

# Botsende buizen

Hoe weet een doorgaans langgerekte plantencel in welke richting hij moet groeien? Om deze keuze te maken en vast te houden moet de cel zijn eigen geometrie verkennen en vervolgens vastleggen. Plantencellen maken hiervoor gebruik van een fascinerend niet-evenwichts-zelforganisatieproces van hun microtubuli, de buisvormige 'werkpaarden' van het cytoskelet, het interne netwerk van lange eiwitcomplexen dat dienst doet als dynamisch 'geraamte' van de cel. Een model van dit proces laat zien dat de waargenomen vorming van een sterk opgelijnde structuur van de aan het celmembraan klevende microtubuli te begrijpen is als een moleculair selectieproces, dat we 'overleven van de gelijkgerichten' hebben genoemd.

Simon Tindemans, Rhoda Hawkins, Eva Deinum, Wilfried Allaerts, Bela Mulder

## Eigenrichting in de plantengroei

Zowel boven als onder de grond wordt de vorm van de meeste hogere planten gekenmerkt door een hiërarchische structuur van zich vertakkende uitgroeisels. Denk aan de sequentie stam, tak, zijtak, ..., blad of bloem, maar ook aan een typisch wortelnetwerk. Deze karakteristieke groeiwijze berust op zich voortdurend strekkende weefsels opgebouwd uit individuele cellen die ieder slechts in één richting groeien. Om dit mogelijk te maken zijn plantencellen, in tegenstelling tot de meeste dierlijke (en dus ook menselijke) cellen 'vormvast'. Ze zijn omgeven door een zelf aangelegd uitwendig 'korset' bestaande uit lange

microvezels van kristallijn cellulose ingebed in een wanordelijke matrix van suikerpolymeren. Dit celwandmateriaal is stevig genoeg om de aanzienlijke osmotische overdruk binnen de cel te weerstaan. Maar hoe is het hebben van een dergelijk 'korset' met zijn cellulose 'baleinen' te rijmen met de noodzaak om te groeien? Experimenten laten zien dat de cellulose microfibrillen dwars op de groeirichting van de cel liggen, wat goed te begrijpen is omdat zij zo de groei niet belemmeren en de cel zich kan strekken zoals een harmonica. Om deze in essentie geometrische klus te klaren, bedient de plantencel zich van microtubuli, lange buisvormige eiwitaggregaten die een onderdeel van het cytoskelet van alle dierlijke en plantaardige cellen zijn (zie kader Microtubuli). Tijdens de groeifase van de cellen vormen de microtubuli spontaan een geordende structuur waarin ze met een hoge precisie dwars op de groeirichting zijn georiënteerd (zie figuur 2). De microtubuli in deze structuur zitten vast aan de binnenkant van het celmembraan en vormen zo een onderdeel van de cortex (buitenste schors) van de cel. Zo kunnen ze dienst doen als rails waarlangs de bewegende eiwitcomplexen

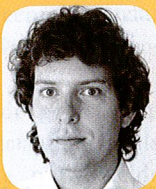
die de cellulose microvezels neerleggen in de juiste richting worden geleid. Dit zogenoemde transversale corticale microtubulus netwerk is een staaltje van niet-evenwichts-zelforganisatie waarvan we graag willen begrijpen hoe het werkt.

## Close encounters

De eerste experimentele aanwijzingen over het mogelijke mechanisme achter ordening van de corticale mi-

382

Simon Tindemans studeerde fysica aan de Universiteit van Amsterdam. Zowel zijn afstudeeronderzoek als zijn promotieonderzoek, beide op biofysische onderwerpen, verrichtte hij op AMOLF in de groep van Bela Mulder. Na zijn promotie in juni 2009 besloot hij zich te richten op onderzoek naar de stochastische risicoanalyse van elektriciteitsnetwerken. Momenteel is hij verbonden als postdoc in de Control and Power onderzoeksgroep van Imperial College London.



Bela Mulder studeerde theoretische fysica aan de Universiteit Utrecht, waar hij in 1986 promoveerde op een onderwerp in de zachte gecondenseerde materie.

