

Zytoskelett: Architektur und Bewegung der Zelle

Cytoskeleton: Architecture and movement of cells

Mandelkow, Eckhard

Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie am DESY, Hamburg

Korrespondierender Autor

E-Mail: mand@mpasmb.desy.de

Zusammenfassung

Die Max-Planck-Gruppe „Zytoskelett“ am DESY in Hamburg befasst sich mit den Proteinfasern der Zelle, speziell den Mikrotubuli und Motorproteinen, die für die Zellbewegung, Zellteilung und Differenzierung wichtig sind. Von besonderer Bedeutung ist hier das Tau-Protein, das bei der Alzheimer-Krankheit in den Nervenzellen aggregiert und ein Merkmal für ihre Degeneration darstellt. Neuere Untersuchungen deuten auf eine Verflechtung der Funktionen des Tau-Proteins mit dem zellulären Transport hin, was für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung wichtig sein könnte.

Summary

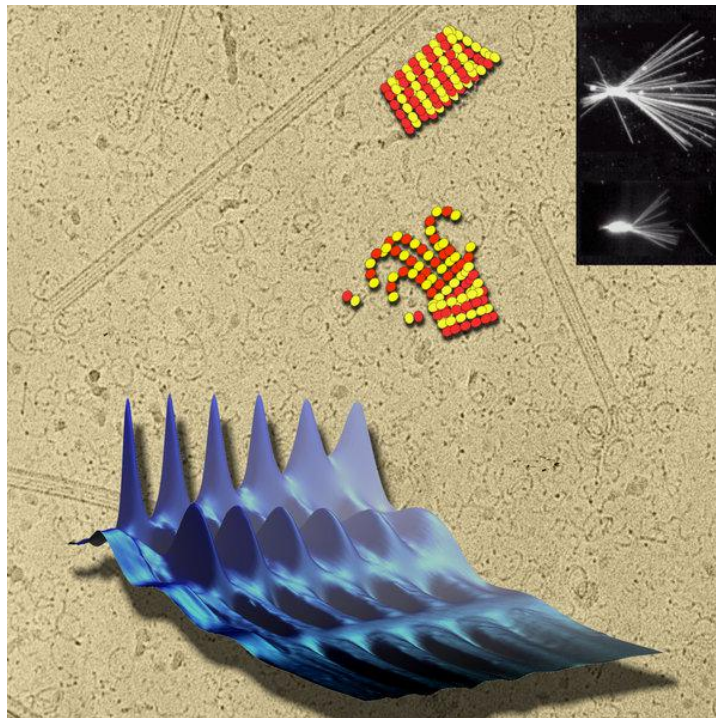
The "Cytoskeleton" group focuses on the structure, self-assembly, and dynamics of protein fibers in cells, in particular on microtubules and their associated proteins which are responsible for cell movement, cell division, cell differentiation, or intracellular transport. One of the microtubule associated proteins, the tau protein, forms typical aggregates in nerve cells affected by Alzheimer's disease. Recent findings reveal a linkage between tau's multiple functions and the cellular transport system which could prove essential for the aetiology of Alzheimer's disease.

Das Zytoskelett ist für die Form der Zellen und ihre Bewegung, für Materialtransport, Zellteilung und Zelldifferenzierung verantwortlich. Es besteht aus drei Fasersystemen: den Aktinfilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli. Diese Fasern können sich aus Protein-Untereinheiten selbstständig auf- und wieder abbauen, das heißt sie sind dynamisch und haben die Fähigkeit der „Selbstorganisation“. Hinzu kommen zahlreiche Proteine, die an die Fasern andocken, sie miteinander verbinden oder Verbindungen mit anderen Zellkomponenten, zum Beispiel der äußeren Zellmembran oder der Kernmembran herstellen können. Eine wichtige Klasse dieser assoziierten Proteine sind die „Motorproteine“. Sie können chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) in mechanische Energie umwandeln und dadurch Lasten transportieren oder verschieben. Die Mikrotubuli werden durch verschiedene „Mikrotubuli-assoziierte Proteine“ (MAP) stabilisiert. Ein bekanntes Beispiel für das Zusammenspiel verschiedener Zytoskelett-Proteine ist die Zellteilung; dabei bilden Mikrotubuli einen Spindelapparat aus, der die Chromosomen mithilfe von Motorproteinen auseinanderziehen kann. Bei den Nervenzellen stellen Mikrotubuli die „Gleise“ für den Transport in den Zellfortsätzen (Axone, Dendriten) dar, wo Lasten über weite Entfernungen zu den Nervenendigungen (Synapsen) geliefert werden müssen.

