

# Moleculaire houdgreep ontrafeld

Eiwitten zijn de bouwstenen van het leven. Echter, hoe eiwitten in cellen in hun uiteindelijke vorm worden 'gevouwen' is nog slecht bekend. Wij hebben het vouwen van afzonderlijke eiwitten bestudeerd door ze mechanisch te manipuleren met een optisch pincet. Zo konden wij blootleggen hoe zogenaamde chaperonnes dit vouwproces dirigeren. Ruud van Leeuwen en Sander Tans

Eiwitten zijn de bouwstenen en werkpaarden van ons lichaam. Zonder eiwitten kunnen cellen niet delen, kan onze boterham niet verteerd worden en zou ons DNA snel in de knoop raken, muteren en uit elkaar vallen. Bij de productie van een eiwit moet een polypeptide, een lange keten van aminozuren, in een specifieke drie-dimensionale vorm worden 'opgevouwen', vergelijkbaar met het omtoveren van een vel origamipapier tot een kraanvogel. Alleen in deze specifieke vorm kan een eiwit zijn functie uitoefenen. Sterker nog, verkeerd gevouwen eiwitten kunnen dodelijk zijn voor een cel en uiteindelijk zelfs voor het lichaam. In het geval van de ziekte van Alzheimer bijvoorbeeld, klonteren verkeerd gevouwen eiwitten in de hersencellen samen tot naaldachtige structuren. Deze kunnen leiden tot afsterven van hersenweefsel en uiteindelijk tot dementie.

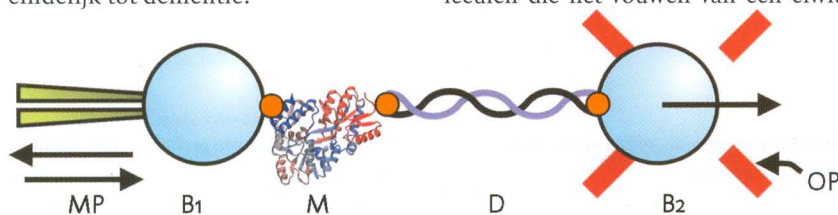


Schematische representatie van het binnenste van een *E. coli*-bacterie, met daarin een chaperonne-molecuul (SecB, geel) dat een eiwit (MBP) in een half ontvouwen toestand houdt. Illustratie (Sander Tans & Graham T. Johnson ©2007)

Om dergelijk onheil te voorkomen heeft de cel allerlei machinerieën om verkeerd gevouwen eiwitten af te breken en – waar het in ons artikel om gaat – om te voorkomen dat eiwitten überhaupt verkeerd opvouwen. Moleculen die het vouwen van een eiwit

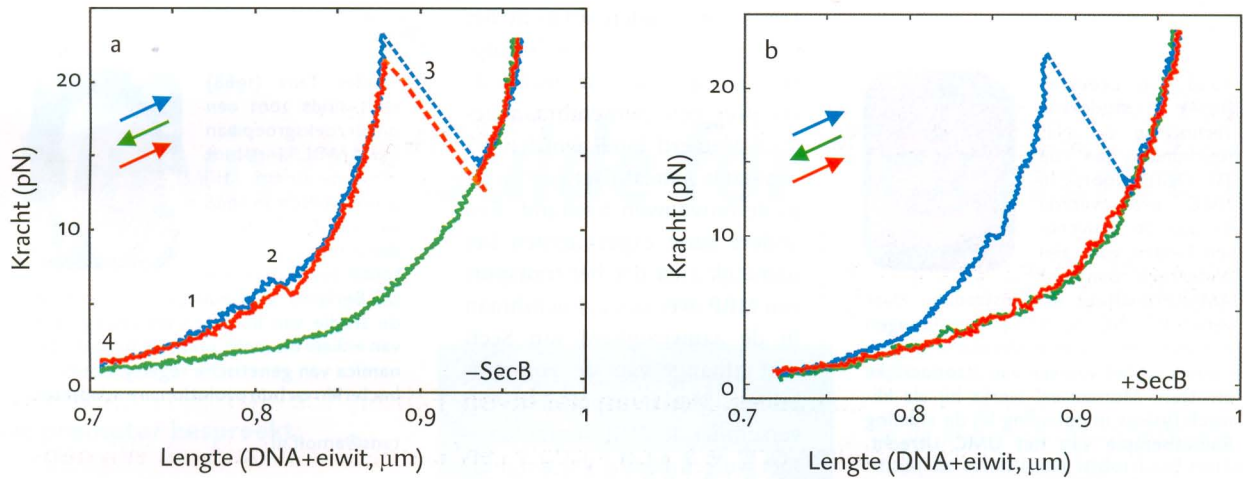
beïnvloeden worden chaperonnes genoemd. Deze zijn al eerder bestudeerd, maar steeds voor miljarden eiwitten en chaperonnes tegelijk, waardoor de cruciale vouwbewegingen van eiwitten vervagen in de massa. Wij hebben een nieuw experiment ontwikkeld waarmee het effect van chaperonnes op deze vouwbewegingen in één enkel eiwit zichtbaar werd. In dit experiment wordt een individueel eiwit bij de uiteinden beetgepakt. Zo konden wij het eerst actief uit elkaar trekken en het daarna langzaam weer spontaan op laten vouwen [1]. Door de chaperonnes wel of niet toe te voegen kon het effect daarvan worden vastgesteld. Al eerder waren individuele eiwitten op deze manier uit elkaar getrokken, maar het effect van chaperonnes was daarin niet onderzocht.

