

Fysische impact op ontdekkingen in de biomoleculaire wereld

Bionanowetenschapper Nynke Dekker van de TU Delft zal op FYSICA 2014 op 1 april in Leiden een plenaire lezing houden over de ontwikkeling van het begrip van biologische processen. Als opwarmertje licht zij hier een tipje van de sluier op. Nynke Dekker

84

Als fysisch met een interesse in biologische systemen ga ik hier een verhaal vertellen over de wereld van biologische moleculen. Recente ontwikkelingen in de biologie hebben het moleculaire niveau binnen bereik gebracht, waardoor het nu mogelijk is om de dynamica van een enkel molecuul te bestuderen, zelfs in een levende cel. De ontwikkelingen in deze richting gaan heel erg snel, mede omdat vele disciplines eraan bijdragen: naast de biologie spelen ook de natuurkunde, de chemie, de biotechnologie en de biomedische

wetenschappen een grote rol. In dit artikel ga ik in op een aantal recente ontwikkelingen in de (bio)fysica en hun impact op ons begrip van biologische processen.

Biologie en fysica

Het is allereerst interessant om de werkwijze van fysici te belichten om te zien hoe deze zich verhoudt tot die van biologen. We weten allen dat fysici een complex probleem het liefst terugbrengen tot of opdelen in simpele elementen die ze wellicht wel kunnen begrijpen. Door dit te doen, hopen ze eerst de kernparameters van een systeem en vervolgens de achterliggende kernprincipes of elementaire wetten bloot te leggen. Maar ook in de biologie probeert men op basis van simpelere systemen meer algemene wetten te achterhalen. Het voorbeeld van Darwin en de ontwikkeling van de evolutietheorie is illustratief: pas na bestudering van een veel simpeler, geïsoleerd systeem – dat van de vinken op de Galápagoseilanden – was het mogelijk om tot een algemene theorie met veel bredere impact te komen.

Voorheen was een groot verschil tussen de biologie en de fysica het feit dat de fysica veel makkelijker

ideeën kon testen: de systemen waren uiteraard niet levend en konden van de grond af opgebouwd worden, uit elkaar gehaald worden en parameters konden worden gewijzigd. Dat maakte het wel makkelijker om de kernprincipes te achterhalen. Maar met de voortschrijding van de moleculaire en de cellulaire biologie is dit verschil een heel stuk kleiner geworden: het kunnen isoleren, zuiveren en hanteren van biologisch materiaal zoals cellen, maar ook de moleculen daarbinnen zoals DNA en eiwitten, is een ontwikkeling die zich de laatste vijftig tot zestig jaar heeft voltrokken en die een minder beschrijvende, meer kwantitatieve aanpak van de biologie mogelijk heeft gemaakt. Het zijn dergelijke ontwikkelingen die vele aanknopingspunten met de fysica, chemie, gezondheidszorg en dergelijke tot stand hebben gebracht en daarnaast ook hebben geleid tot heel nieuwe vakgebieden zoals de biotechnologie, de biofysica, de bio-informatica en andere.

Het aantal aanknopingspunten tussen de biologie op moleculaire en cellulaire schaal en de fysica is des te groter gegeven het feit dat natuurkundigen uitermate kundig zijn geworden in het maken en meten van kleine objecten. Voorbeelden hiervan zijn de ontwik-

Nynke Dekker studeerde natuurkunde en toegepaste wiskunde in Yale (Verenigde Staten) en Leiden, gevolgd door een promotie in de atomaire fysica op Harvard. Vervolgens stapte zij over op de biofysica middels een postdoc aan het Ecole Normale Supérieure te Parijs. Sinds 2002 heeft zij haar eigen onderzoeksgroep aan de TU Delft, waar zij in 2008 tot hoogleraar werd benoemd. Haar onderzoek richt zich op de moleculaire interacties tussen DNA, RNA en eiwitten, zowel binnen als buiten de cellulaire omgeving.



N.H.Dekker@tudelft.nl

kelingen in de micro-elektronica en in de nanotechnologie. Daardoor is er een vruchtbaar samenwerkingsterrein ontstaan dat te maken heeft met het hanteren en manipuleren van en meten aan individuele biologische moleculen (zie het kader *Voorbeeld van afmetingen van biologische moleculen* voor een beschrijving van typische afmetingen) waarop door natuurkundigen en biologen samengewerkt wordt.

