

Het gebruik van biologische motortjes in de nanotechnologie kan leiden tot nieuwe manieren van transport [1]. Door kinesine-eiwitten uit de cel vast te zetten in nanokanaaltjes kunnen we actief microscopisch kleine eiwitbuisjes, *microtubules*, door de kanaaltjes transporteren. Met een elektrische spanning kunnen we bovendien controleren welke kant individuele microtubules opgestuurd worden bij een splitsing. Hiermee hebben we een ‘verkeerscontrolesysteem’ gebouwd voor biomotoren in nanotechnologie. *Martin van den Heuvel, Martijn de Graaff en Cees Dekker*

Op afstand bestuurbare eiwit

BIOLOGISCHE MOTOREN

Een biologische cel is net een complex fabrieksterrein. De celkern bevat de genetische informatie in de vorm van DNA, dat alle processen aanstuurt. Daarnaast zijn er energiecentrales, die via een ingewikkeld proces opgenomen voedsel omzetten in ATP, de brandstofmoleculen van de cel. Er zijn eiwitfabrieken te vinden, structuren

die, met de informatie opgeslagen in het DNA, andere eiwitmoleculen opbouwen die vervolgens weer hun eigen taak gaan uitvoeren in de cel. En voor het transport van stoffen binnen de cel zijn er kinesinomotortjes die met een vrachtje over een netwerk van eiwitbuisjes – *microtubules* – kunnen lopen. Kinesine is een motoreiwit dat bestaat uit twee kleine ‘voetjes’ waarmee het in

m.g.l.vandenheuvel@tudelft.nl

dekker@mb.tn.tudelft.nl

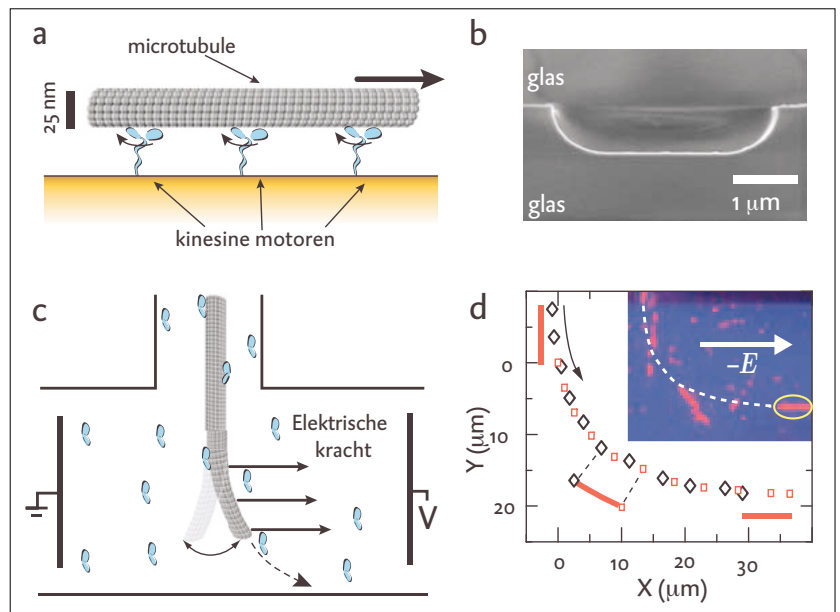


martijndegraaff@gmail.com

Martin van den Heuvel (1978) studeerde technische natuurkunde aan de Universiteit Twente. In 2002 studeerde hij cum laude af in de halfgeleiderfysica bij Philips Research. Sinds 2003 doet hij een promotieonderzoek bij de sectie Moleculaire Biofysica van het Kavli Instituut voor Nanoscience aan de TU Delft onder begeleiding van Cees Dekker.

Martijn de Graaff (1980) studeerde technische natuurkunde aan de TU Delft, waar hij in november 2005 afstudeerde op het sturen van microtubules bij de sectie Moleculaire Biofysica. Daarna heeft hij een half jaar als toegevoegd onderzoeker aan datzelfde onderwerp gewerkt. Momenteel volgt hij een stage bij de Sony Material Laboratoria in Japan.

