

# Kompleks dynamik i celledesignering

Mathias Heltberg, Niels Bohr Institutet

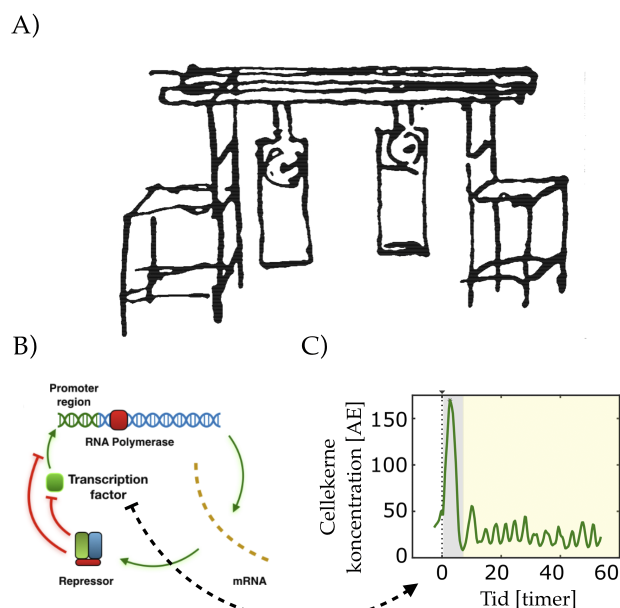
Cellers evne til at kontrollere produktionen af essentielle proteiner er en helt fundamental del af livets evne til at reagere på udefrakommende perturbationer samt vedligeholde korrekt signalering i og mellem celler. Et yderst spændende aspekt her er de seneste årtiers observationer af dynamik i koncentrationen af nogle af de mest vigtige proteiner. Særligt, hvordan deres koncentrationer i cellekernen har en evne til at udvise veldefinerede svingninger, har åbnet for en række grundlæggende spørgsmål. Hvordan kan levende organismer igangsætte disse rytmer og dynamiske signaler, og hvorledes kan dette benyttes til at respondere på udefrakommende perturbationer samt kontrollere den generelle proteinproduktion og celledilstand?

## Fra pendulure til proteiner

I året 1665 lå den senere verdensberømte fysiker og matematiker Christian Huygens i sygesengen. Han var kendt for at lave nogle af de mest præcise pendulure, og på hans væg hang derfor adskillige svingende pendulure. Fra sengen kunne han pludselig gøre en interessant observation: Ure, der hang tæt på hinanden, havde nøjagtig samme frekvens og en låst faseforskel på omtrent en halv rotation. Som en god videnskabsmand noterede han sig dette, og så snart han var frisk, eksperimenterede han med at spænde urene fast på en bjælke med en bestemt afstand imellem sig. Her opdagede han den grundlæggende sammenhæng, at urene påvirkede hinanden, og selvom de startede med forskellige frekvenser (frekvensen er veldefineret af pendulets længde), ville de efter lidt tid svinge med nøjagtig samme frekvens! Her opdagede han, at jo tættere urene var på hinanden, jo mere effektivt ville de koble til hinanden. Disse resultater opsamlede han og redegjorde for overfor sin far gennem brevudveksling, hvor han bl.a. tegnede forsøgsopstillingen (figur 1a).

Denne historie er et af de tidligst dokumenterede eksperimentelle studier af ikke-lineære effekter i fysik, og hvad Huygens grundlæggende opdagede, var, at to svingninger kan kobles, og at der er en parameter for koblingsstyrke (i Huygens tilfælde var denne parameter afstanden mellem urene, og koblingen skyldtes vibrationer i bjælken). Huygens' opdagelse af påvirkningerne mellem oscillerende systemer er et meget grundlæggende fænomen, der har anvendelser i mange fysiske og biologiske systemer.