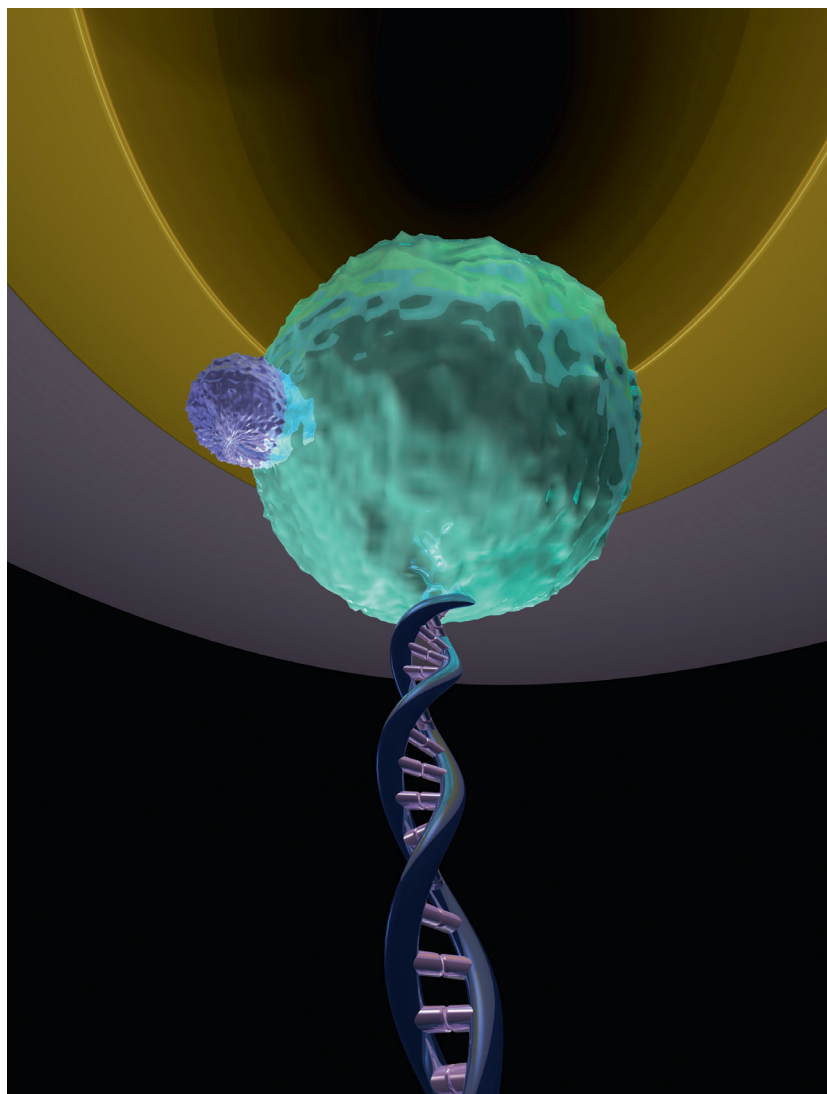
Individuele moleculen

Waarom is het interessant om juist naar individuele moleculen te kijken? Hiervoor is het belangrijk om te weten dat in een cel veel soorten moleculen aanwezig zijn, maar dat er van bepaalde soorten moleculen slechts enkele exemplaren aanwezig zijn. Het specifieke gedrag van een enkel molecuul kan daarom verregaande consequenties voor de cel hebben. Om een goed beeld te krijgen van de dynamica van bio-moleculaire processen en tot meer inzicht te komen dan mogelijk is bij het meten van alleen het gemiddelde product van een interactie, is het vereist om op 'enkelmolecuulniveau' te meten. Het lastige hiervan is natuurlijk dat het molecuul een meetbaar signaal moet afgeven – in vloeistof uiteraard, want dat kenmerkt de biologische omgeving. Aan de totstandkoming hiervan hebben fysici bijgedragen vanuit hun expertise in optica of elektronica. Zo is het bijvoorbeeld mogelijk een laser op een biologisch molecuul te schijnen en te kijken hoeveel licht het molecuul opneemt, of om stroom door een opening in een molecuul (bijvoorbeeld een membraaneiwit) te sturen en vervolgens de fluctuaties hierin te meten. Ook is het sinds het begin van de jaren negentig mogelijk om met de atoomkrachtmicroscop of zogeheten optische of magnetische pincetten een individueel molecuul op te pakken om er aan te trekken of draaien, onder andere om de mechanische eigenschappen daarvan in kaart te brengen [1].