Voor onze metingen hebben wij gebruik gemaakt van een optisch pincet. Optische pincetten worden in de biofysica en celbiologie gebruikt om kleine krachten, piconewtons, te kunnen uitoefenen op cellen of biomoleculen. Met behulp van het optisch pincet en een aantal verbindingsmoleculen konden wij het eiwit MBP uit de *E. coli*-bacterie vastmaken aan twee bolletjes, die door het optisch pincet bewogen kunnen worden (zie figuur 1). Om te voorkomen dat de twee bolletjes tijdens een experiment aan elkaar gingen plakken, werd een DNA-molecuul tussen het eiwit en een van de bolletjes



**Figuur 1** Schematische weergave van ons experiment met eiwit MBP (M). Aan de linkerzijde wordt het eiwit beetgehouden door een polystyreen balletje (B1, diameter ~2 µm) op een micropipet (MP). Rechts zit het eiwit via een DNA-molecuul (D) gekoppeld aan nog een balletje (B2) in het optisch pincet (OP). Door de micropipet te bewegen ten opzichte van het optisch pincet kan de kracht worden gewijzigd.



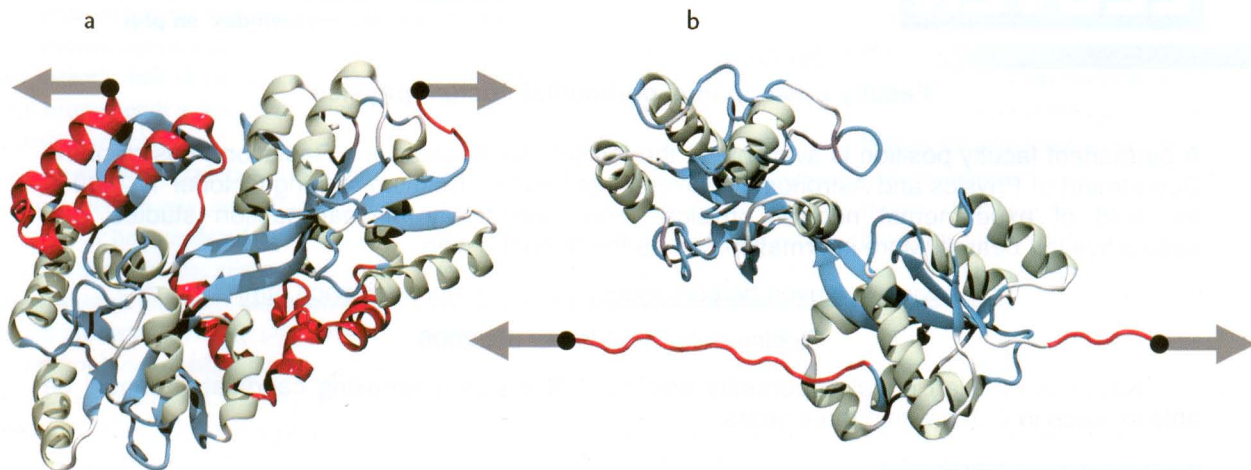


**Figuur 2** Voorbeelden van onze experimenten. a) MBP wordt een keer ontvouwen (blauw), waarna de kracht verlaagd wordt (groen) en het eiwit een tweede keer wordt ontvouwen (rood). De verschillende interessante stapjes in het ontvouwen zijn aangegeven met nummers (zie tekst). b) Hetzelfde experiment in de aanwezigheid van chaperonne SecB.