Na een postdoc aan het NCRPS Demokritos in Athene, keerde hij in 1992 terug naar Nederland als projectleider Theorie van Complexe Vloeistoffen op AMOLF. In het midden van de jaren '90 verlegde hij zijn aandacht naar de fysica van biologische systemen. Zijn groep op AMOLF, Theorie van de Biomoleculaire Materie, houdt zich bezig met moleculaire structuren en processen in cellen. Hij is tevens als bijzonder hoogleraar in de Theoretisch Celfysica verbonden aan het Laboratorium voor Planten Celbiologie van Wageningen Universiteit.



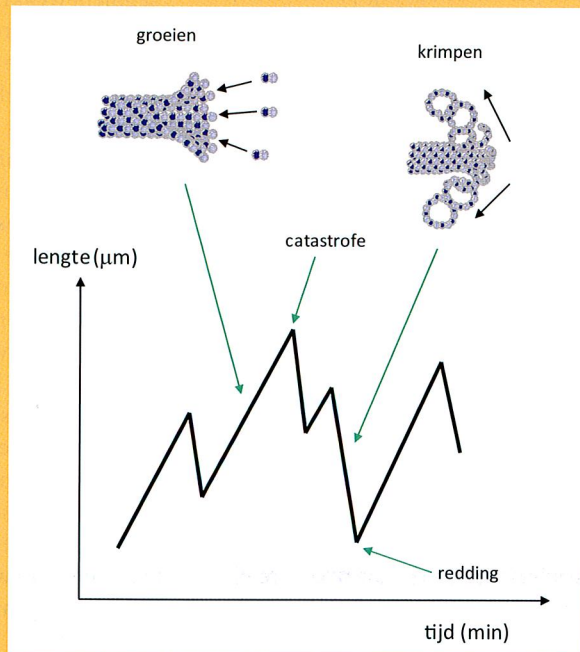
mulder@amolf.nl

# Microtubuli

Microtubuli zijn buisvormige biomacromoleculen met een binair eiwitcomplex als bouwsteen. Dit eiwitcomplex, een dimeer van  $\alpha$ - en  $\beta$ -tubuline, is slechts acht nm lang. Het  $\alpha$ -deel van één dimeer plakt aan het  $\beta$ -deel van een volgend dimeer, en zo kunnen langgestrekte protofilamenten gevormd worden. In vivo vormen dertien van deze protofilamenten een cilindervormig macromolekuul dat, hoewel slechts 25 nm in doorsnede, vele micrometers lang kan worden. Door de regelmatige opeenvolging van  $\alpha$ - en  $\beta$ -tubuline in de protofilamenten en de manier waarop deze protofilamenten aan elkaar vastzitten, is de microtubulus een polair macromolecuul. Het zogenaamde plus-eind, waar de  $\beta$ -delen van de tubuline-dimeren naar wijzen, heeft dan ook andere eigenschappen dan het min-eind. Wat microtubuli zo bijzonder en zo multi-inzetbaar maakt, is hun intrinsieke polymerisatie-dynamica. Onder de juiste biochemische omstandigheden schakelt iedere microtubulus spontaan en op willekeurige momenten tussen fases van groei (polymerisatie) en krimp (depolymerisatie), voornamelijk aan het plus-eind (zie figuur 1).

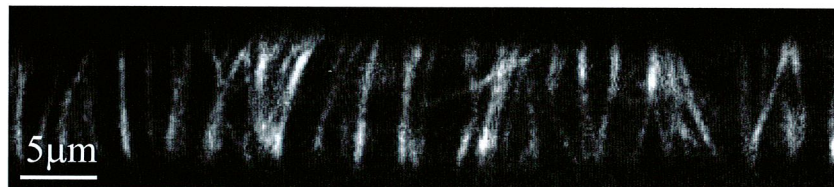
De typische wachttijd tussen deze schakelmomenten, die respectievelijk catastrofes en reddingen worden genoemd, is in de orde van minuten, waarin een microtubulus enige micrometers groeit dan wel krimpt. Soms krimpen microtubuli zo lang door dat ze verdwijnen; iedere microtubulus heeft dan ook een eindige levensduur. Door de frequenties van deze gebeurtenissen te manipuleren, voornamelijk met behulp van eiwitten die de dynamica

beïnvloeden, kan de cel een vorm van controle uitoefenen over de ruimtelijke verdeling van al haar microtubuli die op een stochastische wijze tot stand komt. Daarnaast kunnen zogenaamde  $\gamma$ -tubuline complexen op een gecontroleerde manier de nucleatie van nieuwe microtubuli veroorzaken.

