

Moleculaire motors geven

Membranen worden in levende cellen door motoreiwitten in allerlei labyrintachtige netwerken van membraanbuizen getrokken. We hebben een minimaal modelsysteem ontwikkeld waarmee we de vorming van membraanbuizen kwantitatief hebben kunnen bestuderen buiten de cel. Dankzij deze experimenten weten we nu hoe moleculaire motors in staat zijn gezamenlijk de krachten te leveren die voor buisvorming vereist zijn. Gerbrand Koster



gerbrand.koster@curie.fr

Gerbrand Koster (1974) studeerde experimentele natuurkunde aan de Universiteit van Amsterdam. Vervolgens deed hij zijn promotieonderzoek aan het FOM-instituut AMOLF in de groep van Mariëtte Dogterom. In januari van dit jaar verdedigde hij zijn proefschrift 'Membrane tube formation by motor proteins: forces and dynamics'. Sinds april 2005 doet hij bij het Institut Curie te Parijs onderzoek als postdoc.

MEMBRANEN IN DE CEL

De cel is de basisbouweenheid van levende organismen. Planten- en dieren-cellen zijn doorgaans tussen de 10 en 50 μm groot. Een dubbellaag van lipiden die is doorspekt met eiwitten (zie figuur 1a) vormt de afbakening tussen de cel en de buitenwereld. De cellen zijn geen zakjes met een homogene soep van componenten, zelfs op deze microscopische schaal is er een duidelijke organisatie. Er zijn verschillende compartimenten (organellen) voor de verschillende functies en componenten in de cel, die ook weer afgebakend worden door een membraan. Zo wordt het DNA opgeslagen in de celkern, wordt er energie aangemaakt in de mitochondriën, worden eiwitten en lipiden geproduceerd in het endoplasmatisch reticulum en dient het Golgi-apparaat als een sorteercentrum voor transport tussen verschillende compartimenten (zie figuur 1b). De positie en de vorm van membraancompartimenten wordt in de cel geregeld door een complex samenspel van motoreiwitten en het cytoskelet (het skelet van de cel). Het cytoskelet verschaft stijfheid aan de cel en vormt tegelijkertijd een infrastructuur waarover motoreiwitten kunnen bewegen. Het cytoskelet bestaat uit verschillende

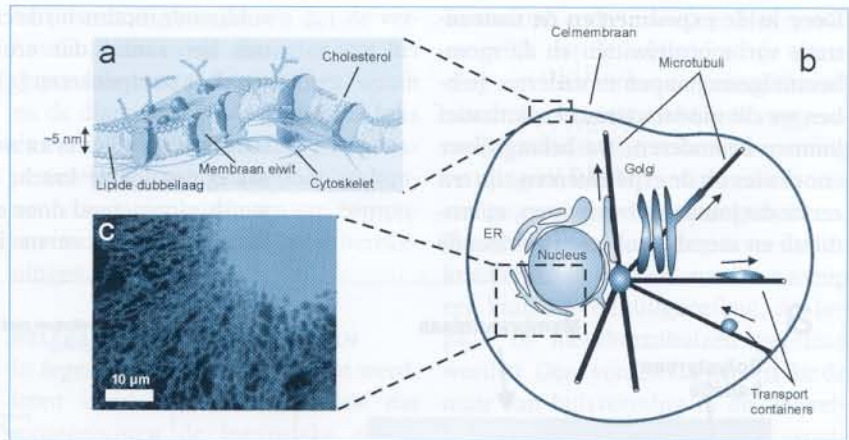
componenten waarvan de zogenaamde microtubuli de dominante component voor de intracellulaire membraanorganisatie vormen (zie figuur 1b). Het motoreiwit kinesine beweegt bijvoorbeeld over deze microtubuli door ATP te verbruiken, het molecuul dat verantwoordelijk is voor opslag en transport van chemische energie binnen de cel. Kinesine kan daarbij een maximale kracht uitoefenen van ongeveer zes picoNewton. Wanneer een motoreiwit zich vastkoppelt aan een membraan, kan het membraancompartiment worden meegetrokken, of zelfs worden vervormd als deze beweging elders wordt tegengehouden. Onder bepaalde omstandigheden kunnen er zo membraanbuizen met een diameter van ongeveer 50 nm gevormd worden. Deze buizen vormen een belangrijke bouwsteen van intracellulaire compartimenten (zie figuur 1c) en worden bovendien gebruikt als langgerekte containers voor het vervoer tussen de verschillende compartimenten.