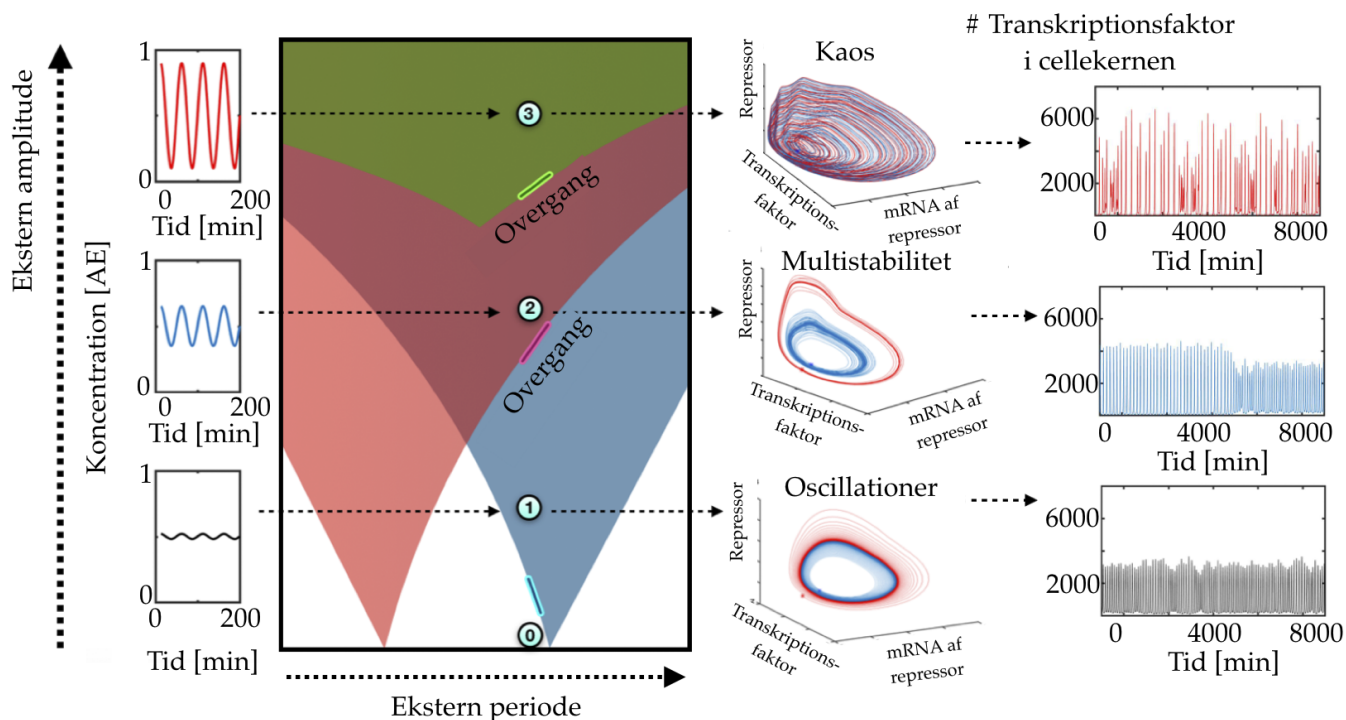
I de seneste årtier er der opstået en stor interesse for dynamikken i proteinkoncentrationer, og særligt de regulerende proteiner, der hedder transkriptionsfaktorer, som er de proteiner, der stimulerer produktionen af en lang række andre proteiner. Et klassisk eksempel på dette er NF- $\kappa$ B-proteinet, der styrer produktionen af flere hundrede forskellige gener og har stor betydning for immunforsvarets funktion. Mutationer i dette protein er korreleret med udbrud af sygdomme som sukkersyge og cancer. For NF- $\kappa$ B-proteinet blev det i starten af det 21. århundrede observeret, at når det stimuleres udefra af liganden TNF, begynder koncentrationen af NF- $\kappa$ B inde i cellekernen at svinge med en periode på ca. halvanden time.



**Figur 1.** A) Huygens' egen illustration af hans oprindelige eksperiment. B) Skematisk figur af det biologiske netværk, der kan lede til oscillationer. C) Eksempel på oscillerende dynamik i p53 [1].

Et andet eksempel på en vigtig transkriptionsfaktor er proteinet p53, der ligeledes regulerer mange gener, og mutationer i dette protein er koblet til op mod 50% af alle cancertilfælde. Dette skyldes, at p53 spiller en afgørende rolle i reguleringen af celledelinger og sikrer, at cellen ikke deler sig, så længe der er skade på DNA'et. For p53 blev det ligeledes i starten af dette århundrede påvist, at når celler udsættes for  $\gamma$ -stråling, igangsættes svingninger i proteinets koncentration i cellekernen, her med en periode på ca. 5 timer.

