

Cellers nano-mekanik

Af Kirstine Berg-Sørensen, Institut for Fysik, Danmarks Tekniske Universitet, Mario Fischer, Niels Bohr Institutet, Københavns Universitet og Institut for Fysik, Danmarks Tekniske Universitet, Poul Martin Hansen og Lene Oddershede, Niels Bohr Institutet, Københavns Universitet

Hvor stærk er en enkelt levende celle? Hvordan bevæger og deformerer den sig? Hvorledes udøves cellens mekaniske funktioner? Hvordan kommunikeres med omverdenen? Svaret på sådanne spørgsmål findes i grænsefladen mellem fysik, cellebiologi og molekylærbiologi – et forskningsområde som er i stor vækst internationalt. I denne artikel koncentrerer vi os om det første af spørgsmålene, og viser hvordan fysiske metoder anvendes til at finde mekaniske egenskaber af en levende celle.

Levende systemers fysik

En levende organisme er yderst kompliceret, og meget af den viden, vi har om f.eks. kroppen, bygger på observationer snarere end en egentlig forståelse. Indenfor fysikken ønsker vi primært at etablere en forståelse, hvilket er vanskeligt i en kompleks levende organisme, da det er svært at separere de væsentligste fra de mindre væsentlige parametre. Med udviklingen af fysiske metoder, der gør os i stand til at studere biologiske molekyler arbejde enkeltvis, har vi i det seneste tiår været vidne til en revolution i forståelsen af enkelte molekylers arbejdsmetoder. Når det enkelte molekyles funktion er forstået, ligger der en mindst ligeså stor udfordring i at forstå hvorledes de enkelte molekyler sammen danner og fungerer i en levende organisme. Her kan fysikere f.eks. bidrage via deres kendskab til metoder fra statistisk fysik og teoretisk kompleksitets-teori.

I denne artikel koncentrerer vi os om een enkelt-molekyle-teknik, nemlig optisk pincet metoden og hvorledes optiske pincetter kan bidrage til forståelsen af en celledes nano-mekanik. Som navnet antyder er en optisk pincet en optisk baseret teknik: Ved hjælp af en stærkt fokuseret laserstråle kan man fastholde og manipulere et enkelt molekyle, og måle sammenhængende værdier af kræfter og afstande. Metoden og nogle anvendelser er tidligere beskrevet i KVANT [1, 2, 3].

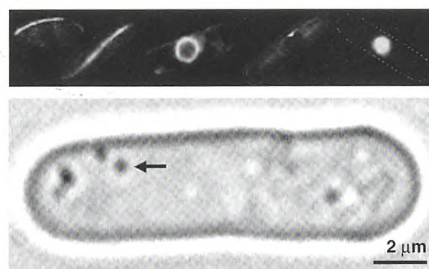
For f.eks. at undersøge hvilke mekaniske kræfter et enkelt molekyle kan udøve, er første skridt typisk at tage molekylet ud af sin biologiske sammenhæng, mindske antallet af ubekendte parametre, og få det til at fungere *in vitro*, dvs. i kunstige omgivelser, typisk i et prøvekammer. For det enkelte molekyle er det inducerede dipolmoment som oftest ikke tilstrækkeligt stort til at en optisk pincet er i stand til at fastholde og detektere det. Derfor fasthæftes et "håndtag", typisk i form af en mikrometer-stor kugle af et dielektrisk materiale som glas eller polystyren. En anden mulighed er at anvende metalliske nano-partikler, da de for små kugle radier har stort induceret dipolmoment i forhold til de spredningskræfter, som laser lyset også udøver [4]. Potentialet fra en optisk pincet kan til en meget god approksimation beskrives som harmonisk, dvs. som fra en fjeder. For at finde de kræfter, der udøves på

en dielektriske kugle i dette potentiale, og dermed kræfterne på det biologiske system, er det nødvendigt at foretage en præcis bestemmelse af fjederkonstanten. Denne karakterisering af fjederkonstanten kan foretages med stor nøjagtighed i et simpelt system, hvor en sfærisk kugle bevæger sig i vand eller en lignende væske [5]. Det bliver straks væsentligt mere kompliceret, hvis kuglen bevæger sig i et medie med både elastiske og viskøse egenskaber.

Næste skridt, efter forståelsen af molekylets virkemåde *in vitro*, er at søge at forstå hvorledes molekylet fungerer i en levende organisme. I optisk pincet gruppen på Niels Bohr Institutet har vi i de seneste år netop koncentreret os om dette og vil her omtale kvantitative optiske målinger af enkelte molekyler og organeller inde i en levende celle. Dette er en proces, som kræver mange skridt, heriblandt at fasthæfte et velkarakteriseret "håndtag" til det biologiske molekyle eller organel, hvis mekaniske egenskaber man ønsker at studere, samt at bestemme fjederkonstanten for den optiske pincet i den levende celledes indre.