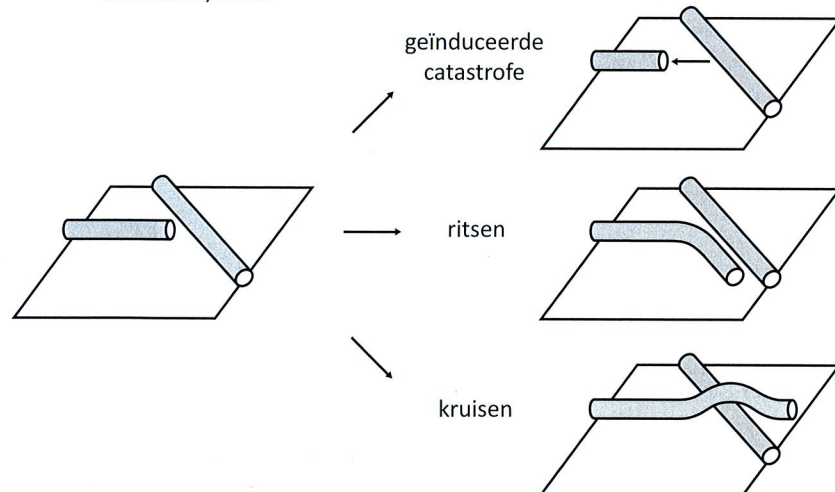


Figuur 1 De lengte van een typische microtubulus als functie van de tijd.

microtubuli dateren uit 2004. Dixit en Cyr [1] observeerden met behulp van confocale microscopie de microtubuli in de cortex van tabaksplantencellen die voorzien waren van een fluorescent eiwit-label. De corticale microtubuli zijn zo sterk gebonden aan het celmembraan dat zij zich effectief in een tweedimensionaal vlak bevinden. Een groeiende microtubulus kan dus gemakkelijk tegen een andere microtubulus botsen. Er bleken drie mogelijke uitkomsten te bestaan van dergelijke botsingen (zie figuur 3), waarvan de relatieve frequentie afhangt van de 'botsingshoek': (1) Bij relatief kleine hoeken van inval ( $\leq 40^\circ$ ) buigt de inkomende groeiende microtubulus af, en groeit verder langs het obstakel, een uitkomst die 'ritsen' genoemd wordt. (2) Bij grotere hoeken wordt het steeds waarschijnlijker dat de inkomende microtubulus bij de botsing van groei naar krimp overschakelt, en zich als het ware terugtrekt, een zogenaamde geïnduceerde catastrofe. (3) In alle overige gevallen heeft het



Figuur 2 Microscopopname van de fluorescent gelabelde microtubuli in de transversale corticale array van het modelplantje *A. thaliana* (zandraket). Afbeelding: Jelmer Lindeboom, WUR.



Figuur 3 De drie mogelijke uitkomsten van botsingen tussen microtubuli in de cortex van plantencellen.

Rhoda Hawkins studeerde fysica in Oxford. Na haar promotie in Leeds was zij als postdoc verbonden aan de groep van Bela Mulder op AMOLF. Vervolgens werkte zij twee jaar aan celbeweeglijkheid in Parijs (UPMC en Institut Curie). Momenteel is zij werkzaam als postdoc op de afdeling wiskunde van Bristol University, waar zij haar werk aan het modelleren van biofysische systemen voortzet.



uiteinde van de inkomende microtubulus zoveel bewegingsvrijheid uit het vlak dat hij over het obstakel heen kan kruisen en gewoon in dezelfde richting blijft doorgroeien. De vraag is nu of deze botsingsdynamica daadwerkelijk verantwoordelijk kan zijn voor het ordeningsproces in plantencellen.

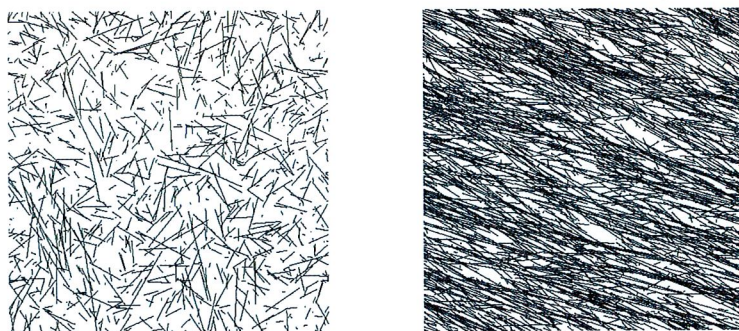
### Model en simulatie

Om deze vraag te beantwoorden, ontwikkelden we eerst een zo eenvoudige mogelijke theorie [2,3]. In deze

