

Nanomachientjes organiseren het skelet van de cel

Het skelet van de cel bestaat voor een belangrijk deel uit microtubuli, die de cel in groeien vanuit het centrosoom, een structuur in de buurt van de celkern. De plaats van het centrosoom in de cel bepaalt in belangrijke mate de interne organisatie van een cel en is daarom van groot belang [1,2]. Om de positionering van het centrosoom beter te begrijpen, hebben we dit proces nagebouwd in een kunstmatige cel met behulp van gezuiverde eiwitten en microfabricagetechnieken [3]. Onze experimenten laten zien hoe de organisatie van het skelet bepaald wordt door kleine nanomachientjes, zogenaamde dyneine motoreiwitten, die op de rand van de cel aanwezig zijn. Begrip van dit proces is belangrijk om bijvoorbeeld celdeling en celbeweging te kunnen verklaren. Liedewij Laan en Marileen Dogterom

294

Organisatie van de cel door het cytoskelet

Binnen de veranderlijke omgeving van een cel verlopen de meeste processen verrassend genoeg juist heel goed georganiseerd, zowel in de ruimte als in

Liedewij Laan (1980) studeerde technische natuurkunde aan de Universiteit Twente. Daarna heeft zij haar promotieonderzoek verricht in de groep Bio-assembly and organization van Marileen Dogterom aan het FOM-instituut AMOLF. Momenteel doet zij postdoctoraal onderzoek in de systeembio-logie op het FAS Center for Systems Biology op Harvard University, in Cambridge, Massachusetts, in de Verenigde Staten.



llaan@mcb.harvard.edu

de tijd. De structuur, die (mede) verantwoordelijk is voor deze cellulaire organisatie is het skelet van de cel, het cytoskelet. Het cytoskelet bestaat uit verschillende eiwitfilamenten waaronder microtubuli. Microtubuli zijn holle eiwitbuisjes die zelfassembleren uit tubuline-eiwitten en de fascinerende eigenschap van dynamische instabiliteit bezitten: ze schakelen continu tussen periodes van groei en krimp [1]. Deze dynamiek maakt het mogelijk om binnen korte tijd zeer verschillende structuren van microtubuli te bouwen. Zo vormen microtubuli tijdens de celdeling een complexe spoelstructuur, de kernspoel, die een belangrijke rol speelt bij de verdeling van het DNA.

In dierlijke cellen groeien microtubuli vanaf een centrosoom

naar de rand van de cel: de celcortex (figuur 1a). De plaats van het centrosoom bepaalt in hoge mate de interne organisatie van een cel en is daarom van groot belang. Maar hoe 'meten' centrosomen hun positie in de cel,

Marileen Dogterom (1967) studeerde theoretische natuurkunde aan de RUG, voltooide haar promotieonderzoek bij Princeton University en was als postdoc verbonden aan Bell Labs van Lucent Technologies. Zij is groepsleider en afdelingshoofd Systeembiofysica bij AMOLF en sinds 2000 hoogleraar aan de Universiteit Leiden. Haar groep houdt zich bezig met voornamelijk experimenteel onderzoek aan de biofysica van cellulaire processen.

