

Privlačne interakcije med negativno naelektrenimi površinami v bioloških sistemih

Šarka Perutkova

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25 in Inštitut za biologijo celice, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

E-pošta: sarka.perutkova@fe.uni-lj.si

Povzetek. V članku je pokazano, da različni biološki delci, kot so na primer proteini z notranjo razporeditvijo električnega naboja, lahko posredujejo privlak med negativno naelektrenimi biološkimi površinami. V okviru najpreprostejšega modela so bili ti delci modelirani kot kroglice ali kot palice z dvema ločenima notranjima električnima nabojema, ki se nahajata na končni razdalji. S pomočjo Monte Carlo simulacij smo pokazali, da se naelektreni delci z opisano notranjo porazdelitvijo naboja elektrostatsko vežejo na negativno naelektreno površino z dovolj veliko površinsko gostoto naboja tako, da je zveznica, ki povezuje notranja naboja v posameznem delcu, v povprečju usmerjena v smeri pravokotno na naelektreno površino. S pomočjo numeričnega reševanja Poisson-Boltzmannove enačbe smo izračunali prsto energijo sistema in ter pokazali na možnost privlaka med enako naelektrenimi površinami. Kroglasti delci so se izkazali kot boljši posredniki (mediatorji) privlaka med enako naelektrenimi površinami kot pa paličasti delci.

Ključne besede: električna dvojna plast, adhezija, Monte Carlo simulacije, orientacijska entropija

Attractive interactions between negatively charged surfaces in biological systems

In the paper, it is shown that different biological particles, such as proteins with internal charge distribution may contribute to the attraction between negatively charged surfaces. We modelled such particles as thin rods or spheres. Monte Carlo simulation and theoretical models based on modified Poisson-Boltzmann equation predicted that the rod-like particles are less effective in mediating of the attractive interactions between the like-charged surfaces than the spherical particles. As a contribution to the fundamental theoretical research, the results of the paper could help in better understanding of the micro- and nanovesiculation processes. The theoretical background of the paper could also contribute to improve the orthopaedic and dental implant materials.

1 UVOD

V bioloških sistemih so makromolekule in celice obdane z vodnimi raztopinami elektrolitov z visoko dielektrično konstanto ($\epsilon_r \cong 80$). Elektrostatske lastnosti takih raztopin imajo znaten učinek na različne procese v bioloških sistemih. Elektrostatske interakcije v bioloških sistemih so zaradi svojega dolgega dosega izredno pomembne za razumevanje mnogih bioloških procesov. Elektrostatika neposredno vpliva na lastnosti bioloških membran, kot so na primer struktura, togost in dinamika membran [1]. Elektrostatske interakcije imajo tudi znaten vpliv na adhezijo membran, medcelične interakcije ali interakcije med celicami in implantati.

Eksperimenti z velikimi lipidnimi vezikli so pokazali, da se vezikli kljub svojemu negativnemu električnemu naboju lahko med seboj zlepijo po dodajanju proteinov, kot so β_2 -glikoprotein I, protitelesa IgG ali mešani proteini iz krvne plazme [2], [3], [4], [5], [6]. Eksperimentalni rezultati nakazujejo, da lahko privlačne interakcije med enako naelektrenimi površinami veziklov posredujejo proteini s pozitivnimi električnimi naboji in notranjo porazdelitvijo električnega naboja prek tako imenovanega mehanizma mostičenja [7].

Elektrostatske interakcije igrajo tudi zelo pomembno vlogo v procesih osteointegracije kostnih implantatov. Dobra kompatibilnost med implantatom in kostjo je odvisna predvsem od plasti oksida na površini implantata, ki prispeva k negativnemu površinskemu električnemu naboju implantata in zato tudi na njegov površinski električni potencial [8], [9]. Ker so osteoblasti negativno naelektreni, bi se morali od površine negativno naelektrenega implantata odbijati, če ne bi bilo posredovanega učinka mostičnih elektrostatskih sil. Pred kratkim so predlagali model vezave osteoblastov na površino implantata, ki temelji na predpostavki o predhodni (začetni) vezavi pozitivno naelektrenih proteinov na negativno naelektreno površino implantata kot potrebnem pogoju za vezavo negativno naelektrenih osteoblastov na negativno naelektreno površino implantatov [10], [11]. V tem delu naprej razvijemo in posplošimo omenjeno predpostavko ter predstavimo tudi ustrezen teoretični model in rezultate modela.

