



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Insights into microtubule catastrophes: the effect of end-binding proteins and force

Kalisch, S.M.J.

Citation

Kalisch, S. M. J. (2023, December 13). *Insights into microtubule catastrophes: the effect of end-binding proteins and force*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3673428>

Version: 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/1887/3673428>

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

Samenvatting

(in interviewvorm)

Dit proefschrift gaat over "microtubules" en "catastrofes"? Kunt u in eenvoudige woorden voor een leek uitleggen wat met deze termen bedoeld wordt?

Laten we eerst eens kijken naar een spin. Het is een complex wezen met veel verschillende lichaamsdelen, maar in wezen zijn ze allemaal opgebouwd uit één bouwsteen: de cel. Dat betekent dat cellen bestaan in veel verschillende vormen en maten met veel verschillende functies. Toch hebben deze cellen veel gemeen. Bijna allemaal bevatten ze een kern die de erfelijke informatie bevat en een cytoskelet om de cel vorm te geven en te helpen bij de interne organisatie. Een van de filamenten waaruit deze cytoskelet is opgebouwd zijn "microtubuli" (MT's). Zij zien eruit als lange kabels en kunnen de hele cel omspannen. Een bijzonder kenmerk is dat ze dynamisch zijn: zoals kinderen een toren bouwen van Lego, de bouwstenen voor kinderen, zo worden MT's opgebouwd uit een kleinere subeenheid, tubuline genaamd. Ook vergelijkbaar met het spel van kinderen met Lego, wisselt het MT af tussen perioden van opbouw en afbraak. De plotselinge overgang naar een afbraakperiode wordt catastrofe genoemd.

Waarom wil je MT catastrofes bestuderen?

Zoals ik al zei, heeft de cel veel verschillende functies. Wanneer deze niet naar behoren worden uitgevoerd, kan dit uiteindelijk leiden tot ziekte of zelfs de dood van het organisme. Om dit te voorkomen is het belangrijk dat de taken van de cel naar behoren worden vervuld, wat alleen kan worden bereikt door een strakke regulering. MT's spelen hierbij een cruciale rol. Aangezien zij een kader geven aan een steeds veranderende cel en dienen als leidende structuren voor het afleveren van lading en signalen, moeten zij op het juiste moment en op de juiste plaats worden opgebouwd (wat wij "groeien" noemen). Evenzo moeten hun andere dynamische instabiliteitsparameters: hun afbraak (die wij "krimp" noemen) en de omschakeling van groei naar krimp, catastrofe, of omgekeerd van krimp naar groei, worden gereguleerd.

Kunt u specifieker zijn in wat u wilt weten over catastrofes?

Ja. Lange tijd werd gedacht dat catastrofes plotseling optreden, op een willekeurig moment [Hill, 1984, Mitchison and Kirschner, 1987, Dogterom and Leibler, 1993, Flyvbjerg et al., 1994, Howard, 2001, Phillips R., 2008]. Later is een ander idee in het onderzoek naar voren gekomen, namelijk dat een catastrofe geleidelijk in verschillende stappen plaatsvindt [Odde et al., 1995, Odde et al., 1996, Stepanova et al.,

2010, Gardner et al., 2011b]. Wij willen onderzoeken of dit inderdaad het geval is en wat de oorzaak van een catastrofe is. Uit hoeveel stappen bestaat het catastrofe proces, wat is de aard van de stap(pen). Zoals ik al zei moeten MT's strak gereguleerd worden om goed te kunnen functioneren. Dit proefschrift gaat over twee MT-regulatoren: eiwitten en drukkrachten die ontstaan wanneer MT's op een intracellulair obstakel stuiten. We willen begrijpen hoe deze twee factoren MT catastrofes beïnvloeden.

Wat zijn deze proteïnen?