Cees Dekker studeerde experimentele natuurkunde in Utrecht waar hij in 1988 ook promoveerde op een onderwerp in de vaste-stoffysica. Na posities in Utrecht en Delft werd hij in 1999 hoogleraar moleculaire biofysica bij de TU Delft waar hij dit jaar benoemd werd als universiteitshoogleraar. Dekkers groep werkt op het grensvlak van nanotechnologie en biologie.



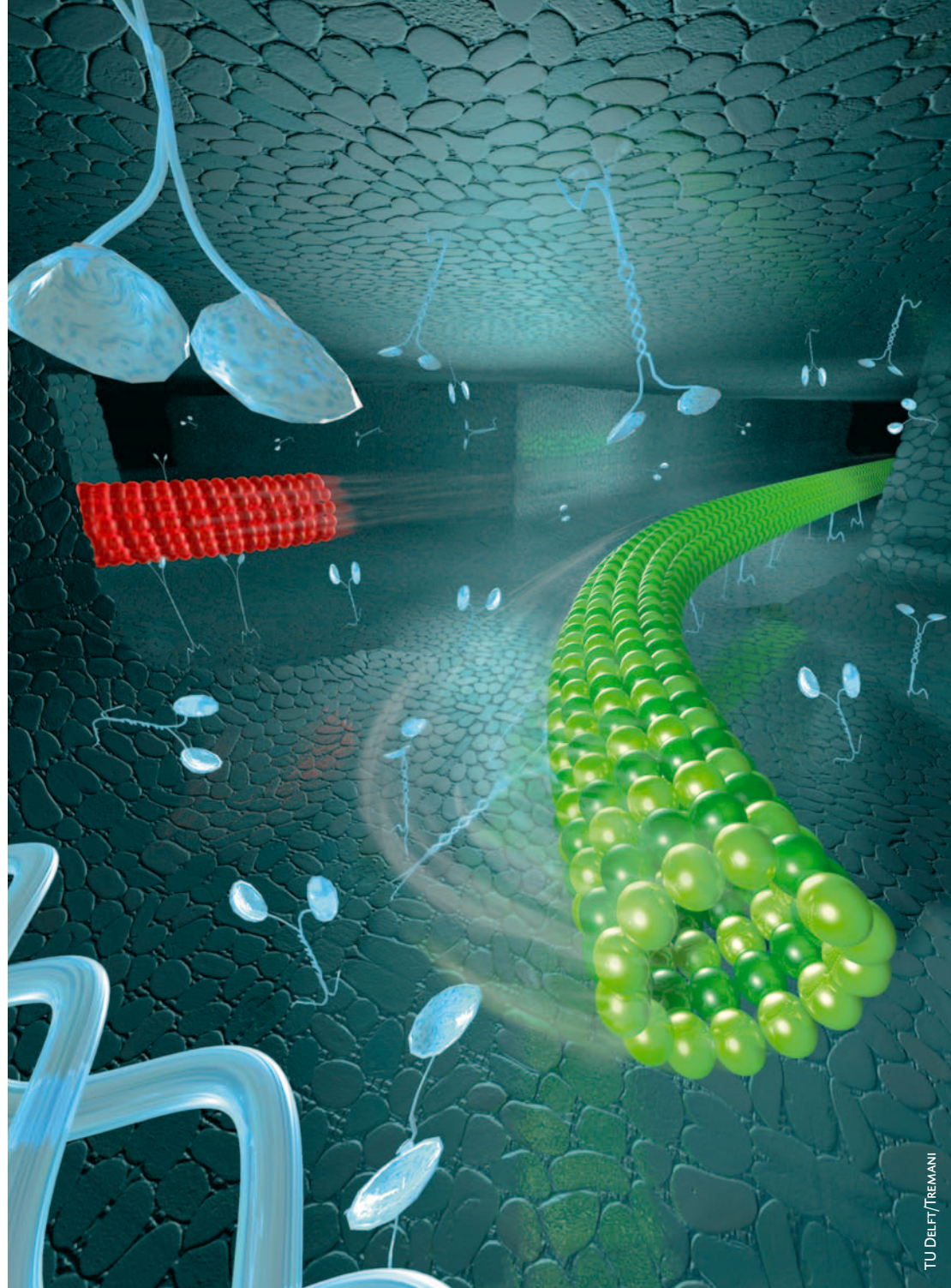
Figuur 1

(a) Kinesinomotoren op een oppervlak duwen een microtubule-filament voort, net zoals bij *crowdsurfen*. (b) Een elektronenmicroscopieopname van een doorsnede van een nanokanaal. (c) Een ‘stuurkanaal’ met daarin een elektrisch veld loodrecht op het kanaal waarin de microtubules voortbewogen worden. De elektrische kracht op de negatief geladen microtubule trekt de zoekende tip naar rechts. (d) Bij elk stapje van het filament wordt de tip iets afgebogen, net zolang totdat de microtubule parallel aan het elektrisch veld ligt.

buisjes

stapjes van 8 nm over een microtubule kan lopen [2]. Het kinesine gebruikt hierbij de energie uit ATP. Aan de twee voetjes zit een staart waaraan de vracht bevestigd is. De microtubules zijn zeer stevige buisvormige eiwitten die zich door de cel uitstrekken en deze stevigheid verschaffen, net als een skelet. Het kinesinemotortje dat wij gebruiken kan in één richting over zo'n microtubule lopen.

Wij hebben geprobeerd dit motortransportsysteem te gebruiken in een nanotech-omgeving. Je kunt je voorstellen dat het hiermee mogelijk wordt om bijvoorbeeld op een gecontroleerde manier individuele moleculen over een chip te laten bewegen, of om kleine bewegende onderdelen aan te drijven. In onze experimenten gebruiken we dit systeem in de omgekeerde geometrie (figuur 1a). De kinesinemotortjes zetten we ondersteboven in grote hoeveelheden op een oppervlak vast. De microtubules kunnen we dan, in lengtes van ongeveer 15 micrometer, over het tapijt van motoren laten voortbewegen, analoog