



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Imaging plasma membrane domains in signal transduction pathways

Pezzarossa, A.

Citation

Pezzarossa, A. (2012, March 13). *Imaging plasma membrane domains in signal transduction pathways*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18585>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18585>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18585> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Pezzarossa, A.

Title: Imaging plasma membrane domains in signal-transduction pathways

Issue Date: 2012-03-13

SAMENVATTING

Het celmembraan scheidt de binnenkant van de cel van de buitenwereld. Het is een barrière die de doorgang van bepaalde stoffen (zoals ionen en moleculen) van buiten naar binnen controleert. Het membraan van een cel, ook wel het *plasmamembraan* genaamd, bestaat uit verschillende soorten lipiden, die georganiseerd zijn in een dubbele laag waarin eiwitten zich bevinden. Het eerste model om dit membraan te beschrijven werd in de 70er jaren voorgesteld door Singer en Nicolson. Volgens dit model, het zogenaamde *fluid-mosaic model*, is het membraan een uniforme dubbele laag waar eiwitten homogeen gedistribueerd en vrij zijn om te bewegen. Dit model werd verworpen toen een veelheid van experimenten aantoonde dat de zaken ingewik kelder wonen. Nieuwe modellen werden voorgesteld waarin de verschillende soorten lipiden georganiseerd zijn zeg domeinen. Deze domeinen verschillen in afmetingen (van tientallen tot honderden nanometers) en in samenstelling.

Het plasma membraan is betrokken bij een grote hoeveelheid processen: bij cel-cel adhesie, ion geleiding en bij signaal overdracht. In het algemeen aangenomen wordt dat membraandomeinen een functionele rol spelen in het reguleren van deze processen, in het bijzonder de processen die signaaltransductie initiëren. Signaaltransductie is het proces waarbij een cel een signaal van de buitenwereld vertaalt in een respons binnen in de cel. Gedurende signaaltransductie bindt het signaleringsmolecuul (soms omschreven als de ligand) aan een specifieke receptor aan het oppervlak van de cel. Deze binding initieert een serie reacties, welke uiteindelijk tot de fysiologische reactie van de cel leiden. Deze processen zijn sterk gereguleerd. Een specifieke organisatie van domeinen in het plasmamembraan kan de efficiëntie van het doorgeven van het signaal verbeteren, onder andere door lokaal de concentratie van moleculaire bindingspartners te vergroten. Zo kunnen dergelijke domeinen als signaalversterkingsplatforms, *signalosomes*, in de cel worden gezien.

In dit proefschrift bestudeer ik het bestaan en de rol van membraandomeinen in levende cellen met fluorescentiemicroscopie aan enkele moleculen. Deze techniek gebruikt een combinatie van laser-excitatie en specifieke fluorescentie-labeling van eiwitten om de positie van ieder molecuul in het membraan met hoge nauwkeurigheid te kunnen bepalen.

In hoofdstuk 2 pas ik deze techniek toe om de verdeling van een eiwit verankerd in het membraan, HRas, aan de binnenste zijde van het plasmamembraan van een fibroblast-cel, te bestuderen. HRas is betrokken bij veel verschillende cellulaire processen, in het bijzonder bij celgroei, -proliferatie en differentiatie. Met behulp van de positie van enkele moleculen die geobserveerd zijn, heb ik een *kaart* gemaakt van de distributie van het eiwit over het membraan. Statistische analyse van deze distributie heeft aan het licht gebracht dat HRas dynamisch lokaliseert in membraandomeinen, met afmetingen van 80 tot 250 nm. Deze domeinen werden gelokaliseerd in de binnenste zijde van het membraan. Verassend genoeg was de vorm en grootte ook gerelateerd aan de organisatie van lipides aan de buitenkant.

Een andere aanpak om lokalisatie van domeinen te bestuderen berust op het volgen van individuele eiwitten op het moment dat ze over het membraan diffunderen. Deze aanpak heb ik gebruikt om de invloed van de membraanstructurering op het samenkomen van een 2-componenten systeem te bestuderen, de type-I interferon receptor. Deze receptor is van fundamenteel belang in de cellulaire reactie op infectie en ongecontroleerde groei, zoals bij kanker. De receptor wordt gevormd door twee afzonderlijke eenheden, ifnar1 en ifnar2, welke een signaleringscomplex vormen zodra ze binden met een ligand, interferon. Maar er zijn maar een paar kopieën van deze afzonderlijke eenheden verspreid over het celmembraan. Omdat ifnar1 en ifnar2 elkaar moeten vinden voordat ze een signaleringscomplex kunnen vormen, bestaat er al enige tijd het vermoeden dat membraandomeinen van belang zijn in dit proces. Als de afzonderlijke eenheden elkaar over het hele membraan moeten vinden, dan zou het een aanzienlijke tijd duren voordat het signaleringsproces geïnitieerd kan worden. Als dit proces binnen domeinen van enkele nanometers plaats vindt, kan het proces zich veel sneller en effectiever voltooien. Door het kijken naar het diffusiegedrag van deze componenten, heb ik waargenomen dat beide receptorcomponenten zich binnen domeinen bevinden. Productie van de subeenheden van de receptor bij verschillende relatieve concentraties (overmaat van ifnar1 ten opzichte van ifnar 2 of vice versa) veroorzaakte een ver-

schil in de lokalisatie van de eiwitten. Deze resultaten suggereren dat de interactie tussen de subeenheden van fundamenteel belang is in de laterale organisatie van de eiwitten in het vlak van het membraan. Zodoende speelt de relatieve concentratie van de twee componenten een rol in het behouden van de organisatie van de componenten in het vlak van het membraan.

Het volgen van enkele moleculen is een erg krachtige techniek om eiwitbeweeglijkheid te bestuderen, maar het is in zijn temporele resolutie wel gelimiteerd tot een paar milliseconden. In hoofdstuk 4 van dit proefschrift presenteer ik een geavanceerde techniek welke mij toelaat enkele moleculen te volgen op microseconde tijdschaal. Na validatie van de techniek op DNA moleculen, heb ik de techniek toegepast op eiwitdiffusie. In hoofdstuk 5 omschrijf ik mijn studie van de diffusie van een klein eiwit, een GPI-verankerd eiwit, met een microseconde tijdsresolutie. Ik was in staat om het bestaan van kleine domeinen te bevestigen die de diffusie beïnvloeden op een korte tijdsschaal; niet te observeren deze domeinen waren met reguliere methodes op een milliseconde tijdsresolutie.

In dit proefschrift heb ik laten zien dat de membraanstructuur een fundamentele rol speelt in cellulaire processen, in het bijzonder bij cel-cel signalering en signaaltransductie. Ik heb nieuwe technieken ontwikkeld, welke het mij toelaten de laterale organisatie van eiwitten met een nog niet eerder vertoonde temporele resolutie te bestuderen. De resultaten in dit proefschrift vertegenwoordigen een belangrijk stap voorwaarts in het begrip van de rol van het plasmamembraan in cel-cel signalering.