Årsagen til disse svingninger kan findes ved at studere det grundlæggende genetiske netværk. En transkriptionsfaktor vil opregulere produktionen af en række proteiner, heriblandt en såkaldt "repressor", der enten gør transkriptionsfaktoren inaktiv (som er tilfældet ved NF- $\kappa$ B) eller nedbryder den (som er tilfældet med p53). Dette giver et negativt feedbackloop, hvor der er en tidsforsinkelse, fordi den negative regulator først virker, efter at den er blevet dannet. Dette er skematiseret i figur 1b, og disse grundsten i et netværk kan ofte lede til oscillationer, der kan fortsætte i flere uger. Et eksempel på denne dynamik for proteinet p53



**Figur 2.** Visuel beskrivelse af koblinger mellem to svingninger og de dertilhørende Arnold-tunger. Til venstre ses den eksterne oscillators svingninger, i midten ses den tilsvarende parameterregion, og til højre den resulterende dynamik i den interne oscillator, først vist i faserummet og derefter som en tidsserie.

er vist i figur 1c. Derfor er det afgørende at forstå, hvorfor celler benytter sig af disse dynamiske signaler, og på det nuværende stadie i forskningen er dette stadig et mysterium. Da der er utallige celler, der kan udvise svingninger, og da der er utallige genetiske netværk, der kan lede til svingninger, er det yderst interessant at se, hvilke typer dynamik, der kan opstå, når svingninger påvirker hinanden.

### Arnold-tunger som universel beskrivelse af interagerende svingninger

Den matematiske beskrivelse af svingninger, der kobler, er ikke-lineær i sin natur, og dette er en af årsagerne til, at det først var i anden halvdel af det 20. århundrede, at en dybere forståelse blev opnået. Her skal man særligt fremhæve den russiske fysiker og matematiker Vladimir Arnold, der studerede det simpleste system, hvor en oscillator (den eksterne oscillator, EO) påvirker en anden oscillator (den interne oscillator, IO), men hvor EO ikke påvirkes tilbage, og dermed bevarer sin oprindelige amplitude og frekvens. Dette virker som en stor begrænsning, men for mange systemer er dette en rigtig god tilnærmelse. Fx kan man forestille sig, at menneskers rytme for at producere hormoner er bundet til Solens 24-timers periode – der jo på ingen måde påvirkes “tilbage” igen. Arnold studerede dette fænomen gennem en såkaldt fase-model, der beskriver fasen af en EO, hver gang IO har gennemført en hel rotation. Denne tager den matematiske form:  $x_{n+1} = x_n + \Omega - \frac{K}{2\pi} \sin(2\pi x_n)$ , hvor  $x_n$  er fasen (med modulus 1) efter den  $n$ 'te omdrejning,  $\Omega$  er EO's frekvens og  $K$  er koblingsstyrken. På baggrund af denne simple struktur kan man vise den rigdom af dynamikker, der kan opstå

ved to koblede oscillatorer, hvilket er visualiseret i figur 2.

Den midterste del af figur 2 illustrerer den grundlæggende sammenhæng, der giver anledning til, hvad man teknisk kalder “Arnold-tunger”. Langs x-aksen varieres EO-perioden og langs y-aksen varieres koblingsstyrken mellem de to oscillatorer, hvilket er vist helt til venstre med svingninger, der har samme middelværdi på 0,5 men forskellige amplituder. Koblingsstyrken er et lidt abstrakt fænomen, men i mange tilfælde kan man forestille sig, at det er amplituden af EO – jo større udsving den har, jo mere vil den påvirke IO.

- Hvis man først antager, at der er en uendelig lille koblingsstyrke mellem disse oscillatorer (svarende til  $K = 0$  i fase-modellen og markeret med “0” på figur 2), vil begge oscillatorer være upåvirkede af hinanden. Her kan man dog stadig tale om, at de vil være låst til hinanden, hvis fx EO har en frekvens på 1, og IO har en frekvens på 2, idet de så altid mødes i samme punkt, hver gang EO har færdiggjort sin omgang. Dette defineres som en  $\frac{1}{2}$  kobling. Dette argument kan man let udvide, og derfor vil alle rationelle forhold i frekvens mellem oscillatorerne lede til en kobling, og matematisk set vil dette give en lukket cyklus i deres fælles faserum. Hvis derimod forholdet er irrationelt, således at IO har en frekvens på  $\sqrt{2}$ , vil deres baner aldrig mødes i det samme punkt i faserummet, hvilket giver *quasiperiodicitet* (bemærk dog, at begge systemer stadig vil oscillere hver for sig). Matematisk set er det meget interessant, da der er uendeligt mange rationelle forhold, men uendeligheden af de irrationelle tal er meget større (dette er defineret ved det såkaldte Lebesgue-mål), og derfor vil oscillatorer i praksis aldrig være låst

for denne koblingsstyrke.

