

die dynamik des zellskeletts

Wie molekulare „Speckles“ die Bausteine der Zelle sichtbar machen

von Leif Dehmelt

Die Entwicklung mehrzelliger Organismen, also auch von Menschen, wird durch zahlreiche Formänderungen einzelner Zellen geprägt. Diese Formänderungen werden durch ein zelluläres Skelett, das sogenannte Zytoskelett, möglich. Im Unterschied zum starren, makroskopischen Skelett von Tieren, ist das Zytoskelett sehr flexibel und dynamisch. Es besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher, faserartiger Strukturen, welche in der Zelle durch Polymerisation und Depolymerisation von löslichen Einzelbausteinen auf- bzw. abgebaut werden (Abb. 1, oben).

Eine besonders wichtige Rolle spielen hierbei Aktinfilamente und Mikrotubuli, welche aus den Proteinbausteinen G-Aktin und Tubulin aufgebaut sind. Diese Filamentarten haben eine asymmetrische Struktur, an welcher direktonaler Transport durch molekulare Motorproteine stattfindet. Solche Transportprozesse bilden zum einen die Grundlage für die räumliche Organisation des Zellinneren, zum anderen kann die Bewegung dieser Motorproteine Kräfte erzeugen, welche das Zytoskelett entlang anderer Zellbestandteile verschieben und hierdurch Änderungen in der Zellform bewirken. In den letzten Jahrzehnten wurden viele

mechanistische Details zur Regulation einzelner Komponenten des Zytoskeletts entschlüsselt. Die übergeordneten Mechanismen, wie sich unterschiedliche Komponenten des Zytoskeletts gegenseitig beeinflussen und wie sich dadurch diese faserartigen Strukturen in der Zelle organisieren und die Zellform beeinflussen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Bezüglich dieser Fragestellung ist die Entwicklung von Nervenzellen (Abb. 1, unten) aufgrund der hierbei beobachteten dramatischen Änderungen der Zellform besonders interessant.

Die Vermessung der Dynamik des Zytoskeletts

In unserer Arbeitsgruppe verfolgen wir einen modernen systembiologischen Ansatz, welcher quantitative experimentelle Untersuchungen mit computergestützter Modellierung kombiniert, um ein tieferes Verständnis zellulärer Prozesse zu erhalten. Die Qualität solcher Modelle ist durch die messbaren experimentellen Daten limitiert, welche typischerweise zelluläre chemische Reaktionen oder einzelne Protein-Interaktionen repräsentieren. Die Erforschung von Zellformänderungen erfordert zusätzlich genaue Messungen von mechanischen Prozessen, welche durch den dynamischen Auf- und Abbau des Zytoskeletts und dessen Verschiebung durch Interaktionen mit

Abbildung 1: Die räumliche Organisation des Skeletts von Nervenzellen in frühen Entwicklungsstadien