theorie bestaan de microtubuli uit een aantal gekoppelde rechte segmenten, ieder met een eigen lengte en richting. Alleen het laatste segment, dat culmineert in het plus-einde, is actief: het groeit of krimpt. Alle overige segmenten zijn inactief, maar kunnen wel weer gereactiveerd worden als het laatste segment wegkrimpt. Bij de geboorte van een microtubulus (nucleatie) start het eerste segment met groeien in een willekeurige richting. Na iedere botsing die tot ritsen leidt komt er een nieuw segment bij in een nieuwe richting. Onze theorie is een gemiddelde-veldtheorie, en onze variabelen zijn de dichtheden van microtubulussegmenten die ontstaan zijn na  $i$  botsingen, en nu groeien (+), krimpen (-) dan wel inactief (o) zijn, en een bepaalde lengte  $l$  en richting  $\vartheta$  hebben. We schrijven vervolgens de continuïteitsvergelijkingen op die deze variabelen met elkaar verbinden; een oneindige set van gekoppelde niet-lineaire integro-differentiaalvergelijkingen. Als we ons beperken tot stationaire toestanden zijn er geluk-

kig genoeg balansvoorwaarden om dit aantal terug te brengen tot vier gekoppelde integraalvergelijkingen. Dimensieanalyse laat zien dat het systeem slechts één controleparameter kent die alle kinetische parameters van de individuele microtubuli bevat, die grofweg de dichtheid van de microtubuli en dus het aantal interacties, bepaalt (zie kader *Het gemiddelde-veld model*). We kunnen met behulp van een stabiliteitsanalyse laten zien dat het systeem spontaan een macroscopische ordening vertoont boven een kritische waarde van deze controleparameter, die we  $G$  noemen. Om dit resultaat te toetsen ontwikkelden we ook een simulatieprogramma voor dit systeem. Door gebruik te maken van een zeer efficiënt zogenoemd *event-driven* algoritme, dat zowel de toekomstige botsingen als de spontane veranderingen 'voorspelt', kunnen we bovendien binnen enkele minuten op een gewone computer de ontwikkeling van een cel met een paar duizend microtubuli gedurende een hele dag volgen. Ook in deze simulaties zien we de microtubuli een voorkeursrichting krijgen als de dichtheid hoog genoeg is (zie figuur 4).

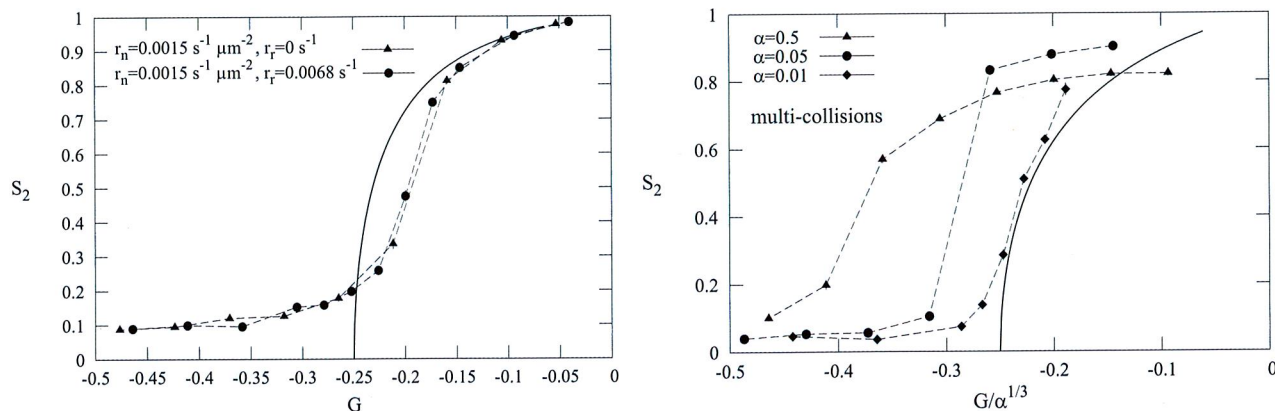
384



**Figuur 4** Snapshots van een simulatie bij lage dichtheid (links) waar het systeem bestaat uit relatief korte microtubuli zonder voorkeursrichting en bij hogere dichtheid (rechts) waarbij ordening optreedt.