aan wat er gebeurt bij *crowdsurfen*. Onder de microscoop kunnen we de beweging van de microtubules volgen, omdat deze fluorescent gemaakt zijn. Om de eiwitten actief te houden, is het noodzakelijk de experimenten te laten plaatsvinden onder soortgelijke omstandigheden als in de cel, dus in gebufferd water op een pH



TU DELFT/TREMANI

van 7, met alle noodzakelijke componenten als de brandstof ATP en opgeloste zouten.

BIOMOTOREN IN NANOTECHNOLOGIE

Het gebruik van motoren in technologie vereist allereerst dat je controle kunt uitoefenen op de plaatsing van de motoren. Tot nu toe gebeurde dit altijd door structuren te fabriceren waarbij de kinesine werd geplaatst op de bodem van open kanalen die in het oppervlak zijn geëtst. Het probleem van deze open structuren is dat microtubules kunnen ontsporen. Ten tweede is het zeer gewenst om microtubules te kunnen sturen. Tot nu toe is er echter nog geen manier gevonden om in deze

open structuren individuele microtubules aan te kunnen sturen.

Door het biologische transportsysteem te integreren in afgesloten nanokanalen (figuur 1b) konden we beide problemen in één klap oplossen [3]. De microtubules zijn gevangen in de kanalen, die het bovendien mogelijk maken om lokaal een sterk elektrisch veld aan te leggen. Dit kan door met behulp van reservoirs met elektroden een elektrisch veld te induceren in een apart 'stuurkanaal', dat loodrecht staat op het kanaal waarin de microtubules getransporteerd worden (figuur 1c). Het elektrisch veld oefent zo alleen een kracht uit op de microtubules die zich in het 'stuurkanaal' bevinden.

11

Wanneer we zo een elektrische kracht uitoefenen loodrecht op de voortbewegingsrichting van de microtubule, kunnen we controleren welk pad de microtubule zal nemen. Omdat de microtubules worden voortgeduwd door de motoren op de kanaalwanden, zal de voorkant van de microtubule bijna altijd los van het oppervlak zijn en fluc-

