

University of Groningen

Passive membrane permeation of small molecules

Frallicciardi, Jacopo

DOI:
[10.33612/diss.219075982](https://doi.org/10.33612/diss.219075982)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2022

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Frallicciardi, J. (2022). *Passive membrane permeation of small molecules*. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.219075982>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Samenvatting

Membraanpermeabiliteit van kleine moleculen, het hoofdonderwerp van dit proefschrift, is een belangrijk onderwerp in wetenschappelijk onderzoek, maar ook op het gebied van biotechnologie, farmacie en geneeskunde. In **Hoofdstuk I** geef ik een introductie over de basiskennmerken van biologische membranen en over de huidige stand van zaken betreft lipiden, lipide fasen en de rol van de lipidenamenstelling bij membraanpermeabiliteit.

In **Hoofdstuk II** presenteer ik een (stopped-flow) fluorescentie gebaseerde methode om de permeabiliteit van water en zwakke zuren door de membraan van lipide vesikels (*in vitro*) en door het plasmamembraan van levende cellen, specifiek *Saccharomyces cerevisiae* (*in vivo*) te bepalen. In het kort, voeren we permeabiliteitsmetingen uit - buiten evenwicht - door de lipide vesikels (liposomen) van levende cellen bloot te stellen aan een osmotische verschuiving, waardoor een stroom van water en oplosbare membraan permeabele stoffen ontstaat. De *in vitro* metingen worden uitgevoerd in vesikels met de zelf-dovende fluorofoor calceïne, welke wordt gebruikt om de verandering in volume van de liposomen als reactie op de osmotische verschuiving te meten. *In vivo* experimenten worden uitgevoerd met gistcellen die de pH-gevoelige fluorofoor pHluorine tot expressie brengen, om de cytosolische verzuring te volgen bij een osmotische verschuiving door zwakke zuren. We gebruiken een goed gedefinieerd fysisch model om de kinetische data te analyseren en de permeabiliteitsmetingen te interpreteren, wat permeabiliteitscoëfficiënten oplevert die worden uitgedrukt in de eenheid cm/s. De permeabiliteitscoëfficiënten zijn onafhankelijk van de grootte van de geanalyseerde objecten, waardoor de data verkregen met lipide vesikels en met levende cellen te vergelijken zijn. We toonden aan dat de permeabiliteit van zwakke zuren als volgt toeneemt: melkzuur < mierenzuur < azijnzuur < benzoëzuur, d.w.z. van hydrofoob naar hydrofiel, zowel in synthetische lipide vesikels als in het plasmamembraan van gist. Uit de analyse van wild-type gist en een veelvoudige knockout stam waarin alle mogelijke transporters van zwakke zuren ontbreken, concluderen wij dat opname van zwakke zuren als reactie op toenemende osmolaliteit meestal gebeurt via passieve diffusie, en niet via gefaciliteerd transport. Interessant is dat de permeabiliteitscoëfficiënten in gist ongeveer twee orden van grootte lager liggen dan in lipide vesikels, en dat permeatie van melkzuur zelfs niet wordt waargenomen op tijdschalen tot 2.5 uur. De lage permeabiliteitscoëfficiënten voor het plasmamembraan van gist zijn in lijn met het vermogen van gist om grote concentratie gradiënten van zwakke zuren en bijvoorbeeld glycerol in stand te houden, in tegenstelling tot bacteriële cellen bij welke het plasmamembraan zeer permeabel is voor deze stoffen.

De reeks experimenten die in hoofdstuk II wordt gepresenteerd kan potentieel worden gebruikt voor i) het bepalen van de permeabiliteit van biologische membranen voor tal van osmolieten, ii) het beoordelen van de fysische toestand van lipide membranen, en iii)

