

POLIMERIZACIJSKA ZASKOČKA

NEJC URH

Fakulteta za matematiko in fiziko
Univerza v Ljubljani

Članek obravnava polimerizacijsko zaskočko, mehanizem, s katerim citoskeletna vlakna ustvarjajo sile in omogočajo gibanje celic ter znotrajceličnih struktur. Vlakno leži ob pregradi, ki jo termične fluktuacije odmaknejo, da se lahko na konico vlakna veže še en monomer. Zato se pregrada zaskoči in ne more več nazaj ter se v povprečju premakne za en monomer naprej. Ključno vlogo pri tem imajo termične fluktuacije membrane in vlaken, ki občasno ustvarijo dovolj prostora za nadaljnjo polimerizacijo. Opisan je energijski vidik procesa, kjer polimerizacija omogoča opravljanje mehanskega dela proti zunanjim silam, vključno z izračunom največje sile, s katero lahko vlakno deluje na pregrado. Obravnavana je tudi omejitev rasti zaradi uklona vlaken, ki postane pomembna pri večjih dolžinah filamentov. Nadalje je analizirana hitrost polimerizacije v različnih režimih rasti glede na to, ali proces omejuje nastanek reže ali vezava monomerov. Zunanje sile upočasnjujejo polimerizacijo in s tem zmanjšujejo hitrost premikanja membrane. Ker opisani preprosti model ne pojasni vseh eksperimentalnih opažanj, je predstavljen še model elastične polimerizacijske zaskočke, pri katerem se vlakna zaradi termičnega gibanja upogibajo. Elastičnost vlaken in njihov kot glede na membrano vplivata na hitrost rasti in učinkovitost ustvarjanja sile – pojasnita na primer obstoj optimalnega kota za polimerizacijo. Polimerizacijska zaskočka je pomemben fizikalni mehanizem celičnega gibanja, katerega razumevanje zahteva upoštevanje elastičnosti, termičnih fluktuacij in kompleksne strukture citoskeleta.

POLYMERIZATION RATCHET

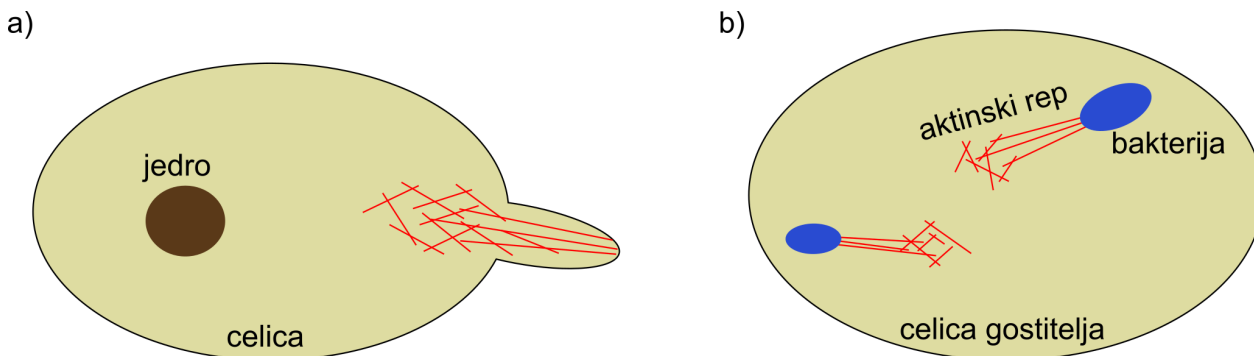
The article discusses the polymerization ratchet, a mechanism by which cytoskeletal filaments generate forces and enable the motion of cells and intracellular structures. The growth of actin filaments and microtubules pushes the membrane or the cell forward. Thermal fluctuations of the membrane and filaments play a key role in the process by occasionally creating enough space for further polymerization. The energetic aspect of the process is described, where polymerization enables the performance of mechanical work against external forces. Maximal force, generated through polymerization, is derived from chemical equilibrium. The limitation of growth due to filament buckling, which becomes important for longer filaments, is also discussed. Furthermore, the polymerization velocity is analyzed in different growth regimes, depending on whether the process is limited by gap formation or by monomer attachment. External forces slow down polymerization and thereby reduce the velocity of membrane motion. Since simple models cannot explain all experimental observations, a model of the elastic polymerization ratchet is also presented, in which filaments bend due to thermal motion. The elasticity of the filaments and their angle relative to the membrane influence the efficiency of force generation and the growth velocity, for example explaining the existence of an optimal angle for polymerization. The polymerization ratchet is an important physical mechanism of cellular motility, the understanding of which requires consideration of elasticity, thermal fluctuations, and the complex structure of the cytoskeleton.

1. Uvod

Citoskelet je mreža vlaken, ki primarno služijo kot celično ogrodje in dajejo celici obliko, trdnost in omogočajo spreminjanje njene oblike, sodelujejo pa celo pri celični delitvi. V grobem poznamo dve vrsti citoskeleta: aktinska vlakna, sestavljena iz dveh polimernih molekul (protofilamentov) iz aktinskih monomerov, ki se ovijata druga okoli druge, in mikrotubule, sestavljene iz 13 protofilamentov tubulina. Citoskeletna vlakna v celici delujejo tudi kot tračnice, po katerih se premikajo molekularni motorji. Toda hkrati se vlakna sama premikajo s polimerizacijo in delujejo kot motor, ki lahko premika celico. Polimerizacija¹ citoskeleta je eden od glavnih celičnih mehanizmov za potiskanje. Uporabljajo ga na primer celice vezivnega tkiva v zlatih ribicah [1], ki s polimerizacijo aktina tvorijo membranske izrastke, s katerimi se plazijo naprej (slika 1a). Poleg tega ga uporabljajo

