



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Dynamics and regulation at the tip : a high resolution view on microtubule assembly**

Munteanu, L.

### **Citation**

Munteanu, L. (2008, June 24). *Dynamics and regulation at the tip : a high resolution view on microtubule assembly*. Bio-Assembly and Organization / FOM Institute for Atomic and Molecular Physics (AMOLF), Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12979>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12979>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

---

## Samenvatting

De interne organisatie van de cel en fundamentele processen als celdeling en intracellulair transport zijn afhankelijk van de dynamische eigenschappen van microtubuli. In de cel wordt de dynamica van de microtubuli zowel in de tijd als in de ruimte gereguleerd door een scala aan microtubulus-geassocieerde eiwitten (MAPs). In dit proefschrift is een *in vitro* methode gebruikt om licht te werpen op de moleculaire details van zowel het zelf-assemblage-proces van microtubuli, als het mechanisme waarmee representatieve MAPs de microtubulusdynamica beïnvloeden. Het voordeel van een *in vitro* minimaal systeem is de mogelijkheid tot ont koppeling van de regulatie-effecten van de verschillende MAPs.

Om met moleculaire resolutie in te zoomen op de dynamische processen aan het uiteinde van de microtubuli, hebben we een hoge-resolutie techniek ontwikkeld, waarin een optisch pincet, micro-gefabriceerde wanden en hoge-resolutie 'video-tracking' van micro-bolletjes geïntegreerd zijn (beschreven in hoofdstuk 2). In onze experimenten groeien microtubuli vanuit een natuurlijke microtubulusbundel, een axoneem, waaraan een polystyreen bolletje is bevestigd aan een uiteinde. Het construct van axoneem en bolletje wordt vastgehouden in een optisch pincet met een 'sleutelgat'-profiel en gepositioneerd voor een wand. Het sleutelgatprofiel wordt gebruikt om zowel de positie van het bolletje als de richting van het axoneem te controlleren. De wand wordt gebruikt om een groeiende microtubulus tegen te houden, zodat lengtetoenames resulteren in een verplaatsing van het bolletje. Door de positie van het bolletje te bepalen kunnen we microtubuluspolymerisatie volgen met schier moleculaire resolutie (resolutie is ca. 10 nm, veel lager dan de ca. 200 nm resolutie van lichtmicroscopie). De experimentele methode, de specifieke eigenschappen van het optisch pincet, en beschouwingen betreffende microtubuli in de context van onze opstelling worden gepresenteerd in hoofdstuk 2.

In hoofdstuk 3 worden de moleculaire bijzonderheden van microtubulusgroei besproken en hoe deze processen op een moleculaire schaal beïnvloed worden door het microtubulus-geassocieerde eiwit XMAP215, waarvan bekend is dat het de groeisnelheid van microtubuli drastisch verhoogt. We hebben gevonden dat de assemblage van microtubuli soms vergezeld gaat van snelle toenames in lengte, die corresponderen met meerdere (2-3) tubuline-dimeren. In aanwezigheid van XMAP215 hebben we snelle lengtetoenames gemeten, die overeenkomen met 7-8 tubuline-dimeren, wat

correspondeert met de afmetingen van het XMAP215 eiwit zelf. Deze observaties wijzen erop dat de assemblage van microtubuli niet altijd simpelweg berust op de toevoeging van individuele tubuline-dimeren. Het lijkt er eerder op dat kleine oligomeren (2-3 tubuline-dimeren) ook aan de groeiende microtubuli kunnen binden, en dat dit effect versterkt wordt door het XMAP215-eiwit. XMAP215 zou langs zijn lengte de verlenging van een tubuline-protofilament kunnen bevorderen, of de formatie van lange tubuline-oligomeren in oplossing mogelijk kunnen maken. Deze scenario's, die gebaseerd zijn op een lokale verhoging van tubuline-additie (mogelijk langs een enkel protofilament), zouden meer algemene mechanismen kunnen zijn die aangewend worden door versterkers van microtubulusgroei.