geplaatst. Dit DNA-molecuul is stukken groter dan een gevouwen eiwit (800 versus 5 nm) en levert zo de benodigde ruimte. Een consequentie is dat in de metingen behalve eiwit(ont)vouwing ook de flexibiliteit van DNA te zien zal zijn. Om de moleculen aan elkaar te koppelen gebruikten wij verschillende moleculaire verbindingen. Bij het verhogen van de kracht op de MBP-eindjes, konden wij het eiwit zien ontvouwen. Figuur 2a laat het verloop van een dergelijk experiment zien. In eerste instantie wordt bij het verhogen van de kracht alleen het DNA uitgerekt (1). Vanaf een bepaalde kracht, in het voorbeeld bij 6 pN, begint het eiwit te ontvouwen (2), wat te zien is als een vergroting van het molecuul. Het ontvouwen bleek met schokken te gaan, en niet als een continue beweging. De meeste eiwitten ontvouwen in twee stappen: een klein stapje bij een kracht van 5-10 pN en een grotere stap boven de 20 pN (3). Na het ontvouwen

van het eiwit brachten we de kracht weer terug naar opN en wachtten we gedurende een bepaalde tijd (4). Als lang genoeg werd gewacht – typisch enkele seconden – vouwde het eiwit opnieuw met een hoge kans en kon het opnieuw worden ontvouwen. Computersimulaties (moleculaire-dynamicasimulaties) hielpen ons bij het verklaren van de stapjes in de ontvouwingsexperimenten. Tot dusver was er nog weinig bekend over de vouw- en ontvouwbewegingen van MBP. In de simulaties konden wij de beweging van elk afzonderlijk atoom tijdens het ontvouwen nabootsen. Het eiwit heeft meer dan 5000 atomen, en daarnaast werden ook alle watermoleculen gesimuleerd, dus vanzelfsprekend vergt dit enorm veel rekenkracht. Uit de simulaties bleek dat het kleine stapje bij 6 pN overeenkomt met het lostrekken van ongeveer 100 aminozuren, die losjes rond een stabielere kern zitten gewikkeld (zie figuur 3). Deze stabiele

kern ontvouwt vervolgens zelf in zijn geheel bij een hogere kracht. Tijdens een ontvouwingsexperiment kon de chaperonne SecB worden toegevoegd, zodat nauwkeurig het effect van de chaperonne op elk van de stapjes in vouwen en ontvouwen kon worden bestudeerd. In figuur 2b is te zien hoe MBP in aanwezigheid van SecB eerst op een normale manier ontvouwt. Als de kracht weer wordt verlaagd, lukt het MBP echter niet meer om weer opnieuw te vouwen. Van MBP is bekend dat bepaalde stukjes van de aminozuurketen kunnen binden aan SecB. Het lijkt er in onze experimenten op dat SecB delen van het ontvouwen eiwit ‘beetpakt’ en zo voorkomt dat het eiwit zijn gevouwen vorm weer aanneemt. Wat kan nu het doel zijn van deze vouwingsverstoring? Een tweede set experimenten gaven een deel van het antwoord. Deze lieten zien dat SecB ook het samenklonteren van meerdere



**Figuur 3** Computerweergave van MBP met in rood de aminozuren die eerst ontvouwen in onze experimenten. a) gevouwen toestand. b) toestand na het afrollen van de ‘rode’ aminozuren.



Ruud van Leeuwen (1976) studeerde Technische Natuurkunde aan de TU Delft (2001). In 2006 promoveerde hij aan de Universiteit Leiden voor zijn onderzoek aan het AMOLF-instituut in Amsterdam. Daar verrichtte hij optisch-pincetmetingen aan het effect van moleculaire chaperonnes op het vouwen van afzonderlijke eiwitten. Momenteel werkt hij als klinisch fysicus in opleiding bij de afdeling Radiotherapie van het UMC Utrecht.



mail@ruudvanleeuwen.nl

eiwitten kan voorkomen. Hiervoor gebruikten we een molecuul bestaande uit vier kop-staart gebonden MBP-eiwitten. Direct na het ontvouwen van dit eiwit ontstond een kluwen die niet meer uit elkaar kon worden getrokken. In aanwezigheid van SecB bleef het vouwen achterwege: In de cel, waar de eiwitdichtheid groot is, zorgt SecB er zo voor dat nieuwe eiwitten niet meteen samenklonteren.