¹Polimerizacija je kemijska reakcija, pri kateri se več osnovnih enot (molekul monomerov) veže v verigo, ki ji pravimo polimer.

bakterije *Rickettsia*, *Shigella* in *Listeria*, ki se znotraj okužene gostiteljske celice premikajo tako, da izkoriščajo aktin gostiteljske celice in za seboj tvorijo aktinske repe, s katerimi se potiskajo skozi citoplazmo [2, 3], kar je shematično prikazano na sliki 1b. Aktinski citoskelet ima zaradi svojih elastičnih lastnosti in sposobnosti opravljanja mehanskega dela tudi pomembno vlogo pri diferenciaciji celic v različne vrste tkiv [4]. Eden od modelov, ki opisuje, kako polimerizacija povzroča sile in gibanje, se imenuje polimerizacijska zaskočka. Na podlagi tega modela si bomo ogledali delovanje polimerizacijske zaskočke in ocenili, s kolikšno silo lahko deluje na oviro pred seboj ter kako hitro se ovira zaradi tega premika.



Slika 1. Shematični prikaz gibanja na podlagi polimerizacije citoskeleta. (a) Citoskeletna vlakna (rdeča) v celici s svojo rastjo potiskajo membrano in jo deformirajo ter tvorijo izrastke (filopodije), s katerimi se celica premika oziroma plazi naprej v smeri rasti vlaken. (b) Bakterija se znotraj gostiteljske celice premika tako, da za sabo tvori aktinske repe, ki jo potiskajo naprej. Za polimerizacijo uporablja molekule aktina iz gostiteljske celice.

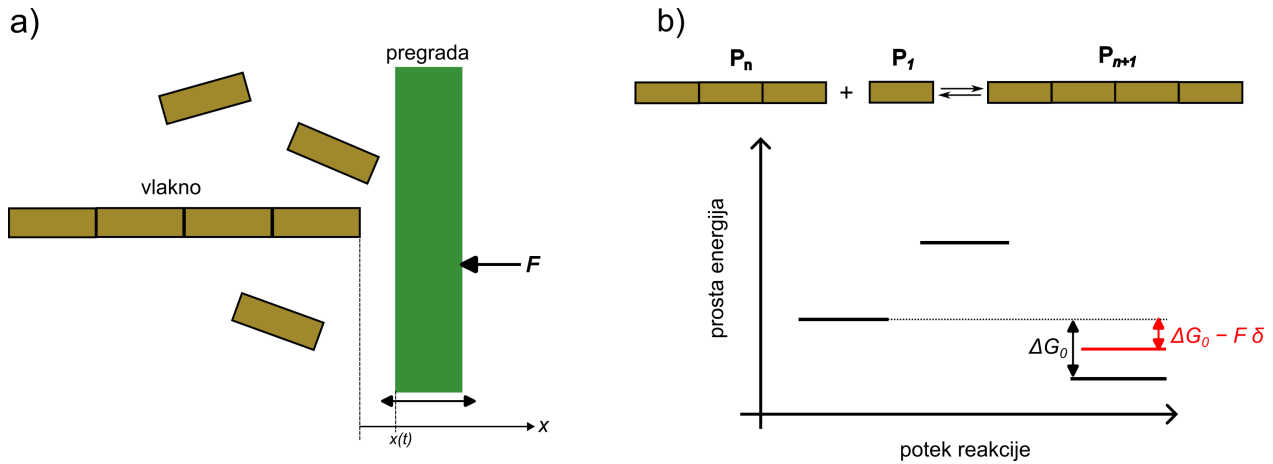
2. Delovanje polimerizacijske zaskočke

Predstavljajmo si citoskeletno vlakno v bližini pregrade (na primer celične membrane), ki je zrastle dovolj, da se konica vlakna in pregrada skoraj dotikata (slika 2a). Drugi konec vlakna je trdno zasidran v citoskeletni mreži. Na prvi pogled se zdi, da bi se morala polimerizacija (rast) vlakna ustaviti, saj ni več prostora za vezavo novega monomera. Če membrana ni povsem pri miru, temveč fluktuira zaradi termičnega gibanja, se lahko zgodi, da je v nekem trenutku reža med njo in konico vlakna dovolj velika za nov monomer. Ko se vlakno zaradi vezave monomera podaljša, se membrana ne more več premakniti nazaj dlje kot do nove konice vlakna. To povzroči povprečen premik ali deformacijo membrane v smeri rasti vlakna. Poleg tega tudi vlakno fluktuira zaradi termične energije. Tako se lahko na primer upogne in spet nastane prostor za vezavo novega monomera. Podaljšano vlakno ni idealno gibko, zato pritisne ob membrano in jo premakne ali deformira. Zdaj razumemo, od kod izhaja ime **polimerizacijska zaskočka** – polimerizacija povzroči, da se pregrada lahko premika le v smeri rasti vlakna, nazaj pa ne more, ker se vsakič zaskoči/zatakne na pravkar dodanem monomeru.

2.1 Največja sila pri polimerizaciji

Rastoče vlakno v obeh opisanih primerih (termično gibanje membrane in vlakna) opravi delo, ko nasprotuje elastičnim silam, ki skušajo pregrado ohraniti nedeformirano. Na podlagi sprememb proste energije pri polimerizaciji lahko ocenimo, koliko dela opravlja vlakno in kolikšna je največja sila potiskanja na pregrado [5].