Diese Vorgänge lassen sich im Reagenzglas oder in Zellmodellen nachstellen und untersuchen. Der Schwerpunkt der Arbeiten der Max-Planck-Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ lag auf der Untersuchung der Selbstorganisation der Mikrotubuli, der Struktur Mikrotubuli-abhängiger Motorproteine, dem Mikrotubuli-assoziierten Tau-Protein und seiner Rolle in der Alzheimer-Krankheit. Dabei wurden biochemische, molekularbiologische, zellbiologische und biophysikalische Methoden kombiniert. Die Intensität der Synchrotronstrahlung erlaubt es, Wachstum und Zerfall von Mikrotubuli in Echtzeit durch Beugung des Röntgenlichts zu verfolgen, Röntgenbilder von sehr kleinen Proben von Alzheimer-Fasern aufzunehmen oder die Struktur von kristallisierten Motorproteinen mit hoher Auflösung zu bestimmen. Die Proteine wurden teils aus Zellgewebe isoliert, teils rekombinant in Bakterienkulturen hergestellt, was die Überprüfung ihrer Funktion durch gezielte Mutationen ermöglicht. Durch Ankoppeln von fluoreszierenden Molekülen und Einschleusen in Nervenzellen untersuchten die Wissenschaftler die Verteilung und die Funktion Mikrotubuli-assoziiierter Proteine *in situ* in lebenden Zellen.

Struktur und Dynamik der Mikrotubuli

Mikrotubuli bilden ein dynamisches Korsett, das sich ständig den wechselnden Anforderungen der Zelle anpasst. Das Nebeneinander von Auf- und Abbau der Mikrotubuli ist typisch für den Zustand von Zellen zwischen zwei Teilungen (**Abb. 1**). Es ist aber auch möglich, alle Mikrotubuli in einer Lösung zu synchronisieren, sodass sie gleichzeitig zwischen Phasen des Wachstums und des Zerfalls hin- und herschwingen. Dies stellt einen biochemischen Oszillator dar, der durch den Verbrauch von energiereichen Phosphatverbindungen (Guanosintriphosphat) in Schwung gehalten wird. In lebenden Zellen werden solche Strukturumwandlungen häufig durch chemische Signalübertragungsketten reguliert. Wenn Tau, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, abgelöst wird (indem eine Phosphatgruppe übertragen wird), werden die Mikrotubuli instabil und zerfallen. Die Protein-Kinase MARK (MAP/Microtubule Affinity Regulating Kinase), die diesen Übergang einleitet, besitzt in manchen pathologischen Zuständen der Zelle eine erhöhte Aktivität.