Een voorbeeld van een biologisch molecuul dat veel bekeken is met 'enkelmolecuultechnieken' is DNA, het molecuul waarin de genetische informatie van cellulair leven ligt opgeslagen. Zoals bekend bevat DNA een dubbele helixstructuur: twee lange strengen, die met basen steeds per paar in elkaar grijpen, draaien om elkaar heen (zie kader *Voorbeeld van afmetingen van*

Voorbeeld van afmetingen van biologische moleculen.

Een menselijke cel heeft een typische diameter van tientallen micrometers; het DNA dat in de kern van de cel ligt opgeslagen is nog veel kleiner. Het molecuul zelf heeft een diameter van ongeveer 2 nanometer en de afstand tussen de bouwstenen van het DNA (de baseparen) is ongeveer 0,3 nm. Toch is het DNA ook heel lang: elke menselijke cel bezit DNA dat bestaat uit 3 miljard traptreden van genetische informatie, zoveel is er nodig om ons te beschrijven... alhoewel dit getal alleen niet alles zegt, want het aantal baseparen van een ui is nog altijd zes keer zo veel! De totale lengte hier van is ongeveer 1 m, dus om in de celkern met een diameter van ongeveer 10-20 micrometer te passen moet het DNA in hoge mate opgekruld worden.



Figuur 1 Artistieke weergave van het magnetische-koppelpincet. Het kleine (paarse) bolletje aan het grotere (blauw-groene) magnetische bolletje vereenvoudigt hoekdetectie, waardoor de meting van koppel in het DNA mogelijk wordt.

biologische moleculen). Met behulp van de magnetische-pincettechniek en varianten daarop is het mogelijk om de mechanische eigenschappen van DNA in kaart te brengen. Hiervoor bevestigen we een stukje DNA tus-

sen een glasplaatje en een klein (~1 micrometer) magnetisch bolletje. Het magnetische bolletje wordt vervolgens beïnvloed door een magnetisch veld, dat zowel kracht als torsie op het bolletje kan uitoefenen. Dit laatste

wordt mogelijk gemaakt door het feit dat het magnetische veld de oriëntatie van de bolletjes in het vlak loodrecht op het DNA vastlegt: door draaiing van het magneetveld draait het magnetische bolletje en vervolgens het DNA [2]. Een dergelijke controle over het DNA-molecuul maakt het ook mogelijk om naar de wisselwerkingen tussen eiwitten en DNA te kijken, eenvoudig meetbaar in realtime als deze de lengte of de stijfheid van het DNA veranderen. Zo is het met deze techniek bijvoorbeeld mogelijk om de dynamica van topoisomerases, eiwitten die ervoor zorgen dat DNA niet in de knoop raakt, in kaart te brengen en daarmee het onderliggende mechanisme van hun werking te ontrafelen [3].

Nieuwe ontwikkelingen

Recentelijk heeft mijn groep ook uitbreidingen van de magnetische-pincettechniek ontwikkeld die nieuwe toepassingen mogelijk maken. Met de bestaande pincetten is het zoals gezegd mogelijk om te trekken en te draaien aan een enkel molecuul, maar daarmee kun je de draaiing en daarmee het koppel op het molecuul nog niet meten, terwijl dit wel belangrijk is. Wanneer moleculaire motoren het DNA ontrafelen om de baseparen uit te lezen, zoals gebruikelijk in het kopiëren of repareren van DNA, draait het DNA op een vergelijkbare manier als wanneer men een gevlochten touw ontrafelt, waardoor torsiekrachten in het DNA ontstaan. Het is belangrijk om te weten hoe het DNA hierop reageert. Met eenvoudige aanpassingen aan de conventionele magnetische pincet, zoals het modificeren van het magneetveld en de introductie van hoekdetectie, is het mogelijk om een zogeheten magnetisch torsiepinnet te ontwikkelen [4]. Met dit nieuwe pincet hebben wij allereerst onderzocht hoe DNA op torsiekracht reageert, zowel in de af- als aanwezigheid van gebonden eiwitten [4]. En vervolgens hebben wij ook dezelfde metingen verricht op RNA, een chemisch gereleerd molecuul dat ook voor de cel erg belangrijk is. Met overigens verrassende resultaten, want ondanks hun grote chemische verwantschap gedragen deze twee moleculen zich toch niet op dezelfde manier. Met overige fysische aanpassingen op het meetontwerp hebben wij het magneti-

