

Meten aan microbuisjes

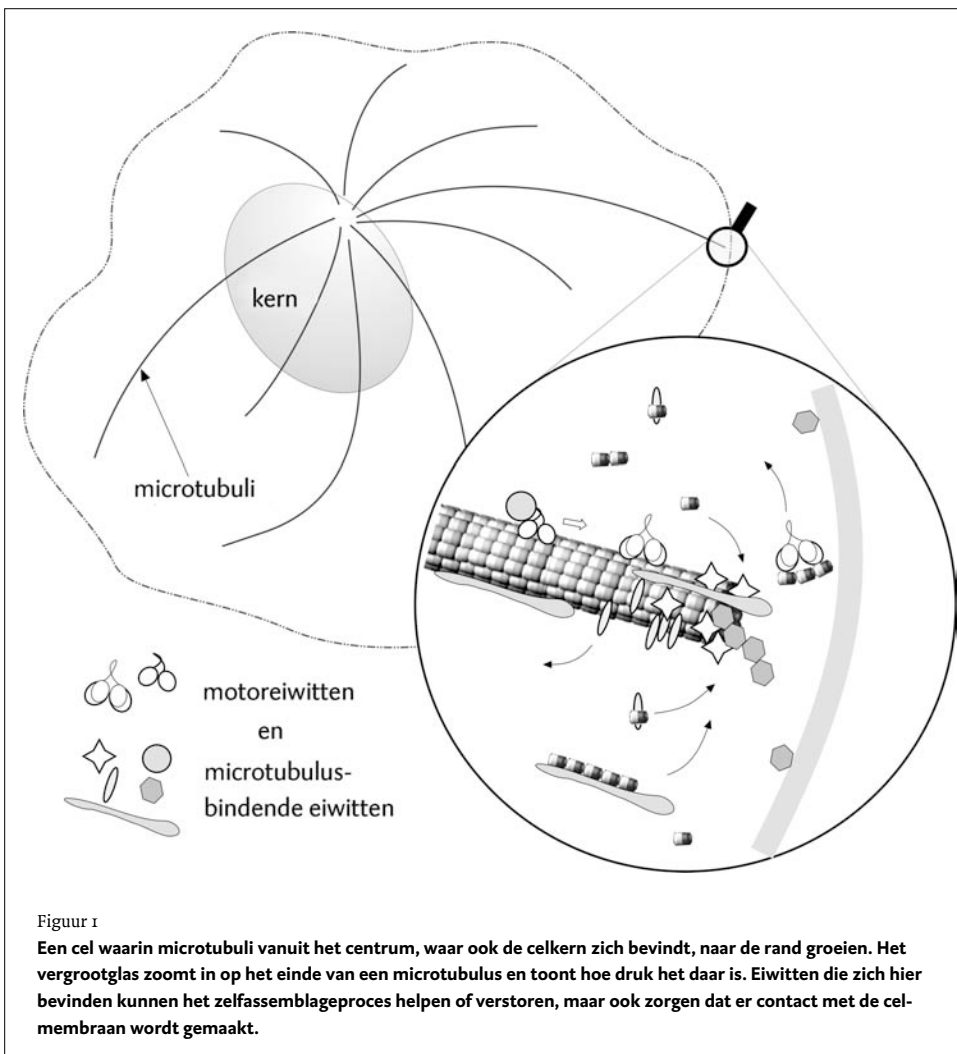
Microtubuli zijn zelfassemblerende eiwitdraden [1] die helpen het binnenste van levende cellen te organiseren [2]. Om het zelfassemblagegedrag beter te begrijpen, hebben we een techniek ontwikkeld om op moleculaire schaal de groei van microtubuli te kunnen volgen. Het blijkt dat microtubuli niet slechts groeien door toevoeging van een enkel tubuline-eiwit, maar dat ook aaneengeschakelde tubuline-eiwitten zich als geheel aan de microtubulus kunnen binden [3].