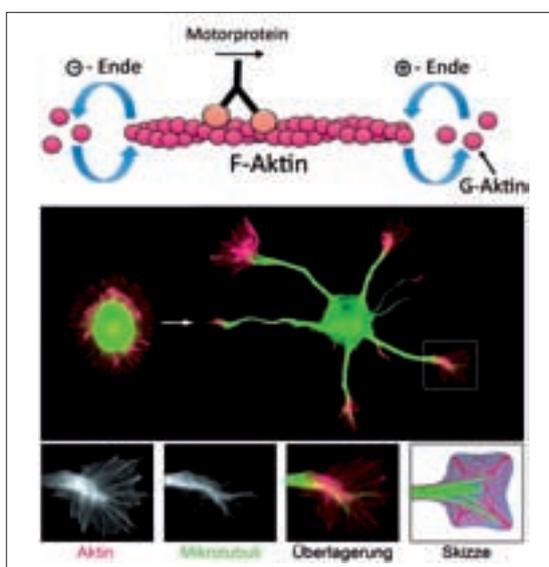


Bild: Leif Dehmelt

Oben: Schematische Darstellung eines asymmetrischen Aktinfilaments (F-Aktin), welches durch Polymerisation aus G-Aktin-Einzelbausteinen gebildet wird. Die asymmetrische Struktur des Filaments ermöglicht directionalen Transport über Motorproteine. Unten: Zwei Arten von Zytoskelettfilamenten sind in einer entwickelnden Nervenzelle angefärbt: Aktin (rot) und Mikrotubuli (grün). Eine Struktur im peripheren Bereich der Zelle, in einem sogenannten Wachstumskegel, ist vergrößert dargestellt (reproduziert aus Dehmelt *et al.* 2003 mit Erlaubnis von The Society for Neuroscience).

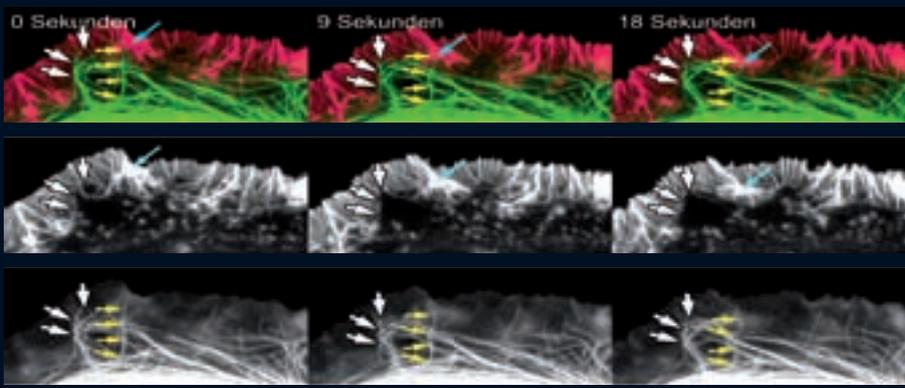


Abbildung 3: Wechselseitiger Einfluss von Zytoskelettkomponenten in Zellen

Aktinfilamente (rot) unterliegen einem ständigen Fluss (türkisfarbene Pfeile), welcher auch Mikrotubulifilamente (grün) in Richtung des Zellzentrums verschiebt. Die Mikrotubuli werden oft unter dem Einfluss dieser Kraft aus dem Aktinzytoskelett gebeugt (gelbe Pfeile). Eine größere Ansammlung von Mikrotubulifilamenten (weiße Pfeile) kann allerdings dieser Kraft entgegenwirken, limitiert hierdurch die räumliche Anordnung des Aktinzytoskelett und beeinflusst somit indirekt die Zellform (Dehmelt *et al.* 2003). Die komplette Filmsequenz kann über den Internetlink www.mpi-dortmund.mpg.de/forschungProjekte/AGs/Dehmelt/forschung/index.html eingesehen werden (Bild: Leif Dehmelt).

