membranen blev det oprensede protein opløst i 45% myresyre og nedbrudt med CNBr i 20 timer, hvorefter reaktionsblandingen blev udrystet med hexan. Efter centrifugering observerede man tre lag, øverst et lag bestående af hexan, i bunden et lag af vandig myresyre og i interfasen mellem disse, et tyndt ugenomsigtigt lag. Dette tynde lag viste sig at indeholde et 3 kDa fragment, der efterfølgende blev behandlet med en endopeptidase specifik for lysinrester. Efter endnu en hexanekstraktion kunne man isolere et dipeptid fra interfasen.

Hvorfor findes 3 kDa-fragmentet og dipeptidet i interfasen mellem hexanfasen og den vandige fase?

5.5 Lokalisér fragmenter i sekvensen

| cyklus | CNBr-fragment | | Lysyl endopeptidase-fragment | |
|--------|---------------|---------------|------------------------------|--------|
| | aminosyre | mængde (pmol) | aminosyre | mængde |
| 1 | Lys | 288 | Phe | 145 |
| 2 | Val | 272 | Ser | 46 |
| 3 | Ile | 252 | X | |
| 4 | Tyr | 236 | X | |
| 5 | Pro | 118 | | |
| 6 | Ala | 302 | | |
| 7 | Val | 266 | | |
| 8 | Glu | 118 | | |
| 9 | Gly | 166 | | |
| 10 | Arg | 128 | | |
| 11 | Ile | 154 | | |
| 12 | Lys | 130 | | |
| 13 | Phe | 110 | | |
| 14 | Ser | 72 | | |
| 15 | X | | | |
| 16 | X | | | |

Tabel 1. Aminosyresekvensen af de oprensede fragmenter. X: Stoffet kunne ikke identificeres.

| Komponent | CNBr-fragment | Lysyl endopeptidase-fragment |
|-----------------------|---------------|------------------------------|
| serin | 1.1 (1) | 1.2 (1) |
| glutamin | 1.3 (1) | |
| prolin | 1.0 (1) | |
| glycin | 1.4 (1) | |
| alanin | 1.0 (1) | |
| valin | 1.7 (2) | |
| isoleucin | 1.6 (2) | |
| tyrosin | 0.8 (1) | |
| phenylalanin | 1.00 (1) | 1.00 (1) |
| lysin | 1.8 (2) | |
| arginin | 0.9 (1) | |
| ethanolamine | 1.9 (2) | 1.8 (2) |
| glucosamine | 0.6 (1) | 0.7 (1) |
| mannose | 2.8 (3) | 2.7 (3) |
| inositol | 1.1 (1) | 0.9 (1) |
| myristic acid (C14:0) | 0.15 | 0.12 |
| palmitic acid (C16:0) | 0.44 | 0.51 |
| stearic acid (C18:0) | 1.35 | 1.28 |
| oleic acid (C18:1) | 0.05 | 0.03 |

Tabel 2. Forholdsmæssigt indhold af forskellige komponenter i de oprensede fragmenter. Værdierne er normaliseret ved at sætte mængden af phenylalanin til 1 nmol. Nærmeste hele tal er vist i parenteser.

Aminosyresekvensen af CNBr-fragmentet og dipeptidet kan ses i Tabel 1 nedenfor mens sammensætningen af fragmenterne er vist i Tabel 2. Begge fragmenter indeholder et komplekst glykolipid og udover komponenterne listet i tabellerne indeholder fragmenterne også glycerol og phosphat. Glykosamine var desuden på formen N-acetyl glukosamine.

Lokalisér 3 kDa-fragmentet og dipeptidet i aminosyresekvensen. Hvilken rest udgør C-terminalen i det modne enzym?

Find glykolipid-bindingsrest

Hvilken aminosyrerest er kovalent bundet til glykolipidet?

Identificér GPI-membrananker

Enzymet kan frigøres fra membranen ved behandling med en inositolspecifik phospholipase C. Hvordan kunne man forestille sig at det er forankret til membranen?

Beskriv GPI-ankermodifikation

Foreslå hvordan det hydrofobe område nær C-terminalen kan være involveret i modifikation af enzymet. Hvor i cellen finder denne modifikation sted?

Bestem enzymets membranlokalisering

På hvilken side af plasmamembranen er 5'-nucleotidase lokaliseret? Diskutér mulige, biologiske roller for enzymet.