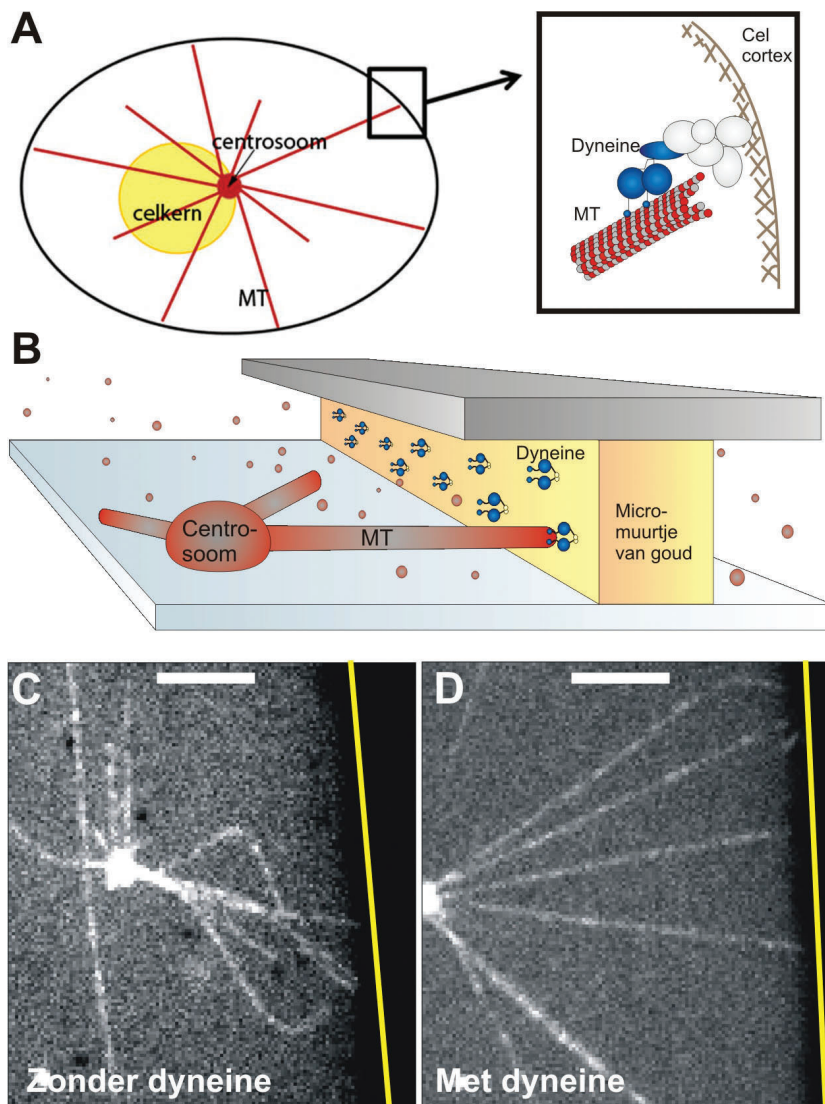


dogterom@amolf.nl

hoe passen zij die desgewenst aan en hoe worden de krachten gegenereerd om deze aanpassingen mogelijk te maken? Biofysische experimenten hebben laten zien dat dynamische microtubuli zelf krachten kunnen uitoefenen: groeiende microtubuli genereren duwkrachten en krimpende microtubuli genereren trekkrachten [2]. Ook weten we dat het motoreiwit dyneïne, een nanomachientje, een rol speelt bij de generatie van trekkrachten aan de cortex (figuur 1a, detail) [4,5]. Het mechanisme van deze krachtgeneratie is echter onbekend. We weten bijvoorbeeld niet of dyneïne dit alleen kan of dat er meer eiwitten voor nodig zijn, of hoe deze trekkrachten de dynamiek van microtubuli beïnvloeden. Bovendien is het nog altijd een open vraag hoe het collectief van duw- en trekkrachten van dynamische microtubuli en motoreiwitten bijdraagt tot een correcte positionering van centrosomen in de cel. De complexiteit van de levende cel zorgt er mede voor dat deze vragen in vivo lastig te beantwoorden zijn. Wij hebben dit probleem aangepakt door drie verschillende minimale model-systemen te ontwikkelen, die we in vitro experimenten noemen en die ons, samen met een wiskundig model, beter inzicht hebben gegeven in bovengenoemde vragen.

Motoreiwitten aan de 'cortex' reguleren de lengte van microtubuli (figuur 1bcd)

In onze in vitro experimenten laten we microtubuli tegen kunstmatige muurtjes groeien en krimpen, als een minimale benadering van de celcortex. In ons eerste experiment in de cartoon in figuur 1b zien we een centrosoom, dat aan het onderoppervlak geplakt zit, waar vandaan microtubuli naar een gouden micromuurtje groeien, waar motoreiwitten (dyneïnemoleculen) aan geplakt zitten. De motoreiwitten zijn specifiek via goudchemie aan het muurtje gehecht. Omdat de toegevoegde tubuline-eiwitten fluorescent gelabeld zijn, kunnen we de microtubuli met behulp van confocale fluorescentiemicroscopie zichtbaar maken. Uit eerdere experimenten weten we dat microtubuli die tegen een muurtje groeien, gewoon kunnen doorgroeien en dus moeten buigen [2]. In de snapshot in figuur 1c, waar motoreiwitten achterwege zijn gelaten, zien we in-



