

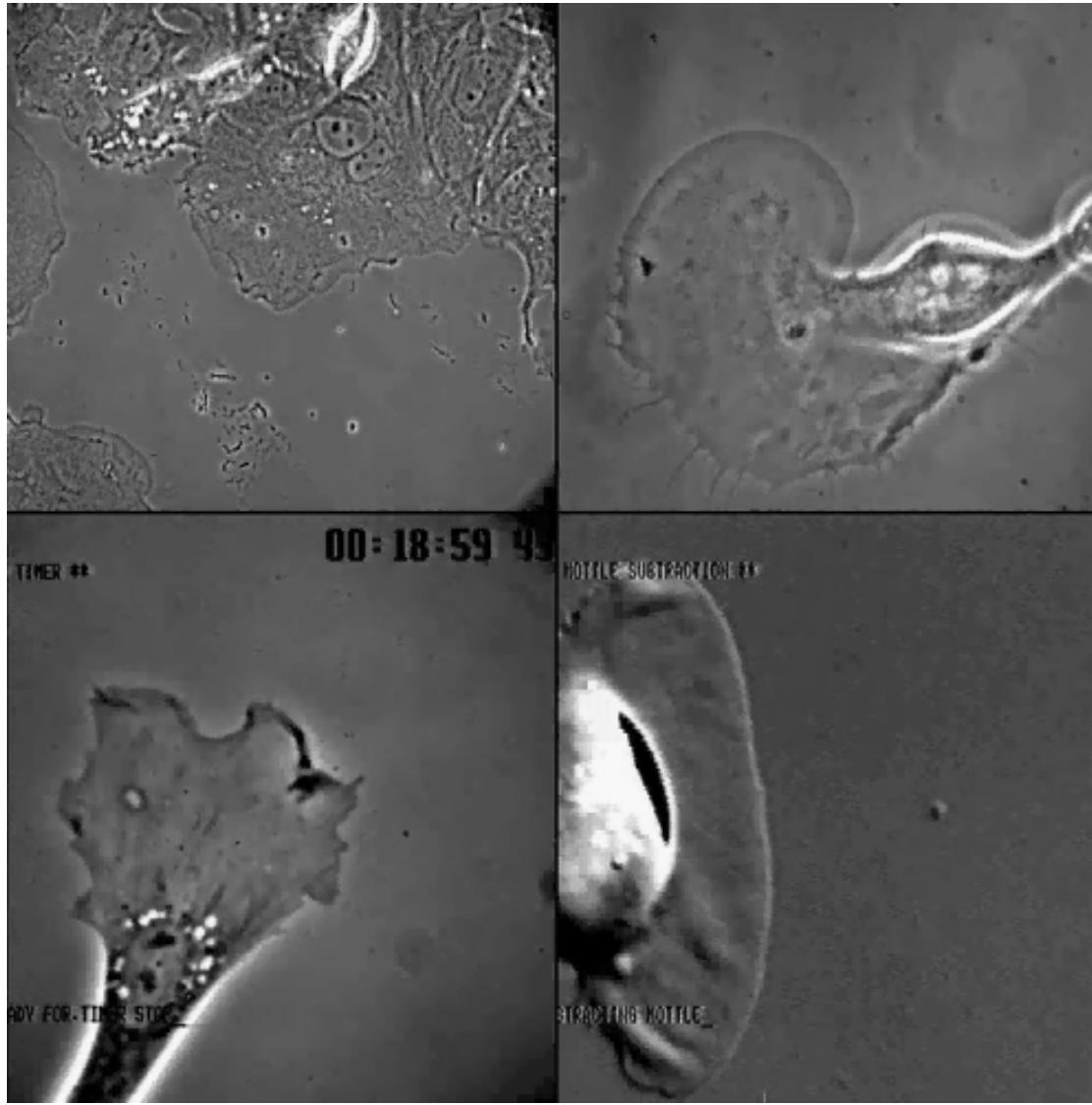
Lebenswissenschaftliches Kolleg der Studienstiftung
Biophysik und biophysikalische Chemie

September 2013
Rastatt

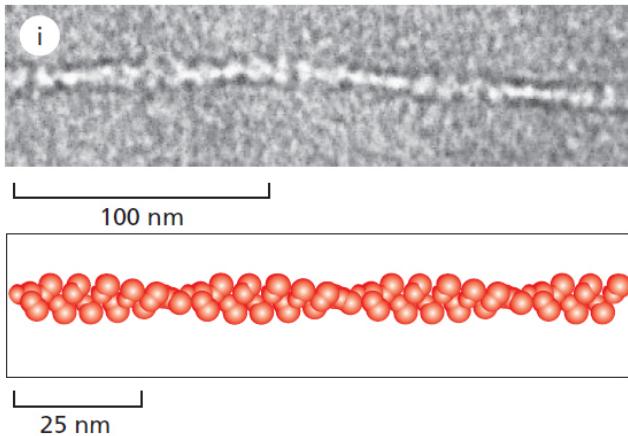
Transport durch Zellskelettfilamente

17. September 2013

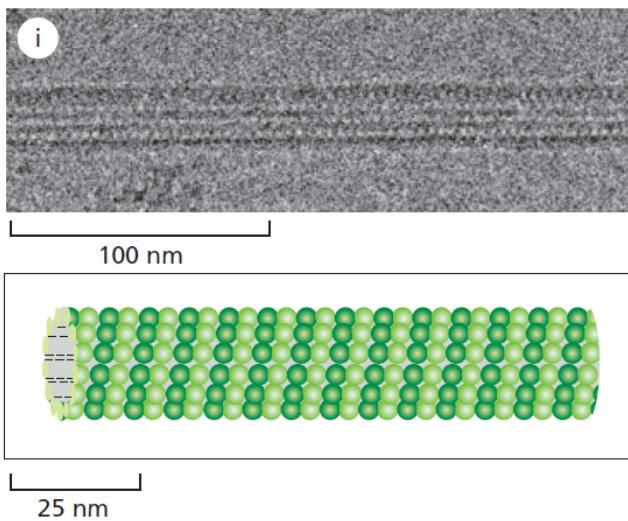
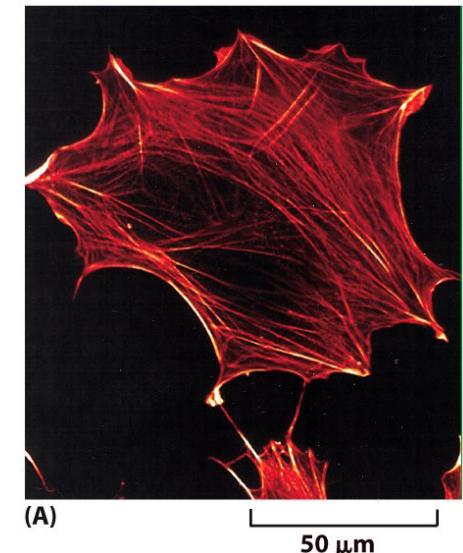
Prof. Holger Kress
Universität Bayreuth
Experimentalphysik I



Film 1: Migration von Zellen. Oben links: Fibroblasten, die in eine "künstliche Wunde" in einer Petrischale wandern (Echtzeit des Films: 3 h). Unten links: Einzelter Fibroblast (Echtzeit: 2 h). Oben rechts: Melanomzelle (Echtzeit: 20 min). Unten rechts: Epidermale Keratinozyte (Echtzeit: 4 min). [Vic Small, IMBA]



Aktinfilamente



Mikrotubuli

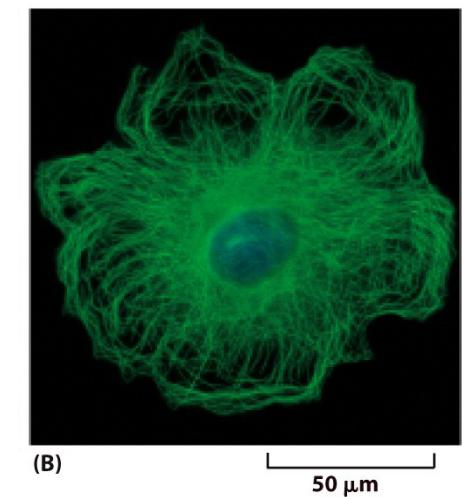


Abb. 1: Aktinfilamente und Mikrotubuli sind Proteinfilamente, deren Mechanik und Polymerisierungsdynamik einen großen Einfluss auf zelluläre Struktur- und Musterbildung und die mechanischen Eigenschaften von Zellen haben. [Alberts et al., *Essential Cell Biology*, 2010]

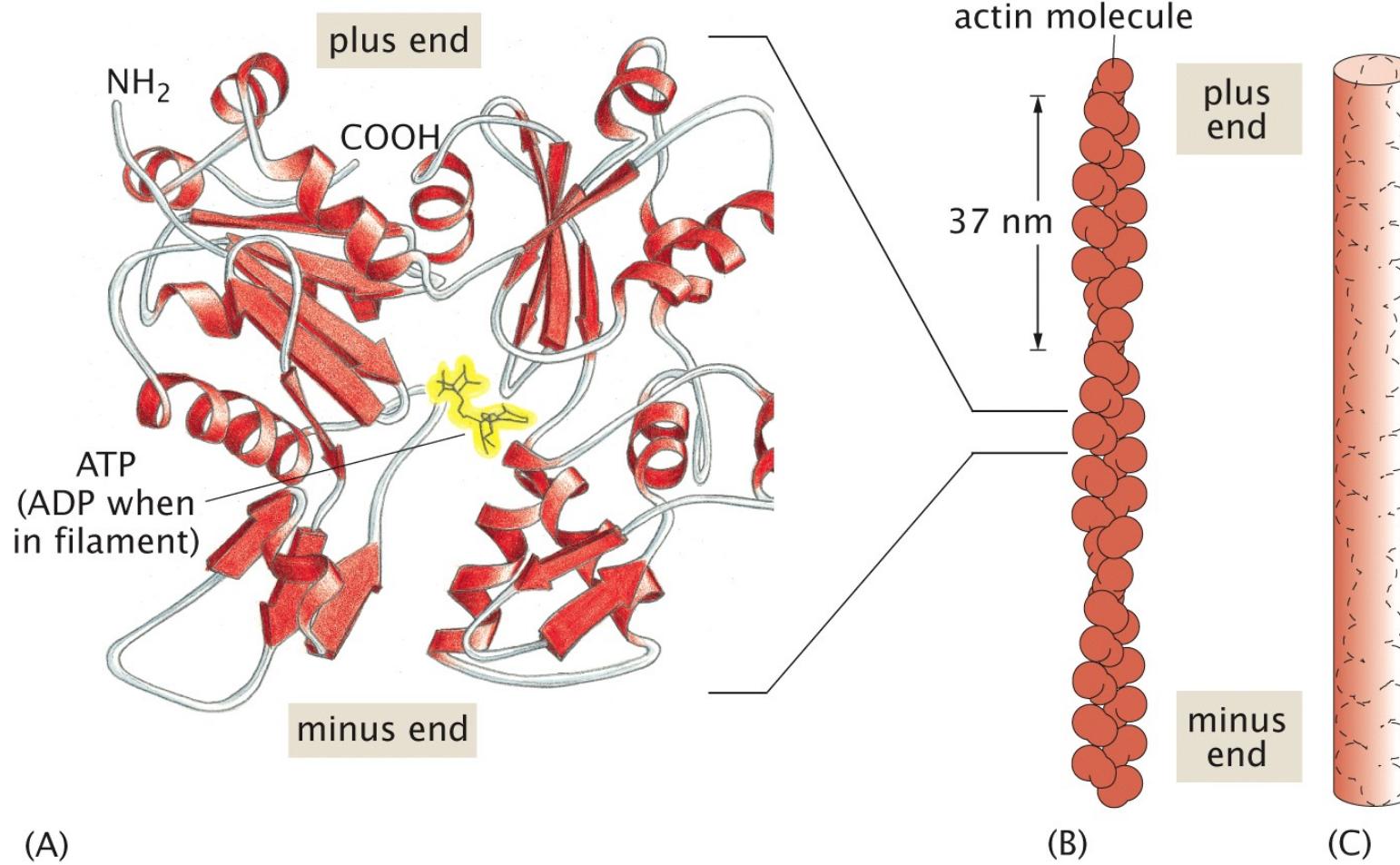


Figure 10.29 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 2: Struktur von Aktinfilamenten. (A) Ein Aktin-Monomer hat einen Durchmesser von etwa 5.4 nm und besitzt eine intrinsische Polarität (Minusende und Plusende). (B) Aktinfilamente bestehen aus zwei Protofilamenten von Aktin. Die Protofilamente winden sich helixförmig umeinander mit einer Periodizität von etwa 37 nm (vergleiche Myosin-V Schrittweite). (C) Vereinfacht können Aktinfilamente als homogene Zylinder betrachtet werden. [Phillips et al., *Physical Biology of the Cell*, 2012]