Cellen bevatten een groot aantal verschillende eiwitten die geassocieerd zijn met microtubuli. Om hun regulerende werking te ontkoppelen doen we *in vitro* experimenten met drie sterk geconserveerde eiwitten waarvan bekend is dat ze de MT dynamica beïnvloeden. Dit maakt ze biologisch zeer relevant. Van onze eiwitten is bekend dat ze met elkaar interageren en ze zijn allemaal afkomstig van fission yeast: mal3, tea2 en tip1 [Busch et al., 2004, Busch and Brunner, 2004]. Zij behoren tot een klasse van microtubule-geassocieerde eiwitten die zich specifiek binden aan de MT uiteinden. Daarom worden ze "end-binding proteins" (EB's) genoemd.

Wat zijn uw methodes om MT catastrofes, EB's en kracht te onderzoeken?

De methoden worden beschreven in hoofdstuk 2 van dit proefschrift. Alle experimenten worden *in vitro* uitgevoerd in stroomkamers met aan de onderzijde stijve, op maat gemaakte groeven. MT's die in deze groeven zijn geassembleerd uit gestabiliseerde MT-zaden groeien tegen de starre barrières waar ze drukkrachten ondervinden. Dit imiteert de interactie tussen MT's en de celwand. In de stroomkamer bevinden zich tubuline en ook de EB's. Met een TIRF-microscoop kunnen we de fluorescent gemerkte EB's en tubuline aan het oppervlak van de kamer tussen de groeven specifiek belichten. We maken ook gebruik van een optisch pincet waarbij we MT's kernen uit een axonoom (dat dient als MT-kiemtemplate) dat aan een gevangen kraal is bevestigd. We richten de MT's tegen een rigide barrière in de aanwezigheid en afwezigheid van EB's. De groei van de MT's tegen de barrière resulteert in verplaatsing van de kraal van het centrum van de val die we kunnen meten met een hoge ruimtelijke en temporele resolutie. Uit deze metingen kunnen we dus MT-groei en krachtontwikkeling afleiden. Bovendien doen we ook experimenten bij constante kracht, waarbij een groei van het MT resulteert in een verplaatsing van de barrière en een constante plaats van de kraal.

Dus wat observeer je met de microscoop? Wat leer je ervan?

We hebben eerst gekeken naar de bindingsdynamica van het eindbindende eiwit mal3 in hoofdstuk 3. We observeerden de fluorescente accumulatie aan het groeiende MT uiteinde en onderzochten hoe deze veranderde voor, tijdens en na catastrofe. Dit deden we voor vrije MT's en voor MT's in contact met een barrière. We zagen, zoals reeds vermeld in [Maurer et al., 2011], dat mal3 begint te ontbinden van het vrije MT, gemiddeld 15 s voor de catastrofe. Deze afname van de mal3 intensiteit stopt ongeveer 5 s na de catastrofe wanneer de roosterintensiteit

wordt bereikt. Wanneer MTs onder kracht staan is het vergelijkbaar, alleen is de afname van de intensiteit nu getimed met het tot stand komen van barrière-contact in plaats van met catastrofe.

Waarom zie je mal3 ontbinden met een vrije catastrofe of vestiging van barrière-contact?

Maurer e.a. stelden een model voor waarbij tubuline aan de top van het MT een andere conformatie heeft dan tubuline verder van de top (de zogenaamde EB1-competente toestand) of tubuline in het rooster. De auteurs suggereren dat mal3 alleen bindt aan de nucleotidetoestand van tubuline in de EB1-competente toestand. De afname van de affiniteit van mal3 voor het MT moet daarom het verlies van zijn bindingsplaatsen betekenen (Maurer 2012). Bijgevolg redeneren we dat catastrofe of een drukkracht (bij barrièrecontact) het wegvallen van de EB1-competente toestand uitlokt.

Wat weet je over het catastrofe proces?

