

Mikrotubuli

Henrik Flyvbjerg

HLRZ, Forschungszentrum Jülich, D-52425, Tyskland

Biologisk celledeling er en kompliceret proces. I komplicerede processer opstår let fejl. Celler benytter derfor specielle mekanismer, som minimerer, korrigerer eller helt undgår fejl. Et godt eksempel er modercellens fordeling af de dupliserede kromosomer med nøjagtig én kopi til hver af de to datterceller. Denne proces må nødvendigvis udføres fejlfrit. Fejlraten er målt for gærceller til cirka én fejl pr. 100.000 delinger. Denne 99,999% præcision skal ses i forhold til, at processen så at sige udføres i blinde:

Inden celledeling duplikeres kromosomerne til par af sammenhæftede *søster-kromatider*. Disse ruller sig sammen på sindrig vis, så de er håndterlige og kan separeres uden at blive viklet ind i hinanden. Derved får de det velkendte udseende, som let ses i et lys-mikroskop; se f.eks. forsidebilledet af dette nummer af KVANT. Selvom vi sagtens kan se kromosomerne, har cellen ikke det samme overblik over sit indre. Den er derfor udstyret med en mekanisme, som både kan *finde* kromosomerne, kan *konstatere* om de *alle* er fundet, og, når dette er bekræftet, kan *skille dem ad* på en måde, så én og kun én søster-kromatid ender i hver af de to datterceller, der dannes umiddelbart efter adskillelsen.

Denne mekanisme og dens forskellige bestanddele er under aktiv udforskning, mest af biologer og læger, selvsagt, men også af fysikere, da emnet indeholder flere fysiske problemstillinger. Eksempler gives i denne artikel.

Mikrotubuli

Celler, som ikke er i færd med at dele sig, har lige ved siden af cellekernen et center, *centrosomet*, hvorfra tynde, stive rør stråler ud i alle retninger til cellemembranen, og giver cellen dens form. Disse små rør, *mikrotubuli*, er polymerer dannet af et enkelt protein, *tubulin*. Navnet dækker over flere, meget nært beslægtede, kugleformede proteiner med en diameter på ca. 4 nm. To af dem, α - og β -tubulin, binder godt til hinanden, og udgør tilsammen en stabil *hetero-dimer* som polymeriserer til mikrotubuli. Elektronmikroskopi viser, at tubulinet i en mikrotubulus danner et to-dimensionalt, cylinderformet "krystalgitter," med en omkreds på typisk 13 hetero-dimerer. Cylinderen har en ydre diameter på ca. 25 nm og en indre diameter på ca. 14 nm; se fig. 1. Så mikrotubuli er altså krystaller, om man vil.

Fra et ingeniørsynspunkt hæfter vi os ved, at hvis man vil forme en stang med maksimal stivhed med et minimalt forbrug af materiale, så er rørformen en optimal løsning. Mikrotubuli er da også det stiveste "bygnings-element" man finder i celler. De fungerer som universelt design-element, for så vidt som at overalt i celler, hvor der er brug for en stiv konstruktion, benyttes mikrotubuli.

Større, stivere strukturer dannes ved at forbinde flere mikrotubuli, indtil flere hundrede ved siden af hinanden.



Figur 1. En mikrotubulus er en polymer af proteinet tubulin, som danner en cylinderisk "krystal" af hetero-dimerer i et spiralformet arrangement. (Grafik: I. Jánosi)

Celledeling

Inden en dyrecelle deler sig, opløses dens skelet af mikrotubuli, mens centrosomet deler sig i to; se fig. ab på forsiden af dette nummer af KVANT. Fra hvert af de to nye centrosomer vokser derefter igen mikrotubuli ud i alle retninger, se fig. bc. Man mener det er vekselvirkning mellem disse mikrotubuli, som skubber de to centrosomer bort fra hinanden. Man formoder, at skubbe-arbejdet udføres af motor-molekyler som *kinesin*, der kan spadserer langs mikrotubuli.

