



## De biologie en wiskunde van strepen

Veel van de mooiheid en schoonheid van de natuur neemt de mens waar omdat het om regelmatige patronen gaat. Regelmaat is essentieel in de natuur omdat het informatie organiseert. Hierdoor kunnen functies aan structuren worden gegeven en processen zoals bijvoorbeeld communicatie wordt mogelijk. Het is dus een belangrijke vraag binnen de biologie hoe symmetrie en meer of minder regelmatige patronen binnen het leven ontstaan en hoe de expressie hiervan geregeld kan worden.

Eerste experimentele bewijzen achter de vorming van een aantal regelmatige structuren zoals strepen op vacht, geometrische patronen op schelpen of de aanleg van lichaamssegmenten begonnen in de late jaren zeventig duidelijk te worden. In 1995 werd er een Nobelprijs voor dit soort onderzoek aan Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus en Edward Lewis uitgereikt. Een van de theorieën achter deze fenomenen is echter al veel ouder en werd in 1952 door de Britse wiskunde Alan Turing geformuleerd. In zijn publicatie “The Chemical Basis of Morphogenesis” stelt hij voor, puur gebaseerd op theoretische overwegingen, dat een simpel en in het begin homogeen systeem door bepaalde reacties en diffusie mechanismen in staat kan zijn om een grotere hoeveelheid en variabiliteit aan vormen en patronen te creëren dan voorafgaande aan de begintoestand het geval was.

Biologische gebeurtenissen baseren op wisselwerkingen van moleculen. Een lokaal verhoogde concentratie van een bepaalde stof kan bijvoorbeeld een signaalfunctie vervullen om aan deze bepaalde plek tot celgroei of –differentiatie te leiden. Maar hoe kan nu uit een homogene een dergelijke graduele verdeling met maximum en minimum concentraties van een stof ontstaan? Turing's theorie voorspeld dat dit mogelijk wordt door een wisselwerking van ten minste twee stoffen die gekoppeld zijn aan diffusie door biologische structuren heen (Fig. 1 (C)). De ene stof wordt “activator” genoemd en heeft een positieve terugkoppeling op zijn eigen aanmaak via een feedbackloop. De tweede stof heet “inhibitor” en beïnvloedt de concentratie van de activator negatief. Hij moet zich sneller verdelen en breekt de activator af of remt zijn positieve feedbackloop. Volgens Turing's theorie, die ook elementen van de natuurkundige en zogenoemde chaostheorie bevat, is een puur homogene verdeling van beide stoffen niet mogelijk. Meer

of minder toevallige concentratie veranderingen van de stoffen of minimale ongelijke verdelingen zijn voldoende om uit een simpel twee-stoffen-verdeling een complex netwerk van interacties te vormen. Dit is mogelijk omdat al een minimale verhoging van de activator op een plek tot een enorm versterkte zelf-catalyse kan leiden. De inhibitor kan vooral de lokale beginconcentraties sterk beïnvloeden. Op macroscopische schaal lijdt deze dynamica vervolgens tot niet-homogene patronen die best regelmatig en symmetrisch kunnen zijn. Periodische lichaamsstructuren of vacht patronen zoals strepen kunnen het gevolg zijn. Echter hangt het resulterende patroon wel af van het bereik (diffusie) en levensduur van de stoffen (Meinhardt, Auf- und Abbau von Mustern in der Biologie, 2001).

