



Universiteit
Leiden

The Netherlands

GPCR and G protein mobility in *D. discoideum* : a single molecule study

Hemert, F. van

Citation

Hemert, F. van. (2009, December 21). *GPCR and G protein mobility in D. discoideum : a single molecule study*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14549>

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/1887/14549>

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

Samenvatting

Cellen zijn de fundamentele eenheid van alle organismen die we met het blote oog kunnen zien. Ze bestaan in allerlei vormen en kunnen alle functies vervullen die mensen nodig hebben om te leven. In het menselijk lichaam bestaan bijvoorbeeld cellen die maagzuur maken en cellen die de elektrische signalen doorgeven die je uiteindelijk in staat stellen te denken. De meesten menselijke cellen zijn tussen de 10 en 100 μm in doorsnee (een haar is ongeveer 60 μm , een μm is 1 duizendste mm), een organisme zoals een mens bestaat dus uit miljarden cellen.

Binnen het lichaam vormen cellen samen eenheden die specifieke taken vervullen, dit noemen we organen. Zo zuiveren de nieren het bloed, slaan de hersenen informatie op en voorzien de longen het geheel van zuurstof. Maar niet alle functies zijn vastgelegd in grote, zichtbare organen.

Het immuunsysteem bijvoorbeeld omvat een aantal organen en een groot aantal losse cellen die door het lichaam stromen en kruipen op zoek naar dingen die er niet thuis horen. Een voorbeeld van zulke losse cellen zijn de witte bloedcellen. Witte bloedcellen worden constant met het bloed mee gevoerd totdat ze op een plaats komen waar een infectie is. Deze infectie kan bijvoorbeeld komen doordat er bacteriën in een wond gekomen zijn. Bacteriën zijn eveneens cellen maar dan zo'n 10 tot 100 keer kleiner dan onze lichaamscellen. Ze gedijen goed in de warme vochtige omgeving die het menselijk lichaam biedt, meestal ten koste van de lichaamscellen van de gastheer. Doordat bacteriën een andere stofwisseling hebben dan de mens scheiden ze stoffen uit die normaal gesproken niet voorkomen binnen het menselijk lichaam. Juist deze stoffen zijn voor witte bloedcellen een signaal om uit het bloed te kruipen richting de plaats van infectie. Daar aangekomen zullen ze de bacteriën

opnemen (endocyteren) en verteren. Tegelijkertijd vind er nog een scala aan processen plaats die de effectiviteit van het immuunsysteem verhogen en leiden tot het verdelgen van de schadelijke bacteriën door het hele lichaam.

Over dit proces van bacteriën localiseren en verdelgen is al veel bekend, bijvoorbeeld welke stoffen bacteriën uitscheiden die hun aanwezigheid verraden. Er is veel minder bekend over de precieze mechanismen die de witte bloedcellen in staat stellen in de richting van de infectie te kruipen. Hoe bepaalt een cel de juiste richting? Als hij deze richting heeft bepaald, hoe zorgt hij dan dat hij ook daadwerkelijk begint te bewegen? Om dit soort vragen te beantwoorden moeten we nog verder inzoomen en kijken naar de opbouw van de individuele cellen.

Een cel is eigenlijk een zeer goed georganiseerde micro-machine. Eiwitten (ongeveer 1 nm groot, ook wel proteïnen genoemd), waarvan de vorm en functie vastligt in het DNA, vormen de werkzame deeltjes. Wat alle cellen echter gemeen hebben is het hebben van een celmembraan. Het celmembraan is een vlies van fosfolipiden wat ervoor zorgt dat de cel bij elkaar blijft en zijn eiwitten en structuur behoudt. Om toch met de buitenwereld te kunnen communiceren en signalen te detecteren heeft de cel eiwitten die door het membraan gaan (transmembrane eiwitten). Sommige van deze eiwitten, zogenaamde receptors, kunnen stoffen die buiten de cel aanwezig zijn binden om vervolgens binnen de cel (in het cytosol) een signaal door te geven. In het cytosol kunnen vervolgens allerlei reacties plaatsvinden die vele eiwitten omvatten en resulteren in een bepaalde actie. In witte bloedcellen resulteert de detectie van bacteriespecifieke stoffen in het kruipen in de richting van de bacteriën. Dit proces van gerichte celbeweging in een concentratiegradiënt van een chemische verbinding (de chemoattractant) wordt chemotaxis genoemd.