Dernæst opløses hinden omkring cellekernen, som holdt sammen på kromosomerne, og mikrotubuli'ene fra de to centrosomer forsøger at finde kromosomerne—som en blind persons søgende fingre—ved at polymerisere i forskellige retninger, og "vende om" ved at depolymerisere, når intet findes i en given retning—for derefter at forsøge i en ny retning. Sådan ser det ud, i det mindste, for en tolkende iagttager. For når enden på en mikrotubulus tilfældigvis finder et af to bestemte punkter midt på et par af søster-kromatider, ophører denne mikrotubulus med sin "søgende adfærd," og hiver i stedet parret hjem til det centrosom, som denne mikrotubulus voksede fra; se fig. d.

Nu er der imidlertid to punkter midt på et kromatid-par, hvor en mikrotubulus kan få fat; ét punkt på hver kromatid, placeret modsat hinanden. Så mikrotubuli fra det andet centrosom kan gribe fat i par, som det første cen-

trosom allerede har fat i, og gør det også før eller siden, for den blinde søgen fortsætter simpelthen indtil opgaven er løst, og alle par er fundet af mikrotubuli fra begge centrosomer. Mens denne søgeproces står på, foregår en voldsom puffen og masen af kromatid-par mellem hinanden, når der trækkes i dem fra to sider, og de som følge heraf alle prøver at placere sig midt mellem de to centrosomer; se fig. de.

Når alle kromatid-par er fundet af mikrotubuli og placeret midt mellem de to centrosomer (fig. e), skilles alle par ad samtidigt, som på kommando, og hver halvdel hives hurtigt over til hvert sit centrosom (fig. f), mens cellemembranen snøres sammen bag dem (fig. g). De to datterceller er dermed dannet. Hinder gendannes om hver af de to nye cellekerner, og de to nye celler danner hver et skelet af mikrotubuli (fig. hi). Cyklen er fulendt.

I hurtigt formerende dyre- og planteceller tager det kun 1–2 timer at kondensere kromosomerne, finde og separere dem, og dele cellen i to, mens hele cyklen varer 16–24 timer. Så den delikate delingsproces afvikles tilsyneladende effektivt, og udgør ikke nogen flaskehals i cyklen.

Vi har lige set, at cellen ikke behøver at "vide," eller kunne "se," hvor kromosomerne befinder sig. Den finder dem med en tilfældig søgeproces, som er effektiv, fordi der søges i alle retninger samtidigt. Men hvordan "ved" cellen så, hvornår alle kromosomer er fundet af begge centrosomer, og hvori består "kommandoen," som udløser sidste fase i celledelingen?

Svaret er enkelt: Det punkt på hver kromatid, som mikrotubuli'ene leder efter, udsender et kemisk signalstof, med mindre der trækkes i det. Dette kemiske signal fungerer som et input til en logisk *and-gate*: Så længe der ikke trækkes i *alle* kromatid-par fra *begge* sider, vil de, der ikke er udsat for træk, udsende signalstoffet, og søgeprocessen fortsætter. Først når alle par er "bragt til tavshed," opfattes denne tavshed som kommandoen om deres deling, og celledelingen løber til ende.

At det forholder sig således, ses i forsøg: Hvis man, når alle forbindelser mellem søster-kromatider og centrosomer er skabt, knækker en enkelt forbindelse, så sker delingen af parrene ikke. Søgeprocessen fortsætter derimod indtil en ny forbindelse er skabt, og først da sker delingen. At det er træk i det enkelte kromatid, som er afgørende, ses af, at man i den netop beskrevne situation kan narre cellen til fortsat deling ved bare at trække i det afknækkede stykke mikrotubulus, som har fat i kromatidet.

To spørgsmål

Celledeling er en udpræget livsproces. Den forløber via mange delprocesser, heriblandt mikrotubulis søgen efter kromosomerne. Er det så også en livsproces? Det er ikke et særligt meningsfuldt spørgsmål. Grænsen mellem levende og død materie bliver diffus, når vi stiller skarpt på den. Men hvad er mekanismen bag mikrotubulis skiftevis polymerisering og depolymerisering?