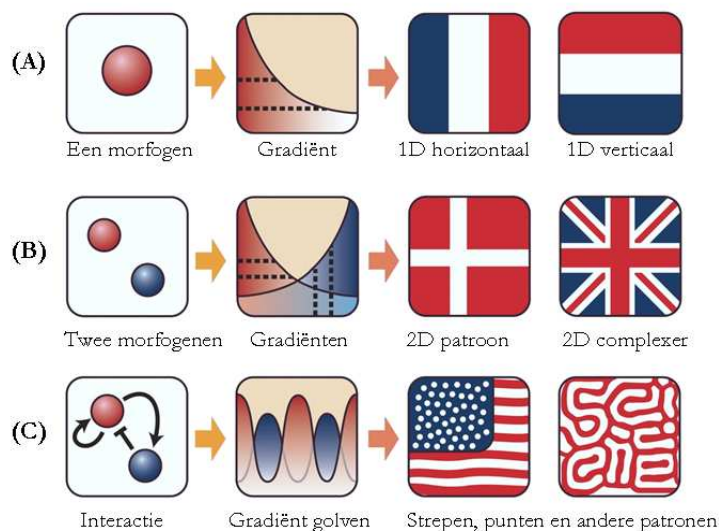


Fig. 1: Verschillen en overeenkomsten tussen het morfogen-gradient-model en Turing's reactie-diffusie theorie. (A) Eenvoudige gradiënt door diffusie. (B) Twee diffusie gradiënten leiden tot complexere patronen, maar er treedt geen zelfbeïnvloeding op. Alleen de morfogen bron en diffusie reguleren resulterende patronen. (C) Door interactie van twee of meer morfogene stoffen wordt het systeem zelf-regulerend en onafhankelijk van de begin condities. De complexiteit neemt verder toe (gebaseerd op: Kondo *et al.*, Reaction-Diffusion Model as a Framework for Understanding Biological Pattern Formation, 2010).

Een vergelijkbaar mechanisme die in de biologie zelfs nog vaker optreedt heet morfogen-gradient-model (Fig. 1 (A), (B)). Dit model mag niet verwisseld worden met Turing's theorie (Fig. 1 (C)). Hoewel het morfogen-gradiënt-model een onderdeel van deze theorie is, treden hier geen interacties van de aan de reactie deelnemende stoffen (morfogenen) op. Het leidt dus ook tot wat simpelere patronen omdat de gradiënten puur afhankelijk zijn van de bron en niet beïnvloed worden door interacties.

De ontwikkeling van een van de bestbestudeerde organismen, namelijk van de vlieg *Drosophila melanogaster*, en van veel anderen organismen verloopt volgens het in Fig. 1 genoemd morfogen-gradient-model. De "bron" van de gradiënten zijn in veel organismen eiwitten die door de moeder tijdens de bevruchting mee worden gegeven. Patroon vorming zonder voorafgaand patroon treedt dus niet vaak op. De theorie die Turing in 1952 heeft opgezet is dus niet altijd van toepassing en heeft onder de biologen geen te grote bekendheid. Vaak wordt er aan getwijfeld of Turing's theorie in de realiteit *überhaupt* klopt. Dat dit voor

sommige gevallen zo is, is inmiddels duidelijk geworden, dat het voor andere gevallen niet zo is sinds 2006 ook duidelijk (zie onder). Niets des te min en tegen de kritiek in heeft het reactie-diffusie model de kracht om theoretisch tot een lichaams patroon te leiden zonder van een initiële asymmetrie uit te gaan. De boven beschreven stof of morfogen interactie kan door een redelijk simpel wiskundig model worden beschreven. Fig. 2 geeft een samenvatting van de vier variabelen die per morfogen van toepassing zijn. Deze variabelen zijn de snelheid van de morfogen synthese, de snelheid van afbraak, de snelheid van diffusie en de kracht van de activator/inhibitor functie (resulterende concentratie verandering).

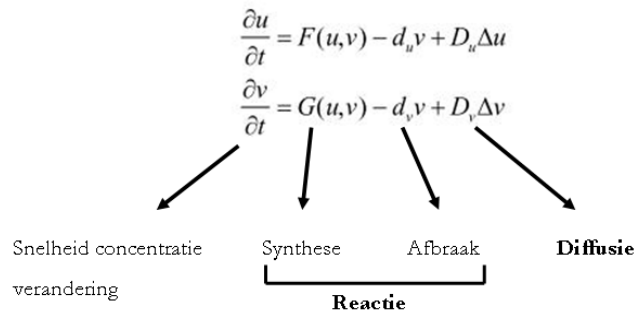


Fig. 2: Formule van Turing's reactie-diffusie theorie. Dit is echter niet de originele formule uit 1952, maar een over de tijd aangepaste versie ervan (gebaseerd op: <http://phylogenous.wordpress.com/2010/12/01/alan-turings-reaction-diffusion-model-simplification-of-the-complex/>).