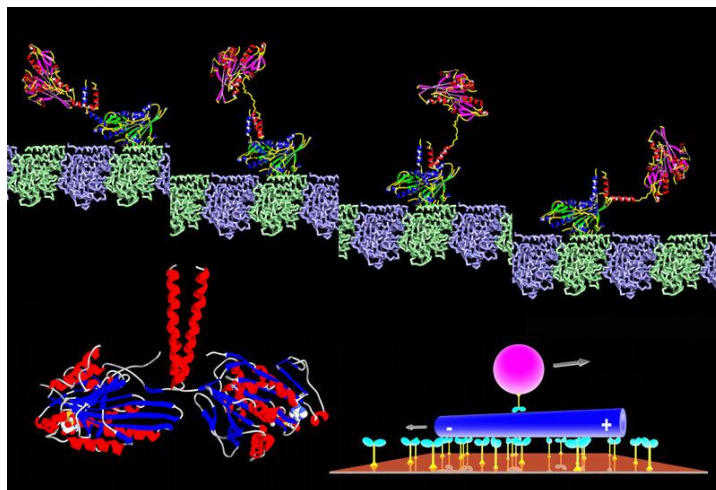


Die Abbildung zeigt im Hintergrund eine Momentaufnahme von Mikrotubuli, die innerhalb einiger Millisekunden eingefroren und so in ihrem Zustand festgehalten wurden (Aufnahme mit Kryo-Elektronenmikroskopie). Wachsende Mikrotubuli haben gerade Enden, während zerfallende Mikrotubuli am Ende gekrümmt und ausgefranst sind (siehe dazu die schematischen Darstellungen in rot und gelb, die den Aufbau der Mikrotubuli aus alpha, beta-Tubulindimeren verdeutlichen). Im Vordergrund unten ist eine Serie von Röntgenbeugungsexperimenten zu sehen, bei denen die oszillierenden Mikrotubuli mit einer zeitlichen Auflösung von einigen Sekunden verfolgt wurden. Aus der Form der Kurven können die Wissenschaftler die Struktur der Zwischenzustände berechnen. Das rechts oben eingefügte Bild zeigt einen „Strauß“ von Mikrotubuli (aufgenommen mit Video-Dunkelfeldmikroskopie), die von einem gemeinsamen Zentrum aus gewachsen sind und durch das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau stabil gehalten werden. Darunter ist der Zustand nach Ablösen des Tau-Proteins durch Phosphorylierung zu sehen.

© Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie

Struktur und Funktion des Motorproteins Kinesin

Das so genannte „konventionelle Kinesin“, der Hauptvertreter der Kinesine, besteht aus zwei schweren und zwei leichten Peptidketten. Jede der beiden schweren Ketten hat eine etwa 350 Aminosäuren umfassende globuläre „Motordomäne“ (**Abb. 2**, links unten). Diese Motordomänen binden an die Oberfläche der Mikrotubuli und wandeln chemische Energie in Form energiereicher Moleküle (ATP) in gerichtete Bewegung um. Obwohl die Moleküle nur wenige Nanometer Durchmesser haben, kann man die Bewegung mithilfe der Videomikroskopie in Echtzeit sichtbar machen (**Abb. 2**, links unten). Dazu bringt man einen „Rasen“ von Motorproteinen auf einem Mikroskopierglas auf und lässt einen Mikrotubulus (violett) darübergleiten, oder man belädt ein Vesikel (rosa) mit einem Motor und lässt es am Mikrotubulus in Pfeilrichtung entlangwandern.



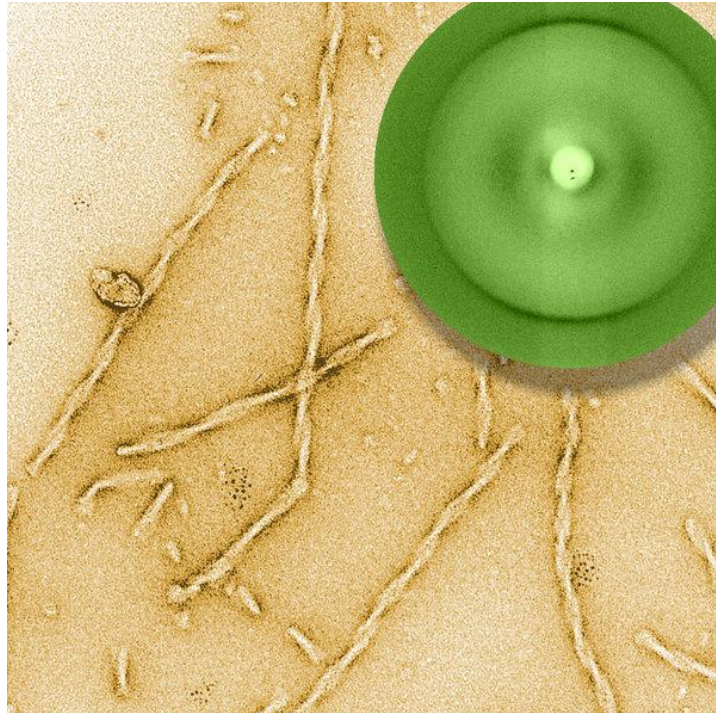
Das Strukturmodell links unten zeigt einen doppelköpfigen Protein-Komplex, bei dem die beiden Köpfe die Funktion der „Motoren“ übernehmen; sie sind durch eine „Deichsel“ miteinander verbunden (doppelte alpha-Helix, rot). Der obere Bildteil veranschaulicht, wie die beiden Motor-Köpfe des Kinesins auf einem Mikrotubulus entlangwandern, indem sie abwechselnd an die Tubulin-Untereinheiten (blau/grün) andocken. (Der Übersichtlichkeit halber ist nur ein Protofilament des Mikrotubulus dargestellt; es ist hier treppenförmig unterbrochen, um verschiedene Phasen der Bewegung zu unterscheiden.) Damit wird eine Last von links nach rechts gezogen (am oberen Ende der Doppelhelix, hier nicht gezeigt). Das Modell rechts unten illustriert die beiden Möglichkeiten, wie die von Motorproteinen hervorgerufene Bewegung beobachtet werden kann.

© Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie

Entsprechend ihrer grundlegenden Funktion für die „Infrastruktur“ der Zelle spielen Proteine des Zytoskeletts bei verschiedenen Krankheitsprozessen eine Rolle [1]. So besteht die Krebs-Krankheit aus einer unkontrollierten Teilung von Zellen. Die Wirkung einiger Zytostatika beruht darauf, die Mikrotubuli oder Motorproteine der Teilungsspindel zu vergiften, sodass sich die Krebszellen nicht mehr teilen können.

Anomale Aggregation des Tau-Proteins

Krankhafte Veränderungen des Tau-Proteins spielen unter anderem bei der Alzheimer-Demenz eine Rolle, weil dort das Zytoskelett zusammenbricht, sodass das Tau-Protein zu unlöslichen Fasern verklumpt [2]. Es bilden sich die „paarigen helikalen Filamente“ der Alzheimerkrankheit, die die Nervenzellen verstopfen und sie absterben lassen.

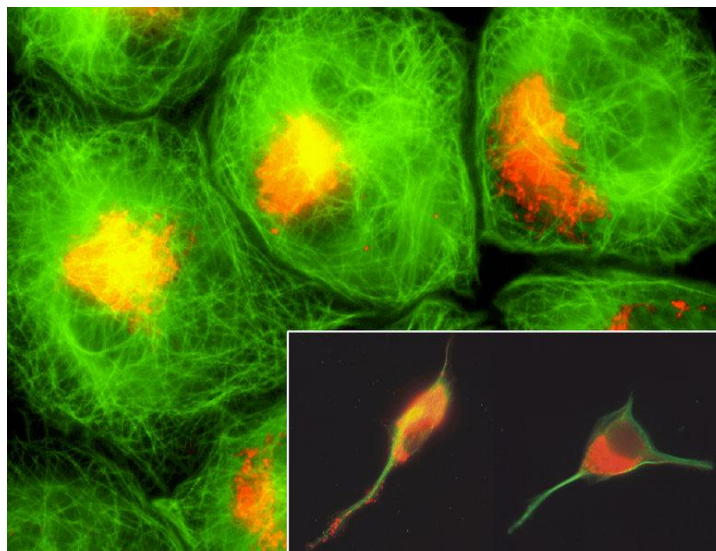


Künstliche paarige helikale Filamente. Die Abbildung zeigt im Hintergrund (gelb) eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Tau-Proteinfasern mit einer typischen Schraubenstruktur: charakteristisch für Ablagerungen in Nervenzellen, die in der Alzheimer-Krankheit langsam aber unaufhaltbar absterben. Das Röntgenbeugungsbild rechts oben (grün) zeigt anhand der typischen Abstände und der unterschiedlichen Intensitätsverteilungen der Ringe, dass das anomale Tau-Protein eine neue Struktur annimmt (das sog. beta-Faltblatt), die stark zur Vernetzung mit anderen Proteinen neigt.
© Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie