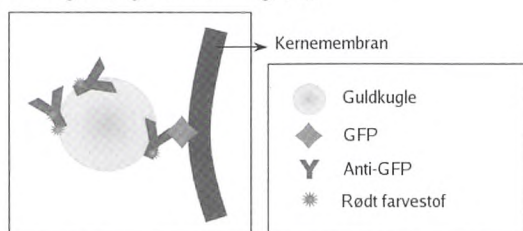
Udforskning af en celledes indre

Vi har valgt at studere gærceller af typen *Schizosaccharomyces Pombe*, der er isoleret fra afrikansk øl. Det er en type gærcelle, som er vel karakteriseret både for så vidt angår dens genetik og for ændringer i "cytoskelettet", et konstruktionsbærende netværk af fiberproteiner i cellen, under de forskellige stadier af cellens liv [6]. Mikroskop-billeder af celler er vist i figur 1.

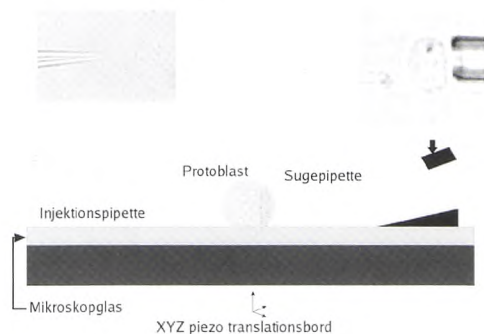


Figur 1. Gærceller af typen *S. pombe*. Øverst ses laboratoriestammer hvori forskellige organeller er koblet til grønt fluorescerende protein, GFP, f.eks. mikrotubuli og kernemembran. Et mikrotubulus er et såkaldt fiberprotein, der udgør en væsentlig del af cytoskelettet. Nederst ses en celle i almindelig lysmikroskopi. Naturligt forekommende fedtperler, granulærer, ses som sorte pletter. En af dem er markeret med en pil.

I laboratoriet dyrker vi celler, hvor forskellige organeller udtrykker et protein, der kan ses i fluorescensmikroskopi, det såkaldte *Green Fluorescent Protein* (GFP), se figur 1, øverst. Figuren viser også en celle, hvori naturligt forekommende fedtperler, granulærer, ses som mørke områder. Det inducerede dipolmoment i granulærer er stort nok til at de kan manipuleres med den optiske pincet, og i gruppen har vi tidligere anvendt disse fedtperler til at undersøge de viskoelastiske egenskaber af cellens indre [7]. Granulærene har endvidere været anvendt til at flytte rundt på cellens kerne [8]. Men da granulærene ikke er fastgjort til et bestemt organel, kan de ikke bruges som "håndtag" for kvantitativ måling og manipulation. Vores strategi er derfor at tilføre cellen eksterne partikler, der kan fastgøres f.eks. til kernemembranen og anvendes som håndtag for optisk manipulation og kvantitativ bestemmelse af de kræfter, som udøves på cellekernen f.eks. under celledeling. Det er vigtigt at vælge de tilførte partikler, så de ikke er reaktive og så de samtidig er meget små for at mindske risikoen for, at de ændrer ved naturlige processer i cellen. Da metal partikler af guld eller sølv i nm størrelse har et forholdsvis stort induceret dipolmoment og endvidere er forholdsvis inerte, er de et fornuftigt valg til håndtag [4].



Figur 2. Skitse af bindingen mellem en guldkugle forbundet med anti-GFP og f.eks. kernemembranen, i hvilken der er indkorporeret GFP. I denne skitse er guldkuglerne yderligere mærket med et rødt farvestof, men dette har vist sig unødvendigt i eksperimenterne.



Figur 3. Skitse af mikroinjektionssystemet, suppleret med mikroskopbilleder. Guldkugler injiceres via den smalle glaspipette til venstre som også vist i foto øverst til venstre. Cellen fremstår sfærisk da dens ydre cellevæg er enzymatisk nedbrudt. Til højre ses en bredere glaspipette, som via et sug fastholder cellen. Cellen er ca. $10\mu\text{m}$ i diameter.