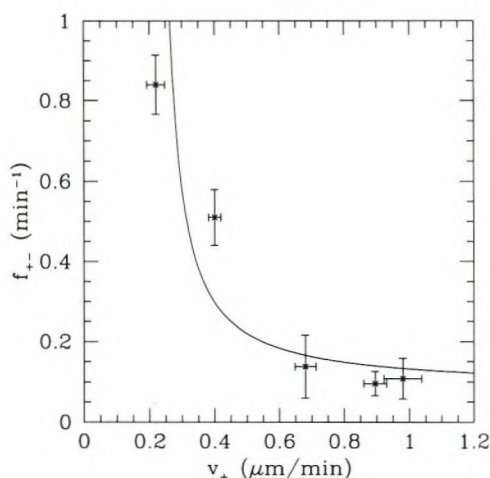
En anden mekanisme er interessant, fordi den kunne

forventes at optræde, men ikke gør det, og dette også er formålstjenligt: Når cellen indeholder tubulin i koncentrationer, som medfører vedvarende polymerisering af mikrotubuli, hvorfor vokser de så kun fra centrosomet? Hvorfor dannes mikrotubuli ikke også spontant i celleplasmaet?

Svar på disse spørgsmål detaljerer vores forståelse af livets mekanismer. Men der er ikke nødvendigvis langt fra erkendelse til praktisk anvendelse: Flere typer cancermedicin standser løbsk cellevækst ved specifikt at påvirke mikrotubulis dynamik.

Vækst af mikrotubuli – modstridende eksperimenter?

Man ved at polymerisering af mikrotubuli koster energi i form af GTP (guanosin-tri-fosfat). Kun dimerer forbundet med to GTP-molekyler kan polymerisere. Man ved også, at kort efter en dimer er indgået i en voksende mikrotubulus' krystalgitterstruktur, hydrolyseres et af disse GTP-molekyler til GDP (guanosin-di-fosfat). Man siger at tubulin-t er blevet til tubulin-d. Man forestiller sig derfor, at enden på en polymeriserende mikrotubulus består af tubulin-t, omtalt som en *GTP-hætte*, og at denne hætte udgør forskellen på de to tilstande, polymeriserende og depolymeriserende. På trods af meget eksperimentelt og teoretisk arbejde, er dette billede kontroversielt. Eksperimenterne synes at modsige hinanden:

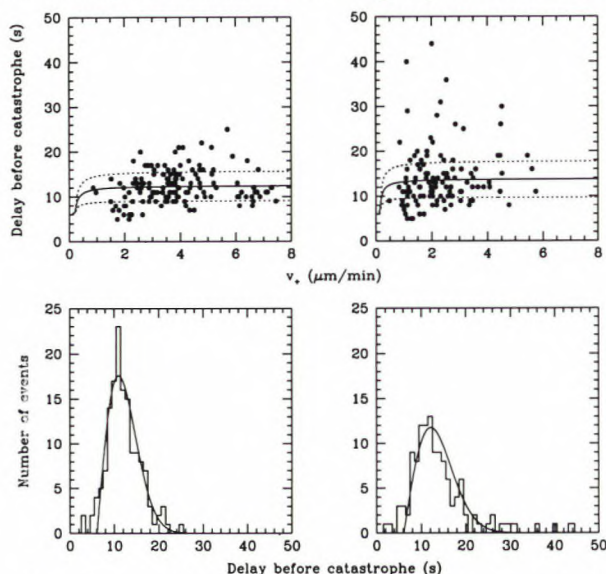


Figur 2. Katastrofe-raten som funktion af polymeriseringshastigheden ¹.

Chancen for at en mikrotubulus, som vokser ved polymerisering, skifter til depolymerisering indenfor et givet tidsrum, er mindre jo hurtigere mikrotubulus'en vokser; se fig. 2. Tilstandsskiftet kaldes meget manende en *katastrofe*, og katastroferatens aftagen med væksthastigheden forklares ved at hættens på én gang vokser med mikrotubulus'en ved polymerisering af tubulin-t og afkortes ved hydrolyse af sådan tubulin-t til tubulin-d. Begge processer er stokastiske, så hvis den sidste indhenter den første ved en tilfældighed, er hættens væk, og "katastrofen" indtruffet. Sandsynligheden for at dette sker aftager med hættens størrelse, og hættens er større, jo hurtigere mikrotubulus'en

vokser ved tilføjelse af nyt tubulin-t, så dermed synes katastroferatens aftagen med væksthastigheden forklaret, i det mindste kvalitativt.