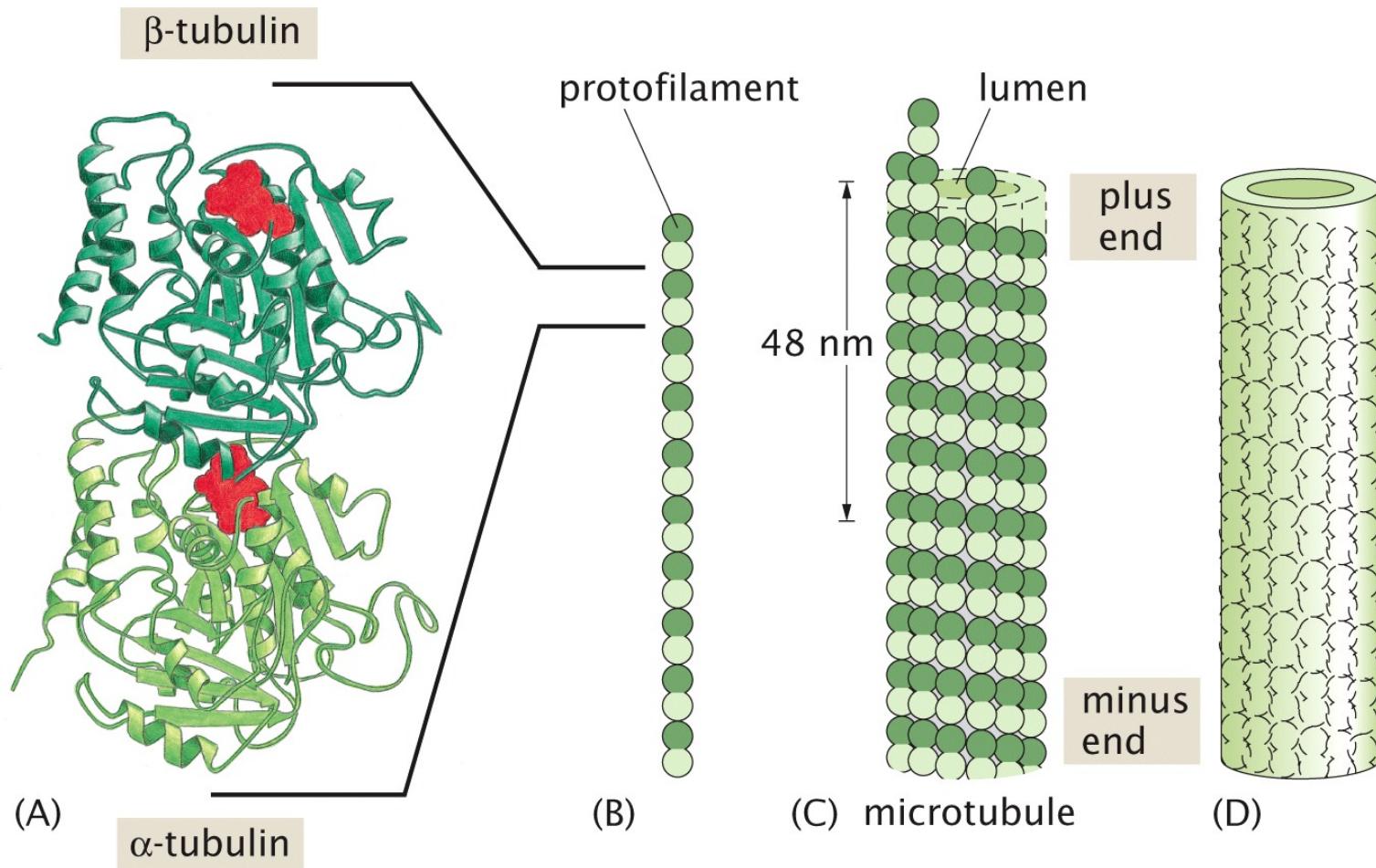
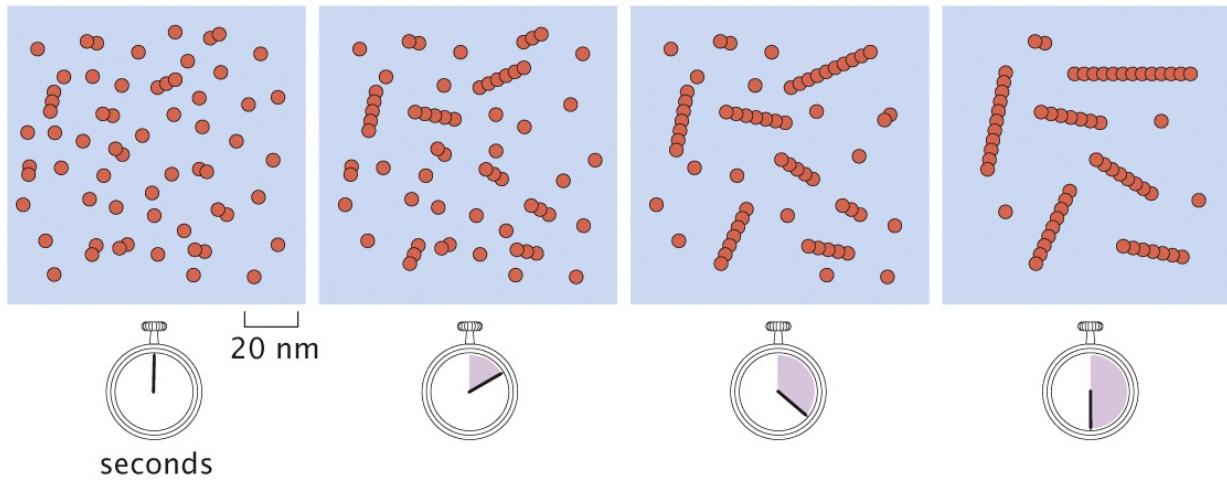


Figure 10.28 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 3: Struktur eines Mikrotubulus. (A) Eine Tubulin-Untereinheit besteht aus einem Dimer von α -Tubulin und β -Tubulin und hat eine Länge von etwa 8 nm (vergleiche Kinesin Schrittweite). (B) Die linearen Protofilamente dieser Dimere sind alleine instabil. (C) Je 13 dieser Protofilamente bilden die stabilen, röhrenförmigen Mikrotubuli mit einem Außendurchmesser von etwa 25 nm. (D) Vereinfacht können Mikrotubuli als homogene hohle Zylinder betrachtet werden. [Phillips et al., 2012]

(A) *in vitro* polymerization



(B) *in vivo* polymerization

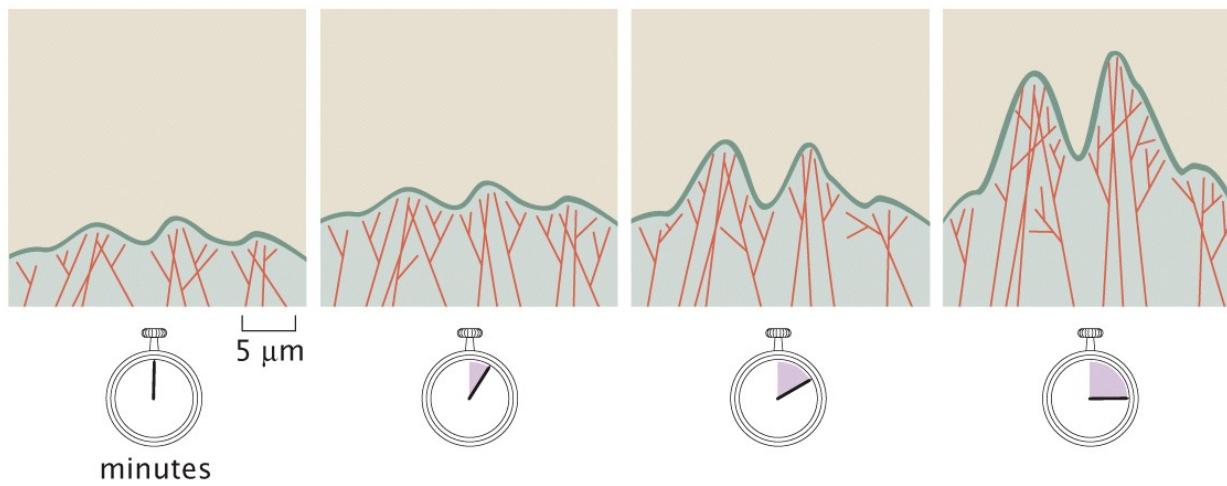


Figure 15.1 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 4: Raum-Zeitliche Dynamik von Filamenten. (A) Untersuchungen *in vitro* zeigen, wie Zellskelettfilamente aus Lösungen von Monomeren entstehen. (B) Untersuchungen *in vivo* zeigen, wie beispielsweise das Wachstum von Aktinfilamenten die vorderste Front einer migrierenden Zelle vorwärts schiebt. [Phillips et al., 2012].