### Overleven van de gelijkgerichten

Maar kunnen we nu ook begrijpen wat de ordening van de microtubuli veroorzaakt? Dit wordt in feite al duidelijk als we naar het resultaat van de stabiliteitsanalyse kijken. De kritische waarde van de controleparameter  $G$  blijkt namelijk niet af te hangen van de waarschijnlijkheid om te ritsen, maar alleen van de waarschijnlijkheid om een geïnduceerde catastrofe te on-



**Figuur 5** De voorspelling van onze theorie vergeleken met de resultaten van simulaties, weergegeven als de mate van waarin de segmenten dezelfde kant uit wijzen – de ordeparameter  $S_2$  – bij gegeven waarde van de controleparameter  $G$ . In het geval dat we ritsen veroorzaken, is er zeer goede overeenstemming (links). In het geval met ritsen (rechts) wordt de overeenkomst beter naarmate we de interacties zwakker maken, door de interactiesterkte  $\alpha$  kleiner te maken.

## Het gemiddelde-veldmodel

Ons model voor de dynamica van botsende microtubuli in de tweedimensionale cortex van plantencellen berust op de volgende principes. Microtubuli worden homogeen over het oppervlak geboren (nucleatie) met een constante frequentie  $r_n$  per eenheid van oppervlak en groeiend in willekeurige richting. Ze voldoen aan de standaardregels van dynamische instabiliteit (zie kader *Microtubuli*) en schakelen met frequentie  $r_c$  (catastrofe) van groei (met snelheid  $v^+$ ) naar krimp (met snelheid  $v^-$ ). Het omgekeerde proces (redding) vindt plaats met een frequentie  $r_r$ . Bij iedere botsing die tot ritsen leidt, ontstaat een nieuw groeiend *segment* in de oriëntatie van het obstakel. Een index  $i$  houdt bij hoeveel eerdere ritsende botsingen hieraan voorafgingen. Het door een ritsende botsing achtergelaten segment noemen we *inactief* aangezien het niet meer van lengte verandert. Alleen het laatste segment van iedere microtubulus is *actief* en groeit of krimpt. De inactieve segmenten kunnen dus alleen gereactiveerd worden door het volledig wegkripen van latere segmenten. We beschouwen alleen ongecorrleerde botsingen van groeiende segmenten met de totale dichtheid  $k(\theta)$  van segmenten in een gegeven richting (gemiddelde-veldbenadering). We kunnen nu balansvergelijkingen opschrijven voor de dichtheden  $m_i^+(l, \theta)$ ,  $m_i^-(l, \theta)$ ,  $m_i^0(l, \theta)$  van respectievelijk groeiende, krimpende, of inactieve segmenten met botsingsindex  $i$ , lengte  $l$  en richting  $\theta$ .

Onder de aanname dat we een stationaire toestand bereiken, reduceert dit oneindige stelsel van gekoppelde vergelijkingen (één voor elke waarde van  $i$ ) tot een viertal niet-lineaire integraalvergelijkingen voor de gemiddelde segmentlengte, de totale lengtedichtheid van segmenten, de verhouding tussen actieve en inactieve segmenten, en de dichtheid van actieve einden, allemaal afhankelijk van de richting  $\theta$ . We kunnen deze vergelijkingen analytisch oplossen voor het isotrope geval. Met

behulp van bifurcatieanalyse kunnen we vervolgens bepalen voor welke waarde van de parameters er geordende oplossingen mogelijk zijn.

Dimensieanalyse van de vergelijkingen laat zien dat de toestand van dit systeem bepaald wordt door de waarde van een dimensieloze controleparameter

$$G = \left( \frac{2v^+v^-}{r_n(v^+ + v^-)} \right)^{1/3} \left( \frac{r_r}{v^-} - \frac{r_c}{v^+} \right) = -\frac{l_0}{l_g}$$

die geïnterpreteerd kan worden als de verhouding tussen de lengteschaal

$$l_0 = \left( \frac{1}{\pi} \frac{v^+}{(1 + \frac{v^+}{v^-}) \frac{r_n}{2\pi}} \right)^{1/3}$$