2 TEORIJA ELEKTRIČNE DVOJNE PLASTI

V teoriji so naelektrene površine v stiku z elektrolitsko raztopino opisane v okviru teorije električne dvojne plasti [1], [12], [13], [14]. Že od pionirskega dela Gouya [12] in Chapmana [13] z začetka 20. stoletja je za raziskovanje električne dvojne plasti vladalo veliko zanimanje. Tako imenovana Poisson-Boltzmannova (PB) teorija je osnovna teorija povprečnega polja, ki povezuje električni potencial s prostorsko razporeditvijo električnega naboja, ki sledi osnovnim principom statistične fizike. V PB teoriji so ioni upoštevani kot neskončno majhni točkasti nosilci električnega naboja, medtem ko je voda v raztopini elektrolitov opisana s krajevno neodvisno dielektrično konstanto z vrednostjo okoli 80. Poleg tega imajo v PB teoriji naelektrene površine enakomerno razporejeno elektrino, ki je opisana z njeno površinsko gostoto. Čeprav PB teorija kot relativno preprosta teorija dobro in precej natančno opiše nekatere fizikalne lastnosti električne dvojne plasti, pa ima tudi veliko slabosti in omejitev pri opisu nekaterih kompleksnejših sistemov in pojavov. Ti obsegajo med drugim sisteme z visoko koncentracijo ionov v raztopini, v katerih so opazili privlačne interakcije med enako naelektrenimi površinami, ter sisteme, kjer so pomembne končne velikosti ionov (naelektrenih delcev).

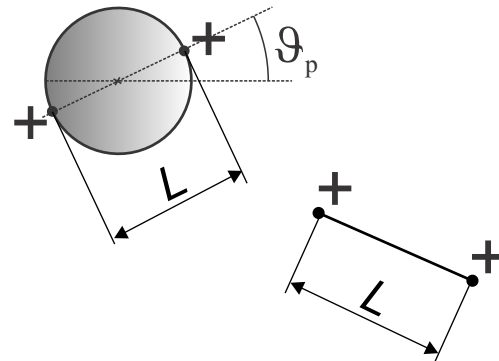
Za izračunavanje elektrostatskih interakcij med dvema naelektrenima površinama v raztopini so vzporedno s teorijami povprečnega polja uporabili tudi simulacije Monte Carlo (MC) [15], [16], [17], [18], [19]. V nasprotju s PB teorijo povprečnega polja simulacije MC upoštevajo tudi direktne elektrostatske in druge interakcije med ioni [19], lahko pa vključujejo tudi končno velikost ionov in/ali porazdelitev električnega naboja znotraj posameznega iona [7], [20]. V večini študij so simulacije MC uporabili tudi za testiranje napovedi rezultatov različnih teorij povprečnega polja [15], [16], [17], [18], [19], [20].

Privlačnih interakcij med negativno naelektrenimi površinami, ki jih pričakujemo pri lepljenju sosednjih naelektrenih fosfolipidnih veziklov ali adheziji osteoblastov na površino implantatov, ne moremo napovedati znotraj osnovne PB teorije. Pokazali pa so, da se lahko omenjene privlačne interakcije razložijo z upoštevanjem ionskih korelacij med točkastimi ioni [21], [22], [23]. Poleg tega nekateri teroretični pristopi upoštevajo tudi porazdelitev električnega naboja znotraj posameznega iona (naelektrenega delca). Nedavno so bili tako razviti novi, modificirani pristopi znotraj splošne PB teorije, ki obravnavajo orientacijo velikih divalentnih ionov z notranjo razporeditvijo naboja [7], [20], [24].

3 METODOLOGIJA

Glavno vodilo naše raziskave je bilo, da smo proteine v raztopini obravnavali kot majhne krogce ali palice z notranjo razporeditvijo naboja, to je z dvema prostorsko

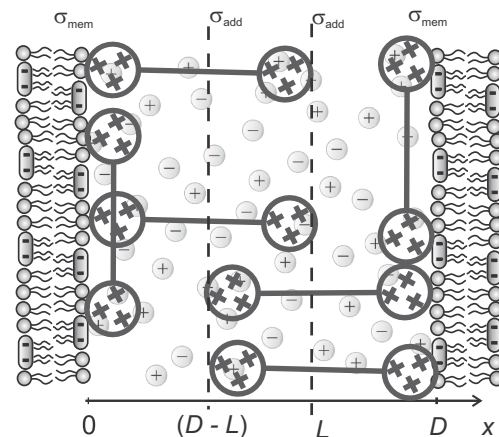
ločenima pozitivnima električnima nabojema, ki se nahajata na površini delca in sta shematsko prikazana na sliki 1.