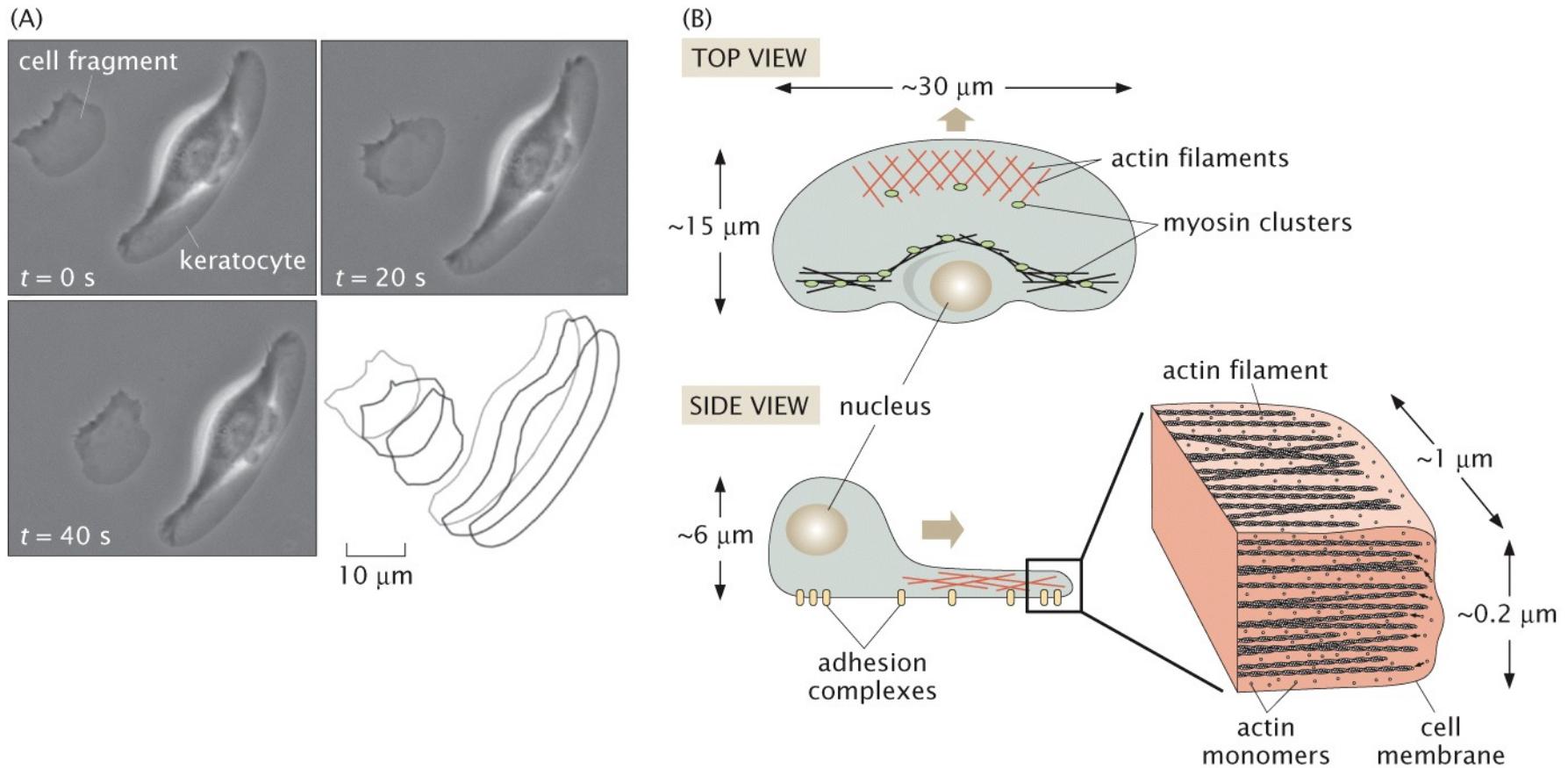


Figure 15.2 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 5: (Links) Eine Serie von Mikroskopiebildern zeigt eine wandernde epidermale Keratinozyte. (Rechts) Organisation des Aktinskeletts in der Zelle. In der Draufsicht ist die Netzwerkstruktur der Aktinfilamente zu erkennen. In der Seitenansicht ist die flache Struktur des Lamellipodiums, des vorderen Teils der Zelle, zu erkennen, welcher die Zelle hinter sich her zieht. Der vergrößerte vorderste Bereich des Lamellipodiums zeigt näherungsweise die Dichte der Aktinfilamente. [Phillips et al., 2012].

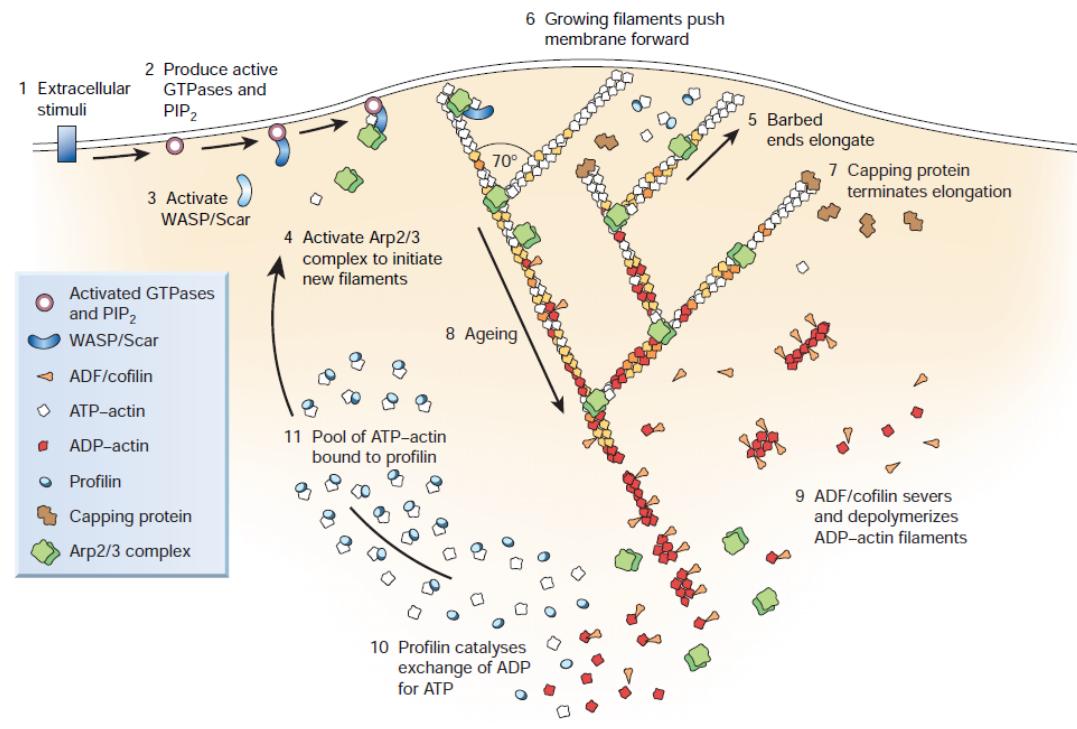
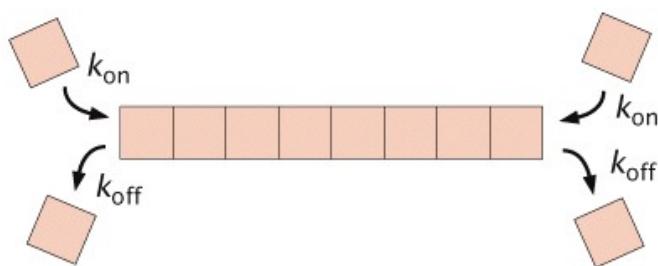


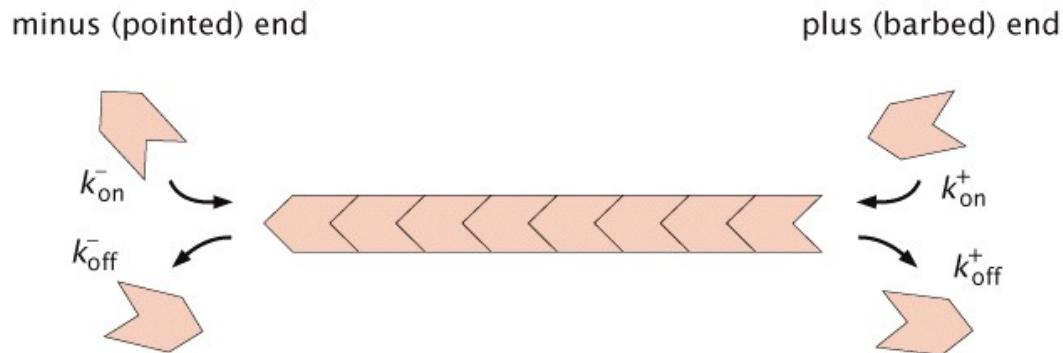
Figure 1 The dendritic-nucleation model for protrusion of lamellipodia. External cues (step 1) activate signalling pathways that lead to GTPases (2). These then activate Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) and related proteins (3), which in turn activate Arp2/3 complex. Arp2/3 complex initiates a new filament as a branch on the side of an existing filament (4). Each new filament grows rapidly (5), fed by a high concentration of profilin-bound actin stored in the cytoplasm, and this pushes the plasma membrane forward (6). Capping protein binds to the growing ends, terminating elongation (7). Actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin then severs and depolymerizes the ADP filaments, mainly in the ‘older’ regions of the filaments (8, 9). Profilin re-enters the cycle at this point, promoting dissociation of ADP and binding of ATP to dissociated subunits (10). ATP-actin binds to profilin, refilling the pool of subunits available for assembly (11). (Image based on an original figure from ref. 32.)

Abb. 6: Modell für die Dynamik von Aktin in Lamellipodien. Aktinpolymerisierung am Plusende der Filamente (auch „barbed end“ genannt) schiebt die Zellmembran vorwärts. Das Molekül Arp2/3 sorgt für eine Netzwerkstruktur mit einem Winkel von etwa 70° zwischen den Filamenten. Am hinteren Ende der Filamente, dem Minusende (auch „pointed end“ genannt) depolymerisiert das Filament und Aktinmonomere werden freigesetzt. Diese Kombination aus Polymerisierung an einem Ende und Depolymerisierung am anderen Ende bezeichnet man auch als „Treadmilling“ [Tom Pollard, *Nature*, 2003].

(A)



(B)



(C)

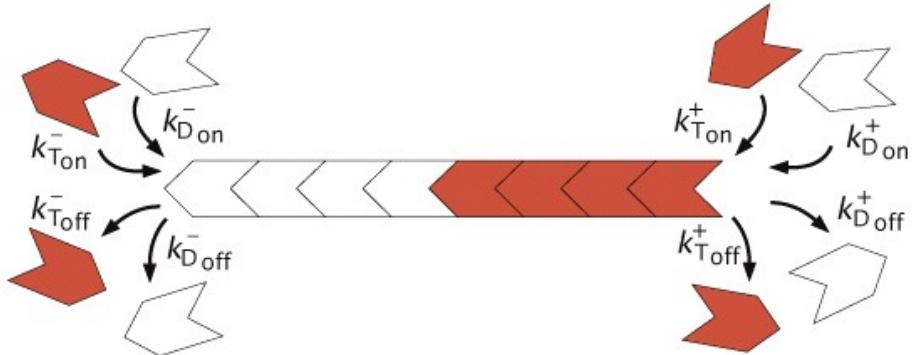


Abb. 7: Verschiedene Modelle für die Dynamik von Zellskelettpolymerisierung.

(A) Modell mit gleichen Polymerisierungsraten an beiden Seiten des Filaments.

(B) Modell mit verschiedenen Polymerisierungsraten an beiden Seiten des Filaments.

(C) Modell mit Polymerisierungsraten, die sowohl von der Seite des Filaments, als auch davon abhängen, ob ATP oder ADP an die Aktinproteine gebunden ist. [Phillips et al., 2012].

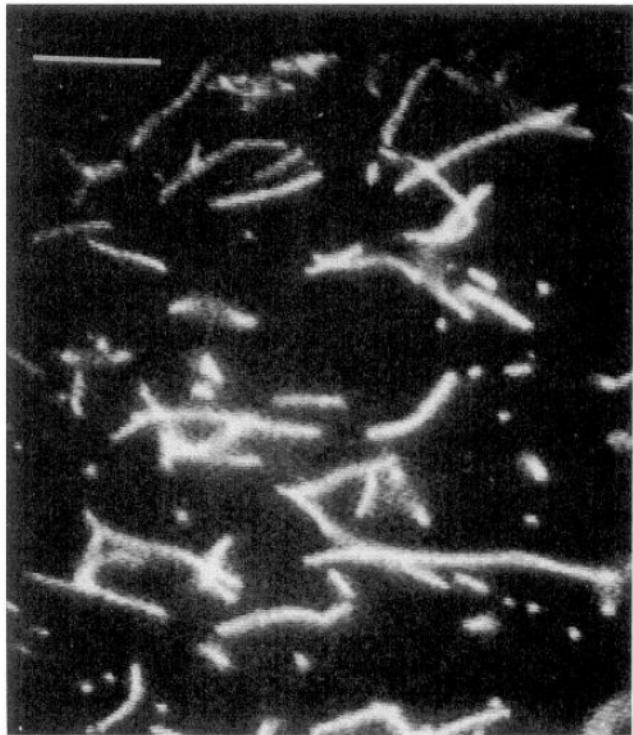


Fig. 1. Fluorescent image of actin filaments stained with tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-phalloidin. F-actin (0.3 mg/ml) in 50 mM potassium acetate, 2 mM MgSO₄, and 10 mM Tris acetate, pH 7.5, was incubated with equimolar concentration of TRITC-phalloidin at room temperature (RT). After 10-min incubation it was diluted with buffer A to a concentration of 10 nM. Three microliters of solution were placed on a microscope slide and observed as described in MATERIALS AND METHODS. Bar corresponds to 10 μ m.