Een voorwaarde voor chemotaxis is dat de cel kan bepalen waar de chemoattractant vandaan komt. Dit proces heet "directionele detectie" en de evolutie heeft cellen uitgerust met een hele batterij aan mechanismen om dit te bewerkstelligen. Het detecteren van de richting van een chemoattractant gradiënt begint altijd met het binden van de chemoattractant aan een receptor. Doordat de chemoattractant een hogere concentratie heeft op de plaats waar het gemaakt wordt dan ver weg van deze "bron" zullen aan de kant van de cel die het dichtstbij de chemoattractantbron ligt meer receptoren geactiveerd worden dan aan de kant die verder weg is. Dit zorgt voor

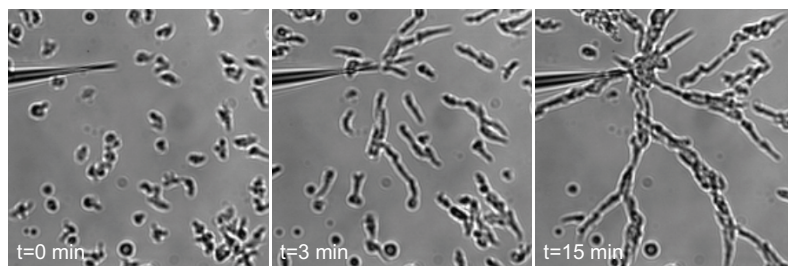


Figure 5.11: *D. discoideum* cellen chemotaxen naar een pipette waaruit cAMP komt. Hierbij vormen ze stromen omdat ze aan de achterkant zelf ook cAMP produceren en uitscheiden.

een verschil in receptor activatieniveau. De interne eiwitorganisatie van de cel ontvangt het gradiëntsignaal van de receptor, versterkt dit en zorgt ervoor dat de cel een duidelijke voor- en achterkant ontwikkelt, dit wordt polarisatie genoemd. De gepolariseerde eiwitconfiguratie binnen de cel zorgt ervoor dat het celskelet (cytoskelet) groeit in de richting van de chemoattractantbron, aan de voorkant van de cel terwijl aan de achterkant andere eiwitten het membraan meetrekken. Het resultaat is een beweging van enkele μm per minuut. Het doel van dit promotieonderzoek is de dynamica van de chemoattractant receptor en de eiwitten waarmee deze een directe interactie heeft, te begrijpen en te beschrijven.

Omdat menselijke cellen heel slecht overleven buiten het lichaam en enorm veel-eisend zijn qua voeding, temperatuur en zuurtegraad, gebruiken we de amoëbe *Dic-tyostelium discoideum* voor dit onderzoek. *D. discoideum* vertoont ook chemotaxis op een manier die vergelijkbaar is met die van witte bloedcellen. Het voordeel is dat *D. discoideum* cellen snel groeien bij kamertemperatuur en geen last hebben van de handelingen die nodig zijn om ze geschikt te maken voor het bekijken met de microscoop. Ze chemotaxen naar cyclisch adenosine mono-fosfaat (cAMP), een simpele, goedkope chemische verbinding. Door een verdunning van cAMP langzaam uit een pipette te pompen ontstaat er een concentratiegradiënt om de pipette die de *D. discoideum* cellen kunnen detecteren. Zoals te zien in figuur 5.11 bewegen de cellen richting de cAMP bron.