Een andere specifieke klasse van MAPs zijn de +TIPs, die gespecialiseerd zijn in het volgen van de dynamische microtubuli-uiteinden. Hun positie aan het uiteinde van microtubuli maakt directe regulatie van de microtubulusdynamica mogelijk. We hebben onze studie gefocuseerd op het complex van drie +TIPs uit gistcellen (*S. pombe*): Mal3 (homoloog van EB1), kinesine Tea2 en de cargo Tip1 (hoofdstukken 4 en 5). Het behoud van de eiwitfunctionaliteit *in vitro* is een essentiële vereiste. Daarom hebben we eerst *in vitro* het gedrag (het volgen van het uiteinde) gereconstrueerd. Uit dit experiment (hoofdstuk 4) kwam een hiërarchie onder de drie +TIPs naar voren. Mal3 is een autonome eind-volger, die een specifieke structuur herkent aan het uiteinde van microtubuli. Mal3 treedt ook op als een 'loading factor' op de microtubuli voor het Tea2-Tip1-complex. De motoractiviteit van Tea2 garandeert processief transport van het Tea2-Tip1-complex naar de uiteinden van microtubuli, waar beide eiwitten accumuleren.

Het is bekend dat de leden van de EB1 eiwitfamilie invloed hebben op de dynamica en organisatie van microtubuli *in vivo*, maar het is nog onduidelijk of de EB-eiwitten een direct effect hebben op de dynamica van microtubuli. Aangezien Mal3 in staat is te lokaliseren aan het uiteinde van groeiende microtubuli, vroegen we ons af of dit EB-homoloog individueel een invloed heeft op de dynamica van microtubuli. De resultaten worden gepresenteerd in hoofdstuk 5. Er zijn drie onafhankelijke technieken gebruikt: DIC-microscopie om de parameters te bepalen van de dynamische instabiliteit van de microtubuli, fluorescentie-microscopie om te lokaliseren van Mal3 op de microtubuli te kwantificeren, en een techniek gebaseerd op een optisch pincet om de veranderingen te onderzoeken die door Mal3 aan het dynamische uiteinde van de microtubulus geïnduceerd worden. Mal3 heeft een complex effect op de microtubuli, zowel op het rooster, als op het uiteinde. Mal3 bindt efficiënt aan het uiteinde en verandert de eindstructuur op zo'n manier dat de netto toevoeging van tubuline-dimeren bevordert wordt, alsmede de kans dat een microtubulus schakelt van een groei- naar een krimp-fase. Mal3 bindt minder goed aan het microtubulusrooster dan aan het uiteinde. De aanwezigheid van Mal3 belemmert het uiteenvallen van de microtubuli en bevordert 'rescues'. Onze observaties suggereren een mechanisme van Mal3-regulatie dat gebaseerd is op de lokale verandering van de eigenschappen van de microtubulus, die

---

een weerspiegeling kunnen zijn van het moleculaire mechanisme dat ten grondslag ligt aan de interactie tussen Mal3 en de microtubulus. Hoogstwaarschijnlijk zijn de Mal3-tubuline-bindingsplaatsen verborgen binnen het rooster als gevolg van de laterale contacten tussen de protofilamenten en bindt Mal3 daarom slechts incidenteel aan het rooster. Op de naad zijn deze bindingsplaatsen beter toegankelijk en aan het uiteinde bieden de vrije protofilamenten de meest optimale bindingsplaatsen voor Mal3. Dit regulatiemechanisme maakt gebruik van de complexe architectuur van de microtubulus en maakt het mogelijk dat eiwitten zoals Mal3 een verschillende werking hebben op verschillende plaatsen op de microtubulus.