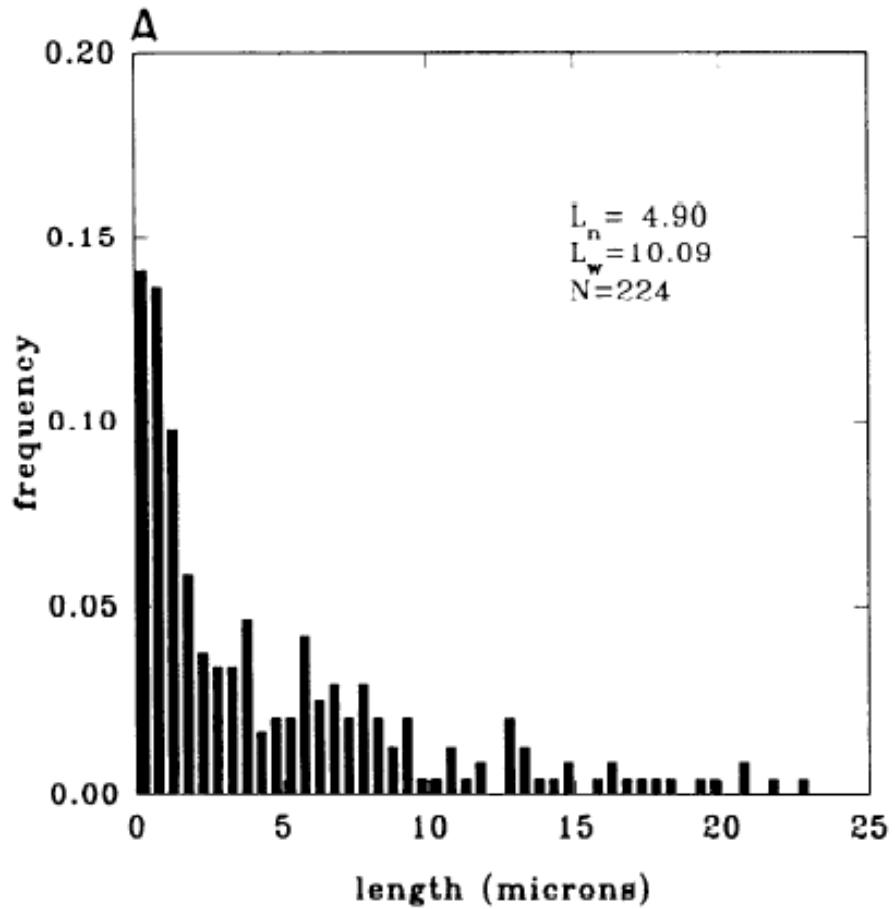


Abb. 8: Verteilung von Aktinfilamentlängen gemessen mit Fluoreszenzmikroskopie. (Links) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Aktinfilamenten. (Rechts) Verteilung der Länge von Aktinfilamenten. Die mittlere Filamentlänge beträgt hier 4.90 μ m. [Burlacu et al., Am. J. Physiol., 1992].

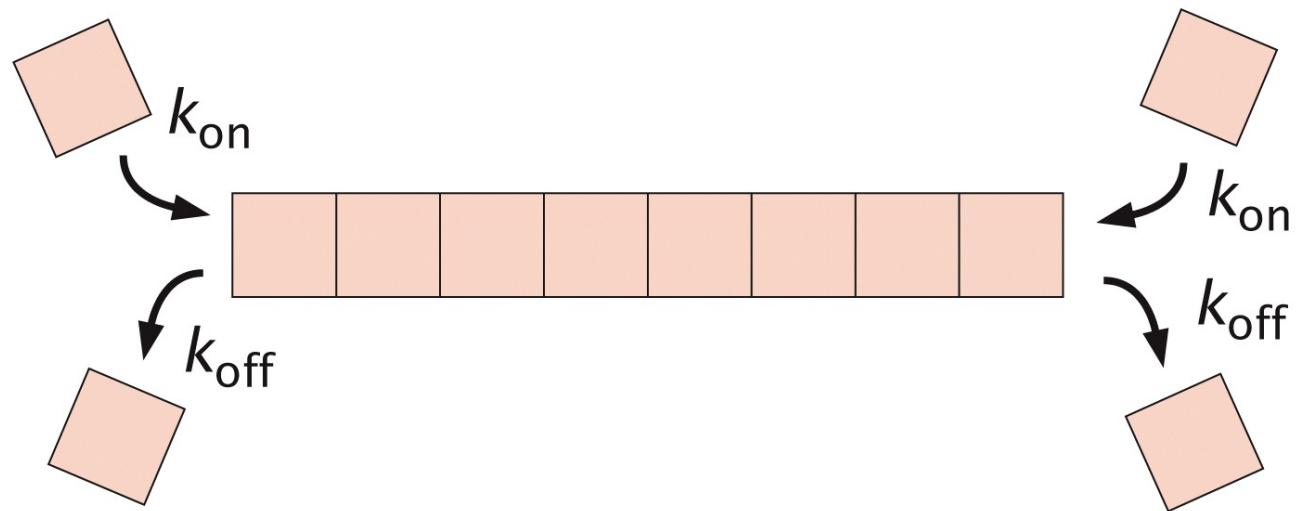


Figure 15.21a Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 9: Einfaches Modell für die Dynamik von Zellskelettpolymerisierung: Gleiche Polymerisierungs- und Depolymerisierungsraten an beiden Seiten des Filaments. [Phillips et al., 2012].

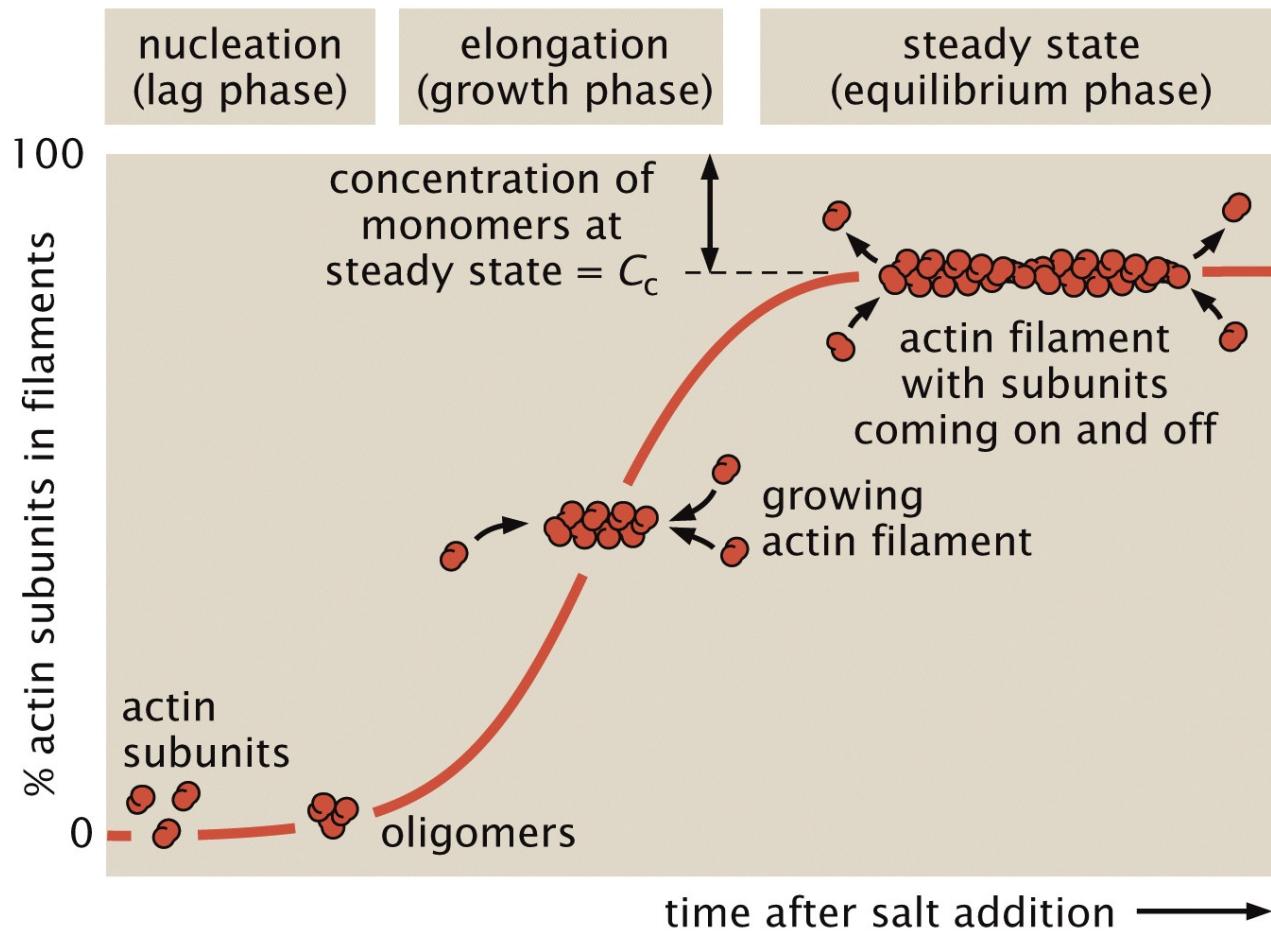


Figure 15.19a Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 10: Schemazeichnung des Polymerisierungsgrades von Aktin als Funktion der Zeit. Wenn man mit einer puren Lösung von Aktinmonomeren beginnt, ist der limitierende Schritt für die Polymerisierung die zufällige Kollision von mindestens drei Aktinmonomeren, die einen Nukleationskeim bilden, der dann durch das Anbinden von Monomeren wachsen kann. Nach dieser Verzögerungsphase (lag phase) folgt die Wachstumsphase und danach die Gleichgewichtsphase. In der Gleichgewichtsphase gibt es noch eine bestimmte Konzentration c_c an Monomeren. Diese nennt man auch die kritische Konzentration. [Phillips et al., 2012].