Liedewij Laan, Laura Munteanu, Jacob Kerssemakers en Marileen Dogterom

Het is de laatste jaren steeds beter mogelijk om specifieke eiwitten in de cel te lokaliseren. In onze groep zijn wij erg geïnteresseerd in microtubuli en de eiwitten die zich specifiek aan het einde van deze microbuisjes binden. Microtubuli maken deel uit van het cytoskelet, het skelet van de cel. Ze groeien vanuit het centrum van de cel naar de rand, waar ze bijvoorbeeld contact kunnen maken met de celmembraan. Het einde van groeiende microtubuli (figuur 1) blijkt een behoorlijk complex geheel te zijn waar veel verschillende eiwitten samenkomen [4]. Waarom deze eiwitten daar binden is nog onduidelijk. Waarschijnlijk beïnvloeden sommige de microtubuli zelf, terwijl andere meeliften naar de rand van de cel. Het is ook nog een open vraag hoe de eiwitten het einde van de microtubuli herkennen. Daarvoor moeten we eerst begrijpen hoe het einde van de microtubulus er op de moleculaire schaal uitziet en wat daar tijdens het groeiproces precies gebeurt.

WAT WETEN WE VAN MICROTUBULI?

Een microtubulus is een minuscule buisje dat opgebouwd is uit dertien lange strengen van tubuline-eiwitten. Het tubuline-eiwit is een 8 nm-lang dimeer dat bestaat uit een α -tubulinemonomeer en een β -tubulinemonomeer die een nauwe verbinding aangaan. Onder de juiste condities (temperatuur, pH, concentratie, enzovoort) rijgen de tubuline-eiwitten zich spontaan aan tot een microtubulus. De microtubulus is echter geen stabiel polymeer, maar wisselt periodes van groei af met snelle krimp. Dit grillige



met moleculaire resolutie

gedrag wordt ook wel *dynamische instabiliteit* genoemd (zie het kader 'Dynamische instabiliteit').

Sinds het mogelijk is om dit eiwit te zuiveren worden de processen van zelfassemblage en dynamische instabiliteit uitvoerig bestudeerd. Zo kan met lichtmicroscopie de groei en krimp van microtubuli *live* gevolgd worden (figuur 2a). Doordat de resolutie van zichtbaar licht echter ~ 250 nm is, kijken we in dat geval wel naar bulk-eigenschappen: binnen 250 nm-microtubulus passen zo'n vierhonderd tubuline-eiwitten van 8 nm. Elektronenmicroscopie biedt wel de mogelijkheid aparte tubuline-eiwitten te zien (figuur 2b), zij het in gefixeerde, 'dode' monsters, omdat deze bevroren moeten worden. Met deze techniek is het dus onmogelijk de dynamica van het groei gedrag te volgen. Hoe het aangroeien van microtubuli op moleculaire schaal plaatsvindt, was daarom tot nu toe een vraag die we met een nieuwe techniek geprobeerd hebben te beantwoorden.