De meest interessante conclusie die uit Turing's formule kan worden getrokken is, dat onder bepaalde omstandigheden voor D (diffusie coëfficiënten) en F en G (reactie kinetiek bestaande uit opbouw en afbraak snelheden) een dergelijk systeem in staat is om uniforme steady-state patronen te vertonen. Door gebrek aan diffusie blijven deze patronen stabiel, door de aanwezigheid van diffusie wordt echter een niet-stabiele verandering verkregen. Wat op het eerste oog logisch lijkt is echter niet logisch als men er nader op in gaat. Het verassende is dat als men de reactie kinetieken en diffusie apart beschouwd, het allebei redelijk stabiele gebeurtenissen zijn, die niet zomaar veranderen. Als echter beide met elkaar worden gecombineerd is het systeem plotseling niet meer stabiel en oorspronkelijk niet voorspelbare oplossingen worden nu mogelijk. Turing was een de eerste wetenschappers die deze manier van *emergentie* (emergent property), dus het vertonen van eigenschappen die niet zichtbaar zijn uit het reduceren van de delen, konden beschrijven. Complexiteit in de natuur kan dus door redelijk simpel mechanismen optreden.

Door de in Fig. 2 genoemde formules te gebruiken en bepaalde constanten in te vullen wordt het mogelijk om patronen te simuleren die ook in de natuur kunnen optreden. Middels de berekening te herhalen kunnen over de tijd heen verschillende patronen worden verkregen. Dit treedt in de natuur ook op (zie onder, *Zebravis*), hoewel de meeste patronen (zoals bij een tijger) na de embryonale ontwikkeling qua verhouding niet meer veranderen, maar alleen groter worden omdat het organisme groeit. Een interessante manier Turing's formule op te lossen en bovendien duidelijk te maken wat de resultaten ervan kunnen zijn werd door Christopher Jennings uitgewerkt. Het door hem geschreven programma kan op <http://cgjennings.ca/toybox/turingmorph/> worden bekeken.

Echter bleef en blijft een echte toepassing van Turing's reactie-diffusie model in de biologische praktijk, oftewel het vinden van ontwikkelingsmechanismen die erop baseren, nog steeds moeilijk te zijn. Toch lukte het Turing om een complexe vraagstelling in een simpelere context te plaatsen en op die manier een model te creëren dat de weg bereidde voor meer realistische theorieën. Vervolgens ga ik de weg van het Turing mechanisme naar een echte theorie binnen de biologie uitleggen.

Zulke eerste theorieën werden voor het eerst voornamelijk door de ontwikkelingsbioloog Hans Meinhardt beschreven. Samen met collega's onderzocht hij eerst patroonformatie en -regulatie in de zoetwaterpoliep *Hydra*. Dit dier bestaat maar uit enkele cellen en heeft een eenvoudige opbouw. Kunstmatig ingebrachte verstoringen kunnen makkelijk achtervolgd en geanalyseerd worden. Het volgde onderzoek naar de vorm, positie, segmentatie en aders van bladeren. Hoewel veel Turing patronen in de natuur meteen duidelijk waren, zoals op schelp dieren en vissen (Fig. 3), bleef het lastig om aan te tonen dat daadwerkelijke reactie-diffusie mechanismen hiervoor verantwoordelijk waren en niet een soort ander mechanisme.