Slika 1: Shematska slika dveh različnih modelov naelektrenih delcev z notranjo razporeditvijo električnega naboja. Razdalja med naboji in dimenzija delcev je L .

V modelu je raztopina takšnih proteinov stisnjena med dvema neskončno razsežnima naelektrenima ploščama, ki sta zunanja plast biološke membrane ali pa zunanja plast implantata, s konstantno površinsko gostoto naboja. Predlagani sistem smo obravnavali kot navzven električno nevtralen [25]. Elektrostatsko polje se lahko spreminja samo v smeri, pravokotni na naelektreno površino.

V prvem delu raziskave smo opisali elektrostatsko vezavo proteinov na naelektreno površino ter določili orientacijo proteinov v vezanem stanju s pomočjo Monte Carlo simulacij Coulombskih interakcij med proteini in naelektrenimi površinami v vodni raztopini. Simulacije MC smo izvajali za različne vrednosti gostote



Slika 2: Shematska slika sistema, v katerem so delci elektrostatsko vezani na naelektreno površino

površinskega naboja, ter za različne dolžine proteinov in valence njihovega naboja. Če so simulacije MC pokazale elektrostatsko naravo vezave in pravokotno orientacijo glede na naelektreno površino, smo v matematičnem modelu pozitivne naboje na koncih vezanih

proteinov obravnavali kot naelektrene ravnine z gostoto površinskega naboja na razdalji, ki je enaka razdalji med dvema nabojema znotraj posameznega proteina, glej sliko 2. Na podlagi rezultatov simulacij MC smo lahko reševali nelinearizirano PB-enačbo:

$$\frac{d^2\Psi(x)}{dx^2} = \kappa^2 \sinh(\Psi(x)), \quad (1)$$

kje κ je recipročna Debyejeva dolžina, reduciran elektrostatski potencial je definiran kot $\Psi = e_0\varphi(x)/kT$, e_0 je osnovni naboj elektrona, k Boltzmannova konstanta, T absolutna temperatura in φ je električni potencial.

Rešitev enačbe 1 je bila izvedena v programskem paketu Matlab za ustrezne robne pogoje:

$$\left. \frac{d\Psi}{dx} \right|_{(x=0)} = -\frac{\sigma_{\text{mem}}e_0}{\varepsilon_r\varepsilon_0kT} \quad (2)$$

$$\Psi \Big|_{(x=(D-L)_-)} = \Psi \Big|_{(x=(D-L)_+)} \quad (3)$$

$$\left. \frac{d\Psi}{dx} \right|_{(x=(D-L)_-)} = \left. \frac{d\Psi}{dx} \right|_{(x=(D-L)_+)} + \frac{\sigma_{\text{add}}e_0}{\varepsilon_r\varepsilon_0kT} \quad (4)$$

$$\Psi \Big|_{(x=(L)_-)} = \Psi \Big|_{(x=(L)_+)} \quad (5)$$

$$\left. \frac{d\Psi}{dx} \right|_{(x=(L)_-)} = \left. \frac{d\Psi}{dx} \right|_{(x=(L)_+)} + \frac{\sigma_{\text{add}}e_0}{\varepsilon_r\varepsilon_0kT} \quad (6)$$

$$\left. \frac{d\Psi}{dx} \right|_{(x=D)} = \frac{\sigma_{\text{mem}}e_0}{\varepsilon_r\varepsilon_0kT}, \quad (7)$$

kje ε_0 je dielektričnost vakuumu, ε_r je dielektričnost vodne raztopine, σ_{mem} in σ_{add} sta površinski gostoti naboja in D je razdalja med površinama (glej sliko 2).