het bestuderen van de activiteit van membraan transporters. Dit heeft geleid tot een gebruiksvriendelijk protocol voor de gestandaardiseerde uitvoer van permeabiliteitsmetingen, dat wordt gepresenteerd in **Hoofdstuk III**. We geven een stap-voor-stap beschrijving van de procedure en stellen alle benodigdheden voor data-analyse (scripts) vrij beschikbaar. Andere onderzoeksgroepen zouden onze experimentele en computationele methoden kunnen gebruiken om vergelijkbare metingen uit te voeren op andere biologische systemen en zo de permeatie van biologisch, biomedisch en biotechnologisch relevante oplosbare stoffen te bepalen. Als voorbeeld van de mogelijkheden, beschrijven we in dit hoofdstuk permeabiliteitsmetingen uitgevoerd in vesikels gemaakt van synthetische lipiden, om de permeabiliteitscoëfficiënten te bepalen voor alle aminozuren die deel uitmaken van eiwitten, met uitzondering van tyrosine en tryptofaan. We hebben aangetoond dat op een tijdschaal van 2 uur de apolaire aminozuren fenylalanine, isoleucine, leucine, methionine en valine met een aanzienlijke snelheid de membraan permeëren (in de volgorde fenylalanine > isoleucine > leucine > methionine > valine). We zien dat fenylalanine in het membraan zelf terecht komt en bij blootstelling aan cysteïne, vinden we, tot onze verassing, twee verschillende soorten die de membranen met verschillende snelheden permeëren. Wij stellen als hypothese dat cysteïne in oplossing gedeeltelijk geoxideerd wordt, waardoor het meer hydrofiele en volumineuze molecuul cystine ontstaat.

In hoofdstuk II hebben we de relatie tussen de permeabiliteit van kleine moleculen en de verzadiging van de lipide acyl ketens in vesikels van synthetische lipiden getest. De resultaten duiden op een effect van de lipidensamenstelling op de membraanpermeabiliteit. Omdat informatie over lipide-afhankelijkheid van permeatie van oplosbare stoffen verspreid, niet erg systematisch en soms tegenstrijdig is, hebben wij een systematische analyse uitgevoerd op de relevante eigenschappen van lipide membranen voor permeatie van oplosbare stoffen. In **Hoofdstuk IV** presenter ik de permeabiliteit van verschillende kleine moleculen door synthetische membranen met verschillende lipidensamenstellingen. Specifiek hebben we onze stopped-flow kinetische metingen gecombineerd met moleculaire dynamica simulaties om een gedetailleerd moleculair inzicht te krijgen in het mechanisme van de permeatie van oplosbare stoffen. Ten eerste bevestigen we de invloed van membraandikte op de permeabiliteit door vloeibare membranen. Ten tweede laten we dramatische verschillen zien in permeabiliteit wanneer membranen overgaan van de vloeibare (vloeibaar-ongeordend) naar de vloeibaar-geordende en/of naar de gel toestand, in overeenstemming met eerder werk op het gebied van diffusie van water. Ten derde vergelijken we onze *in vitro* analyse met de *in vivo* metingen in gist gepresenteerd in hoofdstuk II, en concluderen we dat het gistmembraan bestaat uit een sterk geordende en rigide toestand, vergelijkbaar met membranen bestaande uit verzadigde lipiden en sterolen.

Hoofdstuk V is een uittreksel van het grotere werk *The structure and function of the bacterial osmotically-inducible protein Y*. Hier richt ik mij op de permeabiliteit van membranen voor water en de rol van aquaporine Z (AqpZ). Verder onderzoek ik de rol van het osmotisch-

induceerbare eiwit Y, OsmY, een periplasmatisch eiwit in *Escherichia coli*, dat groeivoordelen oplevert aan cellen die leven onder hyperosmotische stresscondities. Ik heb kinetische metingen uitgevoerd op osmotisch gestreste *E. coli* cellen om de bijdrage van OsmY aan de stroom van water over het plasmamembraan te bepalen. Bij alle geteste stammen zien we een initiële plasmolyse, gevolgd door gedeeltelijk volumeherstel als gevolg van de opname van K^+ ionen en compatibele oplosstoffen aanwezig in het externe medium. Ik neem een sneller volumeherstel waar wanneer OsmY aanwezig is, maar aquaporine Z (AqpZ) en glycerol zijn ook nodig voor volumeherstel. Vervolgens heb ik permeabiliteitsmetingen uitgevoerd op AqpZ-bevattende proteoliposomen in aanwezigheid van OsmY aan beide kanten van het membraan. We nemen geen effect van OsmY waar op de permeatie van water, ondanks een directe interactie tussen OsmY en AqpZ bij hoge ionische (osmotische) sterkte. Tenslotte stel ik de betrokkenheid voor van het glycerol kanaal GlpF naast AqpZ bij de controle, alleen bij hoge osmolariteit, over water en glycerol stromen over het plasmamembraan van *E. coli*.