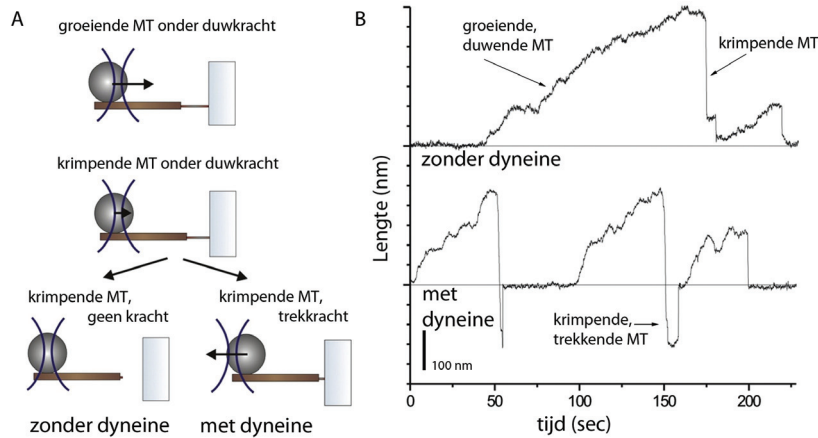
Figuur 1 Motoreiwitten aan de 'cortex' reguleren de lengte van microtubuli. a) Cartoon van een cel met daarin een aster van microtubuli: een centrosoom van waaruit microtubuli (MT) naar de celcortex groeien. Het detail laat het motoreiwit dyneïne zien dat zich op de cortex bevindt en waar het uiteinde van een microtubulus bindt. b) Cartoon van het experiment waarin een centrosoom op een glasoppervlak is bevestigd. Microtubuli groeien vanuit het centrosoom naar een gouden micromuurtje met daarop specifiek dyneïnemoleculen geplakt. c,d) Confocale fluorescentiemicroscopie-plaatjes met microtubuli, die tegen een muurtje zonder c) en met d) motoreiwitten groeien (onderaanzicht). De gele lijn geeft de positie van het muurtje aan. De schaalbalk is vijf micrometer.

derdaad verscheidene gebogen microtubuli. In dit geval wordt de lengte van de microtubuli dus niet gecontroleerd door de interactie met de 'cortex'. Als er motoreiwitten aan het muurtje zitten is de situatie echter anders (snapshot figuur 1d). De microtubuli, die het muurtje raken, stoppen met groeien, maar krimpen ook niet: hun uiteinde wordt gestabiliseerd door het contact met de 'cortex'. Als gevolg hiervan is de lengte van de microtubuli precies aangepast aan de afstand tussen het centrosoom en het muurtje. Hoe nu verandert dyneïne de dynamiek van microtubuli zo dramatisch? Worden de rechte, gestabiliseerde microtubuli

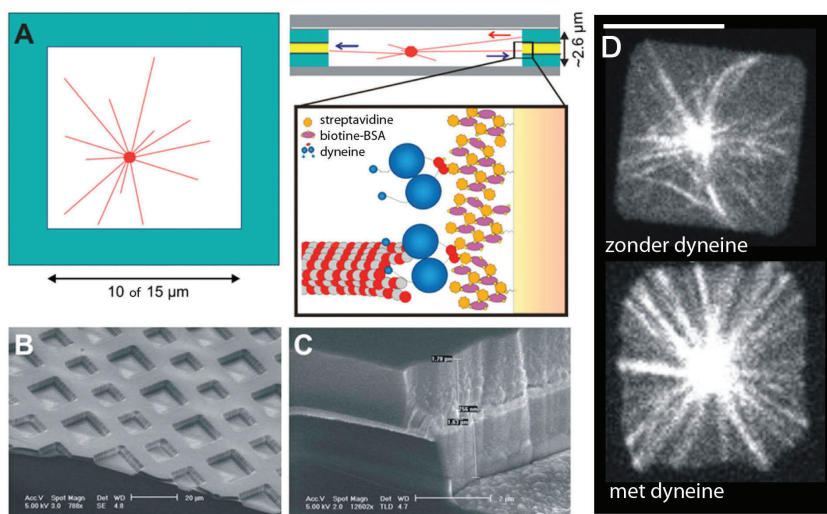
tegen de muur aangetrokken, terwijl ze eigenlijk proberen te krimpen, of weerhoudt dyneïne de microtubuli er alleen maar van om verder te groeien?

