

VU Research Portal

Single-protein motion on microtubules and in cell membranes

van den Wildenberg, S.M.J.L.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van den Wildenberg, S. M. J. L. (2011). *Single-protein motion on microtubules and in cell membranes*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

De titel van mijn proefschrift luidt, in het Nederlands: “ de beweging van enkele eiwitten over microtubules en in het cel membraan”.

Zoals de titel al aangeeft is de rode draad door dit proefschrift *beweging*, de verandering van positie in de tijd. In dit proefschrift onderscheiden we twee soorten beweging: directionele beweging en willekeurige beweging. Een illustratief voorbeeld van deze bewegingen is een man die op straat loopt. Laten we eerst kijken naar deze man als hij van zijn werk naar zijn huis loopt. In dit geval zet de man alle stappen in dezelfde richting, namelijk die van zijn huis, en de afstand die de man aflegt groeit rechtevenredig met de tijd (als gevolg van de constante snelheid waarmee de man loopt). Dit is een typisch voorbeeld van de directionele beweging. Laten we nu eens kijken wat er gebeurt als de man op weg naar huis stopt in een café en dronken het café verlaat. Wanneer hij dronken naar huis loopt is de kans dat hij een stap in de richting van zijn huis zet even groot als een stap in een willekeurige andere richting. Dit heeft tot gevolg dat de wandeling die deze dronken man maakt volkomen willekeurig is. In de natuur, op het niveau van cellen en moleculen, komt deze dronkemanswandeling ook voor. De eerste wetenschappelijke observatie dateert uit 1828 toen de Britse botanicus Robert Brown zag dat stuifmeel in water een zelfde dronkemanswandeling ondergaat. Later werd dit gedrag verklaard door de willekeurige botsingen van stuifmeel deeltjes met water moleculen en deze beweging werd diffusie (of Brownse beweging) genoemd.

De cel wordt vaak gezien als de bouwsteen van het leven. Een gesimplificeerde voorstelling van de cel is een compartiment dat is gevuld met eiwitten en biomoleculen welke omringd is door een membraan. Al deze deeltjes zijn voortdurend in beweging en die beweging kan vaak direct gerelateerd worden aan de functie van het deeltje binnen de cel. De vorm en de structuur van de cel wordt bepaald door het cytoskelet, waarvan een belangrijke component de microtubels (MTs) zijn. MTs zijn niet alleen belangrijk voor de vorm van de cel, maar ook voor het transport binnen de cel en voor de deling van de cel. MTs zijn lange holle buizen die door hun specifieke bouw directionaliteit (- eind en +eind) hebben, die directionaliteit wordt gebruikt door moleculaire motoren, zoals Kinesin-1, om hun vracht van de ene naar de andere kant van de cel te brengen. Kinesin-1 “loopt” over de MT in de richting van het plus einde terwijl het ATP (brandstofmolecuul) verbrandt en het kan honderden stappen maken voor het de MT loslaat. De snelheid waarmee Kinesin-1 beweegt is ongeveer 1 $\mu\text{m/s}$ (1 miljoenste meter per seconde) wat dit transport vele malen efficiënter maakt dan diffusie (Kinesin-1 doet er ongeveer 2 seconde over om van een kant van een cel van 2 μm naar de andere kant te lopen, terwijl diffusie 8 seconde zou duren (met een typische diffusie constante van 10 nm^2/s)). **Hoofdstuk 3** van dit proefschrift gaat over de Kinesin-1 dat over MTs loopt, we beschrijven een nieuwe manier voor het bepalen van drie belangrijke eigenschappen die de directionele beweging beschrijven, namelijk: de

snelheid, de gemiddelde afgelegde afstand en het aantal snelheidslimiterende processen wat ten grondslag ligt aan een enkele stap.

