

Bestudering van moleculaire motoren

Biofysisch onderzoek aan het kopiëren van DNA

Physicalezing 2023

Biofysische bestudering van individuele moleculaire motoren

Hoe werken de moleculaire motoren die onze cellen in stand houden? Deze vraag omvat de kern van ons onderzoek en dat van veel andere wetenschappers. Om dergelijke vragen te beantwoorden hebben biofysici in de afgelopen decennia verschillende technieken ontwikkeld: bijvoorbeeld ionenkanaalopname, fluorescentiespectroscopie en krachtspectroscopie. Aanvankelijk ging het vooral om de technische uitdaging: kun je een enkel biologisch molecuul onderzoeken en bestuderen? En hoe zou je dat dan doen? De zogeheten enkel-molecuulbiofysica werd dan ook aanvankelijk enigszins beschouwd als een technische curiositeit: wat het kon opleveren in termen van wetenschappelijk begrip leek aanvankelijk marginaal. Maar nu, vele experimenten later, danken we veel van ons kwantitatieve begrip en veel van de modellen over hoe moleculaire motoren functioneren aan dergelijke experimenten en de aanpalende theoretische biofysica. Hiermee hebben we als vakgebied

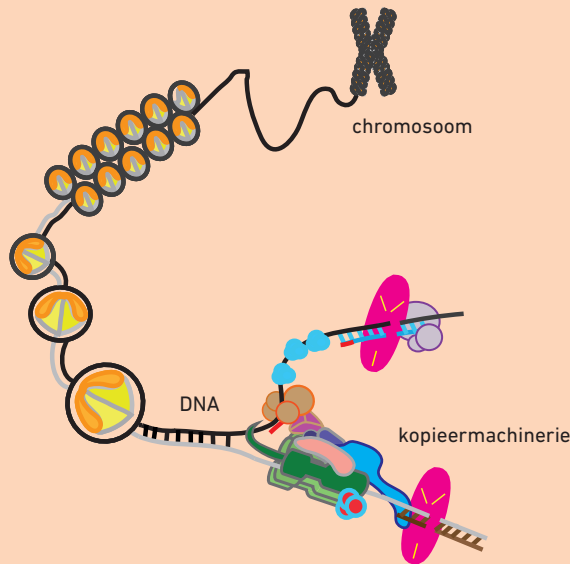
een grote en gevestigde discipline, namelijk de biochemie, veranderd: tegenwoordig kun je geen bijeenkomst over moleculaire motoren bijwonen waarin geen belangrijke bijdrages vanuit de biofysica aan bod komen.

Kopiëren van DNA

Sinds een aantal jaar focust mijn onderzoeksgroep Bionanoscience op het begrijpen van het kopiëren van DNA (figuur 1) vanuit biofysisch perspectief. Dat was voor ons een grote ommezwaai, omdat het aantal eiwitten dat betrokken is bij de totstandkoming en het functioneren van de moleculaire motor die ons DNA kopieert, heel groot is. Dat maakt het uitdagend om enkel-molecuulexperimenten uit te voeren. Het betekende ook voor ons dat we ons meer op de biochemie moesten gaan focuseren, om goed functionerende eiwitten te kunnen zuiveren. De biofysica verandert zoals gezegd de biochemie, maar om diepgaand bij te dragen aan de biochemie moet ook de biofysica veranderen, meer integreren met de biochemie. Maar ik denk dat het altijd zo gaat: de biologie en de

biochemie betrekken alle relevante aanpalende technieken en vakgebieden bij zich, ze gedragen zich als een zich continu ontwikkelend organisme. Maar zolang wij als biofysici een belangrijke invloed kunnen uitoefenen op hoe dit zich op betekenisvolle wijze kan voltrekken, vind ik dat prima.

Maar waarom bestuderen we specifiek het kopiëren van DNA? Deels vanuit de fascinatie met de complexiteit van de moleculaire motor die erbij betrokken is. Maar ook omdat het zo'n essentieel biologisch proces is dat op alle biologische relevante niveaus – moleculair, cellulair, genoombreed, en dat van het gehele organisme – invloed heeft. Bedenk daarbij de omvang van de hoeveelheid DNA die een mens tijdens zijn of haar leven moet kopiëren. Ons lichaam bevat ongeveer 10^{14} cellen, en tijdens een mensenleven vinden er per cel gemiddeld zo'n honderd delingen plaats. Elke cel bevat ongeveer één meter DNA (drie miljard baseparen die op afstanden van 0,34 nanometer van elkaar staan). In de celkern van pakweg tien micrometer is het DNA aanwezig in sterk opgevouwen toestand,