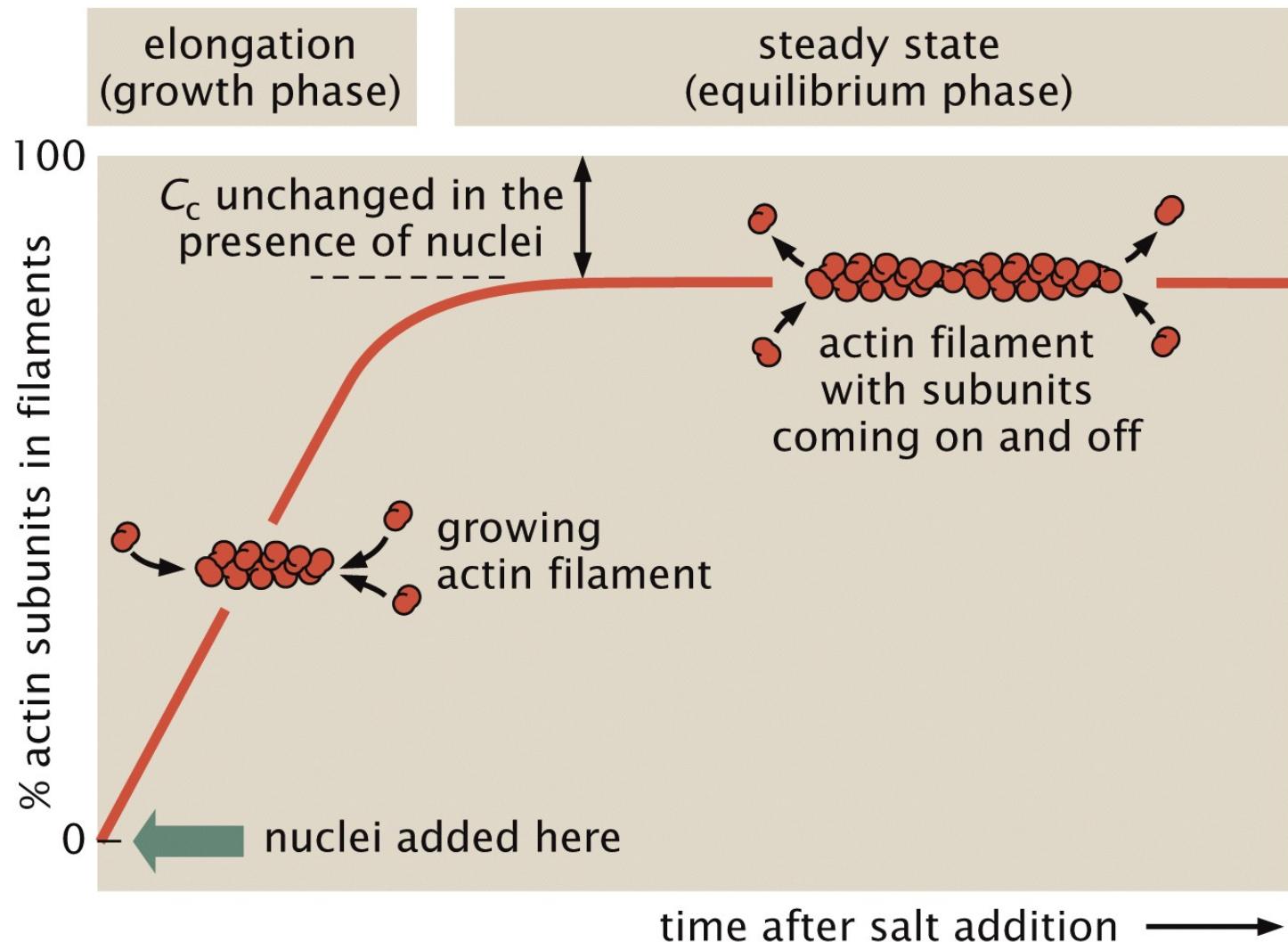


Figure 15.19b Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 11: Wenn man zu Beginn des Experiments Nukleationskeime zu den Monomeren hinzugibt, so beginnt die Wachstumsphase sofort ohne, dass die Verzögerungsphase durchlaufen wird. Die kritische Konzentration c_c ist davon nicht betroffen und bleibt unverändert. [Phillips et al., 2012].

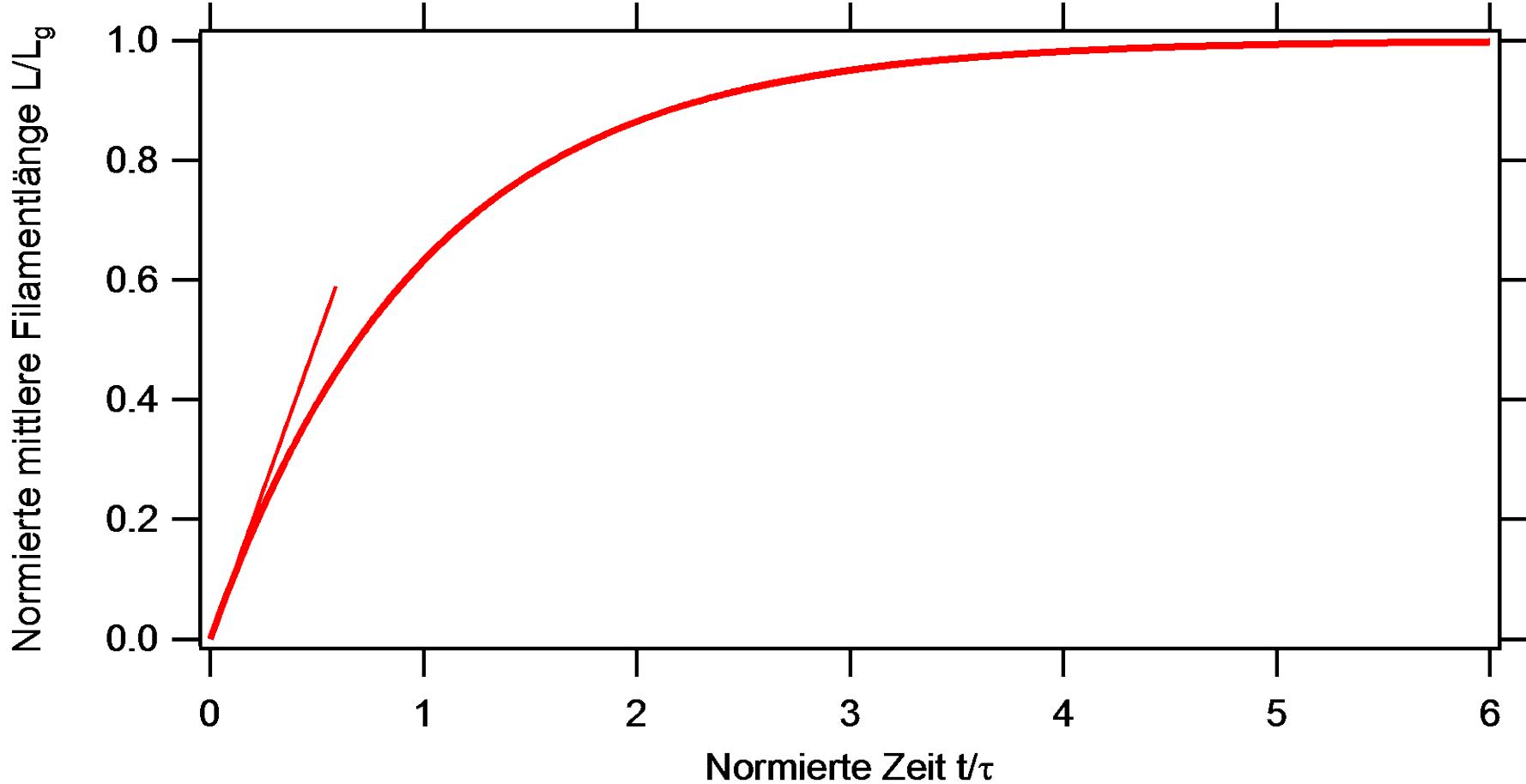


Abb. 12: Mittlere Filamentlänge als Funktion der Zeit. Die Gleichgewichtslänge ist definiert durch $L_g = \frac{aV}{k_{on}M} (k_{on}c_0 - k_{off})$ und die charakteristische Zeitkonstante durch $\tau = \frac{V}{k_{on}M}$. Für kleine Zeiten $t \ll \tau$ wächst das Filament linear mit der Zeit.

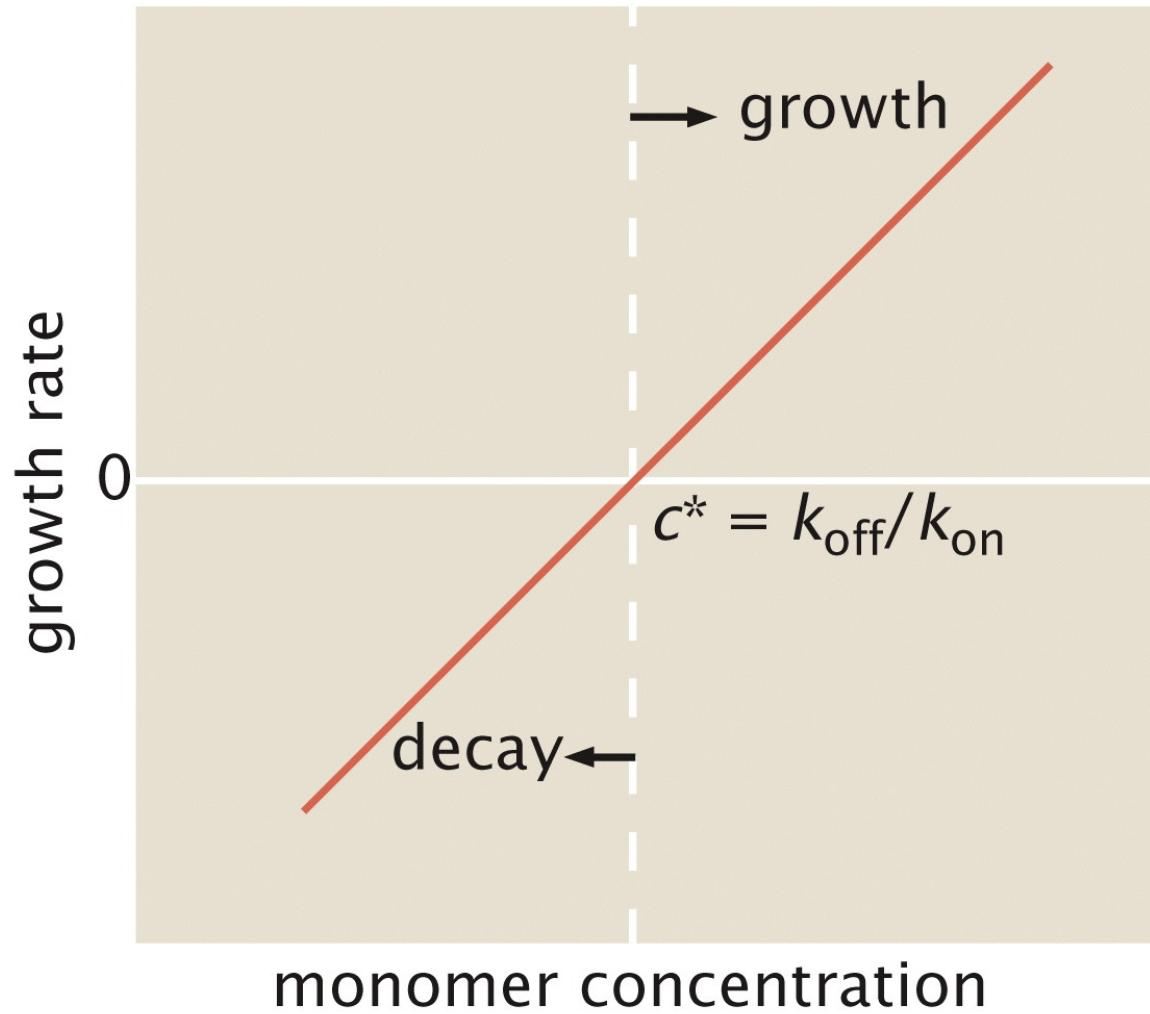


Figure 15.29 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 13: Wachstumsrate von Filamenten als Funktion der Monomerkonzentration. Liegt die Monomerkonzentration oberhalb der kritischen Konzentration $c^* = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, so wachsen die Filamente und liegt sie unterhalb, so schrumpfen sie. [Phillips et al., 2012].