Pri polimerizaciji morajo reaktanti najprej preseči aktivacijsko energijo, da reakcija poteče, nato pa se prosta energija sistema zniža (slika 2b). Prosta energija polimeriziranega produkta je nižja od začetne proste energije reaktantov, razlika med njima pa predstavlja energijo, ki jo lahko sis-



Slika 2. (a) Shematični prikaz polimerizacijske zaskočke. Citoskeletno vlakno (rjava) je v bližini pregrade (zelena), na katero deluje v levo sila F , ki predstavlja elastične sile membrane, nasproti katerim vlakno opravlja delo. Rast vlakna poteka s hitrostjo k_{on} , krajšanje pa s hitrostjo k_{off} . Lego pregrade x merimo od konice vlakna. (b) Energijske spremembe pri polimerizaciji. Reaktanta morata preseči energijsko pregrado, da reakcija lahko poteče. Prosta energija je v končnem stanju manjša kot v začetnem stanju. Ob prisotnosti sile F je razlika med začetno in končno prosto energijo manjša (rdeča), zato je polimerizacija manj verjetna.

tem porabi za opravljanje dela. Prosta energija se pri polimerizaciji aktina na primer zniža za $\Delta G_0 = 14k_B T/\text{monomer}$ [2], kjer je k_B Boltzmannova konstanta, T pa absolutna temperatura. V odsotnosti zunanje sile je disociacijska konstanta reakcije $P_n + P_1 \rightleftharpoons P_{n+1}$ enaka

$$K_d(F=0) = \frac{[P_n][P_1]}{[P_{n+1}]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}},$$

kjer je $[P_n]$ koncentracija polimera iz n monomerov, k_{off} hitrost reakcije v levo in k_{on} hitrost reakcije v desno. Disociacijska konstanta K_d predstavlja ravnovesno koncentracijo monomerov, pri kateri se povprečna dolžina vlaken ne spreminja s časom [5]. Označimo jo s $K_d(F=0) = m^*$ (za aktin na primer velja $m^* \approx 0,1 \mu\text{M}$).

Če vlakno opravi delo $F\delta$, kjer je F sila, s katero vlakno potiska pregrado (oziroma nasprotuje elastičnim silam membrane), premik pregrade pa je enak δ , opravljeno delo zviša prosto energijo končnega stanja (slika 2b). Torej se mora spremeniti tudi disociacijska konstanta, ki predstavlja razmerje med ravnovesnimi koncentracijami reaktantov in produktov:

$$K_d(F) = K_d(F=0) \exp(F\delta/k_B T),$$

kar pomeni, da je v ravnovesju pri $F > 0$ razmerje med reaktanti in produkti večje kot v primeru s $F = 0$. Zdaj lahko izračunamo maksimalno silo, ki jo povzroča rastoče vlakno pri ravnovesni koncentraciji monomerov $m = K_d(F)$. Uporabimo zvezo $m = m^* \exp(F_{\text{max}}\delta/k_B T)$ in dobimo

$$F_{\text{max}} = \frac{k_B T}{\delta} \ln \frac{m}{m^*}. \quad (1)$$

Ocenimo, kolikšno največjo silo lahko povzroči polimerizacija aktinskih vlaken in kolikšno polimerizacija mikrotubulov. Premik membrane ob vezavi enega monomera je za aktin $\delta_A \approx 2,7 \mu\text{m}$, za mikrotubule pa $\delta_M \approx 0,6 \text{ nm}$. Koncentracija aktinskih monomerov v živih celicah je okoli $10 \mu\text{M}$, zato vzemimo koncentracijo obeh vrst monomerov $m = 100m^*$. Termična energija pri $T = 300 \text{ K}$ je $k_B T \approx 4 \cdot 10^{-21} \text{ J}$. Kritična sila, ki jo v takih okoliščinah povzročajo aktinska vlakna, je $F_{\text{max},A} \approx 7 \text{ pN}$, medtem ko mikrotubuli z manjšim polimerizacijskim korakom povzročijo večjo silo $F_{\text{max},M} \approx 30 \text{ pN}$ [5]. Na podlagi kemijskega ravnotežja opazimo, da se vlakno daljša, dokler opravlja delo s silo $F < F_{\text{max}}$, če pa mora nasprotovati sili $F > F_{\text{max}}$, se začne krajšati.

Največjo silo omejuje dolžina citoskeletnih vlaken. Spomnimo se Eulerjeve nestabilnosti, ki opisuje uklon palice dolžine L zaradi velike vzdolžne zunanje sile. Kritična vzdolžna sila, pri kateri se palica ukloni, je podana s $F_c, \text{ palica} = 12YI/L^2$, kjer je Y Youngov modul palice in I vztrajnostni moment njenega preseka. Za citoskeletno vlakno, ki ga obravnavamo, produkt YI zapišemo z enim samim parametrom k_{flex} . Ta opisuje, kako se vlakno upira uklonu, in je povezan s persistenčno dolžino² ξ_p prek zveze $k_{\text{flex}} = \xi_p k_B T$. Tako dobimo enačbo za kritično silo, pri kateri se vlakno dolžine L ukloni:

$$F_c = 12 \frac{k_{\text{flex}}}{L^2}.$$

Iz zgornje enačbe je očitno, da se dolgi filamenti uklonijo pri manjši sili kot kratki filamenti. Kritično dolžino vlaken, pri kateri pride do uklona, izračunamo tako, da izenačimo $F_c = F_{\text{max}}$. Od tod dobimo

$$L_{\text{max}} = \sqrt{12\xi_p \delta / \ln \frac{m}{m^*}}. \quad (2)$$

Za aktinsko vlakno s persistenčno dolžino $\xi_{p,A} \approx 10 \mu\text{m}$ bo maksimalna dolžina $L_{\text{max},A} \approx 0,3 \mu\text{m}$. Mikrotubuli imajo zaradi svoje drugačne strukture veliko večjo persistenčno dolžino $\xi_{p,M} \approx 3 \text{mm}$, zato lahko dosežejo maksimalno dolžino $L_{\text{max},M} \approx 2,2 \mu\text{m}$.