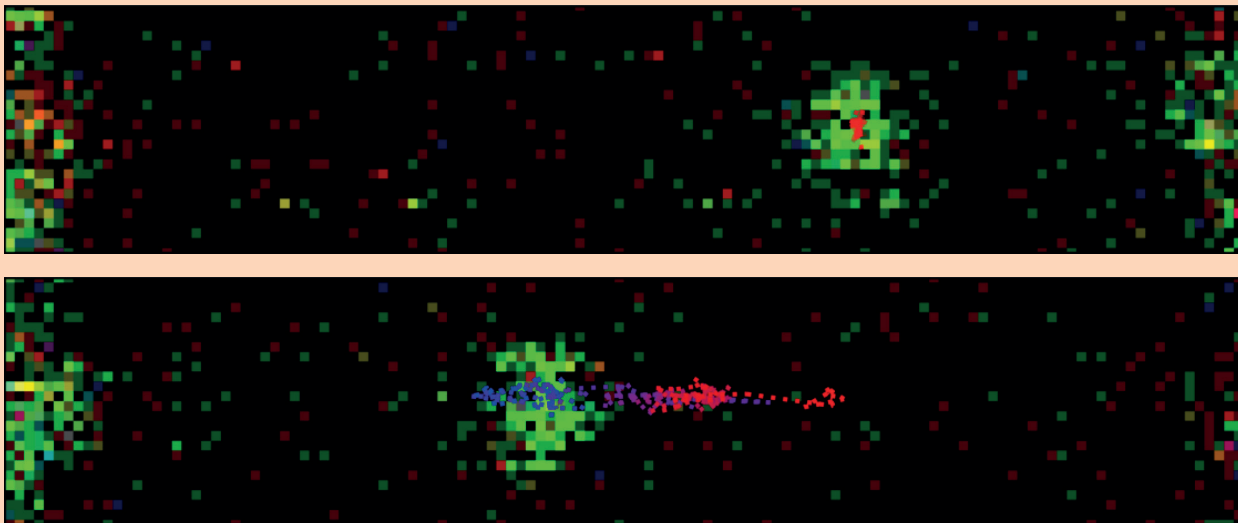


Figuur 1. Het kopiëren van DNA zoals het plaatsvindt in de kern van onze cellen. Om in de celkern te passen, is het DNA om eiwitspoolen gewikkeld. De kopieermachinerie is rechtsonder weergegeven.

zodat het past; maar de kopieermachinerie werkt wel elk basepaar stapsgewijs af. Als je deze getallen met elkaar vermenigvuldigt, dan zie je dat we tijdens ons leven zo'n 10^{16} meter DNA synthetiseren – het equivalent van één lichtjaar aan DNA! Ongelofelijk, toch? En meestal gaat het goed! Hoe krijgt een moleculaire motor dat voor elkaar? En ook: als het alsnog fout gaat, waarom dan? En hoe dan? En hoe worden fouten eventueel hersteld? Allemaal interessante vragen met veel biomedische consequenties: zo kunnen fouten in het kopiëren van DNA leiden tot mutaties in genen, die op hun beurt weer kunnen leiden tot het stilleggen of vertragen van de kopieermachinerie. Dit kan weer leiden tot blootgesteld enkelstrengs DNA, DNA-breuken en andere vormen van zogeheten instabiliteit van het genoom. Daarom bestuderen we hoe de moleculaire motor die het kopiëren van DNA teweegbrengt, functioneert, in samenwerkingen met biochemici. Ik zie het als het bestuderen van een auto, maar dan wel een auto op nanoschaal. Om erachter te komen welke onderdelen essentieel zijn en

hoe ze met elkaar in verband staan, kunnen componenten worden verwijderd en/of aangepast. Deze werkwijze is de kracht van de biochemie. Het is ook mogelijk om individuele componenten van de auto zichtbaar te maken en deze te observeren terwijl de auto beweegt. Op deze manier kunnen we een beter begrip krijgen van de functie van bepaalde onderdelen, en van hun onderlinge verband, tijdens het functioneren van de auto. Deze werkwijze is de kracht van de biofysica. Het krachtigst is het om deze twee werkwijzen met elkaar te integreren. Om dit soort enkel-moleculummetingen van het kopiëren van DNA te bewerkstelligen zijn optica en fluorescentiedetectie essentieel. Zo koppelen we fluorescerende moleculen aan de eiwitten die ons interesseren en bouwen we gevoelige microscopen om deze fluorescentie te meten. Vervolgens kunnen we de vooruitgang van de moleculaire motor op het DNA tijdens het kopiëren meten of brengen we de aanwezigheid van bepaalde eiwitten in kaart. Hierdoor verkrijgen wij inzicht in de dynamiek van de moleculaire motor in termen van