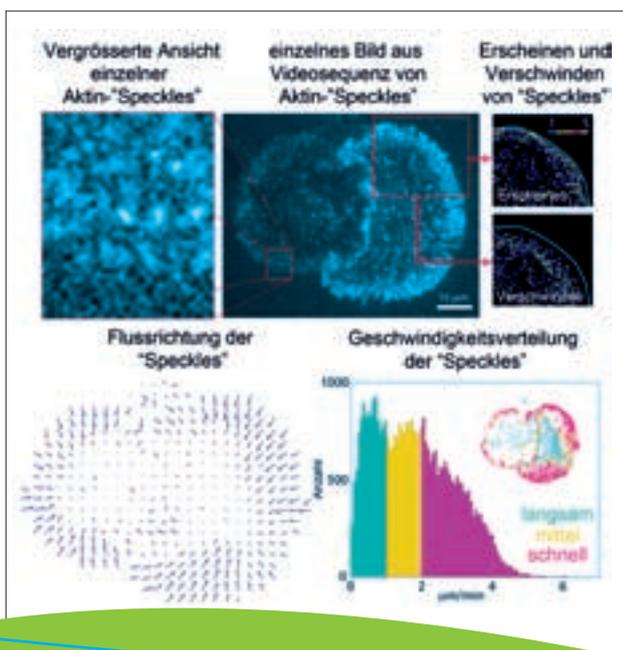
molekularen „Motoren“ angetrieben werden. Zur experimentellen Charakterisierung dieser dynamischen Eigenschaften des Zytoskeletts wird häufig eine spezielle mikroskopische Technik, die sogenannte „Speckle“-Mikroskopie, verwendet (Danuser and Waterman-Storer, 2006). In diesem Verfahren wird eine sehr geringe Menge von Filamenteinzelbausteinen in Zellen eingebracht, welche mit einem Farbstoff – in diesem Fall das Grün fluoreszierende Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* – markiert sind. Diese markierten Einzelbausteine bilden in Zellen winzige „Farbkleckse“ (engl. „Speckles“). Solange diese Bausteine in gelöster Form vorliegen, bewegen sie sich sehr schnell durch typische Molekularbewegungen (Diffusion) und werden daher in der „Speckle“-Mikroskopie nicht als einzelne Moleküle abgebildet. Wenn diese Einzelbausteine jedoch in dynamisch reorganisierende Zytoskelettfilamente eingebaut werden, ist deren Motilität aufgrund der Größe der Zytoskelettstrukturen stark reduziert, wodurch sie leichter detektiert werden können. In Zytoskelettfilamenten können durch sensitive mikroskopische Analyse sogar einzelne, markierte Filamenteinzelbausteine

in lebenden Zellen verfolgt werden (Watanabe and Mitchison, 2002). Das plötzliche Erscheinen eines solchen Speckles entspricht daher dem Einbau (Polymerisation), das Verschwinden eines Speckles dem Abbau (Depolymerisation) eines Filament-segments. Verschiebungen der einzelnen Speckles beruhen auf Bewegungen innerhalb der Zytoskelettstruktur, welche durch herkömmliche Techniken oft nicht genau messbar sind. Abb. 2 zeigt exemplarisch am Beispiel des Aktinzytoskeletts, wie mit dieser Technik ein kontinuierlicher Fluss der Zytoskelettkomponenten in lebenden Zellen vermessen werden kann.

Prinzipien in der Organisation des Zytoskeletts: Modelle zur Integration von experimentellen Daten

Um die räumlich-zeitliche Organisation des Zytoskeletts besser zu verstehen, ist es allerdings nicht ausreichend nur die dynamischen Eigenschaften einer einzelnen Zytoskelettkomponente, wie z. B. von Aktinfilamenten, zu vermessen, da diese mit einer Vielzahl weiterer Komponenten über komplexe mechanische und chemische Mechanismen kommuniziert (Dehmelt and Bastiaens 2010).

Abbildung 2: Vermessung der Filamentdynamik durch „Speckle“-Mikroskopie



Das Aktinzytoskelett wurde in neuronalen Vorläuferzellen mit einzelnen molekularen Speckles markiert. Durch die computergestützte Analyse der dynamischen Eigenschaften dieser Speckles in Filmsequenzen kann die räumliche Verteilung der Polymerisation, Depolymerisation sowie die Verschiebungen von Aktinfilamenten verfolgt und quantifiziert werden (Bild: Leif Dehmelt, Tomáš Mazel).



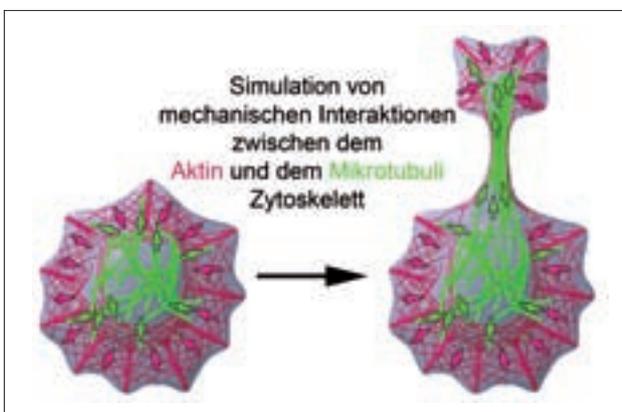
AG Dehmelt: (von links nach rechts und von oben nach unten) Leif Dehmelt, Nicolas Brauckhoff, Julia Arens, Melanie Grässl, Olga Müller, Tomáš Mazel, Johannes Koch, Anja Biesemann, Silke Gandor, Pia Jeggle, Magda Krejczyk, Verena Hannak.