3. Hitrost polimerizacije

Poleg sile, s katero rastoči citoskelet deluje na pregrado, nas zanima tudi hitrost rasti vlakna oziroma hitrost premikanja pregrade, ki je neposredno povezana s hitrostjo premikanja celice. Zaradi termičnega gibanja polimera in pregrade obstaja verjetnost, da se reža med njima poveča dovolj za vezavo novega monomera, čas za nastanek reže pa nam v prvem približku določa hitrost polimerizacije. Najprej si bomo ogledali enostavni model, ki se ne ujema z eksperimenti, nato pa obravnavali še dve izboljšavi, ki upoštevata, kaj omejuje hitrost polimerizacije.

Ocenimo hitrost premikanja pregrade v odsotnosti sile F . Predpostavimo, da se monomeri vežejo na konico vlakna takoj, ko je reža velika vsaj δ , in da po vezavi monomeri ne odpadejo ($k_{\text{off}} = 0$). Predpostavimo tudi, da se pregrada premika le v eni dimenziji. Naključno termično gibanje opisuje difuzija. Za delce z difuzijsko konstanto D , ki so na začetku pri $x = 0$ in se gibajo le vzdolž osi x , je varianca lege ob času t enaka $\sigma^2 = \langle x^2 \rangle = 2Dt$. Čas, ki ga v povprečju potrebuje pregrada, da difundira od $x = 0$ (konica vlakna) do $x = \delta$, je torej enak $t_D = \delta^2/2D$. Od tod ocenimo idealno hitrost rasti [5]:

$$v_{\text{ideal}} = \frac{\delta}{t_D} = \frac{2D}{\delta}. \quad (3)$$

Za premikajoče se bakterije *Listeria* z difuzijsko konstanto $D_b \approx 7 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ je $v_{\text{ideal}} \approx 0,5 \mu\text{m}/\text{s}$ [3]. Ta rezultat so eksperimentalno ovrgli, saj se je pri opazovanju bakterij *Listeria* in *Shigella*, ki se potiskajo s polimerizacijo aktinskih repov, izkazalo, da je hitrost le malo odvisna od velikosti bakterije³ in hkrati ni sorazmerna z difuzijsko konstanto [3].

Alternativni model predpostavlja, da za nastanek reže ni odgovorna samo difuzija membrane, temveč tudi spreminjanje dolžine citoskeletnega vlakna. Dolžina vlakna fluktuirajo, ker v okolici konice vlakna koncentracija monomerov ne ustreza ravnotežni vrednosti. Ta model boljše napove, kako je hitrost odvisna od eksperimentalnih okoliščin. Problema se lotimo z izračunom verjetnosti Δp_{on} , da se vlakno podaljša za en monomer v času Δt . Ta verjetnost je enaka produktu verjetnosti, da je reža med konico vlakna in pregrado dovolj velika (p_{allowed}), in verjetnosti, da se ob dovolj veliki reži na vlakno veže nov monomer:

$$\Delta p_{\text{on}} = p_{\text{allowed}} \times k_{\text{on}} m \Delta t. \quad (4)$$

²Persistenčna dolžina ξ_p je značilna dolžina, pri kateri je termična energija enaka upogibni energiji vlakna.

³Velikost bakterije je neposredno povezana z njenim koeficientom trenja in zato tudi z njeno difuzijsko konstanto.

Oglejmo si dva različna režima rasti polimera. V režimu A se reža pojavi redko, vezava monomera pa se zgodi hitro in vsakič, ko reža nastane, zato rast omejuje čas za nastanek reže. V režimu B se pogosto pojavi dovolj velika reža, a monomer za vezavo potrebuje veliko časa, zato rast omejuje čas vezave monomera.

3.1 Režim A (omejen s časom nastanka reže)

V režimu A rast polimera omejuje nastanek reže. V tem režimu si predstavljamo, da citoskeletno vlakno niha med stanjema z n in $n - 1$ monomeri. Če predpostavimo, da je $k_{\text{on}}m > k_{\text{off}}$, je polimer večinoma v stanju n . Takoj ko se reža dovolj poveča, polimer zraste in nato fluktuiira med stanjema n in $n + 1$. V takih okoliščinah je hitrost rasti enaka $v = \delta/\tau_1$, kjer je τ_1 čas prvega prehoda, tj. povprečni čas za difuzijo pregrade do $x = \delta$.