Men hvis hurtigt voksende mikrotubuli har større GTP-hætter end langsomt voksende, må deres større hætter også være længere om at hydrolyseres bort i en situation hvor eksperimentator pludseligt standser væksten ved at skylle tubulin-opløsningen bort. Studerer man nu en enkelt mikrotubulus under mikroskop, må man altså forvente at se en ventetid fra væksten standses ved udskylning til mikrotubulus'en begynder at afkortes ved depolymerisering som følge af at hættens er væk. Man må også forvente, at denne ventetid afhænger af væksthastigheden inden udskylning, og vokser med den.



Figur 3. Øverst: Hvert punkt angiver en måling af ventetiden fra polymerisering med hastigheden v_g standses ved udskylning til depolymerisering starter. Kurverne angiver teoriens middelværdi og standardafvigelse for ventetiden som funktion af v_g . Nederst: Fordelinger af samme ventetider. Der er forskel på de to ender af mikrotubuli, da de dannes af *hetero*-dimerer. Venstre: Resultater for *plus*-enden. Højre: Resultater for *minus*-enden.

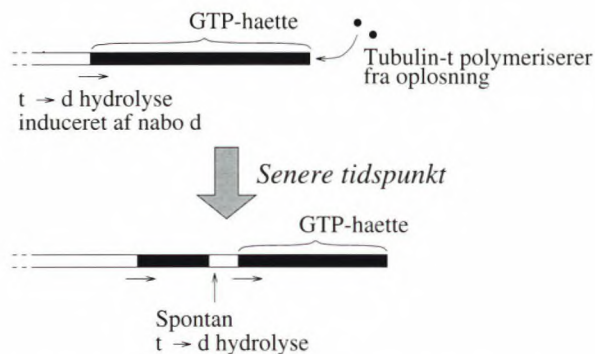
Dette simple eksperiment er med megen tålmodighed foretaget masser af gange i forskellige koncentrationer af tubulin-t, og deraf følgende forskellige væksthastigheder. Resultatet overraskede: Dels var der overhovedet ingen sammenhæng mellem tubulin-koncentrationen, man benyttede, og den ventetid, man observerede. Dels viste ventetiden sig at være en stokastisk størrelse: Ved én og samme koncentration observerede man vidt forskellige ventetider.

Figur 3 viser de målte ventetider. Samme figur viser, hvad en forholdsvis simpel, ny teori forudsiger for ventetidernes fordeling, og denne fordelings afhængighed af koncentrationen. Hver af de to fordelinger er fittet til data med kun én parameter, fordelingernes gennemsnit. Derudover er et fælles effektivt nulpunkt på tidsaksen fittet. Resten er bestemt af teorien. Samme simple teori giver samtidigt kurven gennem datapunkterne i fig. 2, og giver altså en samlet forklaring på eksperimenterne, som syntes

i modstrid med hinanden.

Effektiv teori

Teorien, som giver de viste fits, er en *effektiv* teori: Den tilstræber at beskrive data med så få og simple antagelser og så få parametre, som muligt. Uden hensyn til at virkeligheden sikkert er mere kompleks. Teorien antager, at der er en GTP-hætte af længde x på en voksende mikrotubulus. Denne hætte vokser stokastisk i den ene ende ved tilføjelse af tubulin-t dimerer, og afkortes stokastisk ved hydrolyse fra den modsatte ende, hvor tubulin-t er nabo til tubulin-d i krystalgitteret; se fig. 4. Derudover antages, at tubulin-t dimerer inde i hættens også hydrolyserer tilfældigt, men med langt lavere rate end de, der har tubulin-d naboer. Men *når* en enkelt dimer inde i hættens er hydrolyseret, har dens naboer pludseligt en tubulin-d nabo, hvorefter de hydrolyserer med den hurtigere rate, og en "plet" af tubulin-d breder sig rundt om mikrotubulus'en, så hættens effektivt kortes af til hvor pletten befinder sig; se fig. 4. Hyppigheden, denne afkorting af hættens sker med, er proportional med hættens længde, fordi processen lige gerne starter i en hvilken som helst tubulin-t dimer i hættens. Som følge heraf bliver hættens aldrig rigtig lang. For jo længere den er, desto hurtigere vil den kortes af. Dens længde, x , udfører et 'biased random walk' mod større værdier, men afkortes som beskrevet til en vilkårlig brøkdel af sig selv med hyppighed proportional med x . Når x tilfældigvis bliver 0 ved en kombination af afkorting og random walk, er hættens borte, og vi har en "katastrofe."