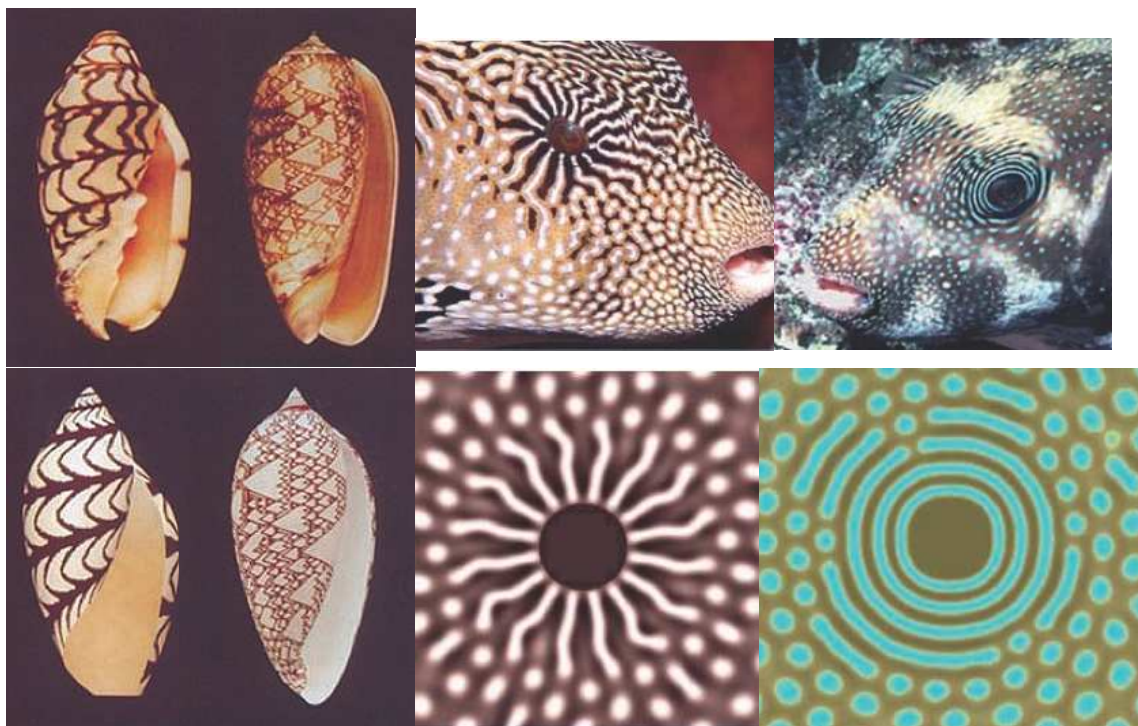


Fig. 3: In de natuur geobserveerde Turing patronen op schelpen en vissen (boven rij) en simulaties van het Turing mechanisme met uitkomsten die vergelijkbaar zijn aan de geobserveerde patronen (onder rij) (gebaseerd op: Meinhardt *et al.*, *The Algorithmic Beauty of Sea Shells*, 2003 en Sanderson, *Advanced Reaction-Diffusion Models for Texture Synthesis*, 2008).

Terwijl er een grote kans bestaat dat de betrokken processen in veel levende systemen optreden is de enige manier om er duidelijk over te hebben het daadwerkelijke aantonen van de activator en inhibitor. In biologische systemen bleek het moeilijk om de concentraties van meerdere stoffen lokaal en over de tijd

heen constant te kunnen meten. Om goede uitspraken over de natuur van de patronen te kunnen maken is het precieze volgen van de gradiënten echter een vereiste. Sinds het volgen van de gradiënten in biologische systemen voor een lange tijd niet mogelijk was focuste zich de wetenschap op meer gecontroleerde puur scheikundige omstandigheden. In de jaren vanaf 1980 werd het meer en meer duidelijk dat door de principes van Turing te gebruiken en op twee (activator, inhibitor) of meer stoffen toe te passen het mogelijk was om patronen te verkrijgen die door simulaties voorspeld waren. Fig. 4 geeft patronen weer die in een twee dimensionaal membraan-gel reactor volgens het reactie-diffusie model zijn verkregen. Het experiment maakt duidelijk dat al een simpel onderzoeksopbouw en kleine moleculen zoals malonzuur (dus niet noodzakelijkerwijs eiwitten) tot Turing patronen kunnen leiden. Het werd gebruik gemaakt van een polyvinyl alcohol gel waarvan de ene oppervlakte in contact staat met een roerende reactor die de aan de reactie betrokken stoffen bevat. De tegenoverliggende oppervlakte is verbonden aan een transparant stuk plexiglas waardoor het bekijken van de resultaten mogelijk is. Door de concentraties van de betrokken stoffen te veranderen konden verschillende patronen gecreëerd worden (Fig. 4).

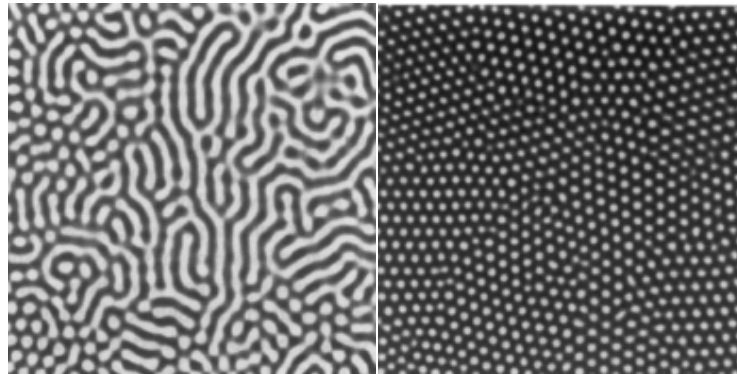


Fig. 4: Experimenteel in een tweedimensionale gel membraan reactor verkregen Turing patronen. Door een hoge malonzuur ( $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$ ) concentratie te gebruiken werden streepachtige patronen verkregen (links) en door de concentratie te halveren resulteerden hexagonale structuren (rechts). Alle anderen chemische parameters bleven gelijk (Vigil *et al.*, Turing patterns in a simple gel reactor, 1992).