Motoreiwitten en krimpende microtubuli genereren samen trekkrachten (figuur 2)

Om de interactie tussen dyneïne en het uiteinde van de microtubulus in meer detail te bestuderen, hebben we een opstelling met een optisch pincet gebruikt, die eerder in ons lab is ontwikkeld [6, 7]. Met een optisch pincet kan op een bolletje van enkele micrometers een kracht in de orde van piconewtons uitgeoefend worden



Figuur 2 Motoreiwitten en krimpende microtubuli genereren samen trekkkrachten. a) Schematische weergave van de verschillende mogelijke krachten op groeiende en krimpende microtubuli in onze optische-pincetopstelling. b) Groei en krimp van dynamische microtubuli tegen een muurtje zonder dyneïne (boven) en met dyneïne (onder).



Figuur 3 Asters van microtubuli centreren beter in microkamertjes met dan zonder motoreiwitten aan de rand. a) Cartoon van een microkamertje. In de zijmuren is een goudrand aangebracht waar dyneïnemoleculen aan gebonden kunnen worden. Detail: een laag van de verbindingseiwiitten streptavidine en biotine-BSA zorgt voor optimale binding. b) Elektronenmicroscopie-plaatje van microkamertjes. c) Elektronenmicroscopie-plaatje van een zijwand van een microkamertje, waar de goudrand zichtbaar is. d) Confocale fluorescenciemicroscopie-plaatjes van kamertjes met asters erin, zonder (boven) en met (onder) dyneïne aan de randen. De schaalbalk is tien micrometer. Zonder dyneïne vindt maar 30% van de centrosomen het exacte midden (middelste 4% oppervlak) van de kamertjes. Met dyneïne is dit 95% [3].

[8]. Aan zo'n bolletje plakken we een bundel van microtubuli vast en dit geheel wordt voor een micromuurtje geplaatst. Tijdens het experiment voegen we tubuline toe, waardoor er een microtubulus vanuit de bundel tegen het muurtje groeit. De positie van het bolletje kan met hoge nauwkeurigheid gedetecteerd worden en uit de positie kan de kracht op de microtubulus berekend worden. Zo gauw de groeiende microtubulus het muurtje raakt, kunnen de groei en daaropvolgende krimp van de microtubulus gevolgd worden via de beweging van het bolletje (figuur 2ab). De krimp kan normaal gesproken alleen maar ge-

volgd worden totdat het bolletje terug is op zijn oorspronkelijke positie. In de aanwezigheid van dyneïne blijft het contact tussen de krimpende microtubulus en de muur echter behouden en wordt het bolletje naar de muur togetrokken (figuur 2b). Dyneïne is dus in staat trekkkrachten van een paar piconewton uit te oefenen op een krimpende microtubulus.

Motorgegeneerde trekkkrachten leiden tot het efficiënt centreren van asters van microtubuli (figuur 3)

We weten nu dat dyneïnemoleculen samen met krimpende microtubuli

trekkkrachten kunnen genereren en dat groeiende microtubuli duwkrachten genereren. De grote vraag blijft echter hoe een centrosoom met behulp van het krachtenspel, gegenereerd door vele microtubuli, zijn juiste positie in de cel vindt? Om deze vraag te beantwoorden, hebben we een minimale kunstmatige cel gebouwd: een centrosoom wordt opgesloten in een goudomrand microkamertje met of zonder motoreiwitten aan de randen van de kamer (figuur 3a). Zodra lange microtubuli beginnen te groeien, bepalen hun interacties met de randen van het kamertje de positie van het centrosoom. Door kamertjes met en zonder motoreiwitten te vergelijken, kunnen we de rol van duw- en trekkkrachten in het positioneringsproces bestuderen. In figuur 3d is een centrosoom in een kamertje zonder dyneïne (boven) en een kamertje met dyneïne (onder) te zien. Door van veel verschillende kamers de positie van het centrosoom te meten, kunnen we bepalen of er verschillen zijn in de posities met en zonder dyneïne. Tot onze grote verrassing en in tegenspraak met eerdere speculaties [2], centreren centrosomen in kamertjes met motoreiwitten beter dan in kamertjes zonder motoreiwitten en dus zonder trekkkrachten.