- Hvis man øger koblingsstyrken, hvilket i figur 2 ses ved den forøgede amplitude til venstre, når man til punktet “1”, der ligger inde i regionen markeret med blå. Denne region er det, man definerer som en “Arnold-tunge”, og er alle de parameter-værdier, hvorved IO vil have et bestemt rationelt forhold til EO. I dette område kan man altså ændre perioden af EO med det resultat, at IO følger med, så de har det samme forhold. I praksis betyder dette, at systemet vil have en stabil svingning, og lige meget hvilke begyndelsesbetingelser man vælger, vil kurven altid falde tilbage til denne løsning. IO vil i så fald altid have en fast amplitude, selv hvis der er støj i systemet (figur 2, nederst til højre). Et universelt element er, at der til hvert rationelt tal er tilknyttet en tunge. Alle tunger vil vokse i bredde, når koblingsstyrken forøges. Tunger med mindste nævner vokser hurtigst, så  $1/1$  breder sig mere end  $1/2$ . Dette virker helt umuligt, men det er netop det, der sker, at tungerne tager form som omvendte pyramider og skubber til de irrationelle værdier (der dog allesammen også eksisterer).

- Nu øges koblingsstyrken yderligere, og man når punktet “2”, der ligger i overlappet mellem den blå og røde region. Man kan forestille sig, at siden tungerne vokser, må de komme til at overlappe, og det er netop det, der sker her. Den resulterende dynamik er, at der opstår flere forskellige stabile svingninger, og afhængigt af hvilket punkt man starter i, kan man ende i to forskellige svingninger (rød og blå kurve i figur 2, i midten til højre), og hvis der er støj i systemet kan kurven blive skubbet mellem de forskellige svingninger. Dette sker kun, når koblingsstyrken er tilpas stor, og i fasemodellen er det bevist, at dette kun kan forekomme, når  $K \geq 1$ .

- Endelig opnår man en meget stor koblingsstyrke i punktet “3”, hvor mange store tunger overlapper hinanden. De har alle mistet deres stabilitet, og den resulterende dynamik bliver kaotisk.

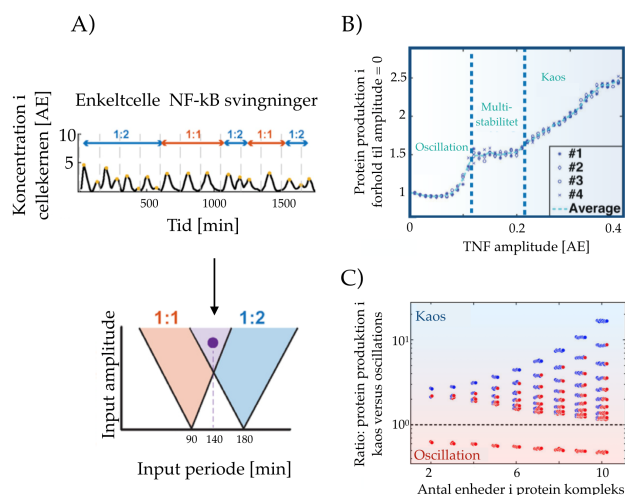
Matematisk set er kaos et veldefineret koncept og er overordnet set defineret ved, at to kurver, der startes næsten ved siden af hinanden (blå og rød kurve, øverst til højre), vil fjerne sig fra hinanden, aldrig komme tilbage til det samme punkt, og dermed bevæge sig på det, der hedder en kaotisk attraktor. Hvis man studerer en kaotisk tidsserie, har den, som fremvist i figur 2, svingninger, der ligner en oscillator, men disse er præget af meget forskellige perioder og amplituder.

### Koblinger, kompleksitet og kaos

Opdagelsen af de oscillerende proteinkoncentrationer har åbnet for nogle meget grundlæggende spørgsmål: Kan dynamik i de regulerende proteiner give en forøget kontrol over signaler? Kan man opregulere grupper af proteiner ved at starte svingninger? Og er det muligt at koble oscillerende proteiner og observere den rige dynamik fra Arnolds teori?