sche pincet ook de mogelijkheid gegeven om veranderingen in de draaiing (twist) van DNA op enkelmoleculniveau te meten. Wij noemen dit nieuwe instrument een magnetisch pincet met vrije omwenteling (*freely-orbiting magnetic tweezers*) [5]. Zeer interessant is dat we hierdoor in realtime veranderingen in de draaiingsdichtheid vastleggen die onder andere plaatsvinden wanneer reparatie-eiwitten of compactie-eiwitten (zie kader *Voorbeeld van afmetingen van biologische moleculen*) aan DNA binden. Dit geeft nieuw inzicht in de dynamica van interacties tussen DNA en eiwit, hetgeen van belang is voor het begrip van fundamentele biologische processen in cellen.

Moleculen in levende cellen

Terwijl de dynamica van biologische processen het meest nauwkeurig kan worden bekeken met gezuiverde componenten en deze aanpak nog veel inzichten zal verschaffen, is het begrip van enkele moleculen in een levende cel ook van groot belang. Uiteindelijk is dit de 'natuurlijke' omgeving van biologische moleculen en is het belangrijk om de wisselwerkingen in dit medium te begrijpen. Uiteraard is dat veel complexer, omdat het aantal spelers veel groter is. Niet alle technieken die goed werken met gezuiverde componenten kunnen direct overgezet worden en voorlopig is het gebruik van fluorescentiemicroscopie nog het meest vruchtbaar. Kenmerkend voor deze techniek is dat een fluorescerend label bevestigd wordt aan het biologische molecuul dat men wil bestuderen. Het volgen van de positie van het fluorescerende label in de tijd geeft vervolgens een beeld van de ruimtelijke dynamica van de biologische moleculen. Met name in bacteriële cellen is deze techniek ook toepasbaar op individuele moleculen [6]. Zo is het bijvoorbeeld mogelijk om de dynamica van het DNA-kopieerproces, dat uitgevoerd dient te worden voordat celdeling plaats kan vinden, in de tijd te volgen. Betrokken bij dit kopieerproces zijn twee eiwitcomplexen, en hoe zij zich gedragen is van groot belang voor de overlevingskansen van de cel. Met andere woorden, het gedrag van een individueel eiwitcomplex is hier bepalend voor de ontwikkeling van de cel.

Het biofysische onderzoek dat hier beschreven is, is met name funda-

menteel van aard. Toch zijn er ook talloze toepassingen, zowel van de technologische ontwikkelingen die het onderzoek mogelijk maken als van de wetenschappelijke uitkomsten van het onderzoek. Een voorbeeld van een techniekontwikkeling die een grote impact heeft gehad is de detectie van individuele bases van het DNA met behulp van fluorescentietechnieken, hetgeen veel vervolg heeft gekregen in de ontwikkeling van DNA-sequenzen. Wetenschappelijk inzicht in de dynamica van eiwitten die het DNA uitlezen (polymerases) of kopiëren (replicases) of uit de knoop halen (topoisomerases) vindt uiteindelijk zijn toepassingen in de ontwikkeling van geneesmiddelen zoals antibiotica of kankerremmers.

Dankwoord

Ik wil alle leden van mijn onderzoeksgroep en overige collega's van de TU Delft bedanken die bijgedragen hebben aan dit onderzoek, alsmede de vele biologen met wie wij samengewerkt hebben.

Referenties

- 1 K.C. Neuman en A. Nagy, *Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy*. *Nature methods*, 5, 491-505 (2008).
- 2 T.R. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon en V. Croquette, *The elasticity of a single supercoiled DNA molecule*. *Science*, 271, 1835-1837 (1996).
- 3 D.A. Koster, V. Croquette, C. Dekker, S. Shuman en N.H. Dekker, *Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB*. *Nature*, 434, 671-674 (2005).
- 4 J. Lipfert, J.W. Kerssemakers, T. Jager en N.H. Dekker, *Magnetic torque tweezers: measuring torsional stiffness in DNA and RecA-DNA filaments*. *Nature methods*, 7, 977-980 (2010).
- 5 J. Lipfert, M. Wiggan, J.W. Kerssemakers, F. Pedaci en N.H. Dekker, *Freely orbiting magnetic tweezers to directly monitor changes in the twist of nucleic acids*. *Nature communications*, 2, 439 (2011).
- 6 X.S. Xie, P.J. Choi, G.W. Li, N.K. Lee en G. Lia, *Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells*. *Annual review of biophysics*, 37, 417-444 (2008).