



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Force generation in dividing *E. coli* cells: A handles-on approach using optical tweezers

Verhoeven, G.S.

Citation

Verhoeven, G. S. (2008, December 2). *Force generation in dividing E. coli cells: A handles-on approach using optical tweezers*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13301>

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/1887/13301>

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

Samenvatting

Dit proefschrift gaat over celdeling in bacteriën. Voor mij is het fascinerende van een bacterie zoals *Escherichia coli* dat het zich ongelooflijk snel kan vermenigvuldigen door in lengte te groeien en zich 'simpelweg' in tweeën te splitsen. Van de cellen in ons eigen lichaam is al tientallen jaren bekend dat deze zich delen door middel van krachtgenererende eiwitten van hetzelfde type zoals aanwezig in onze spiercellen. Hoe echter een bacterie zich deelt is nog steeds een mysterie. Een van de problemen bij het bestuderen van bacteriën is dat ze zo klein zijn (een honderdste van een enkele mensenhaar dik). Mede hierdoor is lange tijd gedacht dat bacteriën 'zakjes met eiwitten' waren, zonder intern eiwitskelet zoals bijvoorbeeld planten- en dierencellen hebben. In recente jaren is hier verandering in gekomen, en blijkt dat micro-organismes meer op onze eigen cellen lijken dan gedacht. Zo is er ontdekt dat een eiwit genaamd FtsZ een ring vormt in het midden van een delende bacterie cel. Er zijn sterke aanwijzingen dat deze 'Z-ring' kracht genereert om de bacterie te doen splitsen. Dit is echter nog nooit experimenteel aangetoond. In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van een methode beschreven om krachtmetingen te doen aan een enkele delende bacterie.

Om de zeer kleine krachten die door enkele cellen geproduceerd worden te kunnen meten maken we gebruik van een 'optisch pincet' (de engelse term is 'optical trap' of 'optical tweezers'). Een optisch pincet is een extreem gevoelige krachtmeter, die werkt met kleine bolletjes in een vloeistof. Omdat krachten in een vloeistof omgeving gemeten kunnen worden is deze techniek zeer geschikt om cellen en eiwitten mee te bestuderen. Ons optisch pincet bestaat uit een microscoop waar een sterke laserbundel in wordt gekoppeld. Door het laserlicht te focuseren tot een diffractiegelimiteerde focus punt (de 'trap') kan een plastic of glazen bolletje van dezelfde orde grootte als van een bacterie hierin gevangen worden. Wanneer een kracht in de orde van een miljoenste van een miljoenste Newton (een Newton is de kracht die de aarde uitoefent op een niet al te zwaar boek) op het bolletje wordt uitgeoefend wordt deze een beetje (op de schaal van nanometers, miljoenste millimeters) uit de trap getrokken. Door de trillingen van het gevangen bolletje precies te meten kan de sterkte van de trap bepaald worden. Daarna kan uit de verplaatsing van het bolletje de kracht worden herleid.

De uitdaging ligt er nu in om zo'n bolletje vast te maken aan een bacterie ongeveer op de plek waar de bacterie zich gaat splitsen, omdat we vermoeden dat daar de krachten

worden gegenereerd. Het idee uitgewerkt in dit proefschrift is om de bacteriën genetisch zo te aan te passen dat ze zelf moleculaire 'handvatten' produceren die op het oppervlak van de bacterie terechtkomen, maar dan enkel en alleen op de delingsplaats. We denken dat dit mogelijk is omdat eiwitten vaak uit meerdere domeinen bestaan, die elk hun eigen functie hebben. Aangezien er eiwitten bekend zijn die zich aan het oppervlak van een bacterie bevinden, en eiwitten die specifiek op de delingsplaats aanwezig zijn, is het in theorie mogelijk om een nieuw samengesteld 'fusie-eiwit' te maken dat aan het oppervlak specifiek op de delingsplaats aanwezig is.