Najprej za vajo izračunajmo τ_1 brez prisotnosti sile F . Ob tem pričakujemo, da bo izračunana hitrost enaka v_{ideal} . Naj bo $p(x)$ verjetnost, da se pregrada nahaja na položaju x , ki leži med 0 in δ . Opazujemo stacionarno stanje, torej $\partial p(x)/\partial t = 0$. Predpostavimo, da pregrada vsakič, ko doseže mejo $x = \delta$, skoči na začetek intervala $x = 0$. To pomeni, da je verjetnost, da se pregrada nahaja na intervalu $(0, \delta)$, enaka 1, hkrati pa je verjetnost, da se delec nahaja pri $x = \delta$, enaka 0. Gostota toka enega delca je po Fickovem zakonu enaka $j_0 = -D \partial p / \partial x$. Če upoštevamo še kontinuitetno enačbo $\partial p / \partial t + \partial j / \partial x = 0$, v stacionarnem stanju dobimo

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -\frac{\partial j}{\partial x} = D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} = 0.$$

Rešitev te enačbe je $p(x) = Ax + B$, kjer sta A in B konstanti, ki ju določimo prek normalizacije in robnega pogoja. Iz normalizacije $\int_0^\delta p(x) dx = 1$ dobimo zvezo

$$\int_0^\delta p(x) dx = B\delta + A \frac{\delta^2}{2} = 1,$$

robni pogoj $p(\delta) = 0$ pa nam da enačbo

$$p(\delta) = A\delta + B = 0.$$

Dobljeni enačbi rešimo in dobimo $A = -2/\delta^2$ ter $B = 2/\delta$. Tako je $j_0 = -DA = 2D/\delta^2$, če pa upoštevamo še $j_0 = 1/\tau_1$, dobimo hitrost polimerizacije

$$v = \frac{\delta}{\tau_1} = \delta j_0 = \frac{2D}{\delta} = v_{\text{ideal}},$$

kar je enako naši prvi oceni za hitrost polimerizacije.

Zdaj obravnavajmo še vpliv zunanje sile F . Ta upočasni tok j_0 :

$$j_0 = -D \frac{\partial p}{\partial x} - \frac{F}{\gamma} p,$$

kjer je γ koeficient upora za pregrado.⁴ Uporabimo tudi Einsteinovo relacijo med koeficientom upora in difuzijsko konstanto $\gamma D = k_B T$. V stacionarnem stanju je enako kot prej $\partial j / \partial x = 0$ oziroma $j_0 = \text{konst.}$, torej rešujemo enačbo

$$\frac{\partial p}{\partial x} = -\frac{F}{k_B T} p - \frac{\gamma}{k_B T} j_0.$$

⁴Zadnji člen v enačbi dobimo, če si pogledamo gostoto toka delcev, ki se premikajo v tekočini skozi presek S in na katere deluje sila F :

$$j = \frac{\Delta N}{S \Delta t} = \frac{\rho S v \Delta t}{S \Delta t} = \rho v = \rho \frac{F}{\gamma},$$

kjer je ρ gostota delcev. V našem primeru z enim samim delcem jo nadomesti verjetnost p .

Rešitev je sestavljena iz homogenega in partikularnega dela

$$p(x) = C \exp(-Fx/k_B T) - j_0 \frac{\gamma}{F},$$

kostanti C in j_0 pa spet določimo iz robnega pogoja in normalizacije:

$$\begin{aligned} p(\delta) &= C \exp(-F\delta/k_B T) - j_0 \frac{\gamma}{F} = 0 \\ \int_0^\delta p(x) dx &= -C \frac{k_B T}{F} (\exp(-F\delta/k_B T) - 1) - j_0 \frac{\gamma}{F} \delta = 1. \end{aligned}$$

Ko določimo konstanti, dobimo stacionarni tok

$$j_0 = \frac{1}{\frac{k_B T \gamma}{F^2} (\exp(-F\delta/k_B T) - 1) - \gamma \delta / F},$$

kar nam da hitrost polimerizacije [5]:

$$v = \delta j_0 = \frac{D}{\delta} \frac{(F\delta/k_B T)^2}{\exp(-F\delta/k_B T) - 1 - F\delta/k_B T}. \quad (5)$$

V mejnem primeru $F\delta \ll k_B T$ se rezultat (5) poenostavi v v_{ideal} (3), saj je termična energija tako velika, da pregrada ne čuti nobene sile. V drugem limitnem primeru $F\delta \gg k_B T$ pa se polimerizacijska hitrost poenostavi v

$$v = \frac{D}{\delta} \left(\frac{F\delta}{k_B T} \right)^2 \exp(-F\delta/k_B T).$$

Opazimo, da je v režimu A hitrost polimerizacije sorazmerna z difuzijsko konstanto bremena, kar ne ustreza eksperimentalnim opazovanjem, zato še vedno potrebujemo boljši model.

3.2 Režim B (omejen s časom vezave monomera)

V režimu B vezava monomera traja mnogo dlje kot difuzija pregrade do $x = \delta$. Dovolj velika reža med pregrado in konico vlakna nastane pogosto, saj pregrada niha relativno hitro, toda monomer nima dovolj časa za vezavo, preden se reža spet zmanjša. Tako vlakno le redko zraste in pregrada ima dovolj časa, da zaradi termičnih fluktuacij preteče vse možne pozicije. Verjetnost p_{allowed} je zato enaka verjetnosti, da je v ravnovesju položaj pregrade pri $x > \delta$:

$$p_{eq}(x > \delta) = \int_\delta^\infty \rho_{eq}(x) dx,$$

kjer je $\rho_{eq}(x) = (F/k_B T) \exp(-Fx/k_B T)$ ravnovesna verjetnostna gostota. Ko izračunamo integral, dobimo $p_{eq}(x > \delta) = \exp(-F\delta/k_B T)$. Iz enačbe (4) dobimo verjetnost na časovno enoto za vezavo monomera

$$\frac{\Delta p_{\text{on}}}{\Delta t} = p_{\text{allowed}} k_{\text{on}} m = p_{eq}(x > \delta) k_{\text{on}} m = k_{\text{on}} m \exp(-F\delta/k_B T).$$

Upoštevamo še, da lahko reakcija polimerizacije poteka tudi v nasprotno smer s hitrostjo k_{off} , in tako dobimo hitrost polimerizacije

$$v = \delta \left(\frac{\Delta p_{\text{on}}}{\Delta t} - k_{\text{off}} \right) = \delta (k_{\text{on}} m \exp(-F\delta/k_B T) - k_{\text{off}}). \quad (6)$$

Ob tem smo predpostavili, da k_{off} ni odvisen od sile F , lahko pa bi mu dodali eksponentni faktor $\exp(-F\delta/k_B T)$ s karakteristično silo $k_B T/\delta$. Za mikrotubule je predvidena karakteristična sila pri eksponentnem padanju hitrosti okoli 7 pN, kar se v grobem ujema z eksperimentalnimi opažanji, kjer je izmerjena karakteristična sila okoli 2 pN.