VERKEERSCONTROLESYSTEEM

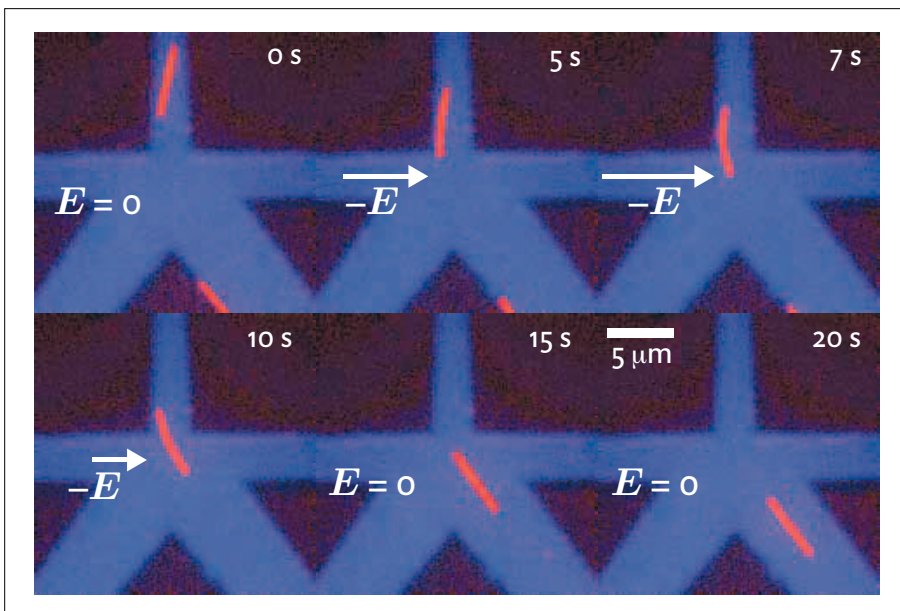
Dit principe van het trekken aan de vrije tip kunnen we gebruiken om microtubules in elke gewenste richting te sturen. Om dit te laten zien, maakten we een Y-splitsing met loodrecht daarop weer een 'stuurkanaal'. Door nu de richting van het elektrisch veld te kiezen, kunnen we de microtubule de ge-

bules rechtsaf gestuurd worden, en rode microtubules linksaf (figuur 3a). Het voorbeeld in figuur 3b laat zien dat we dit vrij precies kunnen doen: eerst duwen we een groene microtubule naar rechts, en direct daarna een rode naar links. Na afloop van het experiment blijkt dat in het linker reservoir voornamelijk rode microtubules terechtgekomen zijn, en in het rechter reservoir vooral groene microtubules (figuur 3a), precies zoals bedoeld. Omdat beide kleuren microtubules negatief geladen zijn, laten we hiermee zien dat we controle hebben over de richting van individuele microtubules. We hebben een soort verkeerscontrolesysteem gemaakt voor biomoleculen.

INTERESSANTE FYSICA

Als we nu zouden weten hoe groot de kracht is die we op de microtubules uitoefenen, en we meten daarnaast hoe sterk de microtubules afbuigen onder invloed van die kracht, dan kunnen we de stijfheid van de microtubule berekenen. Om de grootte van deze elektrische kracht te bepalen, moesten we de elektroforetische mobiliteit van de microtubules meten. Elektroforese is de beweging van geladen deeltjes onder invloed van een elektrisch veld en de mobiliteit is gedefinieerd als de verhouding tussen de snelheid en het elektrisch veld.

Voor de mobiliteitsmeting vulden we lange, rechte nanokanalen met vloeistof en microtubules, en lieten we de kinesinomotoren op de wanden weg. Vervolgens legden we een elektrisch veld aan in het kanaal. Onder de microscoop konden we vervolgens de elektroforetische snelheid van microtubules, die in deze meting vrij in de kanalen zweven, volgen (figuur 4a). Het unieke van de kanalen is dat we de snelheid en oriëntatie van individuele microtubules konden meten. Er bleek een verrassend effect op te treden. De microtubules bewogen niet



Figuur 2

Tijdsopname van het sturen van een microtubule die een Y-splitsing nadert. Op $t = 5$ s wordt het elektrische veld in het stuurkanaal aangezet, waarbij de richting van de elektrische kracht naar rechts gericht is. Op $t = 15$ s is het veld uitgezet en heeft de microtubule de rechter afslag genomen.