Een complicerende factor in bacteriën is de aanwezigheid van een harde celwand, die in veel opzichten lijkt op de celwand waaraan plantencellen hun vorm ontleen. Wanneer een bacterie zich deelt in twee dochter cellen moet ook deze celwand worden gevormd. Je kan het ook anders zeggen: het vormen van de nieuwe uiteinden van de dochterbacteriën IS het delingsproces. **Hoofdstuk 2** geeft een samenvatting van wat er bekend is over de processen die de celwand vormen. De schaal waarop dit zich afspeelt is op het enkele eiwit niveau (1-100 nanometer). Centraal staat de relatief nieuwe hypothese dat krachten uitgeoefend door celskelet eiwitten zoals FtsZ en MreB hierbij een belangrijke rol spelen.

De drie hoofdstukken die volgen houden zich bezig met het creëren van het moleculaire handvat. In **Hoofdstuk 3** beschrijven we de experimenten waarin een oppervlakte-eiwit (OmpA) van de *Escherichia coli* bacterie genetisch wordt aangepast zodat er een stukje van een ander eiwit (een epitoom) aan het oppervlak wordt gepresenteerd. Dit is nodig om er een bolletje aan vast te kunnen maken. Drie verschillende epitopen worden vergeleken. We laten zien dat alle drie de epitopen inderdaad op het oppervlak aanwezig zijn, maar dat de efficiëntie waarmee dit gebeurt verschilt. De zogenaamde FLAG en myc epitopen blijken gedeeltelijk te worden afgebroken door de cel. De SA-1 epitoom daarentegen wordt vrijwel niet afgebroken. Verder worden experimenten beschreven waarin wordt aangetoond dat het OmpA eiwit met een SA-1 epitoom even goed in het buitenste celmembraan inserteert wanneer het OmpA celwand bindingsdomein afwezig is. Hiermee is aangetoond dat de OmpA-177 eiwit module met SA-1 epitoom een geschikt uitgangspunt vormt om er genetisch een tweede eiwit module met delingsplaats affiniteit aan vast te koppelen.

In **Hoofdstuk 4** worden experimenten beschreven waarin gekeken wordt of het celdelingseiwit FtsQ in staat is een additionele eiwit module naar de delingsplaats te

'lokaliseren' (brengen). Aangezien FtsQ zich in het binnenste celmembraan bevindt en de OmpA-177 eiwit module in het buitenste celmembraan, is er een overbruggende verbindingseiwit module nodig om met behulp van FtsQ OmpA naar de delingsplaats te dirigeren. In eerste instantie is het AcrA eiwit gebruikt als verbindingseiwit. Hier waren echter twee problemen mee: nadat in de loop van ons onderzoek de eiwit structuur werd gepubliceerd werd duidelijk dat het niet als verbindingseiwit kan functioneren, en tevens verloor het fusie eiwit zijn affiniteit voor de delingsplaats wanneer het verder werd uitgebreid met extra eiwit modules. Vervolgens is het ALBP eiwit gekozen als verbindingseiwit. Alhoewel nog niet is aangetoond dat het FtsQ-ALBP fusie-eiwit intact aanwezig is op de delingsplaats zijn de voorlopige resultaten bemoedigend.

Echter, na een publicatie over wederom een nieuw eiwit, het Pal eiwit, werd besloten om van strategie te wisselen. Fusies op basis van FtsQ en ALBP bestaan uit tenminste vijf eiwit domeinen (GFP, FtsQ, twee ALBP verbindingsdomeinen en het OmpA-177 domein). De ervaring leert dat de kans op eiwit vouwingsproblemen en afbraak toeneemt naarmate er meer eiwit domeinen kunstmatig aan elkaar worden geknoopt. Het bijzondere van het Pal eiwit was dat het dezelfde structuur heeft als het celwand bindingsdomein van OmpA zelf, met als grote verschil dat het naar de delingsplaats lokaliseert. Door simpelweg het OmpA-177 domein te fuseren aan het Pal domein zou dan het gewenste 'handvat' op de delingsplaats gecreëerd kunnen worden, en dat met maar twee eiwit domeinen. De experimenten in **Hoofdstuk 5** suggereren een extra complicatie: de functie van het Pal eiwit, en de aanwezigheid van celeigen Pal eiwit. *E. coli* kan zonder Pal eiwit groeien, alleen is er dan een probleem met de aanhechting van het buitenste celmembraan aan de celwand. Alhoewel een (OmpA-177)-Pal fusie intern op de delingsplaats aanwezig is in zulke cellen, is dit niet het geval aan het celoppervlak. Het ligt voor de hand om dit te wijten aan de aanhechtingsproblemen van de cel. Wanneer het celeigen Pal eiwit wel aanwezig is, neemt dit eiwit alle plekken in beslag op de delingsplaats, en vindt er het omgekeerde plaats van wat we wilden: het handvat zit nu overal aan het oppervlak, behalve op de delingsplaats! Verder bevat dit hoofdstuk resultaten van fusies tussen verschillende eiwit domeinen en OmpA-177. Het lijkt erop dat als eiwitdomeinen achter OmpA-177 worden geplakt, de kans dat OmpA-177 in het buitenste celmembraan terechtkomt groter is dan als ze ervoor worden geplakt.