Rešitev PB-enačbe nam je dala porazdelitev električnega naboja in odvisnost električnega potenciala vzdolž koordinate x , pravokotne na naelektreno površino. Na podlagi tega rezultata smo izračunali elektrostatski in entropijski prispevek k prosti energiji sistema [26]:

$$\frac{F}{A} = \int_L^D \frac{1}{2} \varepsilon_r\varepsilon_0 \left(\frac{d\Psi}{dx} \frac{kT}{e_0} \right)^2 + kT \sum_{i=+,-} \left(n_i \ln \left(\frac{n_i}{n_s} \right) - (n_i - n_s) \right) dx, \quad (8)$$

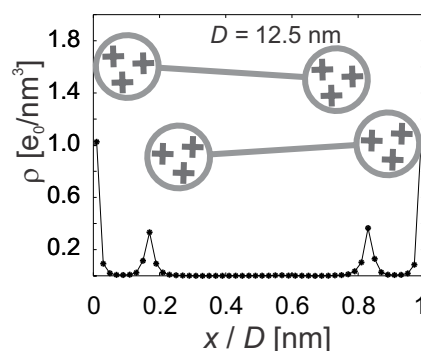
kjer je $n_i(x)$ številska gostota ionov soli ($i = +, -$) med površinama in n_s je številska gostota soli daleč stran od površin, zunaj prostora med površinama.

Algoritem za simulacije MC smo napisali v programskem jeziku C, kjer smo za izračunavanje coulombskih interakcij med pozitivno in negativno naelektrenimi proteini uporabili Leknerjevo in Sperbovo metodo [27], [28]. V skladu s standardno proceduro smo upoštevali

periodične robne pogoje [29]. S pomočjo izdelanega algoritma smo na dva načina izračunali prostorske porazdelitve naboja med naelektrenima površinama in ocenili povprečno orientacijo naelektrenih ionov znotraj izbranih rezin prostora med obema naelektrenima površinama: ali s pomočjo ureditvenega parametra ali pa s povprečnim deležem pravokotno orientiranih proteinov [30], [31].

4 REZULTATI

Na sliki 3 je pokazana izračunana volumska gostota naboja med naelektrenima površinama za paličaste delce. Iz slike je videti, da sta na razdaljah $x = D - L$ in $x = L$ maksima volumske gostote naboja, ki izhajata iz pravokotne orientacije delcev. Ko povečamo razdaljo

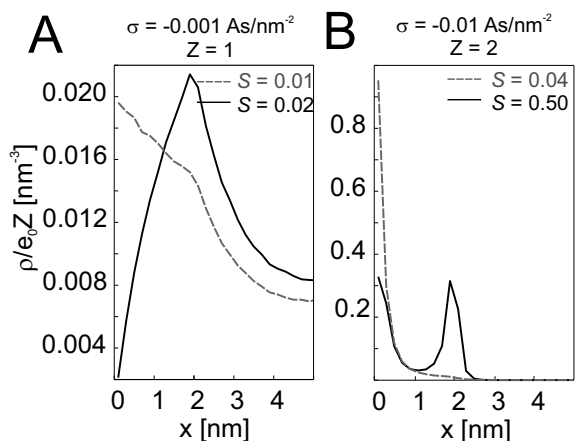


Slika 3: Volumska gostota električnega naboja med dvema naelektrenima površinama za paličaste delce. $L = 10\text{nm}$, $\sigma = -0.07\text{Asm}^{-2}$, $Z = 6$. Slika prevzeta iz [31]

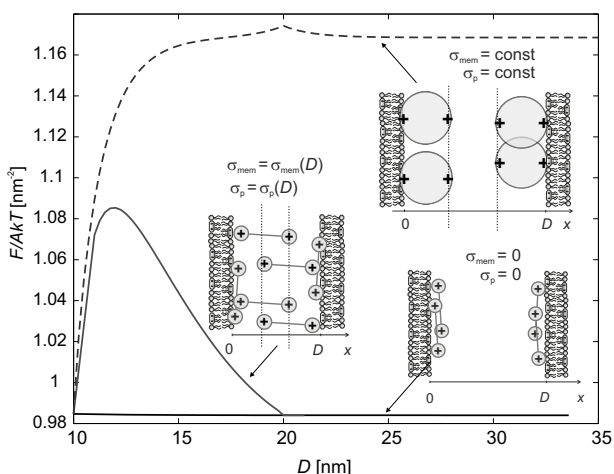
med površinama, tako da je večja od $2L$, maksimuma pri paličastih delcih izgineta, pri sferičnih delcih pa ostaneta (slika 4B). Enaki rezultati so razvidni iz vrednosti ureditvenega parametra ali števila pravokotno orientiranih delcev (glej rezultate v [30], [31]). Iz primerjave med slikama 4A in 4B lahko tudi vidimo, da je oblika volumske gostote naboja odvisna tudi od Z in σ . Pri dovolj majhnih vrednostih σ in Z se na površino ne bodo vezali niti sferični delci. Če primerjamo energije paličastih in sferičnih delcev (slika 5), vidimo, da sferični delci izkazujejo globlji energetski minimum kot paličasti delci in da paličasti delci lahko povzročijo privlak samo v omejeni razdalji od površine. Maksimalna vrednost te razdalje je $2L$ in je odvisna od naelektrenosti površin (σ) in valence naboja (Z) v posameznem delcu.