4. Elastična polimerizacijska zaskočka

V zgoraj opisanem modelu smo predpostavili, da je za nastanek dovolj velike reže odgovorna predvsem pregrada, medtem ko je citoskeletno vlakno toga in se daljša oziroma krajša zgolj zaradi polimerizacije. Če primerjamo difuzijski konstanti bakterije *Listeria* $D_b \approx 7 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ in konice vlakna $D_v \approx 4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [3], ugotovimo, da je $D_v \gg D_b$, kar pomeni, da se fluktuacije konice vlakna dogajajo mnogo hitreje kot fluktuacije membrane. To nas napeljuje k razmišljanju, da nastanek reže v resnici ni posledica fluktuacij membrane, temveč predvsem fluktuacij konice vlakna. Fluktuacije citoskeletnega vlakna si predstavljamo kot upogibanje in krčenje/raztezanje vlakna zaradi termične energije. Zato zgornji model polimerizacijske zaskočke nadgradimo tako, da v hitrosti polimerizacije upoštevamo elastičnost citoskeletnih vlaken⁵ in možnost, da vlakna niso usmerjena pravokotno na membrano [3]. Pri tem upoštevamo naslednje predpostavke:

1. Termična nihanja vlakna se dogajajo v ravnini.
2. Vlakno je glede na membrano usmerjeno pod kotom θ .
3. Dolžina prostega konca vlakna se ne spreminja, torej je rastoči del vlakna konstantne dolžine L .
4. Upoštevamo samo fluktuacije posameznega vlakna, ne pa cele citoskeletne mreže (mrežo obravnavamo kot togo sidro).

Za vezavo novega monomera na vlakno, ki je usmerjeno pod kotom θ glede na pregrado, mora med konico vlakna in pregrado nastati reža velikosti $\Delta = \delta \cos \theta$ (slika 3a). Tako bo hitrost polimerizacije enaka

$$V \approx \Delta(k_{\text{on}}m\hat{p} - k_{\text{off}}),$$

kjer je $\hat{p}$ verjetnost, da je konica vlakna za vsaj Δ oddaljena od membrane. Takšna oblika hitrosti ni presenetljiva, saj smo jo srečali že v enačbi (6), v članku [3] pa so jo tudi izpeljali z reševanjem Fokker-Planckove enačbe.

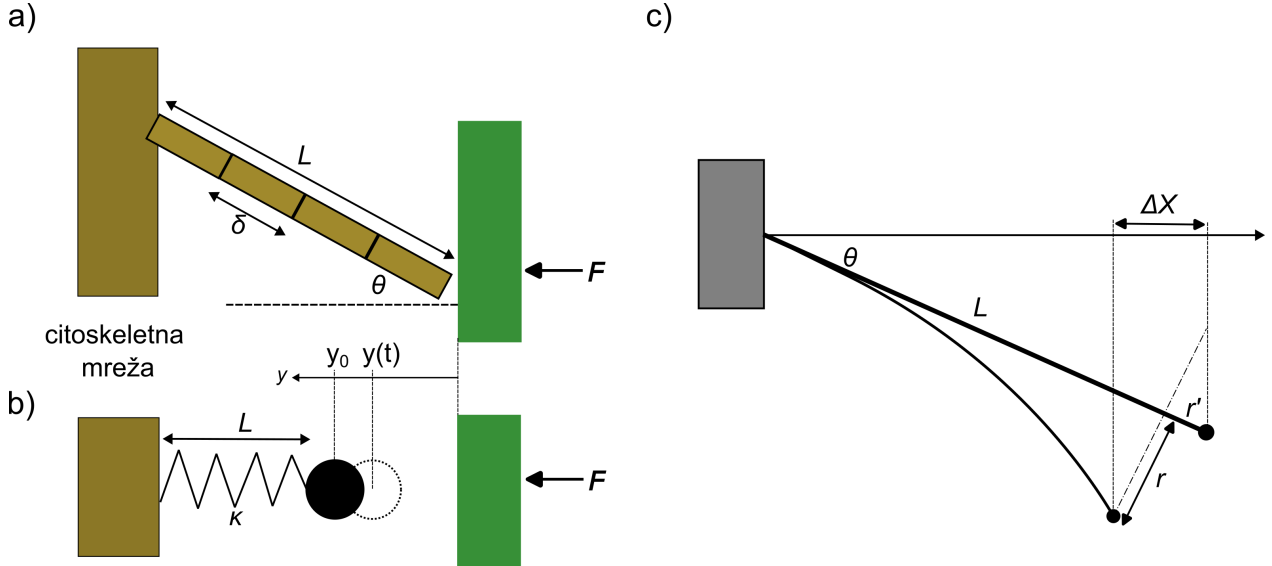
Reža v tem modelu nastane zaradi fluktuacije konice vlakna. Ker se vlakno lažje upogne kot stisne, vzemimo kot glavni način termičnega gibanja vlakna upogib. Ko se vlakno upogne, se njegova efektivna dolžina (tj. razdalja med citoskeletno mrežo in konico vlakna) zmanjša. Upogibajoče se vlakno si zato lahko predstavljamo kot vzmet z efektivno elastično konstanto κ , ki se skrči zaradi termičnega gibanja (slika 3b). Izračunajmo najprej efektivno konstanto vzmeti. Naj bo maksimalna ukrivljenost vlakna $1/R$, kjer je R polmer ukrivljenosti. Predpostavimo majhno ukrivljenost, tako da je $L \ll R$, kar je ekvivalentno pogoju $L \ll \xi_p$, kjer je ξ_p persistenčna dolžina vlakna. S pomočjo skice 3c pogledimo, za koliko se v smeri pravokotno na membrano skrajša vlakno dolžine L , ki je na začetku pod kotom θ glede na membrano in se ukrivi do krivinskega polmera R . Zapišemo lahko $\Delta X = r' \cos \theta + r \sin \theta$, kjer je $r' = L - R \sin(L/R) \approx L - R(L/R - L^3/6R^3) \approx L^3/6R^2$ in $r = R - R \cos(L/R) \approx R - R(1 - L^2/2R^2) \approx L^2/2R$. Tako je