IN VITRO-STUDIE VAN BUISVORMING

De correcte organisatie van membraanstructuren in de cel en het transport tussen de verschillende compartimenten is essentieel voor het gezond functioneren van cellen. Een beter begrip van de mechanismen die deze organisatie tot stand brengen zal leiden tot meer kennis van het disfunctioneren van membranen en de vele mogelijke consequenties daarvan. Een belangrijk vraagstuk is hoe de organisatie gecoördineerd en gereguleerd wordt. Hoe wordt bijvoorbeeld de ruimtelijke organisatie van membranen gereguleerd gedurende de verschillende stadia die een cel doorloopt in haar delingscyclus? Hoewel met ingenieuze technieken veel informatie is vergaard, is het door de complexiteit van de complete cel bijna onmogelijk om de basisreguleringsmechanismen

vorm aan celmembranen

te begrijpen. Om dit probleem te omzeilen, hebben we een vergelijkbaar systeem buiten de cel (in vitro) gereconstrueerd en bestudeerd. Daartoe hebben we microtubuli en het motoreiwit kinesine uit cellen gehaald. Door gebruik te maken van de intrinsieke eigenschap van lipiden om zich te organiseren in dubbellaagen, kunnen grote (~20 µm diameter) membraanblazen worden gemaakt die bestaan uit één dubbellaag van vooraf gekozen lipiden [3]. Deze membranen dienen vervolgens als een gesimplificeerd modelsysteem voor de cellulaire membranen. Het voordeel van het werken met een gereconstrueerd systeem is dat elk van de verschillende aanwezige componenten bekend is, in een gecontroleerde hoeveelheid. Omdat de membraanblazen relatief groot zijn, kunnen ze bovendien zichtbaar gemaakt worden met geavanceerde microscopie.



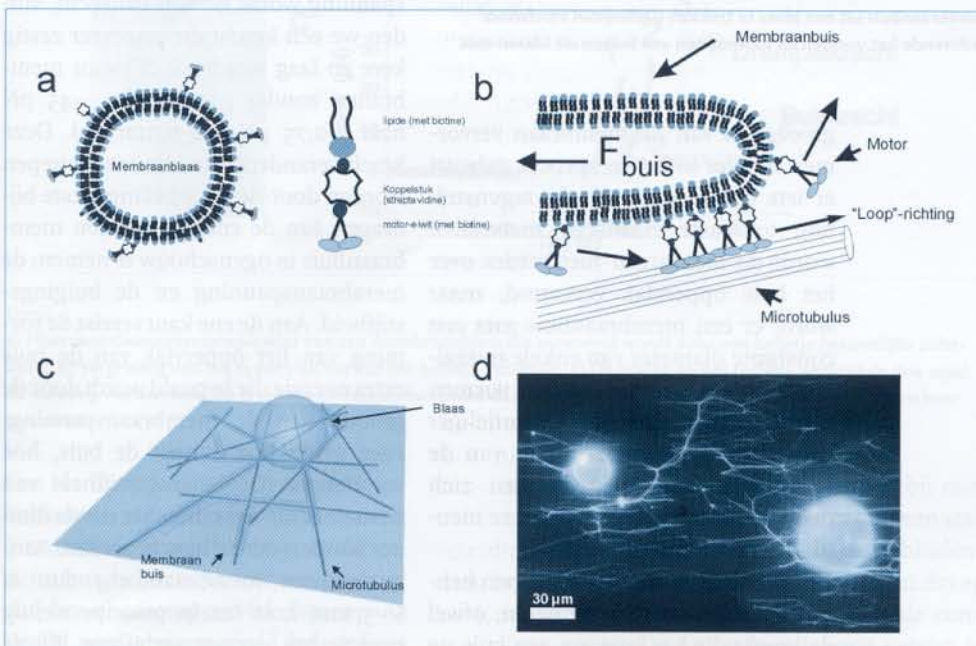
Figuur 1
 a) Schets van een celmembraan [1] (zie tekst). b) Schets van een cel met microtubuli en enkele van de intracellulaire compartimenten. c) Fluorescentieplaatje van de labyrintachtige structuur van het endoplasmatisch reticulum [2].

De motoreiwitten kunnen nu aan deze membraanblazen gekoppeld worden (door een biochemische truc, zie figuur 2a), waarna ze in contact gebracht kunnen worden met een onge-

ordend en geïmmobiliseerd netwerk van microtubuli. Als de motoreiwitten nu gaan 'lopen' over de microtubuli (figuur 2b) zullen ze kracht uitoefenen op de membraan. De experimenten laten zien dat dit (ook in een gereconstrueerd systeem) resulteert in de vorming van netwerken van membraanbuizen (figuur 2c en d).