Guldpartikler som håndtag

For at anvende nanoskopiske guld partikler som håndtag inde i cellen er det nødvendigt at få dem ind i cellen og at binde dem til det ønskede molekyle. Desværre har *S. pombe* cellen en meget stiv cellevæg og det er ikke trivielt at få guldkuglerne ind. Vi har etableret en

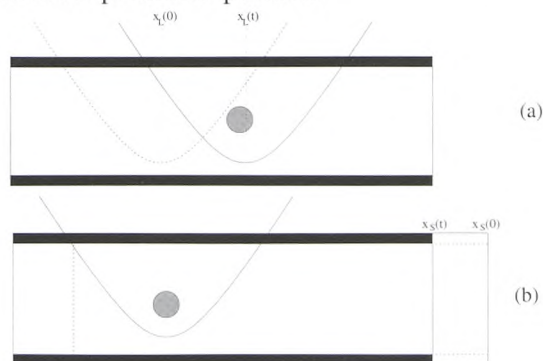
metode, som går ud på først enzymatisk at nedbryde det yderste lag af cellen, dernæst ved hjælp af en meget tynd glas pipette at injicere guld partiklerne, for til sidst at regenerere cellens ydervæg [9]. Metoden er illustreret i figur 3.

I nogle af de regenererede celler vil en eller flere guldpartikler forhåbentlig være bundet til organeller, der udtrykker GFP. Dette kunne være kernemembranen, hvorved vi har opnået det ønskede: En celle, med et håndtag fastgjort til cellekernen.

Kvantitativ kraftbestemmelse i en levende celle

Vi ønsker at udføre kvantitative målinger inde i den levende celle. Til dette formål benyttes den optiske pincet som et "kraft-meter". I indeværende afsnit skitseres nogle af de processer, man er nødt til at gennemgå for at karakterisere den optiske pincet og bruge den som kraftmåler inde i en levende celle, hvis indre, cytoplasmaet har både væskelignende (viskøse) og elastiske egenskaber. Med andre ord et "viskoelastisk" medium.

Vi betragter en partikel, der bevæger sig i et sådant viskoelastisk medie, mens den samtidig er fastholdt i fældepotentialet fra en optisk pincet. Hvis man forestiller sig at kombinere en række målinger på en sådan partikel, viser teoretiske og numeriske overvejelser, at det er muligt at bestemme såvel den optiske pincets som mediets nødvendige karakteristika [10]. Den foreslåede eksperimentelle protokol består af en kombination af to typer af målinger af tidsserier for positionen af partiklen. I type I måles positionen blot "passivt", idet man bestemmer tidsserier af partiklens position, mens den udfører Brownsk bevægelse pga. termisk støj i det viskoelastiske medie. I type II måles "aktivt": Her bestemmes partiklens respons når fældepotentialet translateres periodisk i forhold til partiklen, som skitseret i figur 4. Dette gøres igen ved at måle en tidsserie for partiklens position.

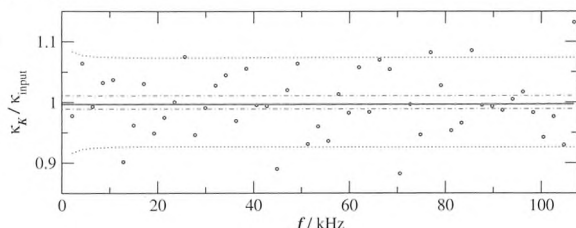


Figur 4. Principskitser, der illustrerer den aktive målestrategi, hvori partiklens relaxsation til fældens midtpunkt måles. Der er mulighed for translation af enten fælde eller partikel. I (a) forestiller man sig at translater fældepotentialet fra $x_L(0)$ til $x_L(t)$, i (b) at translater prøvekommeret med partiklen.

Information om såvel fældens som mediets karakteristika opnås ved spektral analyse og en kombination af power- og relaxsations-spektre for eksperimenter af type I og type II. Derved opnås først og fremmest et estimat af fældepotentialets fjederkonstant κ . Et estimat af κ_K opnås ved forskellige frekvenser, f_K , hvorefter disse

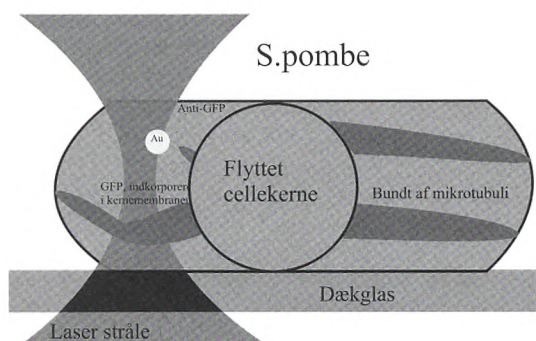
værdier kan midles til en gennemsnitlig værdi, $\kappa^{(av)}$ som illustreret i figur 5. Da cellen indeholder aktive processer, som typisk foregår ved lave frekvenser, er det oplagt at udelade disse lave frekvenser ved midlingen. Tilsvarende er det oplagt at udelade frekvenser, som er behæftet med anden form for eksperimentel støj. Dernæst kan de opnåede spektre udnyttes til estimerer for cytoplasma'ets viskoelastiske egenskaber.

Metoden er indtil videre efterprøvet ved numeriske simulationer, og figur 5 viser et eksempel på resultatet af en sådan.