5 SKLEP

V modelu vodne raztopine s pozitivno naelektrenimi delci smo dokazali obstoj privlačnih interakcij, če so delci na površini elektrostatsko vezani in orientirani. Pri tem smo razkrili različno obnašanje sferičnih in paličastih proteinov. Paličasti naelektreni proteini posredujejo privlačne interakcije med enako naelektrenima površinama samo pri razdalji, manjši od dvojne



Slika 4: Primerjava volumskih gostot električnega naboja kroglastih in paličastih delcev pri razdaljah med površinama večjih od $2D$. S je ureditveni parameter [30].



Slika 5: Primerjava odvisnosti proste energije sistema v odvisnosti od razdalje med naelektrenima površinama D (enačba (8)) za paličaste in kroglaste delce.

dolžine delca ($2L$), medtem ko sferični delci izkazujejo povprečno pravokotno orientacijo (in s tem sposobnost posredovanja privlaka) tudi pri večjih razdaljah med naelektrenima površinama.

ZAHVALA

Raziskavo je omogočila Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) v okviru programa mladih raziskovalcev.

LITERATURA

- [1] J. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*. Academic press, 1992.
- [2] M. Frank, S. Sodin-Šemrl, B. Rozman, M. Potočnik, and V. Kralj-Iglič, "Effects of low-molecular-weight heparin on adhesion and vesiculation of phospholipid membranes: a possible mechanism for the treatment of hypercoagulability in antiphospholipid syndrome." *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1173, pp. 874–886, 2009.
- [3] J. Urbanija, B. Babnik, M. Frank, N. Tomšič, B. Rozman, V. Kralj-Iglič, and A. Iglič, "Attachment of β_2 -glycoprotein I to negatively charged liposomes may prevent the release of daughter vesicles from the parent membrane," *Eur Biophys J*, vol. 37, pp. 1085–1095, 2008.
- [4] M. Frank, M. Manček-Keber, M. Kržan, S. Sodin-Šemrl, R. Jerala, A. Iglič, B. Rozman, and V. Kralj-Iglič, "Prevention of microvesiculation by adhesion of buds to the mother cell membrane - a possible anticoagulant effect of healthy donor plasma," *Autoimmun. Rev.*, vol. 7, pp. 240–245, 2008.
- [5] M. Hammel, R. Schwarzenbacher, A. Gries, G. Kostner, P. Laggenner, and R. Prassl, "Mechanism of the interaction of β_2 -glycoprotein I with negatively charged phospholipid membranes," *Biochemistry*, vol. 40, pp. 14173–14181, 2001.
- [6] J. Urbanija, N. Tomšič, M. Lokar, A. Ambrožič, S. Čučnik, B. Rozman, M. Kandušer, A. Iglič, and V. Kralj-Iglič, "Coalescence of phospholipid membranes as a possible origin of anticoagulant effect of serum proteins," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 150(1), pp. 49–57, 2007.
- [7] J. Urbanija, K. Bohinc, A. Bellen, S. Maset, A. Iglič, V. Kralj-Iglič, and P. Kumar, "Attraction between negatively charged surfaces mediated by spherical counterions with quadrupolar charge distribution," *J. Chem. Phys.*, vol. 129, p. 105101, 2008.
- [8] N. Teng, S. Nakamura, Y. Takagi, Y. Yamashita, M. Ohgaki, and K. Yamashita, "A new approach to enhancement of bone formation by electrically polarized hydroxyapatite," *J. Dent. Res.*, vol. 80, pp. 1925–1929, 2000.
- [9] M. Ohgaki, T. Kizuki, M. Katsura, and K. Yamashita, "Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 57, pp. 366–373, 2001.
- [10] I. Smith, M. Baumann, and L. McCabe, "Electrostatic interactions as a predictor for osteoblast attachment to biomaterials," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 70(3), pp. 436–441, 2004.
- [11] R. Smeets, A. Kolk, M. Gerressen, O. Driemel, O. Maciejewski, B. Hermanns-Sachweh, D. Riediger, and J. Stein, "A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation," *Head & Face Medicine*, vol. 5, no. 1, p. 13, 2009.
- [12] G. Gouy, "Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte," *J. Phys. Radium*, vol. 9, p. 457, 1910.
- [13] D. Chapman, "A contribution to the theory of electrocapillarity," *Philos. Mag.*, vol. 25, pp. 475–481, 1913.
- [14] H. Butt, K. Graf, and M. Kappl, *Physics and Chemistry of Interfaces*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2006.
- [15] D. Bratko and V. Vlady, "Distribution of counterions in the double layer around a cylindrical polyion," *J. Phys. Chem.*, vol. 90, pp. 434–438, 1982.
- [16] T. Das, D. Bratko, L. Bhuiyan, and C. Outhwaite, "Polyelectrolyte solutions containing mixed valency ions in the cell model: A simulation and modified Poisson-Boltzmann theory," *J. Phys. Chem.*, vol. 107, pp. 9197–9207, 1997.
- [17] L. Bhuiyan, C. Outhwaite, and D. Bratko, "Structure and thermodynamics of micellar solutions in the modified Poisson-Boltzmann theory," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 193, pp. 203–210, 1992.
- [18] A. G. Moreira and R. R. Netz, "Simulations of counterions at charged plates," *Eur. Phys. J. E*, vol. 8, pp. 33–58, 2002.
- [19] J. Ibarra-Armenta, A. Martín-Molina, and M. Quesada-Pérez, "Testing a modified model of the Poisson-Boltzmann theory that includes ion size effects through Monte Carlo simulations," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 11, pp. 309–316, 2009.
- [20] Y. Kim, J. Yi, and P. Pincus, "Attractions between like-charged surfaces with dumbbell-shaped counterions," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 101, p. 208305, 2008.
- [21] F. Oosawa, "Interactions between parallel rodlike macro-ions," *Biopolymers*, vol. 6, pp. 1633–1647, 1968.
- [22] R. Kjellander, "Ion-ion correlations and effective charges in electrolyte and macro-ion systems," *Ber. Bunsenger Phys. Chem.*, vol. 100, pp. 894–904, 1996.
- [23] R. Netz, "Electrostatics of counter-ions at and between planar charged walls: from Poisson-Boltzmann to the strong coupling theory," *Eur. Phys. J. E*, vol. 5, pp. 557–574, 2001.
- [24] S. May, A. Iglič, J. Reščič, S. Maset, and K. Bohinc, "Bridging