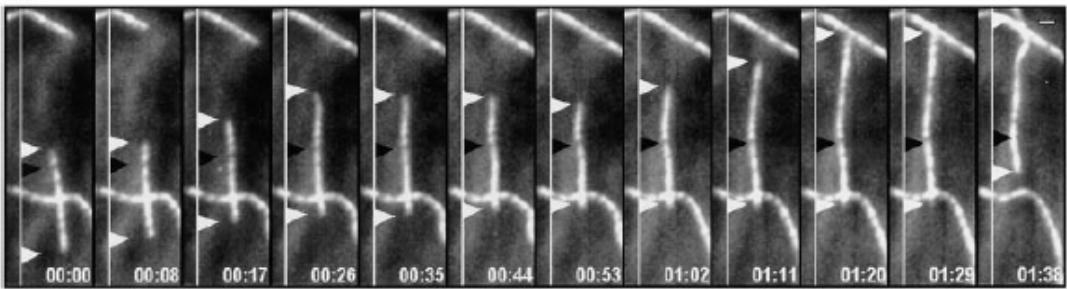
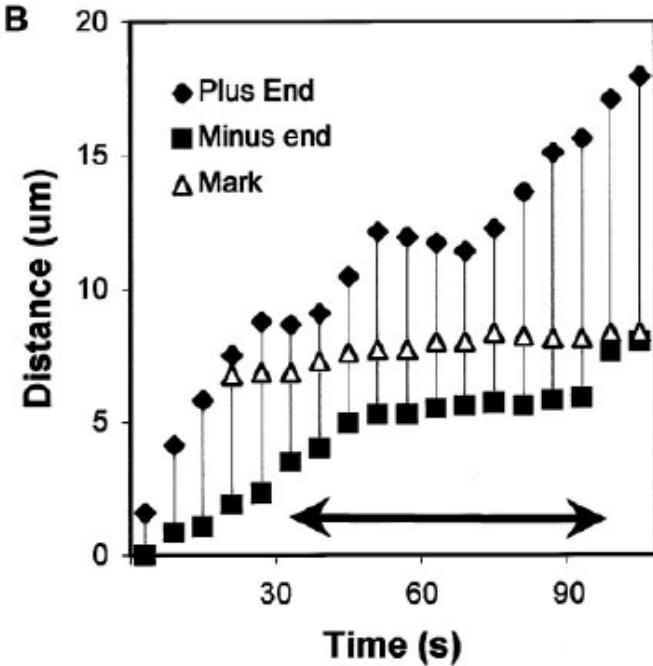
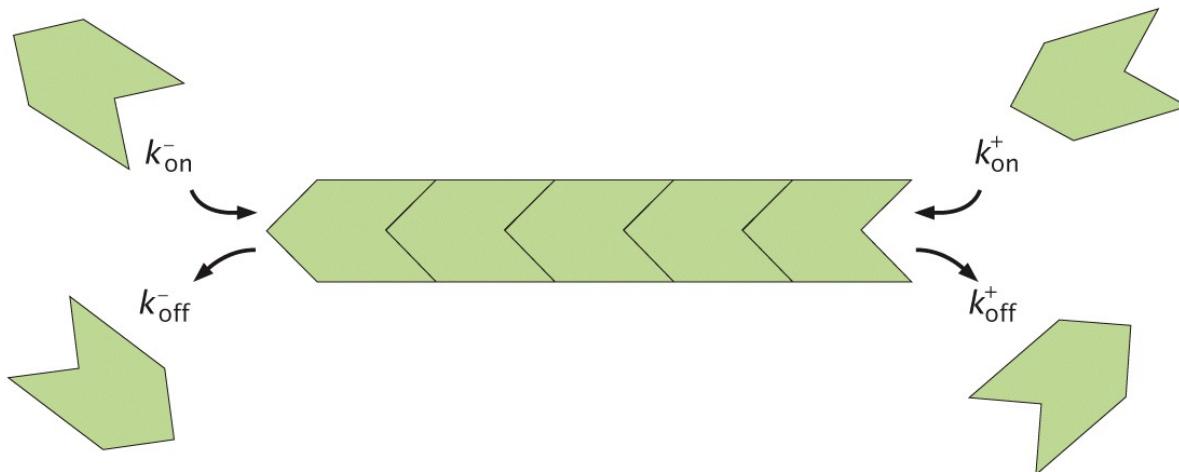
A**B**

Abb. 14: „Treadmilling“ eines fluoreszenzmarkierten Mikrotubulus in einer Zelle.
(A) Der Mikrotubulus sieht aus, als würde er sich von unten nach oben durch die Zelle bewegen. Allerdings erkennt man, dass sich eine nicht-fluoreszierende Stelle („mark“) auf dem Mikrotubulus (schwarzer Pfeil) kaum bewegt. Der Bewegung erfolgt vielmehr durch Polymerisierung am oberen Ende (Plusende) und Depolymerisierung am unteren Ende (Minusende). (B) Positionen der beiden Enden des Filaments und der nicht-fluoreszierenden Stelle des Mikrotubulus als Funktion der Zeit. [Waterman-Storer und Salmon, *J. Cell Biol.* 1997]

(A)

MINUS (POINTED) END

PLUS (BARBED) END



(B)

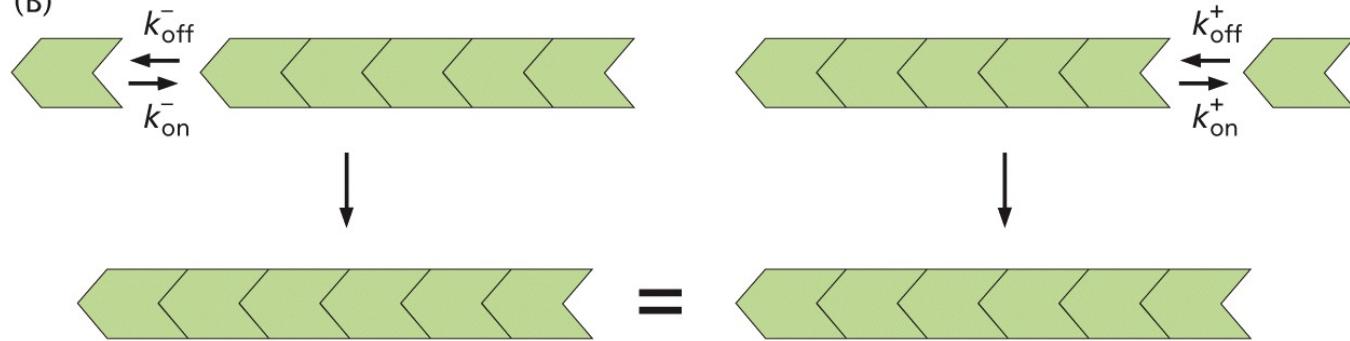


Figure 15.30 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 15: Modell eines Filaments mit unterschiedlichen Polymerisierungsgraten an den beiden Ende. Bei Aktinfilamenten wird das eine Ende „plus end“ bzw. „barbed end“ genannt und das andere Ende „minus end“ bzw. „pointed end“. [Phillips et al., 2012].

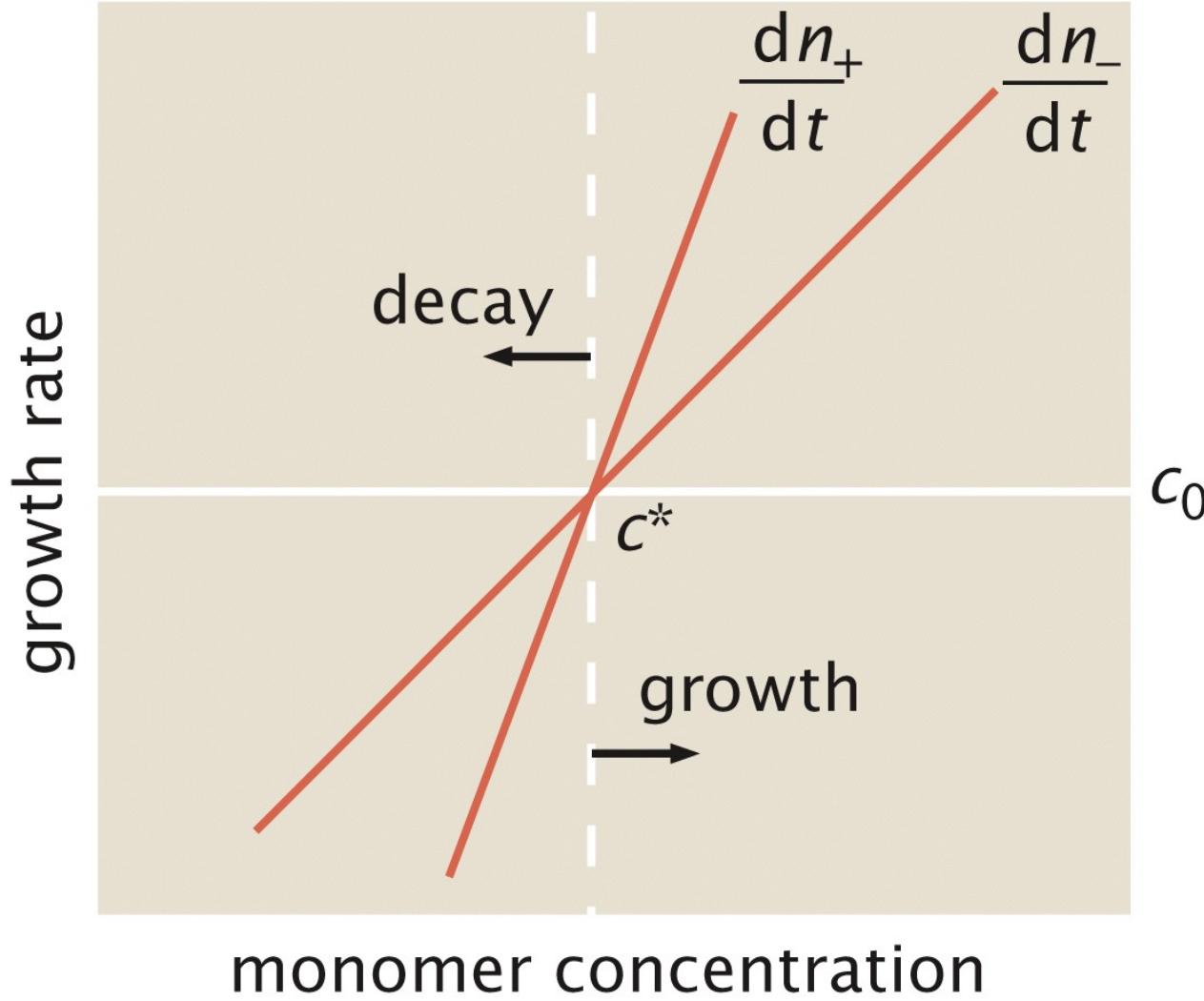


Figure 15.31 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 16: Wachstumsraten für Filamente, bei denen die Polymerisierungs- und Depolymerisierungsraten an beiden Enden des Filaments unterschiedlich sind. Da die kritische Konzentration c^* an beiden Enden gleich ist, findet entweder an beiden Enden Wachstum oder an beiden Enden Schrumpfung statt. [Phillips et al., 2012].