METEN MET MOLECULAIRE RESOLUTIE

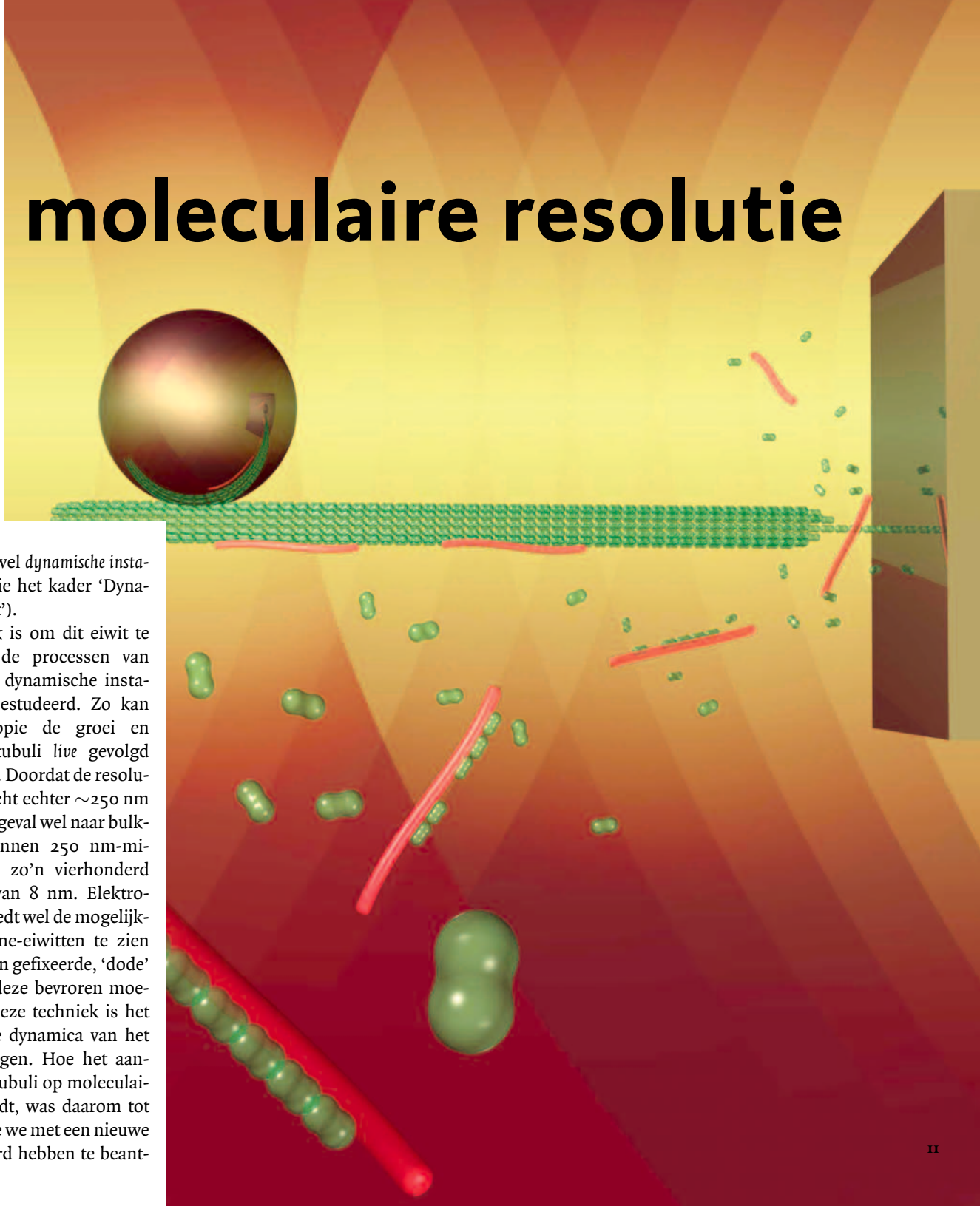
De techniek die we ontwikkeld hebben is gebaseerd op een optisch pincet [5] (zie het kader 'Optisch pincet' en figuur 3b). Een bolletje dat is vastgeplakt aan een bundel microtubuli wordt vastgehouden door een optisch pincet. Dit construct van bundel en bolletje is voor een micromuurtje geplaatst. Tijdens het experiment voegen we tubuline en GTP toe, waardoor er een microtubulus vanuit de bundel tegen het muurtje groeit. Als we het bolletje heel slapjes vasthouden, zal de microtubulus, als hij het muurtje

raakt, het bolletje verplaatsen en zo ruimte maken om verder te groeien (figuur 3a). Doordat het optisch pincet de bundel vasthoudt, kan het construct alleen langs de groei-as bewegen. Het prettige gevolg hiervan is, dat we de lengteveranderingen die plaatsvinden aan het einde van de microtubulus kunnen meten door de verplaatsing van het bolletje te meten. Met een autocorrelatiemethode van beelden in opeenvolgende plaatjes is de positie van het bolletje op nanometerschaal te detecteren, en wordt zo de resolutieli-

miet van de lichtmicroscopie doorbroken. Een illustratie daarvan is te zien in figuur 3c. Aan het begin van het experiment heeft de groeiende microtubulus het muurtje nog niet bereikt en is de verplaatsing van het bolletje nul. Zo gauw de microtubulus in contact komt met het muurtje begint het bolletje te bewegen. Nu kan de groei en de krimp van de microtubulus gevolgd worden.