Hoofdstuk 6 concentreert zich op microtubulus-'catastrofes', de overgangen van groei naar krimp. Kennis van het mechanisme van de catastrofes is tot nu toe beperkt tot modellen die gebaseerd zijn op de structurele eigenschappen van de uiteinden van microtubuli zoals afgebeeld met *cryo-electron-microscopy*. Informatie over hoe MAPs op een moleculair niveau de catastrofes reguleren, is nog gelimiteerder. Met onze techniek, die gebaseerd is op het optisch pincet, konden we de dynamische uiteinden van de microtubuli volgen met bijna moleculaire resolutie. Wij namen een daling waar van de microtubuluslengte van tientallen nanometers voorafgaand aan het uiteenvallen van de microtubuli. Dit suggereert het verlies van een stabiliserende structuur. Twee mogelijke scenario's zijn hier: (i) de bladvormige structuur aan het groeiende uiteinde depolymeriseert, wat een stomp uiteinde oplevert, dat instabiel is en snel uiteenvalt, of (ii) de geblokkeerde microtubulus heeft de vorm van een cilinder die die pas instabiel wordt wanneer de laterale contacten tussen twee of meer protofilamenten worden verbroken. Dit 'openen' van de cilinder zou waargenomen kunnen worden als een lengtevermindering in onze meting. Het is mogelijk dat bij de gebeurtenissen die leiden tot een catastrofe beide scenario's een rol spelen. MAPs zouden beide aspecten van de catastrofes kunnen reguleren. Mal3 zou bijvoorbeeld een MAP kunnen zijn die de initiële gebeurtenissen van catastrofes beïnvloedt door de eindstructuur van de microtubulus te veranderen.

Toekomstige richtingen binnen dit onderzoek vloeien direct voort uit de experimenten die gepresenteerd worden in dit proefschrift (hoofdstuk 7). (i) Het is bekend dat in de cel +TIPs wisselwerkingen met elkaar kunnen hebben waardoor de assemblage van microtubuli beïnvloed wordt. We hebben voorbereidende experimenten uitgevoerd aan de regulatie van de microtubulusdynamica door het Mal3-Tea2-Tip1-complex. We hebben daarbij gevonden dat Tea2 en Tip1 elkaar en Mal3 niet alleen nodig hebben om te lokaliseren aan de uiteinden van microtubuli, maar ook om de dynamica van de microtubuli te reguleren. We hebben waargenomen dat Tip1 een stabiliserend effect had door het verlagen van de door Mal3 geïnduceerde catastrofe-*rate*. (ii) We laten zien dat ook EB3 (afkomstig van zoogdieren en een homoloog van Mal3) *in vitro* autonoom het uiteinde van microtubuli kan volgen. Maar de details van de interactie tussen EB3 en de microtubulus zijn mogelijk anders en vergen verder onderzoek. EB3 waarvan de C-terminale einde verwijderd is, bindt met hoge affiniteit aan het mi-

crotubulusrooster en bevordert de groei van intrinsiek gebogen microtubuli. (iii) De aanwezigheid van MAPs zou de krachten die door de microtubuli gegenereerd worden kunnen beïnvloeden. In de cel worden duw- en trekkrachten voortdurend gegenereerd door microtubuli en benut voor de intracellulaire verplaatsing en transport van andere cellulaire onderdelen. Met het optisch pincet hebben we de krachtgeneratie van microtubuli gemeten in de aanwezigheid van de hier besproken MAPs, XMAP215 en Mal3. Beide eiwitten lijken een effect te hebben. De maximale kracht die gegenereerd wordt door microtubuli in aanwezigheid van Mal3 was lager dan in afwezigheid van het eiwit. Met XMAP215 werden hoge krachten gegenereerd, onafhankelijk van de groeisnelheid. Er zijn meer experimenten nodig om onze eerste observaties te bevestigen.

Concluderend: we hebben aspecten onderzocht van de assemblage en dynamica van microtubuli in af- en aanwezigheid van twee representatieve microtubulus-geassocieerde eiwitssystemen. Onze hoge-resolutie-techniek in combinatie met een *in vitro* aanpak maakte het mogelijk om de regulatie door individuele MAPs te ontleden en mogelijke regulatiemechanismen te identificeren.