$$\Delta X = \frac{L}{2} \left(\frac{L^2 \cos \theta}{R^2} + \frac{L}{R} \sin \theta \right) \approx \frac{L^2}{2R} \sin \theta,$$

kjer smo zaradi majhne ukrivljenosti zanemarili prvi člen. Tako lahko izrazimo $R \approx (L^2/2X) \sin \theta$. Upogibna energija vlakna je enaka

$$E = \frac{k_{\text{flex}}L}{2R^2} \approx \frac{2\xi_p k_B T}{L^3 \sin^2 \theta} \Delta X^2.$$

⁵Do zdaj smo elastičnost uporabili le za oceno kritične dolžine, pri kateri se vlakna uklonijo.



Slika 3. Elastična polimerizacijska zaskočka. (a) Shematični prikaz citoskeletnega vlakna (rjava) dolžine L z monomeri dolžine δ , ki je usmerjeno pod kotom θ glede na normalo pregrade (zelena). Sila F predstavlja elastične sile membrane, ki se upirajo deformaciji. Za vezavo monomera mora reža med konico vlakna in pregrado doseči vsaj $\Delta = \delta \cos \theta$. Polimerizacija poteka s hitrostjo $k_{\text{on}} m - k_{\text{off}}$. Citoskeletno mrežo (rjava) za vlaknom obravnavamo kot trdno sidro. (b) Upogibajoče se vlakno si predstavljamo kot vzmet s konstanto κ . y označuje razdaljo od pregrade do trenutne lege konice vlakna, ravnovesno lego pa označuje y_0 . (c) Izračun efektivne konstante vzmeti za citoskeletno vlakno. Upogib povzroči, da se vlakno efektivno skrajša za ΔX v smeri pravokotno na pregrado. Upogib vlakna si tako predstavljamo kot skrčitev vzmeti s konstanto κ za ΔX .

To primerjamo z energijo vzmeti s koeficientom κ in skrčkom ΔX :

$$E = \frac{\kappa \Delta X^2}{2}.$$

Od tod preberemo, da je

$$\kappa(\theta) = \frac{4\xi_p k_B T}{L^3 \sin^2 \theta}.$$

Določimo še verjetnost $\hat{p}$ za dovolj veliko režo. Postavimo izhodišče koordinatnega sistema v premikajočo se pregrado in naj y označuje oddaljenost konice vlakna do pregrade, kot prikazuje slika 3. Ravnovesno vrednost y označimo z y_0 . Tako bo upogibna energija vlakna, ki si ga predstavljamo kot vzmet, v danem trenutku enaka $E = \frac{\kappa}{2} (y - y_0)^2$, kjer je $y - y_0$ raztezek oziroma skrčitev vzmeti glede na ravnovesno vrednost. Prek fazne vsote lahko določimo verjetnost, da se konica vlakna s termično energijo $k_B T$ nahaja pri $y > \Delta = \delta \cos \theta$:

$$\hat{p}(\theta, y_0) = \frac{\int_{\delta \cos \theta}^{\infty} \exp(-\kappa(y - y_0)^2 / 2k_B T) dy}{\int_0^{\infty} \exp(-\kappa(y - y_0)^2 / 2k_B T) dy}.$$

Kot rezultat teorije želimo hitrost v v odvisnosti od sile F , ki nasprotuje gibanju pregrade in je ob konstantni hitrosti gibanja nasprotno enaka sili, s katero vlakno deluje na pregrado. V članku [3] so prek odvoda proste energije vlakna izpeljali silo, ki jo povzroča konica vlakna zaradi termičnih nihanj:

$$F(y_0) \approx k_B T \frac{\exp(-\kappa y_0^2 / 2k_B T)}{\int_0^{\infty} \exp(-\kappa(y - y_0)^2 / 2k_B T) dy}.$$

Ta sila je monotonno padajoča funkcija y_0 , zato lahko v dveh posebnih primerih najdemo njen inverz $y_0(F)$ (za izpeljave glej [3]). V prvem mejnem primeru je energija vzmeti majhna v primerjavi s

termično energijo in sila vzmeti majhna v primerjavi s silo, ki nasprotuje gibanju pregrade. Takrat je vlakno, ki se upira pregradi, skoraj vedno upognjeno in so termične fluktuacije zanemarljive, zato se obnaša kot navadna vzmet, tj.

$$F \approx -\kappa y_0.$$

V drugem primeru je energija vzmeti velika v primerjavi s termično energijo in sila vzmeti velika v primerjavi s silo, ki nasprotuje gibanju pregrade. Takrat velja

$$y_0 \approx \sqrt{\frac{k_B T}{\kappa} \ln \left(\frac{\kappa k_B T}{2\pi F^2} \right)} \longrightarrow F \approx \sqrt{\frac{\kappa k_B T}{2\pi}} \exp(-\kappa y_0^2 / 2k_B T).$$

Če je torej vlakno trdo in zunanja sila majhna, bo y_0 zelo velik in vlakno bo povzročalo silo na pregrado le ob zelo velikih termičnih fluktuacijah.