Nadat de chemische basis van het fenomeen experimenteel kon worden getoetst, wordt er tegenwoordig weer meer onderzoek gedaan om Turing's reactie-diffusie model in biologische systemen op te sporen. In 1995 lukte het de Japanse wetenschappers Kondo en Asai voor het eerst om duidelijk aan te tonen dat het Turing mechanisme voor graduele streep patroon veranderingen tijdens het leven van de tropische vis *Pomacanthus imperator* verantwoordelijk is (Fig. 5 (A)). Een stationaire fase als bijvoorbeeld bij een tijger (strepen veranderen niet) treedt bij deze vissen niet op en Turing's model kan er makkelijker op deze dynamische fase toe gepast worden door de verandering van de strepen over te tijd heen te simuleren. Door de verandering van de vis streep patronen over te tijd heen te observeren lukte het Kondo en Asai de parameters van een aangepaste Turing formule (Fig. 2 en Fig. 5 (B), (C)) dusdanig te veranderen dat voorspellingen van toekomstige streep patronen mogelijk werden. Voor het eerst werd dus een

voorspelling van de ontwikkeling binnen een biologisch systeem met behulp van Turing's reactie-diffusie mechanisme gedaan.

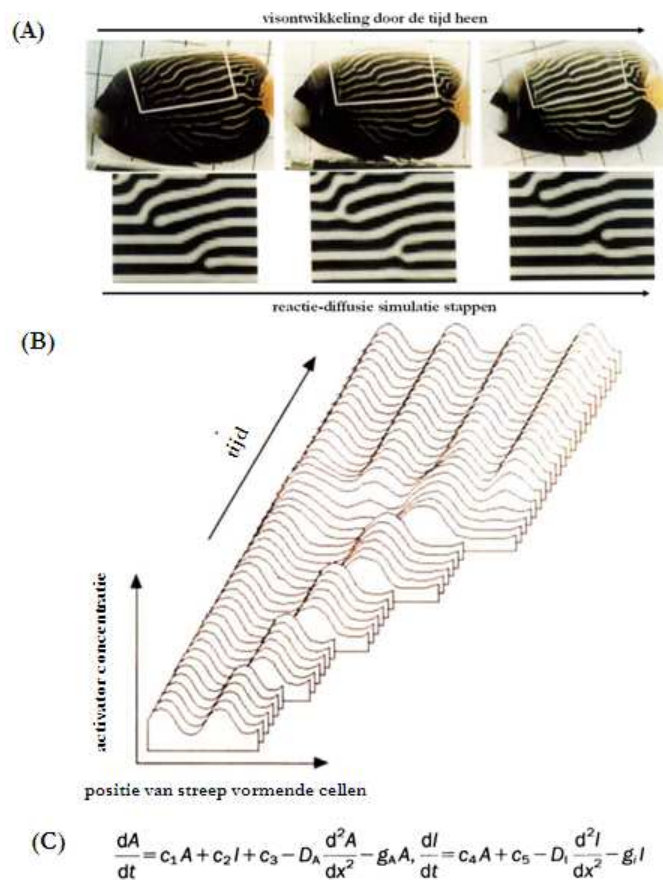


Fig. 5: Samenvatting van de onderzoek van Kondo en Ansaï met betrekking tot de simulatie van het streep patroon van vissen. (A) Boven rij: Geobserveerde streepontwikkeling van *Pomacanthus imperator*. Onder rij: Overeenkomende simulaties volgens het Turing mechanisme toegepast op een biologische oppervlakte. (B) Grafische uitkomst van Turing formule. (C) Ten grondslag liggende versie van Turing's formule met de elementen A en I (concentraties activator en inhibitor),  $D_A$  en  $D_I$  (diffusie constanten voor A en I),  $g_A$  en  $g_I$  (afbraak constanten voor A en I). Gebruikte waarden en limiet waarden voor realistisch uitkomsten volgens de Turing kinetiek zijn terug te vinden in de publicatie (gebaseerd op Kondo en Ansaï, A reaction-diffusion wave on the skin of the marine angelfish *Pomacanthus*, 1995).