Die „paarigen helikalen Filamente“ bestehen weitgehend aus dem Tau-Protein, das seine normale Funktion der Stabilisierung der Mikrotubuli-Transportschienen verloren hat. Der eigentliche Auslöser der pathologischen Entartung von Tau-Protein ist noch unbekannt, aber es konnten in den letzten Jahren einige strukturelle Eigenschaften der anomalen Tau-Fasern aufgeklärt werden (**Abb. 3**) und es ist inzwischen möglich, die Umwandlung von normalem zu pathologischem Tau-Protein im Reagenzglas zu vollziehen [3]. Damit kann der molekulare Prozess systematisch untersucht werden und die Forscher können jetzt gezielt nach Substanzen suchen, die die Entartung von Tau-Protein aufhalten oder rückgängig machen.

Einfluss des Tau-Proteins auf das zelluläre Transportsystem

Die Suche nach Bedingungen, die für das allmähliche Absterben von Nervenzellen in der Alzheimerkrankheit verantwortlich sein könnten, führt unter anderem auf einen Defekt im zellulären Transportsystem hin. Es scheint, dass das Tau-Protein nicht nur Mikrotubuli (die Gleise des Transports) stabil hält, sondern sie auch „verklebt“ und damit unbrauchbar machen kann [4]. Das Ergebnis ist, dass die vom Zellinneren nach außen gerichteten Transportvorgänge gestört werden, sodass die äußeren Bereiche der Zelle unterversorgt bleiben (**Abb. 4**).



Das große Bild zeigt Zellen, bei denen Tau-Protein mit einem grünen Fluoreszenz-Farbstoff ("green fluorescent protein", GFP) im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht ist; man sieht deutlich die Anlagerung an die faserförmigen Mikrotubuli der Zelle. Der gelbe Bereich im Zentrum besteht aus einer Ansammlung von Mitochondrien. Normalerweise müssten diese Organellen gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt sein, aber wegen des defekten Transportsystems bleiben sie im Inneren liegen. Das kleine Bild zeigt zwei Nervenzellen. Im normalen Zustand (links) sind die Mitochondrien in der gesamten Zelle verteilt. Bei Überexpression des Tau-Proteins wird der zelluläre Transport behindert und die Mitochondrien sammeln sich im Zellkörper an.

© Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie

Wird das Transportsystem durch eine Fehlfunktion des Tau-Proteins beeinträchtigt, dann können die Mitochondrien, die „Kraftwerke“ der Zelle, nicht mehr in die Zellfortsätze einwandern, sondern bleiben im Zellkörper liegen. Besonders deutlich wird dies bei Nervenzellen (**Abb. 4**, kleines Bild). Im normalen Zustand sind die Mitochondrien überall im Zellkörper und in den langen Zellfortsätzen verteilt, sodass die Zelle gleichmäßig mit Energie versorgt wird. Bei Störung des Transportsystems durch eine Fehlfunktion des Tau-Proteins bleiben die Mitochondrien im Zellkörper liegen, was zu einer Unterversorgung der Zellfortsätze, zum Absterben der Synapsen und schließlich zum Tod der ganzen Nervenzelle führt.

[1] **Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow:**

Kinesin motors and disease

Trends in Cell Biology **12**, 585-591 (2002).

[2] **Mandelkow, E.M., K. Stamer, R. Vogel, E. Thies and E. Mandelkow:**

Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses

Neurobiology Aging **24**, 1079-1085 (2003).

[3] **Barghorn, S., P. Davies and E. Mandelkow:**

Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled in vitro are based on beta-structure in the core domain

Biochemistry **43**, 1694-1703 (2004).

[4] **Mandelkow, E. M., E. Thies, B. Trinczek, J. Biernat and E. Mandelkow:**

MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons

Cell Biology **167**, 99-110 (2004).