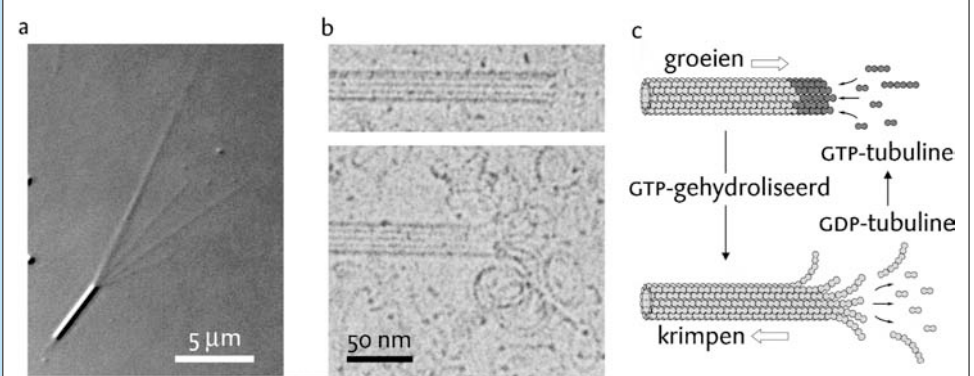
MOLECULAIRE GROEI

In figuur 4a zien we de groei van een microtubulus, maar nu met hoge reso-



Dynamische instabiliteit

Een microtubulus groeit door de zelfassemblage van tubuline dat GTP (guanosinetriphosfaat) aan zich gebonden heeft. GTP wordt net als ATP door de cel gebruikt om energie in op de slaan. Na aanhechting wordt GTP gehydrolyseerd tot GDP en komt de opgeslagen energie vrij. Hierdoor verandert echter de conformatie van het tubuline: het is niet langer recht, maar wil graag naar buiten buigen. Aangenomen wordt dat hierdoor de microtubulus instabiel wordt (figuur 2b en 2c). Zolang er echter GTP-tubuline aan het groeiende einde zit, is de microtubulus stabiel. Als deze stabiliserende kap verdwijnt, schakelt de microtubulus van groei naar krimp. Pas als zich een nieuwe GTP-kap vormt kan de microtubulus weer groeien. Dit proces van plotseeling schakelen tussen groei en krimp noemen we *dynamische instabiliteit* [1].



Figuur 2

a. Lichtmicroscopieplaatje waarin meerdere dynamische microtubuli te zien zijn die uit een gestabiliseerde bundel van microtubuli groeien. b. Elektronenmicroscopieplaatje van een groeiende (boven) en een krimpende microtubulus (onder) [8]. c. Cartoon van b, met hoe we denken dat GTP hydrolysegroei kan laten omslaan in krimp. [Aangepast uit *Molecular Biology of the Cell*, vierde editie]

lutie. De ruis in de meting, deels thermische ruis en deels een gevolg van de eindige stijfheid van ons construct, is 5 tot 10 nm. De aanhechting van een tubulinedimeer, met een lengte van 8 nm, is dus niet van de ruis te onderscheiden. Toch zijn er in de data, zelfs met het oog, stappen te zien die groter zijn dan de ruis. Als we een *stap-vind-algoritme* gebruiken – een methode die we hebben ontwikkeld om automatisch

stappen te detecteren – vinden we een significant aantal stappen van 20 tot 30 nm. Dit betekent dat we niet alleen kijken naar de toevoeging van een enkele dimeer maar ook van complexen van drie tot vier tubuline-eiwitten.

In figuur 4b is de groei van een microtubulus in aanwezigheid van het eiwit XMAP215 te zien. XMAP215 is een eiwit waarvan uit bulkexperimenten bekend is dat het de groeisnelheid van micro-

tubuli verhoogt [6]. Het is een lang eiwit, dat over zijn lengte tot acht tubuline-eiwitten kan binden. Wat voor interactie het XMAP215 heeft met de microtubuli en hoe het de groeisnelheid beïnvloedt, was tot nu toe nog onbekend. Als we kijken naar de groei van een microtubulus met tubuline en een kleine hoeveelheid XMAP215 (ongeveer één XMAP215-eiwit op honderd tubuline-eiwitten), zien we dat de microtu-

Optisch pincet

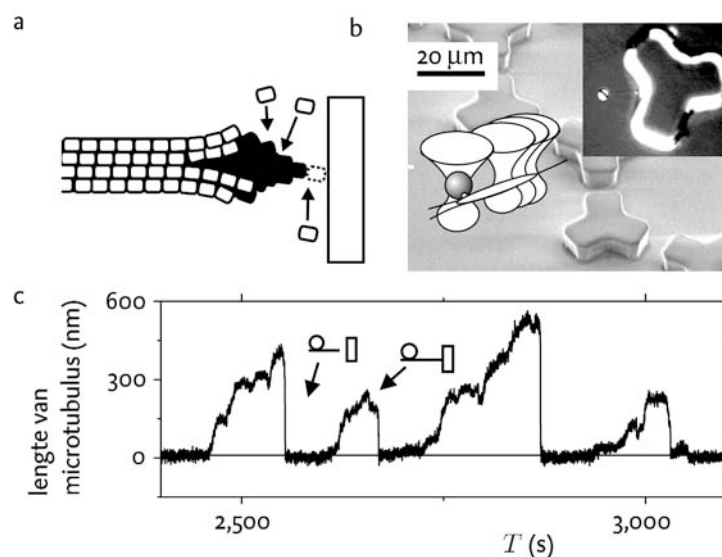
Een optisch pincet maakt gebruik van de impuls van fotonen. Als de fotonen door een glazen bolletje worden afgebogen, verandert hun impuls en dus ook