snelheid, krachtgevoeligheid – typisch op de piconewtonschalen – en eiwitcompositie. Door gebruik te maken van geautomatiseerde detectiemethoden kunnen we snel en efficiënt data verzamelen. Door middel van dit soort metingen hebben wij aangetoond dat het ORC-eiwit (*origin recognition complex*), dat als eerste eiwit betrokken is bij de opbouw van de kopieermachinerie, een beweeglijk eiwit is dat snel diffundeert langs DNA (figuur 2). Herkenning van een specifieke sequentie in het DNA brengt dit diffusieproces een halt toe, waarna de opbouw van de kopieermachinerie kan beginnen. Uiteindelijk wordt een zogeheten helicase gevormd die de dubbele strengen van het DNA uit elkaar haalt zodat nieuwe baseparen toegevoegd kunnen worden: dit is de kern van het DNA-kopieerproces. Voor dit eiwitcomplex hebben wij aangetoond dat het op twee verschillende manieren over het DNA kan bewegen, als het ware in een rechte lijn over het DNA, of op en neer via diffusie. Welk proces de overhand heeft is afhankelijk van de brandstof die beschikbaar is voor het eiwitcomplex.



Figuur 2. De beweging op DNA (niet zichtbaar) van het ORC-eiwit (zichtbaar gemaakt door middel van de koppeling aan een fluorescerend molecuul (groen)). De gestippelde lijnen geven het pad van het ORC-molecuul aan (blauw komt overeen met eerdere tijdstippen, rood komt overeen met latere tijdstippen).

Kopiëren van eiwitpoelen

Zoals aangegeven is het DNA in onze celkernen volledig opgekruld. Dit wordt bewerkstelligd door onder andere het wikkelen van het DNA om eiwitpoelen. Wanneer het DNA gekopieerd wordt, moeten ook deze eiwitpoelen overgezet worden naar het nieuwe DNA. Omdat het kopieerproces van één oorspronkelijk DNA-molecuul twee nieuwe DNA-moleculen maakt, moeten er ook extra eiwitpoelen gesynthetiseerd en op het DNA aangebracht worden. Anders zou namelijk de dichtheid van eiwitpoelen op het DNA met elke celdeling halveren, hetgeen het functioneren van een cel niet ten goede zou komen. Ook deze processen vinden plaats tijdens het kopiëren van DNA. Wij zijn bezig met de eerste stappen om dit op experimenteel niveau in kaart te brengen, wat erg inspirerend is. Het realiseren van een algehele biofysische beschrijving van deze processen zal ons nog wel wat jaren bezighouden.

Technische uitdagingen

In een interdisciplinair vakgebied zoals de biofysica wordt afwisselend vooruitgang geboekt in het fysisch begrip van biologische processen en in de ontwikkeling van vernieuwende instrumentatie. Dit laatste blijft altijd belangrijk: alles wat het onderzoek makkelijker of preciezer maakt wordt met open armen ontvangen. Hoewel er al veel vooruitgang is geboekt, zijn er nog grote stappen nodig om biofysisch onderzoek aan enkele moleculen op een grootschalige, snelle en geautomatiseerde manier mogelijk te maken. Het aangaan van deze uitdaging zal in de toekomst uitgebreide studies naar de eigenschappen en interacties van eiwitten faciliteren.

Dankwoord

Ik wil alle leden van mijn onderzoeksgroep in Delft bedanken die hebben bijgedragen aan de totstandkoming van ons onderzoek aan het kopiëren van DNA op enkel-molecuulniveau, alsmede de

onderzoeksgroep van John Diffley (Francis Crick Instituut, Londen, Verenigd Koninkrijk) met wie wij samenwerken om het begrip van dit belangrijke cellulaire proces te bewerkstelligen.

Nynke Dekker haalde haar bachelor aan Yale University en haar master in Leiden. Ze promoveerde aan Harvard University. Hierna was ze postdoc aan de Ecole Normale Supérieure in Parijs. In 2002 ging ze naar Delft, waar ze inmiddels hoogleraar is. n.h.dekker@tudelft.nl