Zdaj lahko verjetnost $\hat{p}(\theta, y_0)$ v teh posebnih primerih prepišemo v $\hat{p}(\theta, F(y_0))$ in dobimo hitrost polimerizacije

$$V(F, \theta) \approx \delta \cos \theta (k_{\text{on}} m \hat{p}(\theta, F) - k_{\text{off}}). \quad (7)$$

Zanimivo pri tem modelu je dejstvo, da hitrost polimerizacije v odvisnosti od kota θ ni monotona funkcija, temveč ima svoj maksimum pri določenem kotu θ_c . Če je vlakno namreč usmerjeno pravokotno na membrano ($\theta = 0$), potem obstaja možnost, da termične fluktuacije ne bodo mogle upogniti vlakna dovolj za vezavo novega monomera. Po drugi strani pa vlakno, ki raste vzporedno z membrano ($\theta = \pi/2$), ne more potiskati membrane, zato je pregrada pri miru. Tako je očitno, da mora obstajati optimalen kot, pri katerem vlakno ustvarja največjo silo na membrano. Sklepamo lahko, da optimalni kot θ_c raste s silo bremena F in s parametrom k_{flex} , pada pa z dolžino prostega konca L [3].

5. Zaključek

Polimerizacijska zaskočka je mehanizem za potiskanje celične membrane oziroma celice same in opravljanje mehanskega dela. Osnovni princip delovanja zaskočke je usmerjena difuzija zaradi rasti citoskeletnega vlakna. Vlakno raste oziroma se krajša tako zaradi termičnega gibanja pregrade in vlakna kot tudi zaradi ohranjanja reakcije polimerizacije izven ravnotežja (upoštevali smo, da reakcija lahko poteka v obe smeri). Izračunali smo največjo silo [enačba (1)], s katero lahko vlakno na ta način potiska membrano, in pri kateri dolžini se vlakno ukloni [enačba (2)]. Poleg tega smo ocenili hitrost rasti vlakna v različnih režimih rasti:

- polimerizacija zaradi difuzije pregrade brez zunanje sile [enačba(3)],
- polimerizacija zaradi počasne difuzije pregrade [enačba(5)],
- polimerizacija zaradi počasne vezave monomerov [enačba(6)].

Eksperimenti so pokazali, da hitrost polimerizacije ni sorazmerna z difuzijsko konstanto, zato smo zavrgli hipotezo, da je polimerizacija posledica difuzije membrane. Model smo nato nadgradili z upoštevanjem elastičnosti citoskeletnih vlaken, kjer smo predpostavili, da so za nastanek dovolj velike reže odgovorne konice vlaken, ki se zaradi termične energije upogibajo. Upogib vlaken smo modelirali kot preprosto vzmet s konstanto κ ter prek verjetnosti za nastanek ustrezne reže izrazili hitrost polimerizacije [enačba(7)]. Nadaljnje izboljšave modela upoštevajo še:

- strukturo citoskeletnih vlaken, ki so sestavljena iz več protofilamentov z različnim številom monomerov, zato se sila med njih ne razporedi enakomerno [6];

- fazo rasti, med katero so aktinska vlakna prek proteinskih kompleksov vezana na membrano celice [7];
- interakcije med vlakni z obravnavanjem citoskeleta kot zveznega elastičnega sredstva [8].

Tako razširjeni modeli se zato bolje ujemajo z eksperimentalnimi opažanji.

LITERATURA

- [1] J. V. Small in K. Rottner, *Elementary Cellular Processes Driven by Actin Assembly: Lamellipodia and Filopodia*, v M. Carlier, *Actin-based Motility* (Springer Dordrecht, 2010).
- [2] C. S. Peskin, G. M. Odell in G. F. Oster, *Cellular Motions and Thermal Fluctuations: The Brownian Ratchet*, *Biophysical Journal* **65** (1993), 316–324.
- [3] A. Mogilner in G. F. Oster, *Cell Motility Driven by Actin Polymerization*, *Biophysical Journal* **71** (1996), 3030–3045.
- [4] J. He, B. Sui, Y. Jin, C. Zheng in F. Jin, *Cell Condensation Initiates Organogenesis: the Role of Actin Dynamics in Supracellular Self-organizing Process*, *Cell & Bioscience* **15** (2025).
- [5] R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot in H. G. Garcia, *Physical Biology of the Cell*, CRC Press, 2013, New York.
- [6] A. Mogilner in G. F. Oster, *The Polymerization Ratchet Model Explains the Force-Velocity Relation for Growing Microtubules*, *European Biophysics Journal* **28** (1999), 235–242.
- [7] A. Mogilner in G. F. Oster, *Force Generation by Actin Polymerization II: The Elastic Ratchet and Tethered Filaments*, *Biophysical Journal* **84** (2003), 1591–1605.
- [8] F. Gerbal, P. Chaikin, Y. Rabin in J. Prost, *An Elastic Analysis of Listeria monocytogenes Propulsion*, *Biophysical Journal* **79** (2000), 2259–2275.