For at begynde med det sidste spørgsmål, så er det blevet påvist flere gange, at det er muligt at koble sådanne svingninger, og dette har ledt til nye dynamikker i koncentrationen af de vigtige transkriptions-faktorer.

Dette kan gøres på enkelt-celle niveau, hvor man kan aflæse koncentrationen af et bestemt protein over tid. Hvis cellen sættes til at oscillere, fx som i p53, hvor disse oscillationer fremkommer efter bestråling med en  $\gamma$ -kilde, kan cellen stimuleres periodisk af andre proteiner, og afhængigt af perioden og koblingsstyrken kan dette lede til koblinger som beskrevet ovenfor. Netop dette er fx gjort i studier af proteinet NF-kB, der stimuleres udefra af TNF. Ved at lade TNF variere i koncentration med en periode på 140 minutter, kunne man finde et område mellem de to Arnold-tunger og netop se to stabile svingninger i NF-kB, hvor systemet hoppede mellem de to perioder. Dette resultat er vist i figur 3a. På samme måde studeres i dag mange aspekter af proteinsvingningerne, og ved at benytte teorien for Arnold-tunger kan man fremtvinge kompleks dynamik og studere, hvordan dette påvirker cellerne.



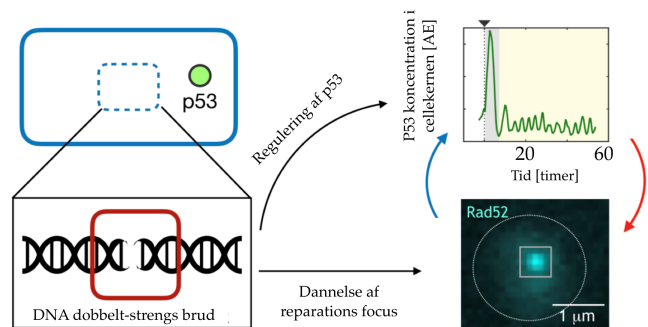
**Figur 3.** A) Svingninger i NF-kB, under oscillerende stimulus fra liganden TNF, og den tilhørende placering på Arnold-tungediagrammet [2]. B) Gennemsnitsproduktionen af lav-affinitetsproteiner som funktion af TNF-amplituden [3]. C) Produktionen af proteinkomplekser. Her viser x-aksen kompleksets størrelse, og y-aksen viser forholdet mellem produktionen i kaotisk NF-kB-dynamik og oscillerende NF-kB-dynamik, mens punkterne angiver sammensætningen af proteinkomplekser (blå = lav affinitet, rød = høj affinitet).

Det har fra gammel tid været en hypotese i systembiologi, at kaotisk dynamik var noget, levende organismer ville holde sig fra, idet det leder til uorden og mangel på kontrol. Men her har nyere teoretiske resultater åbnet for muligheden for, at kaotisk dynamik kan lede til en opregulering af en gruppe af gener, der er karakteriseret ved at have en lav affinitet til NF-kB. Ved at stimulere med TNF af stigende amplitude, er det tydeligt, at overgangen til kaos kan fordoble produktionen af visse proteiner. Dette kan ses i figur 3b, hvor de tre regioner svarer til punkterne 1, 2 og 3 i figur 2. Derudover kan de varierende udsving, der findes i den kaotiske dynamik, give anledning til en forøgelse i effektiviteten, hvormed proteinkomplekser dannes. Ved at studere en simpel model for, hvordan proteiner sammensættes, kan man studere produktionen af disse komplekser både ved et stabilt niveau af NF-kB, ved oscillationer og ved kaotisk dynamik. Dette er skitseret i figur 3c, hvor det kan ses, at alle proteinkomplekser produceres mere



effektivt i det kaotiske regime i forhold til de simple oscillationer. Kun de komplekser, der udelukkende består af proteiner med høj affinitet til NF- $\kappa$ B (markeret med rød), produceres mere effektivt i den oscillerende region.

Dette muliggør altså en vigtig rolle for de dynamiske rytmer af transkriptionsfaktorer, og hvordan de kan lede til forøget protein-produktion i specielle situationer. Dette er et element, der i den følgende tid vil studeres intenst gennem eksperimenter, hvor man blandt andet benytter strukturen af Arnold-tunger. Forhåbentlig kan dette kaste yderligere lys over den grundlæggende betydning af oscillerende proteinkoncentrationer og muligvis endnu mere kompleks dynamik.