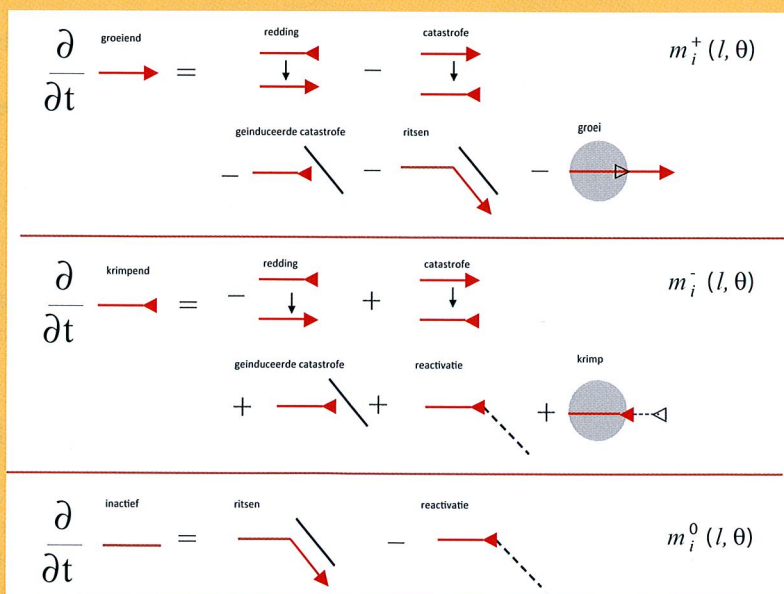
die een effectieve 'maaswijdte' van het netwerk voorstelt en de lengte

$$l_g = \frac{v^+v^-}{v^-r_c - v^+r_r}$$

die de microtubuli zouden hebben in de afwezigheid van botsingen die tot krimp leiden. We beschouwen hier alleen het geval dat deze lengte begrensd is door de intrinsieke dynamica ( $0 \leq l_g < \infty$ ) waardoor  $G \leq 0$ . Alleen als de eigen lengte groot genoeg is ten opzichte van de maaswijdte, zodat  $|G| \ll 1$ , kun je verwachten dat er ordening optreedt. Dit wordt bevestigd door de bifurcatieanalyse die laat zien dat de kritische waarde van de controleparameter gegeven wordt door

$$G^* = (-2\hat{c}_2)^{1/3} \left( \frac{\hat{c}_0}{-2\hat{c}_2} - 1 \right)$$

die alleen afhangt van de fouriercoëfficiënten  $\hat{c}_0$  en  $\hat{c}_2$  van  $\sin(\Delta\theta)P_c(\Delta\theta)$ , waarin  $P_c(\Delta\theta)$  de waarschijnlijkheid is om na een botsing tot krimp over te gaan als functie van de botsingshoek  $\Delta\theta$ .



Figuur 6 De vergelijkingen van ons model in symbolische vorm: de tijdsafgeleiden van de dichtheden van de verschillende typen microtubulussegmenten in het linkerlid worden bepaald door de frequentie van de processen in het rechterlid.

Eva Deinum studeerde biologie en wiskunde aan de Universiteit Utrecht. Zij verrichte haar afstudeeronderzoek aan de collectieve dynamica van microtubuli in de groep van Bela Mulder op AMOLF. Sinds 2009 is zij werkzaam als promovenda in een samenwerkingsverband tussen WUR en AMOLF dat onderzoek doet naar de rol van het transport van plantenhormonen in ontwikkelingsprocessen in plantenwortels. Zij is sinds jaren een van de organisatoren van zowel de landelijke- als de internationale Biologie Olympiade.

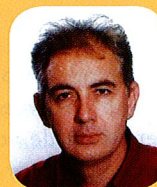


een meerderheid van opgelijnde microtubuli staan, zullen daarvoor juist veel botsingen ondergaan waarbij ze tot krimpen worden gedwongen. Ze zullen dan ook gemiddeld veel sneller weer uit het systeem verdwijnen. Deze welhaast darwiniaanse selectie op de moleculaire schaal hebben we 'overleving van de gelijkgerichten' genoemd.

