



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### When cells respond to light

*All you need is LOV*

Van Geel, O.

#### Publication date

2020

#### Document Version

Other version

#### License

Other

[Link to publication](#)

#### Citation for published version (APA):

Van Geel, O. (2020). *When cells respond to light: All you need is LOV*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

#### General rights

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, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# **APPENDICES**

## ENGLISH SUMMARY

### **When cells respond to light: all you need is LOV**

Cells maintain a delicate balance of many protein signals in order to correctly regulate subcellular processes. The plasma membrane is the interface between all intra- and extracellular signals, where external input gets translated into the required cellular response. Thus, the plasma membrane is a hotspot of signaling activity, of which the strength and range is influenced by several mechanisms such as diffusion or active transport. Since a cell contains complex networks of countless interacting proteins, it is very difficult to study the underlying driving mechanisms. Because of this, a collaborative project was created with the goal of establishing a simple artificial cell containing a minimum of required components to control microtubule growth and adjust the morphology of the encapsulating membrane *in vitro*. Through such a system it should be possible to understand more basic networks of signals and then apply this knowledge to more complex *in vivo* networks. The research performed in this thesis is part of this process. We attempted to find a system under full experimental control with minimal components which is capable of regulating microtubule growth. We focused first on creating a working system *in vivo*, before testing the components in an *in vitro* setting. Regulation of protein activity in the system was achieved through the use of optogenetics. This technique utilizes protein domains that are able to absorb certain wavelengths of light and alter their structure as a result. By fusing these domains to proteins with interesting functions, the induced structural change can be able to influence the target proteins activity, for example through recruiting the protein to specific subcellular locations.

All signaling is subjected to mechanisms such as diffusion, even the optogenetic systems. That is why we first focused our research on limiting the diffusion rate of the components in chapter 2. Cytoplasmic components display fast diffusion and as a result they will usually only create local gradients through binding larger, more immobile structures, such as the plasma membrane. Although membrane bound proteins are still capable of relatively high diffusion rates, especially in the less crowded artificial membranes. Because of this we developed a strategy with different types of membrane anchors which decrease lateral diffusion further. We were able to demonstrate their effect through light-induced recruitment of signaling proteins to the plasma membrane. Chapter 3 addresses the problem of combining FRET sensors with blue light sensitive optogenetic domains. Pre-existing pairs of fluorescent proteins on FRET sensors had to be replaced by redshifted pairs in order to use the sensor independent of the optogenetic activation. With this method we developed a redshifted stathmin FRET sensor and used it to test the effect of photoreglatable Rac1 on stathmin and microtubules. In chapter 4 we explored the possibility of creating a photoreglatable kinase that directly phosphorylates stathmin, in order to reduce

the amount of intermediates between stimuli and microtubule response. After analyzing several approaches with multiple kinases, we discovered a functioning version which we characterized further. Finally, in chapter 5 we offer a way to directly regulate the stathmin molecule itself via blue light. This lead to the first light-induced, reversible mechanism to capture and release endogenous tubulin at will. This could be usefull for studying diffusion related mechanisms and introduces a way to regulate the dynamic instability of microtubules without the activation of unwanted signaling prroteins. The entire project is summarized in chapter 6 and its future impact is discussed in relation to the creation of a minimalistic membrane regulating *in vitro* system.

## NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING

### When cells respond to light: all you need is LOV

Cellen onderhouden een delicate balans van vele proteïne signalen om subcellulaire processen correct te kunnen reguleren. Het plasma membraan vormt de belangrijke barrière tussen alle intra- en extracellulaire signalen, waar ook de input van buitenaf wordt vertaald in de nodige cellulaire reacties. Het plasma membraan vormt daarom een hotspot van activiteit waar allerlei mechanismen zoals diffusie of actief transport een invloed hebben op de sterkte en het bereik van de proteïne signalen die worden doorgegeven. Aangezien de cel een complex netwerk van talloze proteïnes bevat die onderling vele interacties vertonen, is het bestuderen van de onderliggende aansturende mechanismen niet eenvoudig. Daarom werd een samenwerkingsproject opgestart met als uiteindelijk doel een eenvoudige artificiële cel samen te stellen met een minimaal aantal componenten die vereist zijn om microtubuli aan te sturen en de morfologie van het *in vitro* omhullende membraan aan te passen. Met een dergelijk systeem moet het mogelijk zijn om eenvoudigere netwerken van signalen te begrijpen en deze kennis nadien toe te passen om de meer complexe *in vivo* regulering van signaalnetwerken te kunnen doorgronden. Het onderzoek in deze thesis maakt hier deel van uit. We hebben getracht om een systeem te vinden met een minimaal aantal componenten dat zich volledig onder experimentele controle bevindt en in staat is om de microtubuli in cellen aan te sturen. Nadat we een werkend systeem *in vivo* hebben samengesteld, kunnen de onderdelen in de *in vitro* setting getest worden. Om de werking van proteïnes te kunnen reguleren hebben we gebruik gemaakt van optogenetica. Deze techniek maakt gebruik van proteïne domeinen die bepaalde golflengtes van licht kunnen absorberen en daardoor hun structuur veranderen. Bij de fusie van deze domeinen aan proteïnes met interessante functies, kan de geïnduceerde structuurverandering de functie van het gefuseerde proteïne beïnvloeden, bijvoorbeeld door rekrutering naar een specifieke plek binnen de cel of zelfs door de activiteit volledig aan of uit te zetten.

Alle signalering is onderhevig aan mechanismen zoals diffusie, en dus ook optogenetische systemen. Daarom focussen we ons onderzoek in hoofdstuk 2 eerst op het controleren van de diffusie component. Componenten in het cytoplasma vertonen hoge diffusiesnelheden en vormen meestal dus enkel lokale gradiënten door te binden aan grotere, meer immobiele structuren, bijvoorbeeld aan het plasma membraan. Hoewel membraan gebonden proteïnes alsnog relatief snelle diffusie kunnen vertonen, vooral in de minder druk bezette artificiële membranen. Daarom hebben we een strategie ontwikkeld met verschillende soorten membraan ankers die laterale diffusie verder verlagen. We hebben hun effect aangetoond door middel van licht-geïnduceerde rekrutering van signaal proteïnes naar het plasma membraan. Hoofdstuk 3

pakt het probleem aan om FRET sensoren te combineren met blauw licht gevoelige proteïne domeinen. Bestaande paren van fluorescerende proteïnen in FRET sensoren moesten vervangen worden voor een meer rood verschoven paar om ervoor te zorgen dat de sensoren onafhankelijk van de optogenetische domeinen konden aangestuurd worden. Via deze methode hebben we een rood verschoven stathmine FRET sensor ontwikkeld en gebruikt om het effect te testen van fotoreguleerbaar Rac1 op stathmine en microtubuli. In hoofdstuk 4 hebben we de mogelijkheid onderzocht om een fotoreguleerbaar kinase te ontwikkelen dat rechtstreeks op stathmine inwerkt, met het idee om het aantal stappen te verminderen tussen de stimulans en het effect op microtubuli. Na verscheidene aanpakken met meerdere kinases te hebben geanalyseerd, vonden we een werkende versie die we verder hebben gekarakteriseerd. Tot slot biedt hoofdstuk 5 een manier aan om stathmine zelf rechtstreeks te beïnvloeden via blauw licht. Dit leidde tot het eerste lichtgestuurde, omkeerbare mechanisme om endogeen tubuline te kunnen binden en weer los te laten op commando. Dit kan handig zijn bij het bestuderen van diffusie-gerelateerde mechanismen en introduceert een manier om de dynamische instabiliteit van microtubuli aan te sturen zonder ongewenste signaalproteïnes te activeren. Het hele project wordt in hoofdstuk 6 nogmaals kort samengevat en de impact wordt besproken van het gezamenlijke onderzoek op het samenstellen van een minimalistisch membraan regulerend systeem.