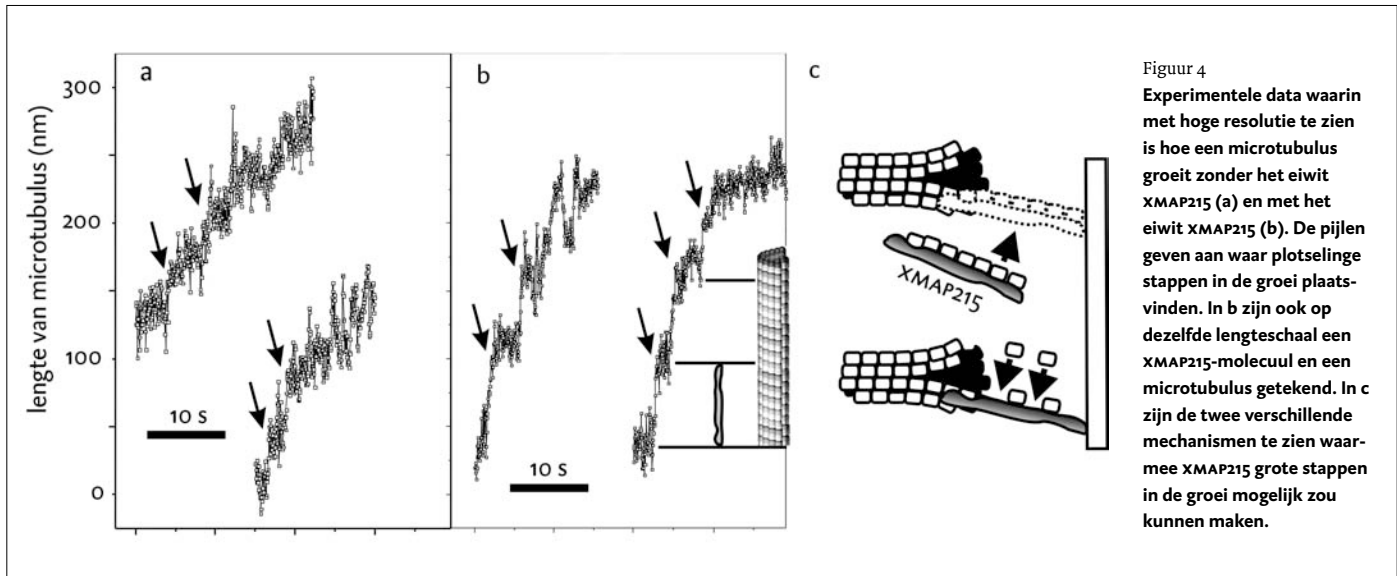
die van het bolletje. Zo kan op een voldoende klein bolletje (van enkele micrometers) met voldoende fotonen (tientallen milliwatts), een kracht in de orde van piconewtons (10^{-12}) uitgeoefend worden. Doordat dit ook de orde van grootte is van moleculaire krachten in cellen, wordt het optisch pincet veel bij biofysisch onderzoek toegepast [5]. Tot nu toe is deze techniek vooral gebruikt om de trekkrachten te meten die bijvoorbeeld motoreiwitten kunnen produceren. Onze opstelling met een pincet die gelijktijdig het bolletje

en de bundel vasthoudt, maakt het nu ook mogelijk om aan duwende eiwitpolymeren te meten.

Figuur 3

a. Cartoon waarin getoond wordt hoe een microtubulus tegen een muur groeit. b. Schematische afbeelding waarin een construct van een microtubulibundel en een bolletje te zien is, tegen een micromuurtje. De foto laat een microscopieopname van dit experiment zien. c. Grafiek waarin de groei van de microtubulus uitgezet is tegen de tijd.