### In het verschiep

Hoewel we het mechanisme voor de ordening van de microtubuli in het corticale netwerk te pakken lijken te hebben, moeten we nog veel werk verzetten om onze ideeën te toetsen aan de biologische werkelijkheid. Zo is er een aantal relevante effecten die we nog niet in beschouwing hebben genomen. In werkelijkheid laten microtubuli vaak los van hun nucleatiepunt, waarna hun min-einde gestaag gaat krimpen zodat de microtubulus als geheel lijkt te verplaatsen als een rups, een effect dat *treadmilling* wordt genoemd. Daarnaast spelen eiwitcomplexen, de zogenoemde katanins (naar het Japanse zwaard Katana), die microtubuli kunnen 'knippen' ook een belangrijke rol. Last, but not least, hebben we hiermee eigenlijk alleen nog maar uitgelegd waarom de microtubuli dezelfde kant op gaan wijzen, maar nog niet waarom

Wilfried Allaerts studeerde biologie en promoveerde in 1989 aan de Katholieke Universiteit van Leuven. Naast zijn werk als docent in de  $\beta$ -vakken op het middelbaar onderwijs, was hij voor een jaar verbonden als FOM Docent-Onderzoeker op AMOLF in de groep van Bela Mulder. Hij is ook actief als uitgever van het tijdschrift *bi-logical* en als bestuurslid van de NNV.



ze dwars op de groeirichting van de gerekte cel gaan staan. We zijn hard bezig deze vragen aan te pakken met behulp van onze simulator, inmiddels ook op de hielen gezeten door concullega's uit de Verenigde Staten en Canada [4,5].

### Referenties

- 1 R. Dixit en R. Cyr, *Plant Cell* **16**:3274-3284(2004).
- 2 S. H. Tindemans, R. J. Hawkins en B. M. Mulder, *Phys. Rev. Lett.* **104**: 058103 (2010).
- 3 R. J. Hawkins, S. H. Tindemans en B. M. Mulder, *Phys. Rev. E* **82**:011911 (2010).
- 4 J. F. Allard, G. O. Wasteneys en E. N. Cytrynbaum, *Mol. Biol. Cell* **21**: 278-286 (2010).
- 5 E. C. Eren, R. Dixit en N. Gautam, *Mol. Biol. Cell* **21**:2674-2684 (2010).

## Agenda

### t/m 8 mei 2011

Master the Universe!, tentoonstelling in het Universiteits Museum Utrecht. Ga met Gerard 't Hooft op expeditie naar een theorie van alles. [www.mastertheuniverse.nl](http://www.mastertheuniverse.nl).

### 4-5 november 2010

Energy for next generations, energieconferentie over duurzame energietechnologieën. U ontvangt 40 euro korting als u bij registratie de code K-NNV10E4NG invoert. [www.energy4nextgenerations.com](http://www.energy4nextgenerations.com).

### 5 november 2010

Najaarsvergadering van de NNV-sectie Subatomaire Fysica, in congrescentrum De Werelt in Lunteren. [www.nikhef.nl/pub/conferences/NNV](http://www.nikhef.nl/pub/conferences/NNV).

### 8-11 november 2010

Holland@CERN, een expositie van Nederlandse hightechbedrijven op het terrein van CERN bij Genève met als doel het contact tussen het onderzoek en de industrie te stimuleren. [www.bigscience4business.com](http://www.bigscience4business.com).

### 17-18 november 2010

Netherlands MicroNanoConference '10, [www.micronanoconference.nl](http://www.micronanoconference.nl).

### 1 december 2010

Fysica in Nederland na de Crisis, netwerkbijeenkomst op de High Tech Campus in Eindhoven. Meer informatie en aanmelden: [www.nnv.nl](http://www.nnv.nl).

### 18-19 januari 2011

Physics@FOM Veldhoven 2011, NH Koningshof te Veldhoven. Aanmelden

voor 19 november. [www.fom.nl](http://www.fom.nl).

### 6-18 februari 2011

2nd Joint DRSTP Postgraduate course AIO/OIO School 2011 Theoretical High Energy Physics (THEP), in Brazilië. [www1.phys.uu.nl/drstp](http://www1.phys.uu.nl/drstp).

### 15 april 2011

FYSICA 2011, Amsterdam. [www.fysica.nl](http://www.fysica.nl).

### 16 juni 2011

TechniekToernooi, de grootste techniekwedstrijd voor alle groepen van de basisschool. Dit jaar met veel scheikunde, want 2011 is het Internationale Jaar van de Chemie. [www.techniektoernooi.nl](http://www.techniektoernooi.nl).