SAMENWERKING DOOR MOTORS

Het interessante is dat de kracht die het kost om een buis te vormen, meestal hoger blijkt te zijn dan de kracht die één enkel motoreiwit kan uitoefenen (zie verderop). De motoreiwitten moeten dus op de een of andere manier samenwerken om voldoende kracht te kunnen genereren. Het heeft echter geen zin ergens halverwege de buis kracht uit te oefenen aangezien de membraan vloeibaar is, lipiden kunnen dus vrijelijk bewegen en diffunderen in het vlak van de membraan. Wanneer een motoreiwit halverwege de buis aan een lipide trekt, zal deze daarom door de membraan heen getrokken worden totdat de punt van de buis is bereikt. Alleen de motoreiwitten die hier kracht uitoefenen zullen vervolgens een bijdrage leveren aan de vorming van een buis.



Figuur 2
 a) Schematische voorstelling van een membraanblaas met aangekoppelde motoreiwitten (niet op schaal). b) Schets van een groepje motoreiwitten dat gezamenlijk een membraanbuis vormt. c) Schets van een netwerk van membraanbuizen gevormd uit een blaas op een ongeordend netwerk van microtubuli. d) Fluorescentiemicroscopieplaatje van een netwerk van membraanbuizen zoals gevormd in een experiment (de microtubuli en motors zijn niet zichtbaar) [4].

Door in de experimenten de concentratie van motoreiwitten en de membraaneigenschappen te variëren, hebben we dit modelsysteem kwantitatief kunnen bestuderen. De belangrijkste conclusies uit de experimenten zijn ten eerste dat louter motoreiwitten, microtubuli en membraanblazen voldoende

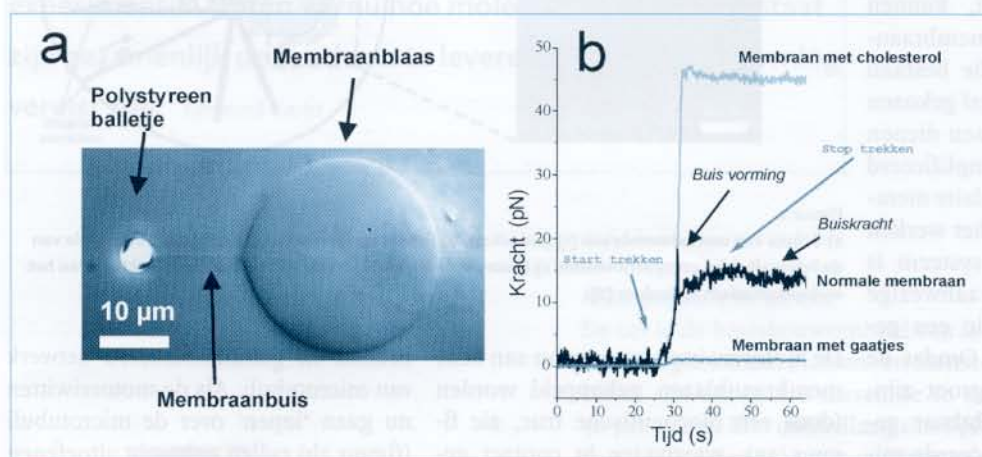
voldoende motors bij de cluster voegen om het aantal dat eruit getrokken wordt te compenseren [5].

HOVEEL KRACHT IS ER NODIG?

Als er een lokale kracht op een blaas wordt uitgeoefend door eraan te trekken, dan zal in eerste instantie een

kunnen gegenereerd en gemeten worden met een optisch pincet [6]. Met dit optisch pincet wordt een balletje van enkele micrometers groot aan de blaas geplakt en vervolgens wegbewogen en op een vaste afstand gehouden (figuur 3a). De kracht op het balletje wordt achteraf bepaald door de verplaatsing ervan in het optisch pincet te meten.