In hoofdstuk 4 hebben we het catastrofe proces van vrije MTs onderzocht. We hebben de catastrofe tijd gemeten, de tijd die verstrijkt tussen de nucleatie en de catastrofe, in drie condities: vrije MTs in de afwezigheid van EBs, in de aanwezigheid van mal3 en in de aanwezigheid van de drie EBs: mal3, tea2, en tip1. Aangezien het experimenteel moeilijk is om de levensduur van zeer korte MT's te bepalen, hebben we echter een onzekerheid in de korte catastrofegebeurtenissen. Om hiermee rekening te houden pasten we onze ongebundelde gegevens aan met verschillende afgeknotte verdelingen. De verdelingen beschrijven meerstapsreacties met onomkeerbare sequentiële en parallelle stappen, waarbij de stappen al dan niet beperkt zijn tot dezelfde tijdschaal (gamma-, (parallelle) tweestaps exponentiële en meerstaps exponentiële verdelingen). Wij hebben vastgesteld dat in al onze drie omstandigheden catastrofe een meerstapsproces is, zoals eerder gesuggereerd. Bovendien stellen we voor dat catastrofe bestaat uit (bijna) twee stappen met ongelijke tijdschalen. Als we de waargenomen tijdschalen vergelijken met de resultaten uit hoofdstuk 3, de tijdschalen van mal3 ontbinding, concluderen we dat de kortste stap van de twee gekenmerkt moet worden door het verlies van mal3. Het kan dus niet de eerste stap zijn. Op dit moment kunnen we niet meer zeggen over de aard van de andere, langere stap, noch kunnen we er zeker van zijn dat de stappen opeenvolgend zijn.

Het bijzondere aan je gegevens is dat je MT's tegen een barrière laat groeien. Hebben drukkrachten invloed op het catastrofe proces?

Dat hebben we onderzocht in hoofdstuk 5. We hebben de tijd gemeten vanaf het tot stand komen van het barrière-contact tot aan de catastrofe van de MT's die vastlopen. Zoals verwacht, hebben we gemeten dat de kracht het catastrofe-proces versnelt. Interessanter is dat er onder kracht een duidelijk effect is van de EB's: in afwezigheid van EB's bestaat het catastrofe-proces uit meer dan twee stappen, terwijl in aanwezigheid van EB's het catastrofe-proces een willekeurige reactie lijkt te

worden. Uitgaande van de resultaten van hoofdstuk 3, het verlies van mal3 met vestiging van kracht, suggereren we dat de willekeurige stap in de aanwezigheid van EB's samenhangt met het verlies van de EB1-competente toestand. Wat betreft de MT's in zuiver tubuline: we hebben op dit moment geen verklaring voor de toename van het aantal stappen.

Eerdere gegevens suggereerden dat een toename van de catastrofesnelheid het gevolg is van een afname van de tubuline aan-snelheid. Zou dat in uw experimenten het geval kunnen zijn?

Dat is inderdaad wat wij in hoofdstuk 6 hebben onderzocht. Door gebruik te maken van een optisch pincet, eventueel met force-feedback, konden we zowel de groeisnelheid als de opgewekte kracht met hoge resolutie meten. Verrassend genoeg veroorzaakte de aan- of afwezigheid van EB's geen duidelijk verschil in de kracht - groeisnelheid relatie in het krachtbereik dat we gemeten hebben ($F > 0.5 \text{ pN}$). We nemen aan dat dit wordt veroorzaakt door het verlies van EB's bij het tot stand komen van de kracht (zie hoofdstuk 3) en de daaropvolgende groei van het MT in afwezigheid van EB-binding.

Er zijn nog een paar open vragen...

Wij hebben inderdaad het effect van mal3, tea2 en tip1 op het catastrofe-proces onderzocht. We weten echter niet veel over de gecorreleerde bindingsdynamiek van de drie EB's. Verder zou er een verband kunnen bestaan tussen de groeisnelheid en het bereiken van catastrofe-bevorderende gebeurtenissen. Voor deze problemen geven wij voorlopige gegevens. Wij kennen ook niet de aard van alle stappen die tot de catastrofe leiden. Hiermee samenhangend kunnen we het raadsel niet oplossen waarom een kracht het aantal stappen van met kracht belaste MTs verhoogt. We bespreken mogelijke, vermeende scenario's zoals een derde stap, niet gedetecteerd in de vrije MT-gegevens maar teruggevonden bij de barrière, en verdere verdelingen met stappen van vaste duur of omkeerbare stappen. Wij denken niet dat het eerste het geval is, terwijl beide laatste scenario's realistisch lijken.