- like-charged macroions through long divalent rod-like ions," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, pp. 1685–1692, 2008.
- [25] D. Andelman, *Handbook fo Biological Physics, Vol 1*, ch. Electrostatics properties of membranes: The Poisson-Boltzmann theory, pp. 603–642. Elsevier Science B.V., 1995.
- [26] K. Bohinc, T. Slivnik, A. Iglič, and V. Kralj-Iglič, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, Vol. 8*, ch. Membrane Electrostatics - A Statistical Mechanical Approach to the Functional Density Theory of Electric Double Layer, pp. 107 – 154. Elsevier, Amsterdam, 2008.
- [27] J. Lekner, "Summation of Coulomb fields in computer-simulated disordered systems," *Physica. A*, vol. 176, pp. 485–498, 1991.
- [28] R. Sperb, "An alternative to Ewald sums part I: Identities for sums," *Mol. Simul.*, vol. 20, pp. 179–200, 1998.
- [29] D. Frenkel and B. Smith, *Understanding molecular simulation*. San Diego: Academic press, 1996.
- [30] Š. Perutková, M. Frank, K. Bohinc, K. Bobojevič, J. Zelko, B. Rozman, V. Kralj-Iglič, and A. Iglič, "Interaction between equally charged membrane surfaces mediated by positively and negatively charged nanoparticles," *J. Membr. Biol.*, vol. 236, pp. 43–53, 2010.
- [31] Š. Perutková, M. Frank-Bertoncelj, B. Rozman, V. Kralj-Iglič, and A. Iglič, "Influence of ionic strength and beta2-glycoprotein I concentration on agglutination of like-charged phospholipid membranes," *Coll. Surf. B*, vol. 111, pp. 699–706, 2013.

Šarka Perutkova je leta 2013 doktorirala s področja elektrotehnike na Univerzi v Ljubljani. Je raziskovalka v Laboratoriju za biofiziko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Področje njenega raziskovalnega dela obsega analitične opise in simulacije elastičnih in električnih lastnosti bioloških membran.