Een tweede reden waarom het tegengaan van vouwing belangrijk kan zijn is dat dit eiwit in de cel over een celmembraan getransporteerd moet worden via een nauw kanaal. Dat gaat beter in de ontvouwen toestand. Een andere serie experimenten liet namelijk zien dat het transport van MBP over een celmembraan in de aanwezigheid van SecB niet afhangt van de vouwstabiliteit. Het transporteren van verschillende MBP-mutanten – met verschillende vouwstabiliteit – bleek een gelijke hoeveelheid energie te kosten. Blijkbaar is SecB in staat om MBP losjes gevouwen aan te bieden aan het membraan waardoor de stabiliteit in gevouwen toestand er niet toe doet. In de cel van de *E. coli* bacterie vergemakkelijkt SecB zo het transport van eiwitten. Een uitgevouwen eiwit past immers makkelijker door kleine poriën in het membraan heen – aminozuur voor aminozuur – dan in gevouwen, min of meer bolvormige, toestand.

Sander Tans (1968) leidt sinds 2001 een onderzoeksgroep aan het AMOLF instituut in Amsterdam. Hij promoveerde in 1998 aan de TU Delft en deed daarna postdoctoraal onderzoek aan UC Berkeley. Zijn huidige werk omhelst de studie van krachten en bewegingen van enkele biomoleculen, alsmede de dynamica van genetische regelsystemen in bacteriën en hun evolutionaire adaptatie.



tans@amolf.nl

Behalve SecB zijn er nog vele andere chaperonnes bekend. De door ons geïntroduceerde methode maakt het mogelijk ook deze op het niveau van een enkel eiwit te bestuderen.

#### Referenties

- 1 P. Bechtluft, R. G. H. van Leeuwen, M. Tyreman, D. Tomkiewicz, N. Nouwen, H. L. Tepper, A. J. M. Driessen, and S. J. Tans. *Direct observation of chaperone-induced changes in a protein folding pathway.* *Science* **318**:1458-1461, 2007

### Faculty position in experimental molecular biophysics

A permanent faculty position is available at the Department of Physics and Astronomy of the University of Leuven, Belgium starting October 1, 2009 in the field of experimental molecular biophysics, more specifically to develop experiments to address fundamental physical questions concerning the structure, configuration and mutual interactions of biomolecules, and phase transitions in biophysical systems. . More information can be found on the web

<http://www.kuleuven.be/personeel/jobsite/vacatures/science.html>

Closing date: September 30, 2008

The K.U.Leuven is an equal opportunity employer. Non-Dutch speaking candidates should be able to teach in Dutch within three years.



Department of Physics  
K.U.Leuven, Belgium  
[http://fys.kuleuven.be/index\\_en.php](http://fys.kuleuven.be/index_en.php)

### Faculty position in experimental nuclear physics

A permanent faculty position is available at the Institute for Nuclear and Radiation Physics of the Department of Physics and Astronomy, University of Leuven, Belgium starting October 1, 2009 in the field of experimental nuclear physics, more specifically nuclear-reaction studies with radioactive ion beams. More information can be found on the web

<http://www.kuleuven.be/personeel/jobsite/vacatures/science.html>

Closing date: September 30, 2008

The K.U.Leuven is an equal opportunity employer. Non-Dutch speaking candidates should be able to teach in Dutch within three years.



Department of Physics  
K.U.Leuven, Belgium  
[http://fys.kuleuven.be/index\\_en.php](http://fys.kuleuven.be/index_en.php)



Nederlands Tijdschrift voor

# Natuurkunde

augustus 2008-jaargang 74-nummer 8

A detailed 3D molecular model of a protein structure. The protein is shown in a ribbon representation with a yellow and blue color scheme. It is positioned on a water surface, which is depicted as a thin layer of water molecules. The background is a soft, blurred gradient of yellow and orange, suggesting a light source or a specific environment. The overall image is framed by a blue border with a radial pattern of lines emanating from the top center.

**Moleculaire houdgreep  
ontrafeld**

**Lopen over water  
Vorm volgt functie**