tueren door de warmtebeweging, totdat het gebonden wordt aan een nieuwe kinesinomotor. Door tijdens dit zoekproces naar een volgende motor met een elektrisch veld aan de negatief geladen microtubule te trekken, kunnen we de richting van dit zoekproces sturen (figuur 1c). Door dit continu te blijven doen, zal de buiging van het vrije uiteinde van de microtubule uiteindelijk resulteren in het afbuigen van de richting van het hele filament, net zo lang totdat de microtubule parallel aan het elektrische veld beweegt (figuur 1d).

wenste aftakking laten nemen (figuur 2). Hiermee hebben wij aangetoond dat we elektrische controle hebben over de richting die een enkele microtubule kiest op een splitsing. Om dit te demonstreren hebben we op moleculaire schaal een sorteerexperiment uitgevoerd, met twee verschillende gelabelde microtubules, rode en groene, die we kunnen volgen met een kleurencamera. Wanneer dit mengsel op de splitsing afkomt, kunnen we afhankelijk van de kleur van de microtubule, de richting van het elektrisch veld steeds zo kiezen, dat groene microtu-

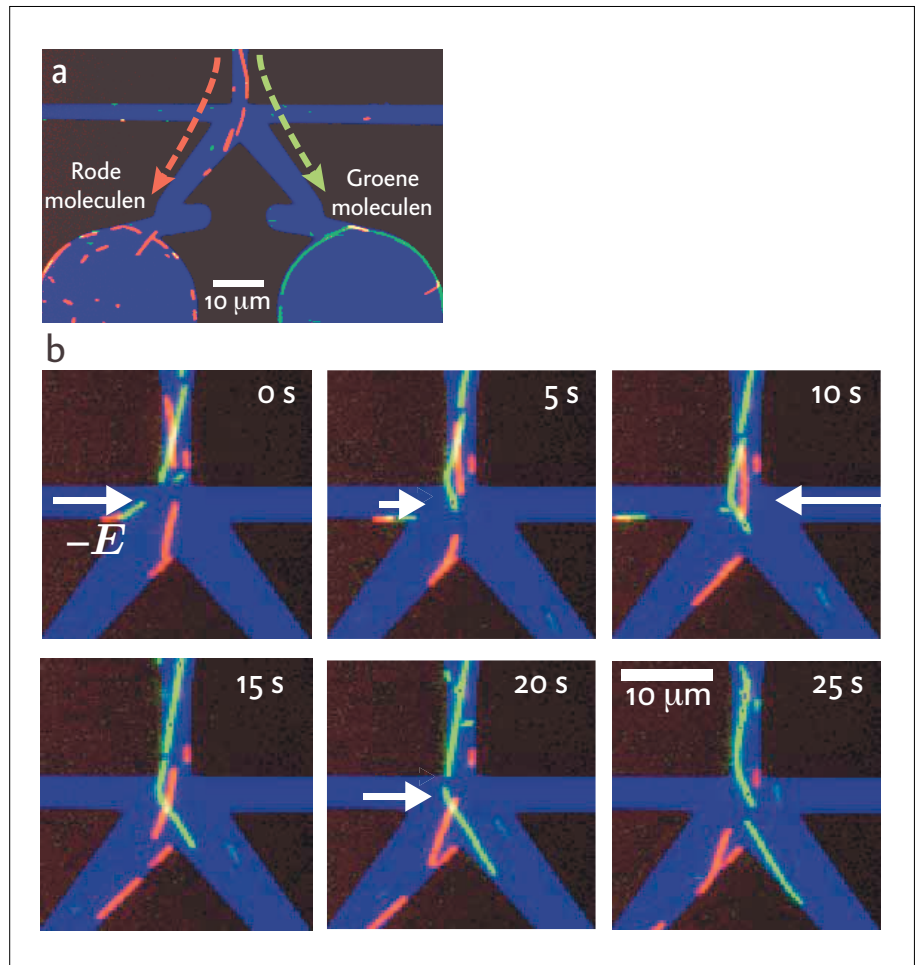
noodzakelijk parallel aan het elektrisch veld, zoals je zou verwachten, maar ook loodrecht op het elektrisch veld (figuur 4a). De reden hiervoor is dat de mobiliteit voor een cilindervormig colloïdaal deeltje, zoals een microtubule, afhankelijk is van zijn oriëntatie [4]. Het deeltje zal sneller bewegen wanneer het veld parallel aan de lange as staat, dan wanneer het veld loodrecht op de cilinder staat (figuur 4b). Hierdoor zullen de microtubules die een oriëntatie tussen deze twee uitersten in hebben, zoals in figuur 4c, een snelheid krijgen die een klein beetje méér in de richting van de lange as ligt. Met andere woorden, het deeltje beweegt niet in de richting van de aangelegde kracht. Dit effect was reeds lang geleden voorspeld [4], maar nog niet eerder gemeten. Doordat onze kanalen zo klein zijn, konden we de elektroforese van individuele microtubules waarnemen en daarmee direct de voorspellingen uit de theorie testen.