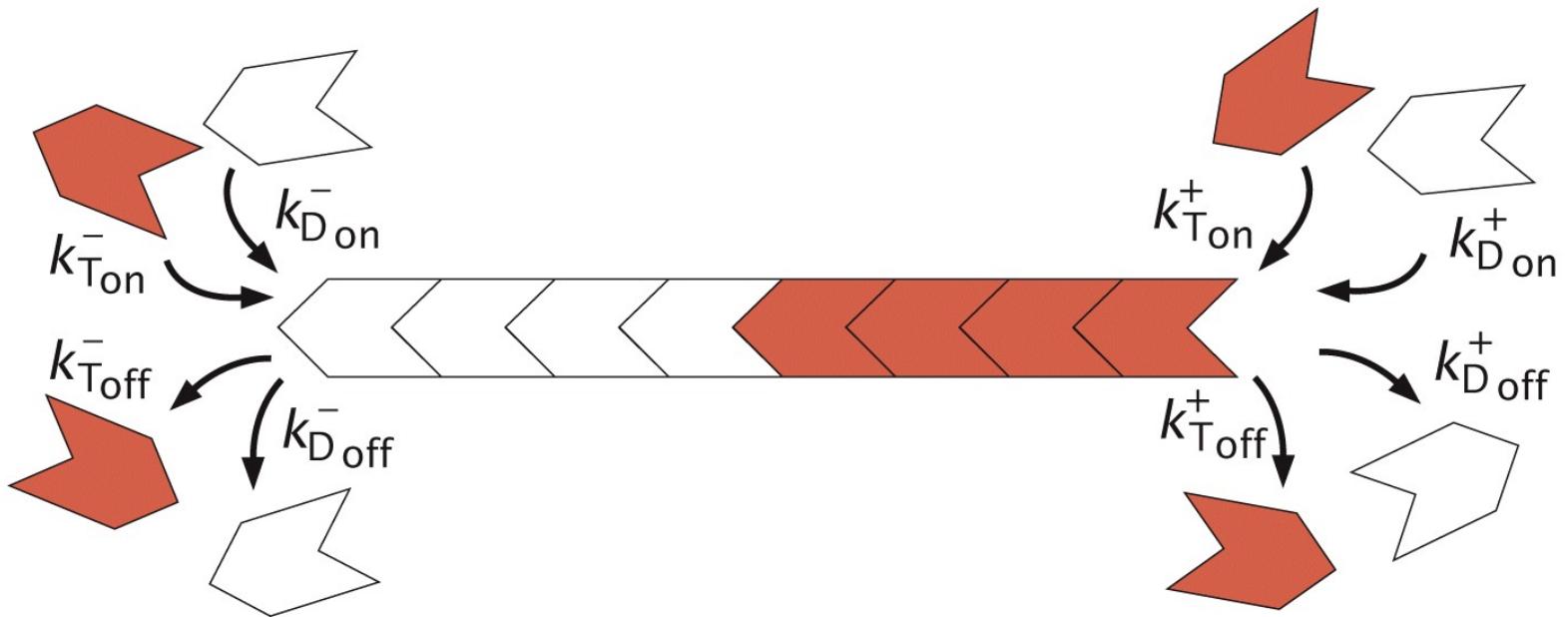


Figure 15.21c Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 17: Modell eines Filaments, bei dem die Raten k_{on} und k_{off} sowohl davon abhängen, an welchem Filamentende sich ein Monomer befindet, als auch davon, ob es an ein Nukleosidtriphosphat (T) oder ein Nukleosiddiphosphat (D) gebunden ist (also z.B. an ATP bzw. ADP). [Phillips et al., 2012]

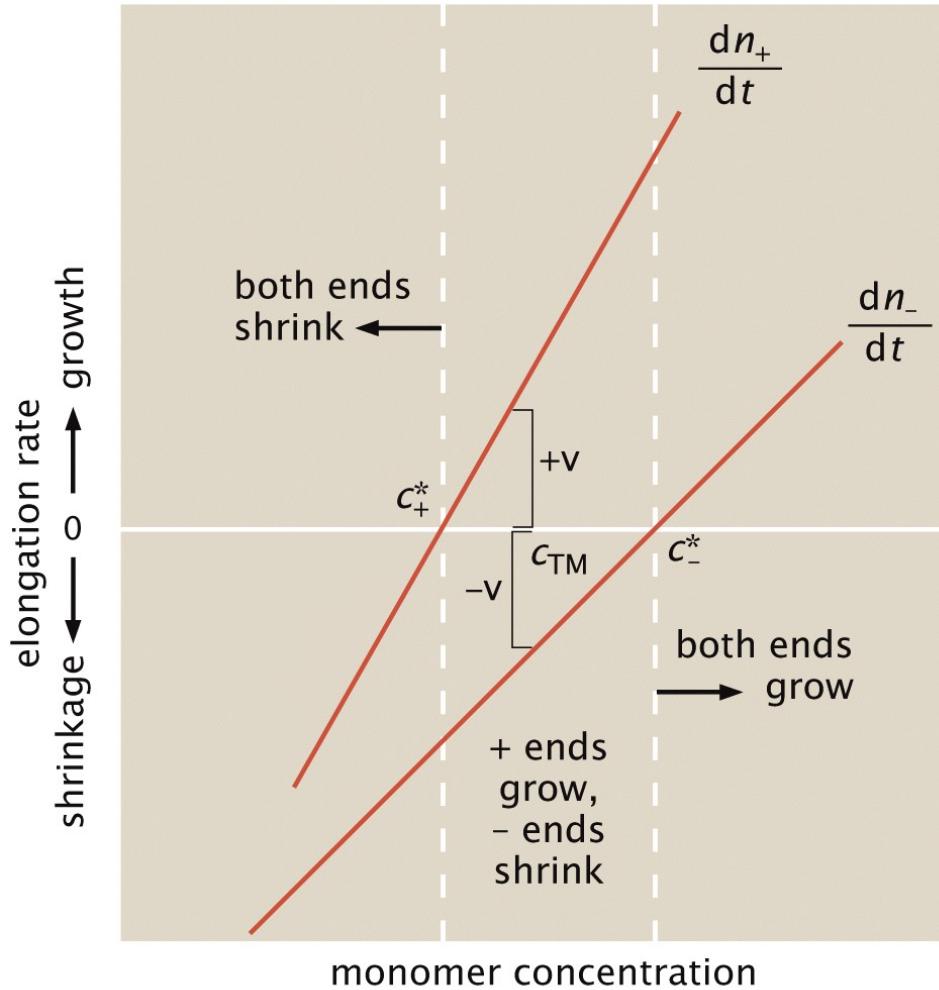
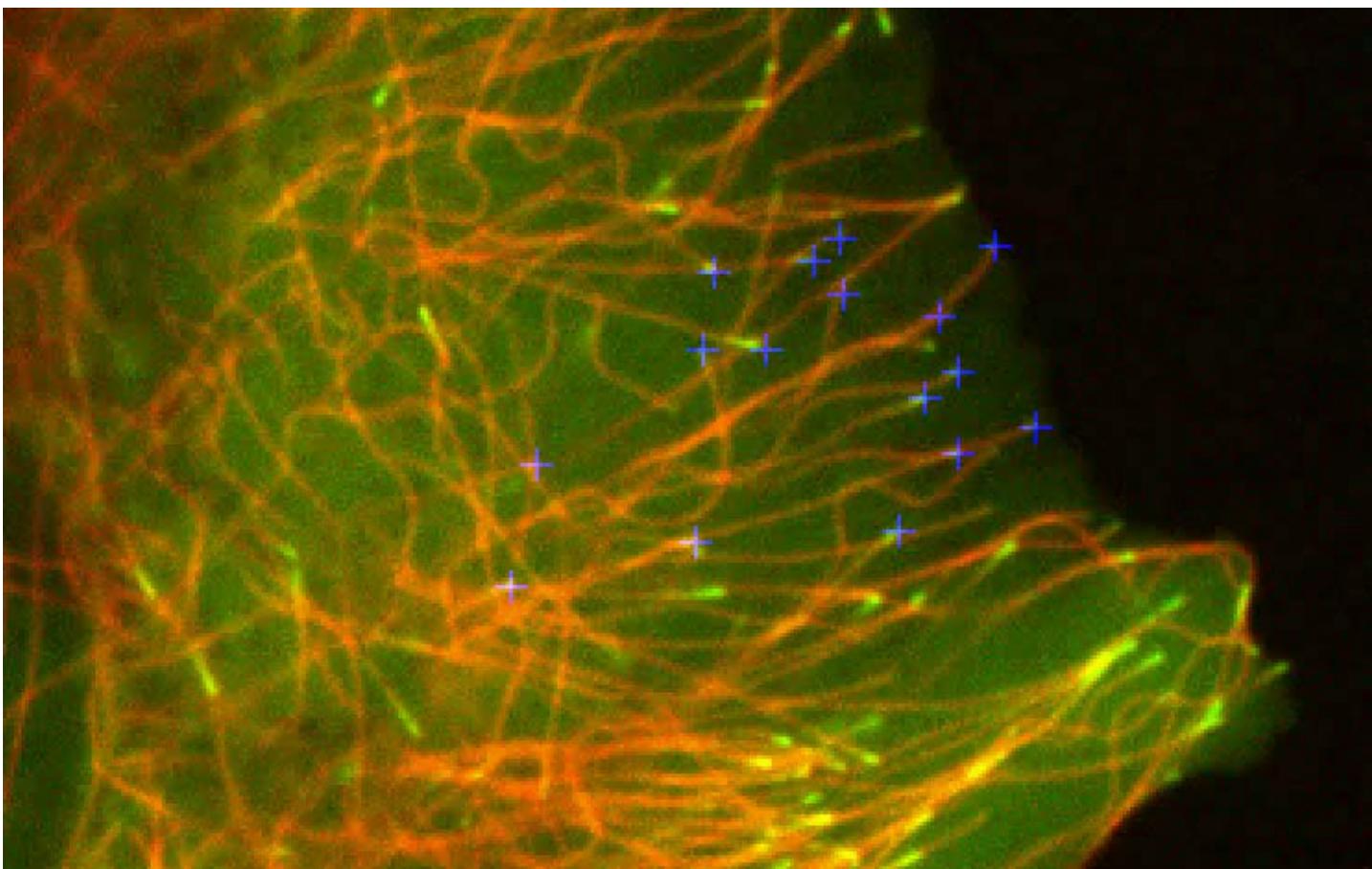


Figure 15.32a Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 18: Wachstumsraten am Plusende und am Minusende eines Filaments in Abhängigkeit der Monomerkonzentration. Sowohl die Raten k_{on} und k_{off} , als auch deren Verhältnis $c^* = k_{off}/k_{on}$ hängen davon ab, an welchem Filamentende sich ein Monomer befindet. Bei der Treadmilling-Konzentration c_{TM} ist die Wachstums geschwindigkeit des Plusendes gleich des Betrages der Schrumpfgeschwindigkeit des Minusendes und es findet daher „Treadmilling“ statt. [Phillips et al., 2012]



Film 2: Untersuchung der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Zelle bei zwei Wellenlängen: Der rote Kanal zeigt Mikrotubuli markiert mit dem fluoreszierenden Protein mCherry und der grüne Kanal zeigt das Protein EB1 markiert mit dem fluoreszierenden Protein EGFP (enhanced-GFP). Das Protein EB1 bindet an das Plusende von Mikrotubuli und kann daher als Polaritätsmarker verwendet werden. Die blauen Kreuze sind das Resultat einer Datenauswertung und zeigen die Positionen der Enden von einigen Mikrotubuli. Der Film wird mit etwa 9.3-facher Geschwindigkeit abgespielt. [Matov et al. *Nature Methods*, 2010]

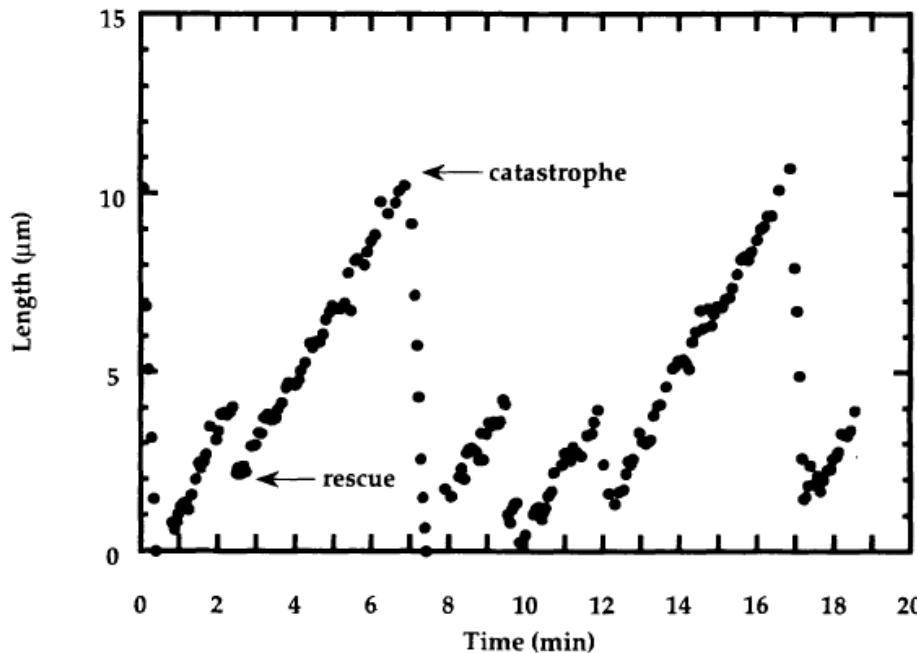


FIG. 1. A typical time series of the length of a single microtubule. The velocities of growth range between 1.6 and 2.3 $\mu\text{m}/\text{min}$ (40–65 dimers/sec), while the velocities of shortening are 10 times faster. The transitions from growth to shortening are called *catastrophes*; transitions from shortening to growth are called *rescues*.

