Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/89134

File ID	89134
Filename	Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Visualizing microtubule dynamics and membrane trafficking in live and dividing plant cells
Author	P.B. Dhonukshe
Faculty	Faculty of Science
Year	2005
Pages	183
ISBN	9090189831

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/165004

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Samenvatting

Een uitdagende vraag in de wereld van de biologie is hoe verschillende componenten van de cel zijn georganiseerd in ruimte en tijd om hun diverse functies uit te kunnen voeren. In het hart van de plantencel zijn microtubulinen aanwezig, die nodig zijn voor de opbouw van weefsel en organen. Door de intracellulaire opbouw kan de cel met zijn buitenwereld communiceren doordat het zijn membranen aanpast. In de afgelopen tientallen jaren hebben we een glimp te zien gekregen van deze twee processen door middel van allerlei statische beelden van gefixeerde cellen. Helaas kregen we hierdoor geen volledig beeld te zien. Wel konden we zien hoe cellen delen. De preprofase band markeert de vlakken van de celdeling tijdens het begin van de mitose (celdeling) door middel van het creëren van geheugen, waarbij duidelijk wordt welk materiaal nodig is om de lijnen van de celdeling te verstevigen.

In dit proefschrift is eerst gekeken door welk mechanisme de microtubulaire organisatie wordt gedreven om tot de preprofase band (PPB) te komen. Om de reorganisatie beter te kunnen begrijpen is het nodig de fysieke parameters te leren kennen. Om het proces te visualiseren en te kwantificeren is gebruik gemaakt van GFP-reporter technologie gekoppeld aan een microscoop, dat ons in staat stelt de cel levend te bekijken. Met deze zogenoemde confocale microscopie kunnen continu delende plantencellen beter bekeken worden en is dynamische instabiliteit van de microtubulinen voor de eerste keer gekwantificeerd. Hiervoor is gebruik gemaakt van drie verschillende markers: GFP-α tubulin, GFP-MAP4 and YFP-CLIP170. Net zoals in dierlijke cellen, herkende de YFP-CLIP170 het plus-uiteinde van de microtubulinen. Dit suggereert dat de architectuur van het plus-uiteinde van de microtubulinen behouden is. Hierbij hebben we gezien dat de interfase van de plant microtubulinen met 5 μm/min groeit en met 20 μm/min krimpt en daarbij een 'catastrofe-' en herstelfrequentie liet zien van respectievelijk 0.02 en 0.08 keren per seconde. Dit is veel sneller dan in dierlijke cellen. Opmerkelijk genoeg verdubbelden de groei- en krimpsnelheden zich tijdens de PPB vorming, en bleef de 'catastrofe' en herstelfrequentie gelijk, waardoor het nettoresultaat is dat de microtubulinen korter en dynamischer worden. Aan de hand van dit onderzoek, en de kwantificatie ervan met behulp van twee- en drie dimensionale microscopie met inbegrepen de meting van tijd (3D en 4D microscopie) hebben we een goed inzicht gekregen in het mechanisme van de PPB vorming.

Deze interessante bevindingen brachten ons ertoe om uit te zoeken of plantencellen nog meer dezelfde eiwitten gemeen hebben met dierlijke cellen. We vonden twee

kandidaten in de Arabidopsis, namelijk: AtTFCB and AtTFCE, die het CAP-Gly-gedeelte bevatten. Dit zijn co-factoren die ervoor zorgen dat de tubulinen goed kunnen buigen en daarnaast zijn ze belangrijk voor de biogenese van microtubulinen. In afwezigheid van deze factoren ondergaat de plant drastische veranderingen. Door een overexpressie van de AtTFCB ging de protoplast bijna dood maar kon het gered worden door overexpressie van α-tubuline. Dit werd aangetoond met een microscoop die gebruik maakt van fluorescentie, resonantie en energie-overdracht (FRET). Deze bevinding houdt in dat microtubulinen ook α-tubuline bevatten. Bovendien gaf het aan dat AtTFCB in α-tubuline in staat is om compartimenten te vormen en dat het erbij toedraagt om de α/β monomeren in balans te houden.

Het signaleren van de microtubulaire reorganisatie is een nieuw onderzoeksgebied. De isolatie van het eiwit p90 in de plant, dat erg veel lijkt op PLD (fosfolipase D) met betrekking tot de localisatie van het membraan en de microtubulinen, geeft ons een kandidaat voor een microtubulaire hechting aan het plasma-membraan. PLDs zijn enzymen die betrokken zijn bij fosfolipide metabolisme en ook bij de signaaltransductie. We hebben de relatie tussen PLD en de microtubulinen onderzocht met behulp van GFP-MAP4 (een microtubulaire marker) die getransformeerd zijn door een BY2-celsysteem. Door het activeren van PLD kwamen de corticale microtubulinen binnen korte tijd (15-30 min) vrij. Daarnaast waren de microtubulinen van de PPB en fragmoplast ook beïnvloed. Deze bevindingen suggereren een mechanisme waardoor activatie van PLD de microtubulinen uitdaagt om zich te reorganiseren in de plantencellen. Het gaf ook een inzicht hoe deze moleculen de celvorm kunnen veranderen door de controle van de microtubulinen die op hun beurt de cellulose-microfibilinen beïnvloeden.