Figur 4. Mikrotubulus vokser ved polymerisering af tubulin-t (sort) som hydrolyseres til tubulin-d (hvid).

Teorien beskrevet her er så simpel, at den kan løses analytisk¹. Men dette at essensen af et fænomen eventuelt kan beskrives med en simpel effektiv teori, som henviser fænomenets detaljer til at udtrykke sig samlet gennem nogle få parametre, det er ingen simpel ide, og ikke en tankegang, som er almindelig udenfor fysikken.

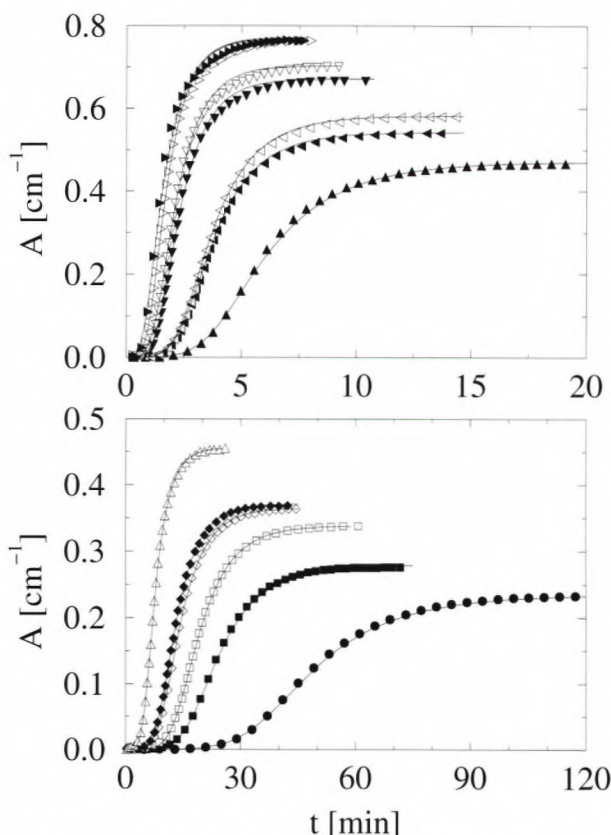
Det hører med til historien, at mens denne teori blev udarbejdet, blev GTP-hætter for første gang set i mikroskop i et elegant eksperiment, som gjorde enkelte

ikke-hydrolyserbare tubulin-t dimerer synlige ved at gøre dem fluoriserende. Man kunne derved tælle dem og regne sig til størrelsen af den mindste hætte, som ville kunne forhindre katastrofe: 40 dimerer måtte den bestå af.²

Uvidende herom, blev de tre parametre i ovenfor beskrevne teori bestemt ud fra de viste data. Disse data er resultat af eksperimenter, der kun kunne opløse længden af mikrotubuli. Hætten var et rent teoretisk begreb. Men teorien forudsagde dens minimumsstørrelse—til 40 dimerer!¹

Spontan dannelse af mikrotubuli

Spontan dannelse af mikrotubuli fra opløsning ses ikke i celler. Men processen kan studeres *in vitro*. Den er interessant for forståelsen af cellers kontrol over den, men også som et model-eksempel på biologisk *self-assembly*, d.v.s. den proces hvorved proteiner samler sig til større strukturer uden brug af anden information end deres egen karakteristiske form. Det er processens første del, som er interessant: Hvordan *begynder* tubulin-molekylerne på det cylinder-formede krystalgitter? Efter dette er dannet, er der blot tale om gentagen addition af molekyler til den eksisterende struktur.