D. discoideum maakt voor de detectie van cAMP gebruik van de receptor ge-

naamd "cAMP receptor 1" (cAR1). Dit is een G eiwit gekoppelde receptor (GPCR), wat betekent dat hij het cAMP signaal via een G eiwit doorgeeft. Het G eiwit vormt het begin van een signaalcascade die uiteindelijk resulteert in chemotaxis. Veel eiwitten die deel uitmaken van de signaalcascade zijn al geïdentificeerd en men heeft een redelijk goed idee van welke eiwitten een interactie met elkaar hebben. Wat nog allerminst duidelijk is is wat de rol is van de dynamica van deze eiwitten. De eiwitten waar dit proefschrift zich op concentreert zijn de GPCR cAR1 en het hiermee geassocieerde G eiwit $G\alpha 2\beta\gamma$.

In dit proefschrift maken we gebruik van de techniek "single molecule microscopy" (SMM). SMM stelt ons in staat om de beweging van individuele eiwitten in het membraan te bekijken en te beschrijven. Een voorwaarde is dat we de eiwitten labelen met een fluorescerend label, in dit geval een eiwit afkomstig uit de kwal *Aequoria victoria*; yellow fluorescent protein (YFP). Met behulp van genetische technieken kunnen we individuele componenten van het systeem dat we onderzoeken (cAR1, $G\alpha 2$ en $G\beta\gamma$) koppelen aan YFP om ze vervolgens zichtbaar te maken met behulp van een laser gekoppeld aan een microscoop met een zeer gevoelige CCD-camera. Door de van individuele YFP eiwitten afkomstige, diffractie gelimiteerde lichtsignalen te beschrijven met een tweedimensionale Gaussische kromme kunnen we de positie hiervan (en dus van het eraan gekoppelde eiwit) bepalen met een positionele accuraatheid die alleen afhankelijk is van de signaal/ruis-verhouding. In theorie kan dit met vrijwel oneindige nauwkeurigheid maar in de praktijk betekent dit dat we stappen van ongeveer 40 nm kunnen waarnemen. Door met geschikte snelheid "snapshots" te maken van de moleculaire posities krijgen we een idee van de snelheid waarmee de eiwitten bewegen. Uit deze snapshots halen we informatie over de diffusie van de eiwitten en tevens over de onderliggende structuur van het celmembraan.

In dit proefschrift onderzoeken we de beweging van cAR1, $G\alpha 2$ en $G\beta\gamma$ in *D. discoideum* cellen. Dit doen we in rustende cellen, cellen die behandeld zijn met actine (een cytoskelet component) polymerisatie inhiberende chemicaliën (latrunculine A) en in chemotaxende cellen. Uit onze resultaten blijkt dat het feit dat een eiwit een homogene verdeling over het celmembraan vertoont, niets zegt over de verdeling van zijn dynamische eigenschappen. Zo beschrijven wij in hoofdstuk 2 nauwkeurig de bewegingen van individuele G eiwit *subunits*. De $G\alpha 2$ en de $G\beta\gamma$ subunits blijken

in rustende cellen precies met dezelfde snelheid en op dezelfde manier te bewegen, een sterke aanwijzing dat ze aan elkaar zijn gekoppeld, iets wat andere groepen ook bevestigen. In de afwezigheid van activatie (van cAMP) blijken $G\alpha 2$ en $G\beta\gamma$ te bestaan in twee fracties, een snelle ($D = 0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$) en een $10\times$ langzamere fractie ($D = 0.015 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Deze laatste fractie beweegt met dezelfde snelheid als een deel van de cAR1 moleculen (zie hoofdstuk 3). Wanneer cAR1 door middel van toevoeging van cAMP aan het celmedium wordt gestimuleerd om het G eiwit te activeren, beginnen de twee subunits zich verschillend te gedragen. De snelle fractie blijft bestaan maar de bewegingen geven aan dat zich in het membraan domeinen hebben gevormd waaruit de eiwitten niet kunnen ontsnappen. De langzame fractie van de $G\beta\gamma$ subunit wordt compleet immobiel, een sterke aanwijzing dat het ergens aan bindt. Deze immobilisatie en de vorming van de domeinen blijken allebei het resultaat te zijn van cytoskeletgroei. In chemotaxende cellen blijken de waargenomen effecten zich te beperken tot de voorkant van de cel. De domeinen spelen waarschijnlijk een rol in het lokaal houden van de activatie van meerdere signaalmoleculen, de immobilisatie zou kunnen duiden op een feedbackmechanisme wat bijdraagt aan de chemotaxis efficiëntie.