Hoewel de resultaten van Kondo en Ansaï een sterke aanwijzing voor Turing's model onder bepaalde situaties zijn, is het scheikundig gezien nog steeds geen experimentele proef voor de theorie in een biologische context. Deze kon pas in 2006, dus 11 jaar later, worden bereikt door wetenschappers van het Max-Planck Instituut voor Immunobiologie (Sick *et al.*, WNT and DKK Determine Hair Follicle Spacing Through a Reaction-Diffusion Mechanism, 2006). Binnen dit onderzoeksproject werd zich niet zo zeer op echte kleurpatronen gefocust, maar op de verdeling haarfollikels. Het is mogelijk om ervan uit te gaan dat ook deze haarfollikels een bepaald patroon volgen en hun expressie dusdanig gereguleerd moet moeten. Het doel was om deze regulering aan het Turing mechanisme toe te kunnen schrijven in plaats van het morfogen-gradiënt model dat veel vaker in de biologie optreedt (zie ook Fig. 1). Uit eerder onderzoek was gebleken dat twee eiwitten met de namen WNT en DKK voor een van deze regulatie mechanismen verantwoordelijk moesten zijn. Vervolgens werd geprobeerd om meer over de functies van deze twee stoffen te komen weten door hun expressie in muis embryo's te remmen en te stimuleren. Door een computer simulatie met behulp van vergelijkbare formules zoals boven genoemd werden eerst bepaalde mogelijke patronen gesimuleerd die vervolgens experimenteel in de muis getest konden worden. Hieruit bleek dat het eiwit WNT een korte afstand activator functie en het eiwit DKK een lange afstand inhibitor

functie binnen dit systeem vertonen. Deze eigenschappen van stoffen zijn essentieel voor het werken van de Turing mechanisme. Bovendien geeft de gecombineerde onderzoeksopzet bestaande uit de computer simulatie en het gen expressie experiment sterke aanwijzingen voor de juistheid van het Turing's reactie-diffusie model in deze biologische context.

Omdat WNT en DKK al langer ervoor bekend staan betrokken te zijn bij een groot aantal regulatie processen (dus niet alleen haarfollikels), geeft dit de theoretische mogelijkheid en aanwijzing dat Turing's theorie misschien breder in de biologie vertegenwoordigd is dan ooit gedacht. Het is echter wel zo dat de aanwezigheid van WNT en DKK niet noodzakelijkerwijs ook een aanwezigheid voor een Turing mechanisme is. Hier spelen ook andere factoren weer een rol. Essentieel is daarom nog steeds de experimentele identificatie van de specifieke dynamica van een reactie-diffusie systeem om het Turing mechanisme hier precies aan te kunnen koppelen. Zoals boven uitgelegd is dit voor haarfollikels en sommige pigment patronen al gelukt. De meerderheid van de meeste andere systemen is echter moeilijk te analyseren omdat de nodige mutaties meestal dodelijk voor het gebruikte organisme zijn. Observaties die computer simulaties zouden kunnen bevestigen zijn dus vaak niet haalbaar. Toch valt er nog veel te ontdekken. Een voorbeeld hiervoor is een recente publicatie uit maart 2011 die aantoont dat een bepaalde variant van Turing's reactie-diffusie systeem theoretisch en praktisch in een gecontroleerde omgeving in staat is om ook driedimensionale patronen te kunnen creëren (Bánsági *et al.*, Tomography of Reaction-Diffusion Microemulsions Reveals Three-Dimensional Turing Patterns, 2011). Gebaseerd op theoretische overwegingen was al langer duidelijk dat een grote variëteit aan driedimensionale patronen door Turing mechanisme gestuurde reacties mogelijk zouden kunnen zijn. Dit zijn vooral cubische patronen, hexagonale cilinders en lamella-achtige patronen welke niet alleen maar extensies van tweedimensionale oplossingen zijn, maar geheel nieuwe patronen. Met behulp van tomografie bleek het mogelijk te zijn sommige patronen uit een chemische reactor zichtbaar te maken (Fig. 6). Hierbij gaat het niet om een 2D gel-reactor zoals eerder uitgelegd, maar om micro-emulsie druppels die omgeven zijn door een surfactant wat de stabiliteit van deze microreactoren verhoogd. Door verschillende polaire en apolaire stoffen in de water respectievelijk de olie fase van de emulsie te gebruiken, konden specifieke diffusie patronen gecontroleerd tot expressie worden gebracht.