De eigenschappen van de membraan hebben we op twee manieren gevarieerd: de membraan is stijver gemaakt door er cholesterol in op te nemen, en de spanning van de membraan is geminimaliseerd door gaatjes in de membraan te maken waardoor de osmotische druk wordt weggenomen. Als we de kracht meten die het kost om een buis te trekken na toevoegen van cholesterol vinden we grofweg een verdriedoubling van de kracht die het anders kost om een buis te vormen (van ~ 15 naar 45 pN, zie figuur 3b). Als door de gaatjes in de membraan de membraanspanning wordt geminimaliseerd, vinden we een kracht die ongeveer zestig keer zo laag wordt als die voor membranen zonder gaatjes (van ~ 45 pN naar $\sim 0,75$ pN, zie figuur 3b). Deze krachtveranderingen kunnen begrepen worden door de twee belangrijkste bijdragen aan de energie van een membraanbuis in ogenschouw te nemen: de membraanspanning en de buigingsstijfheid. Aan de ene kant vereist de vorming van het oppervlak van de buis extra energie die bepaald wordt door de grootte van de membraanspanning. Hier geldt: hoe dunner de buis, hoe voordeliger. De buigingsstijfheid van de membraan zal echter het steeds dunner worden van de buis beperken. Aangezien een membraan erg dun is (~ 5 nm) kost het in principe weinig energie om deze te verbuigen. Bij de vorming van een buis met een diameter van ~ 50 nm blijkt de buiging desalniettemin een vergelijkbare bijdrage aan de energie te leveren als die door toedoen van de membraanspanning [7].



Figuur 3
a) Een polystyreen balletje wordt gebruikt om een membraanbuis uit een blaas te trekken (Differential Interference Contrast-microscopie). b) De kracht op het balletje gedurende het vormen en vasthouden van buizen uit blazen met verschillende eigenschappen.

zijn voor de vorming van buizen, en ten tweede dat er een drempelconcentratie van motoreiwitten nodig is om buizen te vormen. Deze concentratie hangt af van de kracht die het kost om een buis uit de blaas te trekken (zie verderop).

Deze resultaten kunnen beschreven worden met een theoretisch model waarin de motors een cluster vormen die dynamisch in stand wordt gehouden. Motoreiwitten die reeds in het groepje aanwezig zijn, zullen met een bepaalde kans loslaten. Deze kans is afhankelijk van de kracht die het motoreiwit te verduren heeft. Tegelijkertijd zal zich per seconde een aantal motors (afhankelijk van de concentratie van motoreiwitten) bij de cluster voegen. De hoeveelheid motoreiwitten in de cluster kan dus alleen gehandhaafd worden als er zich per seconde

groot deel van de membraan vervormen. Verder in het trekproces gebeurt er iets contra-intuïtiefs: in tegenstelling tot vaste elastische materialen wordt de membraan niet verder over het hele oppervlak vervormd, maar wordt er een membraanbuis met een constante diameter van enkele tientallen nanometers gevormd. Het vormen van een buis is energetisch voordeliger en dankzij de vloeibare aard van de membraan kunnen de lipiden zich makkelijk hergroeperen tot deze nieuwe configuratie.

Om dit systeem beter te begrijpen hebben we de buiskracht gemeten, ofwel de kracht die het kost om een buis na vorming op een vaste lengte te houden, voor membranen met een verschillende samenstelling [5]. Deze krachten zijn doorgaans een paar (tientallen) piconewtons. Krachten van deze orde

BARRIÈRE VOOR BUISVORMING

De initiële kracht (de drempelkracht) die vereist is om een buis te vormen, blijkt niet even groot te zijn als de kracht die nodig is om een reeds gevormde buis vast te houden. Tijdens de eerste vervorming van de membraan neemt de kracht toe tot een moment waarop de situatie niet meer stabiel is (figuur 4a, tweede en derde plaatje van boven). Op dat moment wordt er een membraanbuis gevormd (figuur 4a, onderste figuur) en voor de handhaving hiervan is een lagere kracht vereist. De hoogste kracht die bereikt moet worden om een buis te vormen is de drempelkracht.

ken wordt (figuur 4c), en dat de verhouding tussen de diameter van het oppervlak waaraan getrokken wordt en de diameter van de gevormde buis de drempelkracht bepaalt [8]. Deze experimentele metingen hebben we kunnen staven met resultaten van computersimulaties en theoretische berekeningen.