Dan volgt het tweede gedeelte van het proefschrift, waar de krachtmetingen aan bod

komen. In **Hoofdstuk 6** wordt de optisch pincet opstelling beschreven. Het bijzondere aan deze optisch pincet opstelling is dat er laserlicht van beide kanten het preparaat binnenkomt. Hiermee kunnen deeltjes met een hogere brekingsindex worden vastgehouden, wat leidt tot sterkere 'trap' krachten op het deeltje. Hiermee kunnen dus ook hogere krachten gemeten worden. Uitbreidingen aan de opstelling, zoals de mogelijkheid om bij hogere temperaturen te meten (nodig om delende bacteriën te bestuderen), en de mogelijkheid om meerdere bolletjes met een enkele laserbundel tegelijkertijd te manipuleren (het zogenaamde 'time-sharen') worden beschreven. Dit laatste kan vergeleken worden met de circus act 'borden draaien', waarbij meerdere borden op stokken draaiend gehouden worden door ze op gezette tijden een extra slinger te geven. Zo ook kan door maar snel genoeg een laser bundel op verschillende plekken te richten meerdere bolletjes op hun plaats gehouden worden. Op deze manier kunnen twee bolletjes aan een enkele bacterie vastgemaakt worden.

In **Hoofdstuk 7** worden experimenten beschreven waarbij bolletjes via een DNA molecuul vastgemaakt worden aan bacteriën die het eerder genoemde SA-1 epitoom op hun oppervlak presenteren. Door kracht-extensie curves te meten van DNA moleculen tussen twee bolletjes en die te vergelijken met soortgelijke curves van DNA moleculen die aan de SA-1 epitoom vastzitten kunnen we leren over de eigenschappen van het handvat op het celoppervlak. Onverwachts bleek de geometrie van het experiment, waarbij het bolletje onder een hoek uit de 'trap' getrokken wordt, een groot effect te hebben op de gemeten krachten. De resultaten suggereren dat het handvat via een membraanbuis uit het buitenste celmembraan getrokken kan worden. Experimenten waarbij de hoogte van het bolletje ten opzichte van de bacterie nauwkeurig ingesteld wordt moeten uitwijzen of dit inderdaad het geval is, en of het celwand bindingsdomein van OmpA de kans hierop kan verkleinen. Het is belangrijk om dit vast te stellen omdat het niet de bedoeling is dat het handvat uit de cel getrokken wordt tijdens de krachtmeting.

Tenslotte wordt in **Hoofdstuk 8** de mogelijkheid van een fusie-eiwit op de delingsplaats bediscussieerd. Belangrijk hiervoor is dat de eiwit module in het buitenste celmembraan zich moet kunnen verplaatsen om zo de interne module met delingsplaats affiniteit naar het midden te brengen. De (schaarse) literatuur hierover suggereert dat dit mogelijk is. Verder worden alternatieve benaderingen die zijn verkend binnen dit onderzoek in dit hoofdstuk beschreven. Hieronder vallen een speciale *E. coli* mutant die

Samenvatting

geen celwand en buitenmembraan meer heeft, en het vasthouden van een bacterie door kleine bolletjes aan beide celpolen te plakken en deze te 'trappen'. De eindconclusie is dat het voortzetten van de zoektocht naar een eiwit handvat op de delingsplaats zinvol is om zo tot de realisatie van de beoogde experimenten aan krachtgeneratie tijdens celdeling te komen.