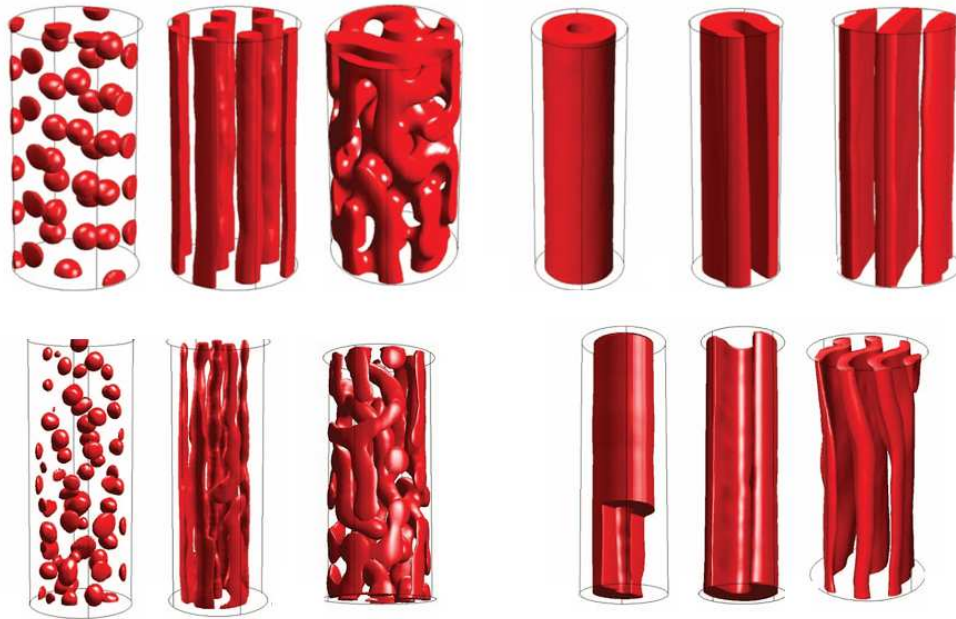


Fig. 6: Driedimensionale Turing patronen volgens het reactie-diffusie model verkregen door computer simulaties (boven rij) en tomografische beelden van overeenkomende structuren uit een micro-emulsie reactor (onder rij). Door middel van aanpassingen van de parameters van de Turing formule was het mogelijk om de uitkomsten van de oscillerende Belousov-Zhabotinsky reactie te beïnvloeden. Parameters van de reacties en computer simulaties zijn na te lezen in de publicatie (gebaseerd op: Bánsági *et al.*, Tomography of Reaction-Diffusion Microemulsions Reveals Three-Dimensional Turing Patterns, 2011).

Meer dan 50 jaar nadat Turing zijn theorie publiceerde zijn er nog steeds veel van de belangrijke vragen niet beantwoord. Een van de hoofdvragen is het onvermogen van de klassieke Turing formule de gradiënt vorming in een niet-statisch, dus expanderend systeem, te verklaren. De meeste organismen groeien voortdurend, vooral natuurlijk tijdens de ontwikkeling. Voor een dergelijke situatie heeft Turings theorie geen goede oplossingen. Hoewel er onderzoeksgroepen bestaan die zich met gemodificeerde versies van de theorie bemoeien is er nog geen voldoende oplossing gevonden. Maar: Voor het geval dat Turing's theorie niet helemaal klopt, betekent dit nog lang niet dat ze geen toegevoegde waarde aan de wetenschap bezit. Het is best mogelijk dat een toepasbaarheid op nog niet getoetste systemen goed mogelijk is.

Sinds jaren wordt dus al duidelijk dat er geen ultieme manier bestaat die in de biologie vastlegt hoe de strepen van een tijger ontstaan en tegelijkertijd bepaald hoe haarfollikels worden aangelegd. Patroon formatie binnen de ontwikkelingsbiologie blijkt een vrij heteroog onderzoekgebied te zijn. Alan Turing's theorie maakt er een onderdeel van uit, maar is niet geschikt om alle verschijnselen te verklaren. Toch is deze theorie een goed voorbeeld van de gecombineerde kracht en de invloed die twee natuurwetenschappelijke disciplines op elkaar kunnen hebben. Deze combinatie van wiskunde en experimentele biologie heeft een grote kans om ook in de toekomst nog tot interessante en veelbelovende inzichten te leiden.