Figur 5. Turbiditet som funktion af tiden for 13 forskellige tubulin koncentrationer³.

Figur 5 viser tidsserier fra 13 forskellige forsøg i hvilke man som funktion af tiden målte tubulinopløsningers turbiditet ("uklarhed") ved 350 nm. Ved denne bølgelængde er turbiditeten proportional med den samlede masse af dannede mikrotubuli. Den eneste forskel på de 13 for-

søg er mængden af tubulin til stede. I alle tilfælde var al tubulin i opløsning og ingen mikrotubuli til stede til tid 0. Men ved brat at hæve temperaturen fra 0°C til 37°C til tid 0, begyndte mikrotubuli at dannes spontant. Disse mikrotubuli vokser indtil de har opbrugt al tubulin i opløsningen, hvorefter der ikke sker mere. "Katastrofer" forekommer ikke; mekanismen er "slået fra" ved at komme glycerol i opløsningen.

Gør man nu forsøgsvis den rimelige antagelse, at mikrotubuli altid dannes ved samme mekanisme, så må de viste tidsserier indeholde megen information om denne mekanisme. Indeholder de nok til at vi kan finde mekanismen? Det ville være interessant, for kemiske processer i opløsning kan jo ikke følges i mikroskop. Det kan elementartpartiklers processer heller ikke, men det forhindrer ikke partikelfysikere i at finde mekanismerne fra produkterne. Endvidere har matematiske fysikere helt klarlagt under hvilke betingelser man kan regne baglæns og entydigt fastlægge et potential ud fra viden om hvordan potentialet afbøjer passerende partikler. Så hvorfor ikke formulere et tilsvarende såkaldt *inverst problem* for ikke-ligevægts reaktionskinetik?

Inverst problem

Man kan faktisk fastlægge en kinetisk model for spontan dannelse af mikrotubuli ud fra de viste eksperimentelle tidsserier. Resultatet er vist som kurver gennem de eksperimentelle datapunkter i fig. 5, og ses at stemme med dem. Vi giver ikke beviset, men smagsprøver fra det:

Første trin i analysen benytter slet ingen teori: Man konstaterer bare at de eksperimentelle tidsserier alle har samme s-form, og viser sig at *scale* til en meget god approksimation—d.v.s. de kan alle gengives med én og samme funktion med en s-formet graf, f , ved at skrive dem som

$$A_i(t) = A_i(\infty)f(t/t_i). \quad (1)$$

Her er $A_i(t)$ turbiditeten af den i te tidsserie som funktion af tiden t , og t_i er en karakteristisk tid for denne serie—f.eks. tiden, det tager for turbiditeten, at vokse til 1/10 af sin slutværdi, $A_i(\infty)$. Yderligere viser det sig at

$$t_i \propto A_i^{-3}(\infty) \quad (2)$$

med al ønskelig præcision.

Den simple form af disse 100% fænomenologiske resultater tyder stærkt på at mekanismen, vi ønsker at afdække, er simpel. Resultaterne er også præcise matematiske betingelser, som en model for mekanismen skal opfylde. Det giver håb om at den kan findes.

Næste trin består i at nedskrive et generelt sæt kinetiske ligninger, som indeholder så få antagelser, som overhovedet muligt. Vi kræver dernæst af disse ligninger at deres løsning opfylder lign. (1) og (2). Dette viser sig at være et meget stærkt krav, som definerer en snæver klasse af ligninger, der tilmed viser sig løsbare. Derefter er kun tilbage at fitte et heltal og to reelle reaktionsrater til data. Resultatet ses i fig. 5.