**Figur 4.** Skematisk fremstilling af en hypotetisk mekanisme mellem oscillationerne i p53 og reparationen ved hjælp af mikrostrukturer, der fysisk set er dråber, i cellekernen.

## Reparation og regulering

DNA-skader er en uundgåelig del af livet på alle niveauer og stadier, og derfor er det af afgørende betydning, at alle levende organismer har et effektivt og optimeret modsvar til at håndtere dette korrekt. I denne forbindelse er to af de vigtigste aspekter den fysiske reparationsproces og den tilhørende regulering, der sikrer, at ingen celler deler sig, så længe der stadig er skade på DNA'et. I det øjeblik denne mekanisme svigter, kan DNA-skade nedarves gennem cellegenerationer, og man har derfor en motorvej mod udviklingen af cancer. Studier af de molekylære processer ved reparationen af DNA-skader har påvist, at der omkring det skadede DNA-område dannes en mikrostruktur med radius på ca. 100 nm, kaldet et focus. Ved at skabe et lokalt miljø, er det muligt at opregulere de nødvendige proteiner for reparationsprocessen og dermed øge effektiviteten og kvaliteten. Et eksempel på et focus kan ses som den lyseblå cirkel i figur 4.

Studier af den fysiske natur af disse strukturer tyder på, at de kan karakteriseres som en dråbe, der er fase-separeret fra den omkringliggende væske, og ligeledes, at dråberne dannes og opløses på en tidsskala omtrent lig med p53-svingningens periode, som beskrevet i indledningen. Det er påvist, at p53 stimulerer adskillige proteiner, der er relateret til DNA-reparation, men om fremkomsten af svingninger i p53 er relateret til dannelsen af foci, er imidlertid ukendt. Men strukturen

af et focus muliggør en yderst interessant rolle for dynamikken i p53: Ved  $\gamma$ -stråling er det estimeret, at der opstår ca. 20 dobbeltbrud på DNA'et, og derfor kan man let forestille sig, at cellen ikke har ressourcer til at lave dråber omkring alle steder med brud, men må koncentrere sine ressourcer om enkelte steder. På denne måde kan en oscillerende produktion af proteiner give en afgørende tidsskala for, hvornår dråberne opløses og nye skabes gennem tidsrum med maksimal stimulans. Fremtidige eksperimenter kan teste denne hypotese ved at benytte koblede oscillationer til at styre perioden af p53, og samtidig måle mængden af ødelagte DNA-områder. Her ville man forvente, at ved at styre p53-perioden til at blive for hurtig, ville flere steder ikke blive ordentligt repareret, mens en for langsom periode ville skabe unødigt ventetid for at reparere alle steder med brud på DNA'et. På denne måde kan man benytte teorien om synkronisering til at ændre perioden af p53 og dermed teste, om reparationen er dikteret af svingninger, der kan give de optimale tidsskalaer – lidt på samme måde som trafiklys kan optimere trafikken i byer. Om oscillationerne også er det afgørende signal, der sikrer, at cellen ikke deler sig så længe, der er skade, er endnu uvist. Forestillingen om, at de to mest fundamentale elementer i DNA-reparationen er koblet som vist på figur 4, er meget tiltrækkende, men fremtidig forskning vil forhåbentlig kaste yderligere lys over denne afgørende mekanisme.

## Litteratur

- [1] M.L. Heltberg, S.H. Chen, A. Jiménez, A. Jambhekar, M.H. Jensen og G. Lahav (2019). Inferring leading interactions in the p53/Mdm2/Mdmx circuit through live-cell imaging and modeling, *Cell systems*, bind 9, side 548–558.
- [2] M. Heltberg, R.A. Kellogg, S. Krishna, S. Tay og M.H. Jensen (2016). Noise induces hopping between NF- $\kappa$ B entrainment modes, *Cell systems*, bind 3, side 532–539.
- [3] M.L. Heltberg, S. Krishna og M.H. Jensen (2019) On chaotic dynamics in transcription factors and the associated effects in differential gene regulation, *Nature communications*, bind 10, side 1–10.



*Mathias Luidor Heltberg* er postdoc i biokompleksitet ved Niels Bohr Institutet og i statistisk fysik ved det franske universitet École normale supérieure i Paris. Han har netop modtaget Carlsberg-fondets reintegrationsstipendium til at forske i regulering og reparation som respons efter DNA-skader samt Kirstine Meyers Mindelegat fra Selskabet for Naturlærers Udbredelse.