Tijdens het onderzoek naar de PLD-microtubuline interactie hebben we de stabiliteit van het plasma-membraan op aanwezigheid van PLD activatoren gecontroleerd waarbij we gebruik maakten van de endocytose marker FM4-64. FM4-64 werd gebruikt om de celplaat te vormen. Het is algemeen aangenomen dat de vesicels ('blaasjes') van het Golgi apparaat de enige bron is voor het materiaal dat gebruikt wordt bij het opbouwen van de celplaat. Onze bevinding van de FM4-64 geeft een deelname van endocytose aan in het complexe proces van celplaatvorming. Door gebruik te maken van drie kleuren hebben we het Golgi apparaat en de endosomen tegelijkertijd gevisualiseerd tijdens de cytokinese (laatste stap in de celdeling) en de interactie hiertussen gemeten. Deze analyse samen met de immunologische, farmacologische en genetische analyse lieten een snellere toelevering zien van materiaal van het plasma-membraan en de celwand voor de celplaatvorming. Naast deze toelevering van het materiaal van buitenaf, zien we ook indicaties van toelevering van materiaal van binnenuit, in de vorm van voorgevormd

plasma-membraan en celwand materiaal, dat nodig is voor de vorming van de celplaat gedurende de celdeling. Dit was bevestigd door FRAP analyses. Het lijkt er op dat dit proces, de endocytose, een soort lijm is voor vorming van de celplaat. Daarnaast kunnen we hieruit afleiden dat alle cellen een deel van het membraan van de ouderlijke cel erven. Ook laat het zien waarom we niet in staat zijn geweest om de synthese van het plasma-membraan door alléén de vesieels van het Golgi apparaat te laten zien.

In de interfase van de plantencel zitten de microtubulinen alleen in de buurt van het plasma-membraan maar bij het begin van de mitose komen ze ook in het cytoplasma voor. Om de polariteit van de endoplasmatische microtubulinen te onderzoeken, hebben we de dynamische aspecten van GFP-AtEB1gelabelde microtubulaire plus-uiteinden in de mitotische cellen. Om het proces van de endocytose verder te onderzoeken, hebben we FM4-64 in de analyses opgenomen. Onze resultaten lieten zien dat de plus-uiteinden ontstonden aan het oppervlak van de kern en bij de PPB kanten samenkwamen met de lokale endocytose. Tijdens de PPB vorming vormden de endosomen-band met de microtubulinen. Dit gebied blijft behouden tijdens de 'spindle' (een bepaalde fase van de celdeling). Dit kon geobserveerd worden vanwege het stoppen van de vacuole structuur. Tijdens de cytokinese kwamen de plus-uiteinden van de EMTs vanuit de spindle naar de cortex. Dit viel samen met de celplaat-navigatie en de tiltcorrectie. Aan het einde van de telofase vielen deze EMT plus-uiteinden weer samen met de endosomen die voorheen aan de PPB gekoppeld waren. Auxin efflux inhibitor NPA, welke interfereert met een gepolariseerde lokalisatie van PIN1, veroorzaakte abnormale PPBs en verschoof het vlak van de celdeling. Deze resultaten suggereren een onverwachte link tussen endoplasmatische microtubulaire plus-uiteinden en de polariteitendocytose betrokken bij de regulatie van celdeling.

Ik wil in het kort de resultaten van dit proefschrift hieronder evalueren. Aan het begin van dit onderzoek werd de plant microtubuline onderschat door gebrek aan informatie van de individuele dynamiek van microtubulinen. Daarnaast was het ook niet mogelijk om de mitotische plantencellen en het membraantransport te visualiseren. De GFP-reporter technologie heeft het mogelijk gemaakt om molekulen te visualiseren, te volgen en de gebeurtenissen te kwantificeren. Daarom hebben we ons in dit project toegewijd aan het visualiseren van de dynamische microtubulinen en het membraantransport in levende en delende plantencellen. Dit proefschrift geeft een schat aan informatie hierover. We komen nu dichterbij tot antwoorden van mysteries die lange tijd onbeantwoord zijn gebleven in de plantenwereld, namelijk: i) welk mechanisme drijft de vorming van PPB, ii) wat voor geheugen creëert PPB dat de celvorming krijgt, iii) hoe de aan het plasma-membraan gehechte microtubulinen signalen ontvangen en reorganiseren en iv) welk membraantransport-route deelneemt aan de opbouw van de

celplaat. Dit proefschrift heeft een kamer geopend, waarvan nog vele deuren gesloten zijn. Toekomstige experimenten om deze deuren te openen zijn a) kwantificatie van microtubulinen-dynamiek in overexpressie en achtergrond van de mutant dat bepaalde eigenschappen mist, b) een PLD-activator gebaseerde mutant en een GFP-gebaseerde reporter die gekoppeld is aan het fosfolopide metabolisme, c) het testen van de relevantie van de analyse van endocytose in cytokinetische mutanten, en d) analyse van de PIN polariteit in relatie tot EMT en celdeling.