Das Max-Planck Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund.

Abb. 3 zeigt wie Mikrotubuli- und Aktin-vermittelte Kräfte durch ihren gegenseitigen Einfluss die Zytoskelettstruktur und somit die Zellform beeinflussen (Dehmelt *et al.*, 2003; Dehmelt *et al.*, 2006). Leider ist die Anzahl der Komponenten, welche simultan in einer einzelnen Zelle verfolgt werden können, durch die Anzahl verfügbarer unterscheidbarer Farbstoffe begrenzt. Daher können nicht alle möglichen Interaktionen gleichzeitig gemessen werden. Um die mechanistische Grundlage dieser wechselseitigen Interaktionen dennoch zu entschlüsseln, integrieren wir Beobachtungen aus unterschiedlichen Experimenten in dynamischen, mathematischen Modellen der zentralen Komponenten des Zytoskeletts (skizziert in Abb. 4). Die Vorhersagen aus solchen Modellen bezüglich der Zelldynamik werden durch gezielte experimentelle Manipulationen überprüft. Durch ein enges Zusammenspiel zwischen Theorie und Experiment entschlüsseln wir somit die grundlegenden Prinzipien, auf welche Weise sich die Struktur des Zytoskeletts durch mechanische und chemische Interaktionen mit anderen Zellkomponenten selbst organisiert und wie

Abbildung 4: Schema eines einfachen Modells zur Simulation von Formänderungen in Zellen



Drei Komponenten, Aktin (rot), Mikrotubuli (grün) und die Plasmamembran (grau), beeinflussen sich gegenseitig über mechanische Kräfte und bilden spontan einen Auswuchs. Zahlreiche weitere Komponenten, welche die beteiligten Kräfte produzieren und die chemischen und mechanischen Eigenschaften der Zytoskelettfilamente regulieren, sind zur Vereinfachung nicht aufgeführt (Bild: Leif Dehmelt).

diese Prozesse zu Zellformänderungen, wie beispielsweise der Bildung von Zellfortsätzen in Nervenzellen, führen. Die direkte Beobachtung von molekularen Speckles hilft uns hierbei Licht ins Dunkel dieser komplexen zellbiologischen Vorgänge zu bringen.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Die Arbeiten wurden von der FORSYS Partner Initiative des BMBF unter dem Titel „Interaktionen von zellulären Systemen in der Entwicklung von Nervenzellen“ gefördert und in der Abteilung für Systemische Zellbiologie im Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und an der TU Dortmund durchgeführt.

Referenzen:

- Danuser, G., and Waterman-Storer, C.M. (2006). Quantitative fluorescent speckle microscopy of cytoskeleton dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 35, 361-387.
- Dehmelt, L., Smart, F.M., Ozer, R.S., and Halpain, S. (2003). The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci* 23, 9479-9490.
- Dehmelt, L., Nalbant, P., Steffen, W., and Halpain, S. (2006). A microtubule-based, dynein-dependent force induces local cell protrusions: Implications for neurite initiation. *Brain Cell Biology* 35, 39-56.
- Dehmelt, L., and Bastiaens, P.I. (2010). Spatial organization of intracellular communication: insights from imaging. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 440-452
- Watanabe, N., and Mitchison, T.J. (2002). Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 295, 1083-1086.

Kontakt:

Dr. Leif Dehmelt

Arbeitsgruppenleiter Abteilung Systemische Zellbiologie
TU Dortmund und Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
leif.dehmelt@mpi-dortmund.mpg.de