RELEVANTIE VAN DE RESULTATEN

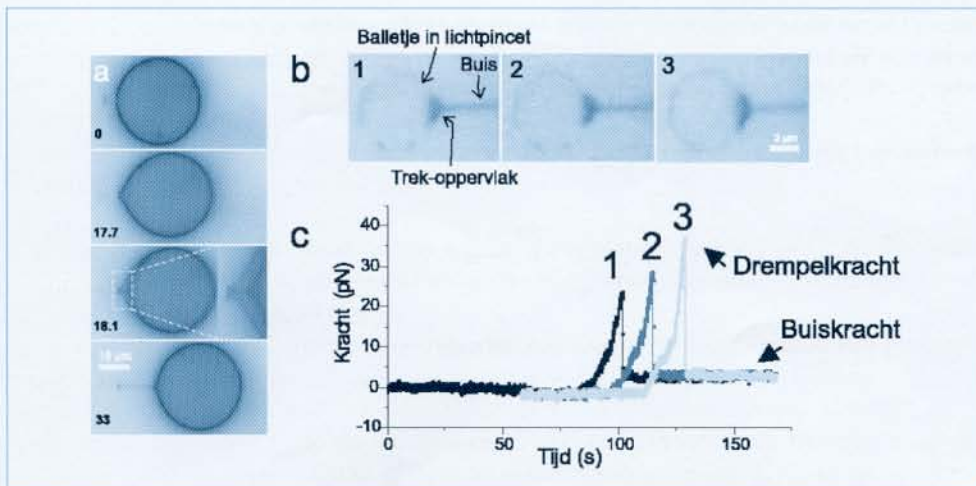
In tegenstelling tot wat gedacht werd, laten onze experimenten zien dat motoreiwitten de intrinsieke eigenschap hebben om via zelforganisatie een cluster te vormen die voldoende kracht kan uitoefenen om membraan-

toerewitten te beïnvloeden. Het is ook mogelijk dat de stijfheid of de spanning van de membraan gemodificeerd wordt. Onze krachtmetingen suggereren daarnaast dat voor buisvorming een hogere kracht vereist is als er aan een groter oppervlak wordt getrokken. Het is dus niet alleen de grootte van de kracht, maar ook de manier waarop een kracht wordt uitgeoefend, die bepaalt of membraanbuizen gevormd worden. Deze vondst suggereert dat de mate van buisvorming in de cel wellicht gereguleerd wordt door de grootte van de domeinen waarmee de motoreiwitten verbonden zijn.

We hebben via onze *in vitro*-benadering veel geleerd van de basismechanismen die de ruimtelijke organisatie van membranen bepalen. De uitdaging zal nu zijn om te bestuderen hoe deze mechanismen in de complexiteit van de levende cel daadwerkelijk gereguleerd worden.

REFERENTIES

- 1 <http://www.people.virginia.edu/~rjhgu/cell-memb.html> (Human Biology, D. Chiras).
- 2 J. Lane en V. Allan, 'Microtubule-based Endoplasmic Reticulum motility in *Xenopus Laevis*: activation of membrane-associated kinesin during development', *Mol. Biol. Cell* **10** (1999), 1909–1922.
- 3 M.I. Angelova, S. Soléau, P. Meleard, J.F. Faucou en P. Bothorel, 'Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications', *Prog. Colloid Polym. Sci.* **89** (1992), 127–131.
- 4 Zie ook 'Ingelijst', *Nederlands Tijdschrift voor Natuurkunde* **70–4** (2004), 126.
- 5 G. Koster, M. VanDuijn, B. Hofs en M. Dogterom, 'Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003), 15583–15588.
- 6 M. Dogterom en M. Janson, 'Duwen en trekken in de cel', *Natuur en Techniek* **68** (2000), 22–27.
- 7 I. Derényi, F. Julicher en J. Prost, 'Formation and interaction of membrane tubes', *Phys. Rev. Lett.* **88** (2002), 238101–1–238101-4.
- 8 G. Koster, A. Cacciuto, I. Derényi, D. Frenkel en M. Dogterom, 'Force barriers for membrane tube formation', *Phys. Rev. Lett.* **94** (2005), 068101–1–068101-4.



Figuur 4
a) Fluorescentiemicroscopieplaatjes van een membraanblaas die vervormd wordt door een balletje (nauwelijks zichtbaar). b) Vergroting van het oppervlak dat aan het balletje vastplakt. c) De kracht op het balletje gedurende drie maal de vorming van een buis. De krachten corresponderen met de figuren in b), waarin het contactoppervlak iedere keer toeneemt.

Om de drempelkracht te bestuderen hebben we verscheidene malen buizen gevormd uit dezelfde blaas. In dit experiment hebben we ervoor gezorgd dat het contactoppervlak waarop de kracht wordt uitgeoefend iedere keer dat een buis gevormd wordt, toeneemt (figuur 4b). Deze experimenten tonen aan dat de drempelkracht voor buisvorming lineair toeneemt met de omtrek van het oppervlak waaraan getrok-

buizen te vormen. Het is daarbij niet noodzakelijk om de motors via een statische connectie aan elkaar te binden. Bovendien hebben we laten zien dat er voor buisvorming een minimale concentratie van motoreiwitten vereist is die afhangt van de kracht die het kost om de buis te vormen. Dit suggereert dat de mate van buisvorming in de cel gereguleerd zou kunnen worden door bijvoorbeeld de concentratie van mo-