Uit de elektroforesemetingen konden we dus direct de mobiliteit van de microtubules voor de twee verschillende oriëntaties bepalen (figuur 4b). Bovendien konden we hieruit de grootte van de elektrische lading van de microtubule afleiden.

Wij hebben laten zien dat biomotoren in nanokanalen kunnen worden gebruikt om een moleculair transportstelsel te bouwen. Met elektrische krachten kunnen we individuele microtubules sturen. Dit is een allereerste integratie van biologische motoren op een chip. Daarnaast blijken nanokanalen een uitstekend systeem om interessante biofysische experimenten in uit te voeren.

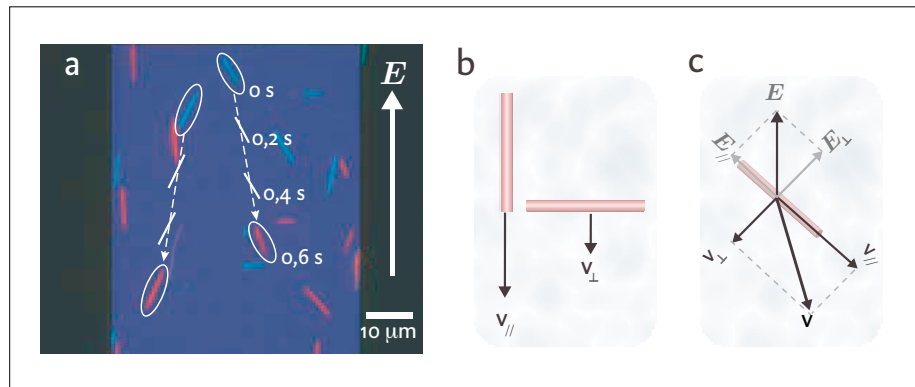
REFERENTIES

- 1 H. Hess, G.D. Bachand en V. Vogel, *Chemistry* **10** (2004), 210.
- 2 J. Howard, *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton* (Sinauer Associates Inc. 2001).
- 3 M.G.L. van den Heuvel, M.P. de Graaff en C. Dekker, *Science* **312** (2006), 910.
- 4 D. Stigter, *J. Phys. Chem.* **82** (1978), 1417.



Figuur 3

(a) In een sorteerexperiment scheidt men microtubules op kleur, door de rode microtubules naar het linker reservoir en de groene naar het rechter reservoir te sturen. (b) Een voorbeeld van het sorteren. De richting van de elektrische kracht wordt door ons aangepast aan de kleur van de microtubule op de splitsing, eerst naar rechts, dan naar links.



Figuur 4

(a) In elektroforese bewegen microtubules niet parallel aan de richting van het aangelegde elektrische veld (verticaal), maar ook met een component loodrecht op het veld (horizontaal). Weergegeven is het traject van twee verschillende microtubules. (b) Dit effect wordt veroorzaakt doordat een cilindervormig deeltje een snelheid heeft die afhankelijk is van zijn oriëntatie [4]. Bij eenzelfde elektrisch veld beweegt de cilinder met zijn as parallel aan het veld sneller dan de cilinder die dwars op het veld georiënteerd is. (c) In de situatie dat de cilinder een hoek maakt met het elektrische veld, kan het elektrische veld worden ontbonden in componenten parallel aan en loodrecht op de cilinder. De beide veldcomponenten geven de cilinder verschillende snelheden parallel aan en loodrecht op de as. Als gevolg hiervan zal de totale snelheid niet parallel (verticaal) aan het elektrische veld zijn.