Figuur 4
Experimentele data waarin met hoge resolutie te zien is hoe een microtubulus groeit zonder het eiwit XMAP215 (a) en met het eiwit XMAP215 (b). De pijlen geven aan waar plotselinge stappen in de groei plaatsvinden. In b zijn ook op dezelfde lengteschaal een XMAP215-molecuul en een microtubulus getekend. In c zijn de twee verschillende mechanismen te zien waarmee XMAP215 grote stappen in de groei mogelijk zou kunnen maken.

bulus inderdaad sneller groeit. We zien weer stappen, maar deze stappen zijn 40 tot 60 nm groot. XMAP215 maakt dus de toevoeging van grotere complexen mogelijk. We denken dat dit op twee verschillende manieren kan gebeuren (figuur 4c). XMAP215 kan tubuline binden in de oplossing en als geheel binden aan de microtubulus. XMAP215 kan echter ook eerst aan het einde van de microtubulus binden en dan als een mal dienen voor tubuline. Wij vermoeden dat het eerste het geval is, omdat ook met de elektronenmicroscopie is aangetoond dat XMAP215 in de oplossing aan tubuline bindt.

MOLECULAIRE INTERACTIE ONTRAFELD

Sinds men in 1963 voor het eerst sprak over microtubuli naar aanleiding van de

eerste elektronenmicroscopieplaatjes in cellen, zijn microtubuli uitvoerig bestudeerd. Met onze techniek, gebaseerd op het optisch pincet, kunnen we voor het eerst met moleculaire resolutie de groei van microtubuli *live* bekijken. Deze metingen leren ons dat microtubuli niet slechts dimeer voor dimeer groeien, maar dat ook oligomeren van enkele dimeren in hun geheel aan de microtubulus binden. We kunnen ook voor het eerst zien hoe microtubulus bindende eiwitten (MAPs, Microtubule Associated Proteins) op moleculaire schaal de groei van microtubuli beïnvloeden. Met het optisch pincet kunnen we daarnaast ook een kracht uitoefenen op groeiende microtubuli, die zelf tijdens die groei krachten genereren [7]. Voor de cel zou het wellicht erg nuttig

zijn om deze krachtgeneratie te kunnen sturen door middel van MAPs. We willen gaan bestuderen of er eiwitten zijn die daadwerkelijk de krachtgeneratie beïnvloeden en hoe ze dat op moleculair niveau doen.

REFERENTIES

1. A. Desai en T.J. Mitchison, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** (1997), 83–117.
2. M. Dogterom, et al., *Current Opinion in Cell Biology* **17** (2005), 67–74.
3. J.W.J. Kerssemakers, et al., *Nature* **442** (2006), 709–712.
4. G. Lansbergen en A. Akhmanova, *Traffic* **7** (2006), 499–507.
5. A. Ashkin, *PNAS* **9** (1997), 4853–4860.
6. D.L. Gard en M.W. Kirschner, *J. Cell. Biol.* **105** (1987), 2203–2215.
7. M. Janson en M. Dogterom, *NTvN* **69** (2003), 280–281.
8. E.M. Mandelkow, et al., *J. Cell Biol.* **114** (1991), 977–991.



Liedewij Laan (1980) studeerde technische natuurkunde aan de Universiteit Twente. Sinds mei 2005 doet zij promotieonderzoek in de groep Bio-as-

sembly and organization van Marileen Dogterom aan het FOM-instituut voor Atoom- en Molecuulfysica (AMOLF).



Laura Munteanu (1978) studeerde biofysica/medische fysica aan de A.I. Cuza Universiteit te Iasi (Roemenië) en voltooide haar masters in de biofysica aan het Niels Bohr Instituut van de universiteit van Kopen-

hagen (Denemarken). Sinds september 2003 is ze promovenda in de groep Bio-assembly and organization op het AMOLF-instituut te Amsterdam, onder begeleiding van Marileen Dogterom.



Jacob Kerssemakers (1968) is in 1993 afgestudeerd bij technische natuurkunde in Delft en promoveerde in 1997 in Groningen op atomaire tribologie. Daarna is hij gaan werken in de vaste-stoffysica aan de Vrije Uni-

versiteit, in de bio-assemblage bij AMOLF, en bio-nanotechnologie aan het MPI-Moleculaire Biologie & Genetica in Dresden. Tegenwoordig werkt hij aan microscopieontwikkeling in Berlijn.



Marileen Dogterom (1967) studeerde theoretische natuurkunde aan de RUG, voltooide haar promotieonderzoek aan de Universiteit Leiden. Haar groep Bio-assembly and organization houdt zich bezig met voornamelijk experimenteel onderzoek aan celbiofysica. Zij is groepsleider

dogterom@amolf.nl