Figur 5. Resultatet af en simulering hvor fældepotentialet er translateret periodisk. Datapunkterne viser forholdet $\kappa_K / \kappa_{input}$ og den "prikkede" linie indikerer den forventede stokastiske fejl. Den fuldtoptrukne linie angiver forholdet mellem den gennemsnitlige værdi $\kappa^{(av)}$ og den korrekte værdi, κ_{input} . Den stiplede linie (dot-dashed) angiver den forventede stokastiske fejl på $\kappa^{(av)} / \kappa_{input}$.

Der vil snarest blive foretaget en eksperimentel eftervisning af metoden, dels i en *in vitro* opløsning af polymerer, der udgør en væsentlig del af cytoplasma, dels i levende celler. De foreslåede metoder til karakterisation af den optiske fælde kan også anvendes til *in vivo* undersøgelser af enkelte motorproteiner, der f.eks. kan mærkes med en quantum dot [11]. Sådanne eksperimenter kan tjene til sammenligning med tidligere, præcise bestemmelser af enkelte motorproteineres mekaniske karakteristika i *in vitro* eksperimenter.



Figur 6. Principskitse der viser et muligt eksperiment: Manipulation af cellekernen vha. en guldkugle, der er fastgjort til kernemembranen.

Celledelingens mekanik

Status er, at vi er i stand til optisk at fange guld-kuglerne samt at foretage en mikroinjektion i gær-cellen *S. pombe*. Desuden har vi teoretisk værktøj til at karakterisere den optiske fælde inde i det komplekse cytoplasma. I det videre forløb påtænkes forsøg i stil med det, som er skitseret i figur 6. Her er en guld-kugle forbundet med cellekernens membran og vi forestiller

os at guld-kuglen kan fungere som håndtag på cellekernen, som vi derved kan fastholde eller manipulere og således måle hvilke kræfter der udøves på kernen under celledelingsprocessen.

Kernen er bundet til mikrotubuli, som er dynamiske proteinfilamenter, der i *in vitro* eksperimenter konstant forlænges eller forkortes. I cellen forventes de at gøre det samme. Som illustreret i figur 6, fastholder mikrotubuli kernen mellem cellens ender. Hvis f.eks. et mikrotubulus forlænges mod cellevæggen til højre i figur 6, vil reaktionen fra cellevæggen give anledning til en kraft mod venstre på cellekernen. Det bliver spændende at sammenligne de kræfter vi kan måle *in vivo* med kræfter målt for enkelte mikrotubuli-bundter i *in vitro* systemer.

Når det er lykkedes at foretage kvantitative målinger inde i levende celler, f.eks. af mikrotubuli's kraftpåvirkning af cellekernen, ligger der et væld af cellulære processer, hvis nano-mekanik venter på at blive afdækket med tilsvarende undersøgelser. Ultimativt ønsker vi at undersøge cellens kontrolmekanismer i forbindelse med celledelingen, dvs. f.eks. også spillet mellem biokemiske og mekaniske processer i cellen.

Litteratur

- [1] L. Oddershede, KVANT, 2002 **1**, 3.
- [2] H. Flyvbjerg, L. Oddershede og K. Berg-Sørensen, KVANT, 2005 **2**, 6.
- [3] P. M. Hansen, T. W. Madsen og L. Oddershede KVANT, 2005 **4**, 14.
- [4] P. M. Hansen, V. K. Bhatia, N. Harrit og L. B. Oddershede, Nano Letters **5**, 1937 (2005).
- [5] K. Berg-Sørensen og H. Flyvbjerg, Rev. Sci. Instrum. **75**, 594 (2004).
- [6] J. Hayles and P. Nurse, Nature, Nature Reviews, **2**, 647 (2001).
- [7] I. M. Tolic-Nørrelykke, E.-L. Munteanu, G. Thon, L. Oddershede, og K. Berg-Sørensen, Phys. Rev. Lett. **93**, 078102 (2004).
- [8] I. M. Tolic-Nørrelykke, L. Sacconi, C. Stringari, I. Raabe og F. S. Pavone, Current Biology, **15**, 1212 (2005).
- [9] P. M. Hansen og L. B. Oddershede, SPIE proceedings **5930**, 1 (2005).
- [10] M. Fischer og K. Berg-Sørensen, indsendt til publikation.
- [11] X. S. Xie, J. Yu og W. Y. Yang, Science, **312**, 228 (2006).



Kirstine Berg-Sørensen er teoretisk fysiker, ph.d. og lektor ved Institut for Fysik, Danmarks Tekniske Universitet. Lene Oddershede er eksperimentalfysiker, ph.d. og lektor ved Niels Bohr Institutet. Sammen startede de i 1999 *Optisk Pincet Gruppen* ved Niels Bohr Institutet, på basis af en bevilling fra FREJA programmet.