MTs zijn niet alleen belangrijk voor het transport in de cel, maar ze spelen ook een belangrijke rol tijdens de deling van een cel wanneer het genetisch materiaal (DNA) gelijk moet worden verdeeld tussen de twee dochter cellen. Deze verdeling wordt gecoördineerd door een combinatie van moleculaire motoren en een specifieke MT spoelstructuur waarvan de werkzaamheid nauw samen hangt met de directionaliteit van de MTs. In **hoofdstuk 4** hebben we de MT-bindende moleculaire motor, KLP61F bestudeerd en we hebben aangetoond dat deze motor in staat is om MTs te binden en bundelen om ze vervolgens over elkaar heen te laten bewegen. Ook hebben we laten zien dat KLP61F een preferentie heeft om MTs in een antiparallelle orientatie (de directionaliteit in de tegenovergestelde richting) te bundelen. Samen verklaren deze resultaten de cruciale rol van KLP61F in de vorming en de evolutie van de spoelstructuur.

De structuur van een MT netwerk wordt dus bepaald door de hierboven genoemde directionaliteit van de MTs en door de MT-bindende moleculaire motoren, maar ook door MT-bindende niet-motor eiwitten. Deze eiwitten kunnen dus wel MTs binden en bundelen, maar ze kunnen in tegenstelling tot de motoren niet directioneel over een MT kunnen bewegen. In **hoofdstuk 5** bestudeerden we PRC1, een niet-motor eiwit wat wel aan MTs bindt. Wij hebben aangetoond dat dit eiwit MTs bindt om er vervolgens over heen te diffunderen. Wanneer PRC1 vervolgens ook een tweede MT bindt wordt de diffunderende beweging langzamer, met als gevolg dat PRC1 ophoopt tussen gebundelde MTs waar het de bundels kan stabiliseren.

Een andere plaats in de cel waar diffusie kan worden waargenomen is in het cel membraan waar eiwitten in bewegen. Een voorbeeld is het Tat systeem (Twin arginine translocation), dat bestaat uit verschillende eiwitten en diffundeert in het cel membraan van de bacterie *E.coli*. Het Tat systeem vormt complexen die zijn opgebouwd uit een combinatie van drie eiwitten namelijk TatA, TatB en TatC, met als functie om andere eiwitten door het cel membraan te transporteren. In **hoofdstuk 6** hebben we gemeten hoeveel TatA eiwitten voorkomen in een Tat complex en hoe deze complexen in het cel membraan bewegen. Verder hebben we aangetoond dat de beweging afhankelijk is van de hoeveelheid te transporteren eiwit en van de beschikbare energie. Vervolgens hebben we in **hoofdstuk 7** de beweging van de Tat complexen verklaard met behulp van computer simulaties. De simulaties lieten zien dat de complexen uit hoofdstuk 6 kunnen worden verdeeld in twee groepen, meest waarschijnlijk zijn dat complexen gevormd uit alleen TatA en grotere complexen gevormd uit zowel TatA, TatB en TatC.

Vrijwel alles in de biologie is in beweging; het zij passieve beweging (bijvoorbeeld de diffusie die een eiwit in het cel membraan ondergaat door de constante botsingen met andere

moleculen in het cel membraan), het zij actieve beweging (bijvoorbeeld de directionele beweging van kinesin-1, die de benodigde energie voor deze beweging haalt uit de verbranding van ATP), het zij een combinatie van deze twee. Om de beweging te beschrijven en te kwantificeren is het belangrijk dat men het bewegend deeltje zichtbaar kan maken zodat de positie van het deeltje op verschillende tijden kan worden bepaald en vervolgens de gelopen weg kan worden gereconstrueerd.

Een prima techniek voor deze uitdaging is enkele-molecuul fluorescentie microscopie dat we in detail uitleggen in **hoofdstuk 2**. Deze techniek maakt het mogelijk om specifiek biomoleculen zichtbaar te maken tegen een donkere achtergrond door er een fluorescente kleurstof aan te hangen. In combinatie met geoptimaliseerde filters en lenzen en snelle en gevoelige camera's kan de positie van de gelabelde biomoleculen dan nauwkeurig worden bepaald. Enkele-molecuul fluorescentie microscopie is dus een techniek waarmee zowel een plaats als tijd resolutie kan worden bereikt die nodig is om de verschillende bewegingen in de biologie te bestuderen.