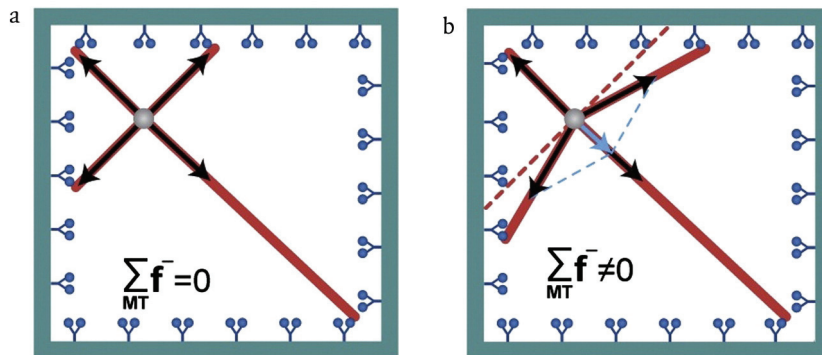
Asters van microtubuli centreren door een combinatie van duw- en trekkkrachten (figuur 4)

Om deze verrassende observatie te verklaren hebben we een simpel mechanisch model opgesteld. In dit model beschouwen we twee populaties microtubuli: duwende microtubuli en trekkende microtubuli. De duwkracht hangt af van de lengte van de microtubulus, omdat de kracht die een microtubulus doet buigen omgekeerd evenredig is met de lengte in het kwadraat. De trekkkracht is onafhankelijk van de lengte. Deze ingrediënten zijn echter niet genoeg om voor een centrering door trekkkrachten te zorgen, zoals we in figuur 4a kunnen zien: alle trekkkrachten heffen elkaar op en hebben geen centrerende werking. Het nieuwe en sleutelement in ons model is nu dat groeiende, duwende microtubuli langs de muur glijden voordat ze gegrepen worden door een motoreiwit. Deze houdt vervolgens verder glijden tegen en genereert een trekkkracht. De anisotrope hoekverdeling van microtubuli, die hierdoor

ontstaat, oefent op een centrosoom een kracht naar het centrum van het kamertje uit, zoals kwalitatief in de cartoon in figuur 4b te zien is. Deze kwalitatieve beschrijving komt goed overeen met kwantitatieve berekeningen, die uit dit model volgen [3].

Tot slot

Door een minimaal modelsysteem te ontwikkelen voor de interactie tussen dynamische microtubuli en de cel-cortex, hebben we voor het eerst kunnen aantonen hoe centrosomen gebruik kunnen maken van dynamische microtubuli, om hun afstand tot de cortex te meten. We hebben ook laten zien dat ‘corticale’ motoreiwitten trekkkrachten kunnen genereren aan krimpande microtubuli. Vervolgens hebben we aangetoond hoe centrosomen de duw- en trekkkrachten van verschillende microtubuli kunnen integreren om hun positie in een afgesloten geometrie te bepalen. Uiteraard is het nu van belang om experimenten te ontwerpen die kunnen aantonen of dit mechanisme ook daadwerkelijk in de meer complexe werkelijkheid van levende cellen van belang is. Dit zal ons begrip van processen als celde-



Figuur 4 De combinatie van duw- en trekkkrachten zorgt voor betrouwbare centrering. Cartoon, die de netto trekkkrachten ($\sum \vec{f}$) laat zien zonder (a) en met (b) duwende en glijdende microtubuli. Zonder het duwen en glijden van microtubuli is de netto trekkkracht op het centrosoom nul. Na het glijden van microtubuli ontstaat, door interactie met motoreiwitten, een net-centrerende trekkkracht op het centrosoom.

ling en celmigratie verder vergroten, processen die essentieel zijn voor veel toegepast biomedisch onderzoek.

Referenties

- 1 A. Desai en T.J. Mitchison, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** (1997), 83–117.
- 2 M. Dogterom, J.W.J. Kerssemakers, G. Romet-Lemonne en M.E. Janson, *Current Opinion in Cell Biology* **17** (2005), 67–74.
- 3 L. Laan, N. Pavin, J. Husson, G. Romet-Lemonne, M. van Duijn, M. Preciado-Lopez, R.D. Vale, F. Jülicher, S.L. Reck-Peterson en M. Dogterom, *Cell* **148** (2012), 502–514.
- 4 S.W. Grill, P. Gonczy, E.H. Stelzer en A.A. Hyman, *Nature* **409** (2001), 630–633.
- 5 J.C. Labbe, P.S. Maddox, E.D. Salmon, B. Goldstein, *Curr. Biol.* **13** (2003), 707–714.
- 6 J.W.J. Kerssemakers, E.L. Munteanu, L. Laan, T.L. Noetzel, M.E. Janson en M. Dogterom, *Nature* **442** (2006), 709–712.
- 7 L. Laan, L. Munteanu, J. Kerssemakers en M. Dogterom, *NTvN*, **72** (2006), 388–391.
- 8 A. Ashkin, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **9** (1997) 4853–4860.