



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Dynamics and structural features of the microtubule plus-ends in interphase mouse fibroblasts

Zovko, S.

Citation

Zovko, S. (2010, June 22). *Dynamics and structural features of the microtubule plus-ends in interphase mouse fibroblasts*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15711>

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/1887/15711>

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

Samenvatting (Nederlands)

Samenvatting

Samenvatting

Microtubuli (MT) vormen, samen met actine-netwerk en het intermediaire filament-netwerk, het cytoskelet van de eukaryote cel. Verschillende cellulaire processen, o.a. intracellulair transport, positionering van de organellen, bewerkstelling van cel polarisatie, celmigratie en celdeling worden door microtubuli gereguleerd.

Microtubulus is een intrinsiek-dynamisch, hol polymeer opgebouwd uit α/β -tubuline heterodimeren. Een microtubulus heeft twee, qua structuur en functie, verschillende uiteinden: het minus- en plus-eind. Het plus-eind is hiervan het meest dynamisch. In een rustende cel, vormen de microtubuli een radiaal netwerk dat over de hele cel uitgespreid is. Minuseindjes zijn gesitueerd in het microtubuli-organiserende centrum (MTOC) in de buurt van de celkern, terwijl de plus-eindjes georiënteerd zijn naar de periferie van de cel. De meeste microtubuli groeien vanuit het MTOC naar de periferie van de cel, waarbij ze het cytoplasma doorzoeken en met verschillende structuren (organellen) in contact komen en hiermee associëren (zogenaamd "search and capture" gedrag). Het

Samenvatting

fascinerende hierbij is dat de microtubuli-pluseindjes in de buurt van het celmembraan het gedrag vertonen dat gekenmerkt is door continue wisseling van groei en krimp. Dit gedrag wordt de dynamische instabiliteit genoemd. Dit gedrag is ook een eigenschap van de zelfgeassembleerde microtubuli *in-vitro*. In de levende cel wordt de dynamiek van het pluseindje gereguleerd door bepaalde factoren die specifiek met het pluseindje van de microtubulus associëren, namelijk de pluseind-volgende eiwitten (in het Engels: 'plusend tracking proteins' afgekort als +TIPs). Een voorbeeld van +TIPs zijn cytoplasmatische linkereiwitten CLIP-170 en CLIP-115 die in eukaryote cel bekend zijn als "rescue"-factoren; dat wil zeggen dat ze een krimpend pluseindje naar een groeiend pluseindje omzetten. Op welke manier dit plaats vindt is (nog) niet bekend.

In-vitro elektronenmicroscopisch onderzoek aan zelfgeassembleerde microtubuli heeft uitgewezen dat microtubuli pluseindjes verschillende vormen (conformaties) kunnen aannemen, afhankelijk van de dynamische toestand waar ze zich op dat moment in bevinden. Dus een groeiend pluseindje heeft een andere vorm dan een krimpend pluseindje. Deze *in-vitro* studies suggereerden ook dat er drie basisvormen van het pluseindje waren, namelijk de "sheet-like" of "extended" vorm, de gekrulde vorm ("ram's horn") en de stompe vorm ("blunt"), die zouden corresponderen met de groei, krimp en pauze, respectievelijk.

Het doel van de hier gepresenteerde wetenschappelijke studie was te onderzoeken welke microtubuli pluseind structuren in de periferie van de muis fibroblasten voorkomen en welke dynamische toestand deze structuren representeren. Bovendien is onderzocht hoe de +TIPs CLIP-170 en CLIP-115 deze pluseind structuren beïnvloeden en wat de consequenties zijn van het weghalen van deze eiwitten op de pluseindjes structuur, microtubuli netwerk en de celvorm. Als model cellijn hebben we muisfibroblasten (3T3s en MEFs) gebruikt omdat deze cellen een uitgebreid microtubuli netwerk hebben, waar microtubuli in de periferie niet te dicht op elkaar liggen zodat het mogelijk is naar de individuele microtubuli te kijken.

Om de pluseind structuren, die van de grootte van een paar tientallen nanometers zijn, in de cel te kunnen identificeren en visualiseren hebben we elektronen microscopie (EM) gebruikt. In Hoofdstuk II van dit proefschrift wordt deze techniek in detail beschreven. Hier laten we ook zien dat het behoud van de originele structuur van de microtubuli en de pluseindjes sterk afhangt van de manier waarop de cellen behandeld (gefixeerd) zijn. Met behulp van EM hebben we vervolgens naar de periferie van de gefixeerde (dus niet levende) muisfibroblasten (3T3s) gekeken omdat in dit gebied microtubuli zitten die dynamische instabiliteit vertonen. Door een zeer uitgebreide fotografische studie te maken van de in de periferie aanwezige pluseindjes in tientallen cellen te maken, is een morfologische inventarisatie van pluseindjes gemaakt. Lettend op verschillende structurele kenmerken van de pluseindjes, hebben we negen morfologisch van elkaar te onderscheiden structuren van pluseindjes kunnen omschrijven. We hebben deze negen conformaties ook onderzocht in 3D door elektronen-tomografie (ET) toe te passen. Met deze techniek wordt het sample in de EM geroteerd en bij elke rotatiehoek wordt er een

foto van het object genomen. Deze foto's worden vervolgens digitaal verwerkt (geprojecteerd) zodat het gereconstrueerde object in ruimte (3D) geobserveerd kan worden (Hoofdstuk II en Hoofdstuk III).