In hoofdstuk 3 onderzochten we in detail de beweging van cAR1. Die beweging blijkt ook sterk af te hangen van het actine cytoskelet maar op een andere manier als de G eiwit subunits. In rustende cellen beweegt cAR1 relatief langzaam. Wanneer we actine polymerisatie wederom inhiberen worden de cellen rond en neemt de mobiliteit van cAR1 ook met factor 2 toe. Eenzelfde mobiliteitstoename vonden we ook in chemotaxende cellen, waarbij de receptoren aan de voorkant nog sneller bewogen dan aan de achterkant. Dit verklaren wij met behulp van de resultaten van een andere groep die concludeerden dat de binding tussen het cytoskelet en het membraan veel minder sterk is in de voorkant van een chemotaxende cel. Het feit dat zelfs na behandeling met Latrunculine A de receptoren aan de voorkant nog steeds sneller zijn dan aan de achterkant geeft aan dat er ook nog andere factoren zijn die de diffusieconstante van cAR1 beïnvloeden, dit kunnen bijvoorbeeld signaallipiden zijn. De afwezigheid van de G eiwit subunits heeft geen gevolgen voor de diffusie van cAR1 echter, in cellen zonder de $G\alpha 2$ subunit vinden in een cAMP gradiënt geen veranderingen plaatst wat betreft de mobiliteit van cAR1. Een logisch gevolg van het

feit dat deze cellen de gradiënt niet kunnen waarnemen wanneer we aanvaarden dat slechts het binden van cAMP geen invloed heeft op de mobiliteit.

In hoofdstuk 4 keken we naar de invloed van de kleine G eiwitten RasC en RasG op het gedrag van cAR1 en $G\beta\gamma$. Deze eiwitten liggen stroomafwaarts van het GPCR / G eiwitsysteem, echter ze zijn van groot belang voor de regulering van het cytoskelet. Omdat het cytoskelet op verschillende manieren de diffusie van cAR1 en $G\beta\gamma$ beïnvloedt onderzoeken we hier eigenlijk een feedback regulering. Eén van de conclusies in dit hoofdstuk is dat wanneer we een functioneel cAR1 molecuul in het systeem brengen de cellen wederom kunnen chemotaxen. De groep die de cellen gemaakt heeft toonde al aan dat de expressie van het cAR1 gen *cara* verwaarloosbaar was maar of alleen dit feit de reden was voor het niet vertonen van chemotaxis was nog onduidelijk. Het blijkt dat de *rasC*⁻/*rasG*⁻ cellen geen van de hiervoor beschreven effecten van het cytoskelet op cAR1 en $G\beta\gamma$ vertonen. Het feit dat er geen immobilisatie en domeinvorming plaatsvindt na stimulatie en het feit dat de cAR1 mobiliteit homogeen is in chemotaxende cellen duidt erop dat de gebruikte knockouts hun cytoskelet niet goed op een ruimtelijke manier kunnen reguleren.

Dit proefschrift voegt kwantitatieve informatie toe aan de reeds bekende GPCR / G eiwit interactie. Zonder deze informatie is het onmogelijk om een volledig begrip te verkrijgen van de door ruis overspoelde processen die leiden tot chemotaxis. Een volledig begrip van chemotaxis brengt een beter begrip van processen zoals wondgenezing, embryogenese, axonsturing en het immuunsysteem met zich mee.