Det fremgår af den fundne model, hvorfor mikrotubuli kan polymerisere fra specielle centre i en celle, uden at nye mikrotubuli dannes spontant: Mængden af tubulin, som i et givet tidsrum polymeriserer på den første måde, er proportional med tubulin-koncentrationen. Mængden, som polymeriserer på den anden måde, viser sig at være proportional med koncentrationen opløftet til 16. potens! Hvis et positivt tal ikke er valgt med særlig omhu, vil dets 16. potens enten være forsvindende lille, eller meget stor. Så denne potens-afhængighed fungerer som en "kontakt," der enten er tændt eller slukket. I celler er den slukket.

Modellen viser samtidigt, at en nydannet mikrotubulus skal indeholde $16 - 1 = 15$ dimerer, før tilføjelsen af yderligere dimerer bliver en simpel gentagelse af samme proces. Dette antal er besnærende tæt på de 13-14 protofilamenter, som en sådan spontant dannet mikrotubulus typisk indeholder. Man kan forestille sig, at en mikrotubulus starter som kun én dimer lang og 13-14 dimerer i omkreds. Men dette billede er en overfortolkning af modellen. Den giver kun et tal, 15, og siger ikke noget om sådan en ringform. På den anden side er sådanne ringe kendte fra elektronmikroskopi af tubulin-opløsninger hvori mikrotubuli dannes. Men deres rolle er uklar. Elektronmikroskopi kræver, at motivet fryses, så man ved ikke hvordan det, man ser, ville have udviklet sig i tid. Men at en nydannet mikrotubulus skal indeholde 15 dimerer, før den polymeriserer ligesom længere mikrotubuli, synes at være et robust resultat: En helt anden eksperimentel metode, som målte hvor hurtigt nye mikrotubuli dannes ved andre koncentrationer og temperaturer, fandt værdien 12 ± 2 for dette tal ⁴.

Konklusion

Det tilfældige element i mikrotubulis søgen efter kromosomer kan forklares som resultat af en konkurrence mellem to simple stokastiske processer i GTP-hætten, vækst og hydrolyse. Fraværet af spontan dannelse af nye mikrotubuli under forhold, hvor eksisterende mikrotubuli villigt polymeriserer, kan forklares med nydannelsens voldsomme koncentrationsafhængighed.

De to problemstillinger beskrevet her er eksempler på hvordan moderne molekylær-biologi afføder gode fysiske problemer. Det sker dels fordi man studerer systemer på så kort en længdeskala, at grænserne mellem biologi, kemi og fysik bliver uskarpe, og dels fordi man benytter fysiske målemetoder, som i kraft af måledatas mængde og nøjagtighed gør matematisk modellering mulig, men også gør den nødvendig for overhovedet at kunne tolke data.

Referencer:

- 1) H. Flyvbjerg, T. E. Holy, and S. Leibler, *Stochastic Dynamics of Microtubules: A Model for Caps and Catastrophes*, Phys. Rev. Lett. **73**, 2372 (1994).

- 2) D. A. Drechsel and M. W. Kirschner, *The minimum GTP cap required to stabilize microtubules*, Current Biology **4**, 1053 (1994).
- 3) H. Flyvbjerg, E. Jobs, and S. Leibler, *Kinetics of Self-assembling Microtubules: An "Inverse Problem" in Biochemistry*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), to appear (1995).
- 4) D. Kuchnir Fygenson, H. Flyvbjerg, K. Sneppen, A. Libchaber, and S. Leibler, *Spontaneous nucleation of microtubules*, Phys. Rev. E **51**, 5058 (1995).



Henrik Flyvbjerg er dr.scient. og leder af biofysikgruppen ved det tyske super-computer-regnecenter HLRZ i Jülich. Interesserer sig for matematisk modellering, især teoretisk biofysik.

balzers

**Gasanalyse til særdeles
god pris pr. ydelse**

Restgasanalyse i vakuum-
processer, procesgas-
kontrol, tæthedskontrol, etc.
Kvalitetssikring og
forebyggelse af utilsigtede
driftstop

Prisma™

Nordiska Balzers AB
Baunegårdsvej 7 L
DK-2820 GENTOFTE
Tel. 39 68 32 61
Fax 39 68 22 55

Nordiska Balzers AB
Box 10412
S-434 24 KUNGSBACKA
Tel. +46 0300 710 80
Fax +46 0300 172 85

K049dk1