## **CURRICULUM VITAE**

Orry Van Geel was born on the 31<sup>st</sup> of May 1992 in Gent, Belgium. After obtaining his ASO diploma in Latin & Science studies at the Sint-Theresia College in Kapelle-op-den-Bos, he continued his studies at the Catholic University of Leuven. In 2013, he obtained his Bachelor's degree in biochemistry & biotechnology there, and continued the same track for obtaining his Master's degree in biochemistry & biotechnology with magna cum laude in 2015. During his education, he spent one year studying at Durham University, England. His final research internship titled 'Cellular mechanism of neuroplasticity' under Prof. D. Balschun involved the use of optogenetic rhodopsins, which sparked his interest in the rising field of optogenetics. In the hopes of continuing to work with optogenetics, he searched abroad for interesting PhD projects. In September 2015, he started as a PhD student at the University of Amsterdam in The Netherlands under Prof. T.W.J. Gadella, working on a collaboration project titled 'Spatio-temporal patterns of membrane protein activity' which wants to utilize optogenetics to regulate signaling in an *in vitro* system eventually. The results of Orry's contribution to this research project are presented in this thesis. Upon completion of the thesis, Orry decided to travel extensively before continuing his career in the field of science.

## DANKWOORD

Nu het zware werk erop zit, word het tijd om wat mensen te bedanken. Ik heb van vele kanten steun ontvangen tijdens het hele project, dus vergeef me dat ik de meeste van jullie niet individueel benoem, anders word dit boek veel te dik en vergeet ik waarschijnlijk alsnog mensen. Maar ook al probeer ik het beknopt te houden, weet dat ik iedere persoon uit de vermelde groepen enorm dankbaar ben voor alles.

Allereerst mijn promotor Dorus, zonder wie van dit project helemaal geen sprake zou geweest zijn. Bedankt voor alle input en leidraad, alsook mij de vrijheid te geven om zelf aan het project te sleutelen met al die genetische legoblokken.

Uiteraard heeft dit project ook veel te danken aan de Pl's uit de Moleculaire Cytologie groep, die ook vaak tijdens gesprekken of werkbijeenkomsten met nuttige tips kwamen, of al eens hielpen met een microscopie probleem.

Dat brengt ons dan weer bij onze fantastische in-house ingenieur Ronald, die vaak schijnbaar onverklaarbare technische problemen in een handomdraai kon fixen, en zo vele microscopie experimenten heeft gered.

Natuurlijk heb ik ook veel tijd in het lab gependend, en wil ik graag de motor die het lab draaiende houdt bedanken, de technicians. Geen gemakkelijke taak en toch lukt dat prima, al dan niet met eens verschillende meningen dan de PhD's, maar dat levert dan weer interessante gesprekken op. Ook bedankt voor de meer casual gesprekken uiteraard en om altijd bereid te zijn om te helpen.

Dan bedankt aan de grote groep van alle collega PhDs en postdocs van de Moleculaire Cytologie groep doorheen de voorbije jaren. Wij zaten natuurlijk allemaal in dezelfde boot en konden al eens bij elkaar klagen over experimenten, advies vragen, of gewoon eens de gedachten verzetten. Ook buiten het lab hebben we leuke momenten gehad samen, en dat maakte het allemaal toch tot een leuke werkomgeving.

Ook was ik heel blij met de masterstudenten die ik begeleid heb. Ze hebben elk een hoop experimenteel werk verricht wat geholpen heeft om dit project te kunnen afronden.

De partner labo's uit het consortium van dit project hebben voor een aantal interessante meetings gezorgd die ook een grote invloed hebben gehad op het verloop van dit project.

Uiteraard houd je een stressvolle job als PhD student geen vier jaar vol zonder uitlaatklep, en daarvoor wil ik graag mijn gehele kung fu groep bedanken.

Dan de grootste groep van allemaal, alle vrienden en familie, met in het bijzonder mijn ouders. Ook al waren jullie niet rechtstreeks bij het onderzoek betrokken, de interesse en motivatie waren van groot belang om dit project tot een goed eind te kunnen brengen.

Tot slot wil ik mijn allergrootste steun en toeverlaat bedanken, mijn partner Anaïs. Zonder jou was deze thesis er niet gekomen, je hebt me vaak moeten horen klagen over mislukte experimenten en dergelijke maar bent altijd in mij blijven geloven en hebt mij altijd aangemoedigd. Dankjewel om mijn rots te zijn.