Vervolgens hebben we onderzocht welke van de negen gevonden pluseind conformaties bij welke dynamische toestand horen. Aangezien de visualisatie met behulp van EM niet toelaat om naar een dynamisch systeem te kijken (de cellen moeten eerst gefixeerd zijn om ze in een EM te kunnen observeren), hebben we een truc toegepast. Hiervoor is gebruik gemaakt van een stof, nocodazole, die microtubuli doet krimpen. Door de cellen bloot te stellen aan nocodazole hebben we dynamische instabiliteit opgelegd richting enkel krimp. Na de inductie van krimp met behulp van nocodazole hebben we de cellen op verschillende momenten in de tijd gefixeerd. Vervolgens hebben we de pluseindjes in de behandelde cellen onderzocht in de elektronenmicroscop. Op deze manier konden we het chronologische verloop voor elk van de negen verschillende pluseind structuren na de krimp-inductie volgen en een bepaalde dynamische toestand aan elk van de negen structuren toekennen (Hoofdstuk III).

Tijdens verder onderzoek is gekeken of er een correlatie is tussen de plek in de celperiferie en de distributie van de verschillende pluseind conformaties. Onze data laten zien dat de negen conformaties niet egaal gedistribueerd zijn over de celperiferie. Zo waren vooral de pluseind structuren geassocieerd met de krimp (gekrulde pluseindjes) dichtbij de celmembraan te vinden. Dit betekent dat de dynamische status en/of vorm van het pluseindje beïnvloed wordt door de structuren aanwezig in de periferie (Hoofdstuk III).

Om de visualisatie van de microtubuli pluseind structuren verder te optimaliseren hebben we hele fibroblasten cryo-gefixeerd en met cryo-EM/ET onderzocht. Door de op EM-grid gegroeide fibroblasten (i.e. 'whole mount') te cryo-fixeren en onder cryogene atmosfeer direct in een EM te bestuderen worden de mogelijke artefacten afkomstig van sample preparatie (fixatie, staining, etc) omzeild terwijl de preservatie van het sample zeer sterk de natieve toestand van de cel benadert. Doordat het snijden van de coupes van de cellen niet meer nodig is in deze setting, is er geen gevaar dat de pluseindjes worden afgesneden (Hoofdstuk IV).

In het tweede gedeelte van het onderzoek (Hoofdstuk V) hebben we gebruik gemaakt van muisfibroblasten (mouse embryonic fibroblasts of MEFs) die deficiënt zijn voor CLIP-170 en CLIP-115 eiwitten, de zogenaamd double-knockout (DKO) MEFs (CLIP eiwitten zijn beiden dus afwezig in DKO MEFs). Door met de EM de pluseindjes in DKO cellen te onderzoeken en te vergelijken met de pluseindjes uit de normale, wild-type (WT) MEFs konden we afleiden welke invloed CLIP-eiwitten op de pluseind structuur hebben. We hebben gevonden dat alle negen structuren die in de WT MEFs aanwezig waren (en in de 3T3 cellen, Hoofdstuk III) ook in de DKO MEFs voorkwamen. We hebben daarom geconcludeerd dat CLIPs *an sich* geen invloed hebben op de vorming van bepaalde pluseind conformatie. Wel hebben we gevonden dat de pluseind structuren geassocieerd met de groei in mindere mate aanwezig waren in de DKO cellen. Of dit gemeten effect een directe consequentie is van de afwezigheid van CLIPs als stabiliserende factoren

Samenvatting

die aan deze specifieke pluseind structuur zouden binden, of juist een indirect effect van de verstoorde microtubulodynamiek, is niet duidelijk.

Door middel van fluorescentiemicroscopie hebben we gekeken naar de effecten van de CLIPs-deficiëntie op het microtubuli netwerk. Onze resultaten suggereren dat CLIPs een rol spelen in de cellulaire distributie van de microtubuli, hoogstwaarschijnlijk door het wegvallen van de CLIPs als "rescue"-factoren en dus een verstoorde microtubuli dynamiek. Daarnaast hebben we gevonden dat zowel dynamische als stabiele populatie microtubuli gevoeliger zijn voor nocodazole in DKO cellen, wat mogelijk duidt op een stabiliserende rol voor CLIPs. Op het cellulair niveau vinden we dat CLIPs-deficiënte cellen een dubbel zo groot oppervlak hebben als de WT cellen. Bovendien laten onze data zien dat afwezigheid van CLIPs tot een verstoorde cel-matrix-adhesie leidt: de cel-matrix-adhesie structuren in de DKO cellen zijn significant groter en anders over de cel verdeeld dan in de WT cellen. Het is daarom plausibel dat CLIP-eiwitten betrokken zijn bij het door microtubuli geïnduceerde "disassembly" van cel-matrix-adhesie. Op welke manier deze eiwitten betrokken zijn bij dit proces zal verder in de toekomst uitgezocht moeten worden. Aangezien cell-matrix-adhesie signaaltransductie belangrijk is in het proces van celmigratie, is het ook van belang om te onderzoeken wat de rol is van de CLIPs- eiwitten in deze context.