Abb. 19: Längenvariationen eines einzelnen Mikrotubulus. Der Mikrotubulus vollzieht mehrere Wachstumsphasen, die von sehr schnellen Depolymerisierungs-phasen unterbrochen sind. Die Übergänge von der langsameren Wachstums- zur schnelleren Schrumpfungsphase werden auch als „catastrophe“ bezeichnet und die Übergang vom Schrumpfen zum Wachstum als „rescue“. [Fygenson et al., *Phys. Rev. E*, 1994]

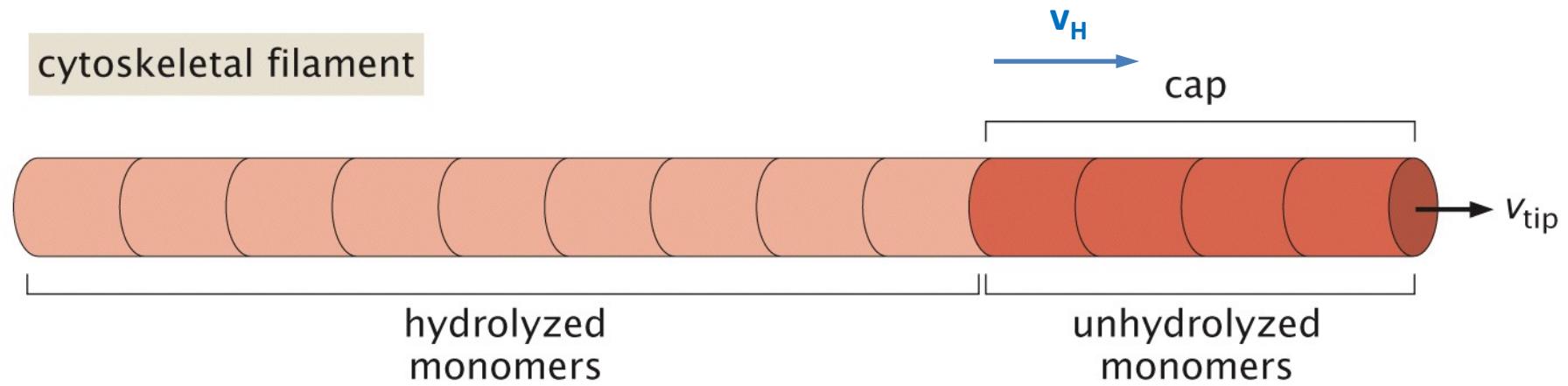
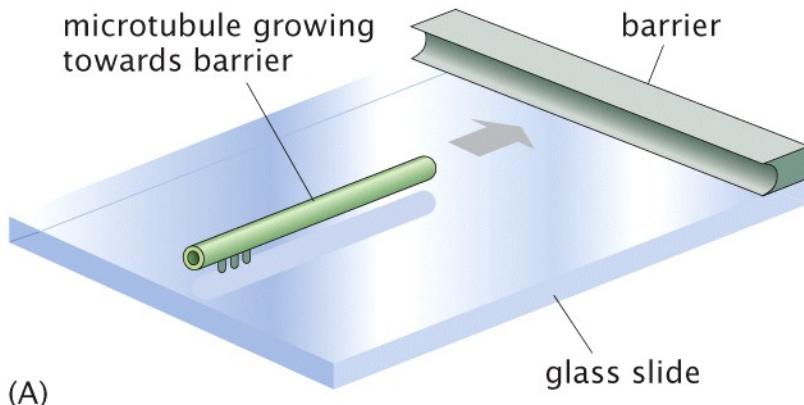
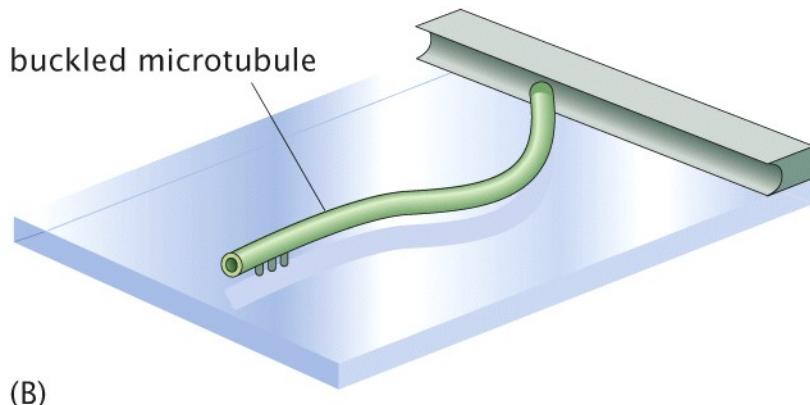


Figure 15.35 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 20: Modell eines Zellskelettfilaments mit einer einer „Kappe“ unhydrolysierte Monomere am Plusende des Filaments und hydrolysierten Monomeren am Minusende. Für den Fall von Mikrotubuli bestünde die Kappe also aus GTP-Tubulin und der Rest des Filaments aus GDP-Tubulin. Die Schnittstelle zwischen diesen beiden Regionen, die „Hydrolysefront“ bewegt sich mit der Geschwindigkeit $v_H = a/\tau_H$ nach rechts. [Phillips et al., 2012]



(A)



(B)

Figure 10.34 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

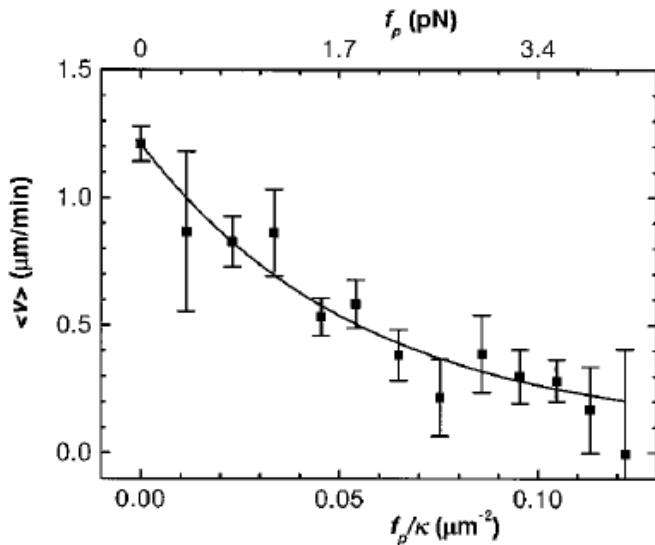


Fig. 4. Average MT growth velocity as a function of force. Velocity and force were obtained from combining data such as shown in Fig. 3A (18). The lower x axis gives the value of the normalized force, f_p/κ . The upper x axis gives the absolute value of the force, based on our measurement of the flexural rigidity. The solid line gives the best fit of the data to an exponential decay.

Abb. 21: Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Mikrotubuli mithilfe mikrostrukturierter Oberflächen. (A) Zu Beginn des Experiments werden die Mikrotubuli an einem Ende an die Oberfläche gebunden. Das andere Ende wächst (polymerisiert) in Richtung einer Barriere. (B) Die Polymerisierungskräfte der Filamente können ausreichen, um die Mikrotubuli zu knicken. Dieses Knicken ermöglicht die Messung der Kräfte, die das wachsende Filament auf die Barriere ausübt. Des weiteren kann gemessen werden, wie die Polymerisierungsgeschwindigkeit von der Gegenkraft der Barriere abhängt (linke Abb.). [Dogterom and Yurke, *Science*, 1997 und Phillips et al., 2012 adaptiert von Dogterom und Yurke]

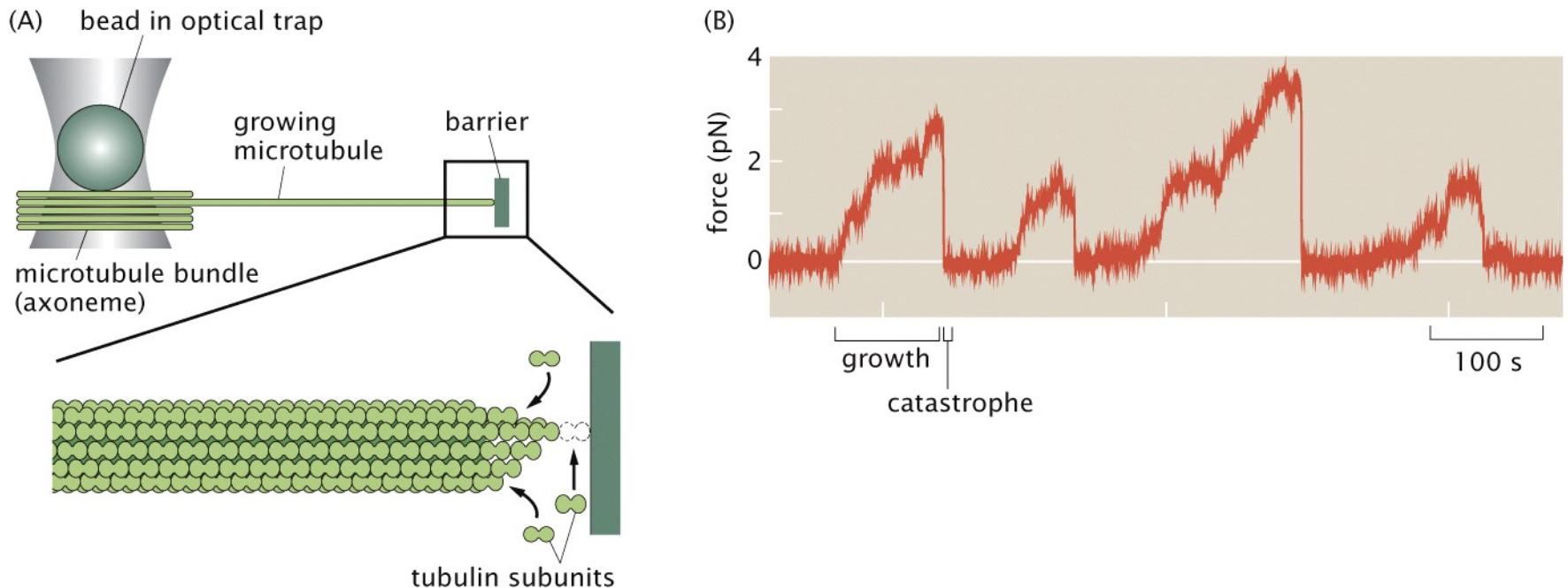


Figure 16.49 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Abb. 22: Messung der Polymerisierungskräfte vom Mikrotubuli mithilfe optischer Pinzetten. (A) Ein Mikrotubuli-Bündel wird an ein optisch gefangenes Kugelchen geheftet. Das andere Ende des Bündels wird in die Nähe einer festen Barriere gebracht. Durch die Zugabe von Tubulin-Monomeren können die Filamente wachsen. Dieses Wachstum drückt das Kugelchen in die entgegengesetzte Richtung aus dem Mittelpunkt der optischen Falle heraus. (B) Eine einzelne Trajektorie der Polymerisierungskraft als Funktion der Zeit lässt Phasen von langsamerem Wachstum und schnellem Schrumpfen der Filamente erkennen. [Phillips et al., 2012, adaptiert von Kerssemakers et al., *Nature*, 2006]