

Zellteilung

Centrosomen und Zytokinese bei *Dictyostelium discoideum*

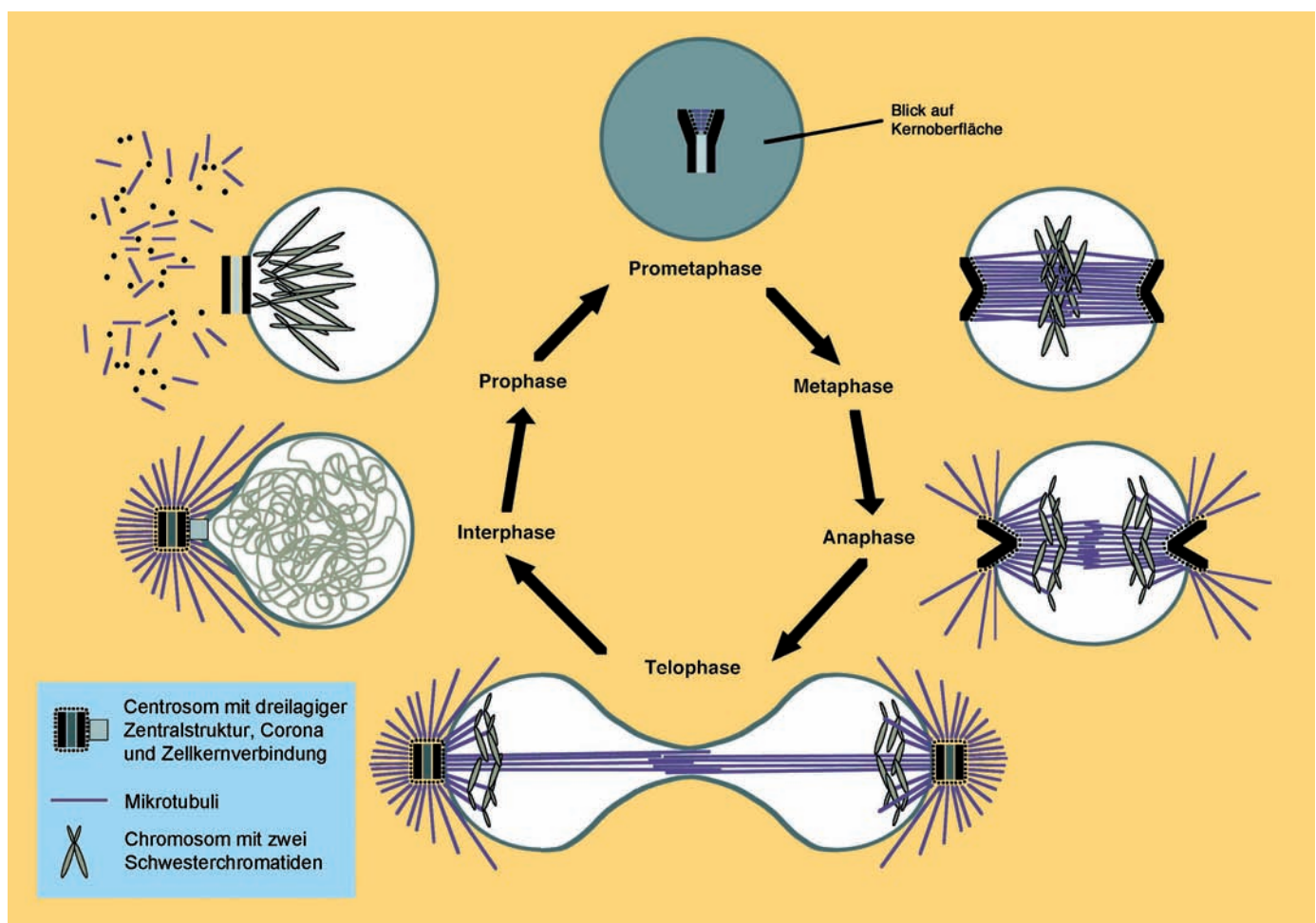
ANNETTE MÜLLER-TAUBENBERGER¹, RALPH GRÄF²

¹INSTITUT FÜR ANATOMIE UND ZELLBIOLOGIE, LMU MÜNCHEN

²INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND BIOLOGIE, ABTEILUNG ZELLBIOLOGIE, UNIVERSITÄT POTSDAM

Die Zellteilung ist ein zeitlich und räumlich streng koordinierter Vorgang. Unsere Arbeiten zielen auf ein besseres Verständnis dieses Prozesses, insbesondere im Hinblick auf die Rolle des Centrosoms, die Funktion des Zytoskeletts und die an der Zytokinese beteiligten regulatorischen Komponenten.

Cell division is a temporarily and spatially highly coordinated process. Our work aims at a better understanding of this process, in particular with respect to the role of the centrosome, the function of the cytoskeleton and the regulatory components involved in cytokinesis.



▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der Centrosom-Duplikation und Kernteilung bei *Dictyostelium*. Die Centrosom-Duplikation beginnt in der Prophase. Die aus den beiden äußeren Lagen der Zentralstruktur des Centrosoms hervorgegangenen mitotischen Centrosomen organisieren eine zentrale Spindel mit Pol-zu-Pol-Mikrotubuli und Kinetochor-gebundenen Mikrotubuli. Im Laufe des Faltungsprozesses der mitotischen Centrosomen wird je ein komplettes Centrosom pro Tochterkern regeneriert (verändert aus Gräf *et al.*, *Int Rev Cytol* (2004) 241:155–202).

■ Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden von dem deutschen Zellbiologen Walther Flemming wichtige Beobachtungen zur Zellteilung gemacht und die Verteilung des Chromatins beschrieben. Nur wenig später beschrieb Theodor Boveri die „Chromosomenindividualität“ und erkannte das Centrosom als Zellteilungsorganell. Zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen der Zellteilung und ihrer Regulatoren dienen heute neben verschiedenen Modellsystemen höherer Eukaryoten auch die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sowie die Amöbe *Dictyostelium discoideum*. *Dictyostelium*-Zellen ähneln sehr stark amöboiden Säugerzellen wie beispielsweise neutrophilen Granulozyten. *Dictyostelium* lässt sich im Labor leicht in großer Zellzahl kultivieren und eignet sich nicht nur für biochemische, sondern auch für molekulargenetische und mikroskopische Experimente. Insbesondere Live Cell Imaging-Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Proteinen haben *Dictyostelium* zu einem attraktiven Modellsystem für zellbiologische Fragestellungen gemacht.

Centrosomen und Spindelbildung

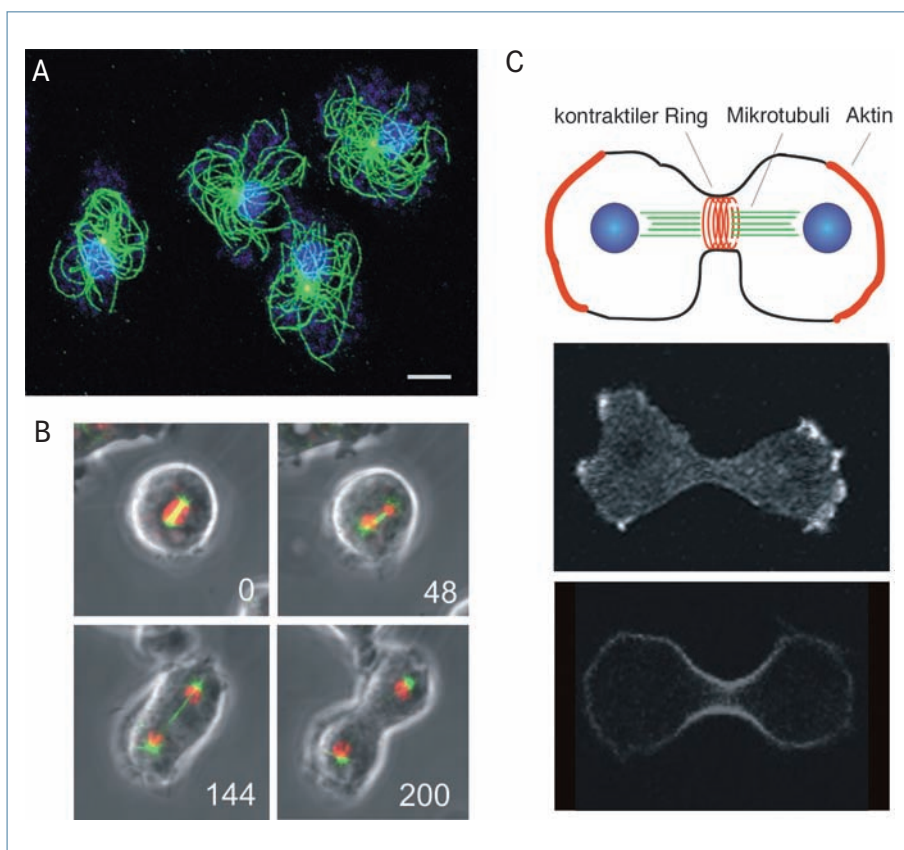
Das Centrosom ist ein nicht von Membranen umschlossenes Organell, das vor allem durch seine Funktion als Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) bei Tieren, Pilzen und niederen Eukaryoten bekannt ist. Es spielt eine Schlüsselrolle bei allen Mikrotubuli-abhängigen Prozessen wie der Organellenpositionierung und damit der Zellarchitektur oder der Organisation der Kernteilungsspindel. Auch die der Kernteilung (Mitose) folgende Zellteilung (Zytokinese) und die Passage der Zelle über einen noch nicht näher charakterisierten Checkpoint in der G_1 -Phase wird vom Centrosom gesteuert [1]. Mit einer Größe von einem halben bis

einem Mikrometer stellt es den größten Proteinkomplex einer eukaryotischen Zelle dar. Somit verwundert es auch nicht, dass isolierte Centrosomen in massenspektrometrischen Analysen ein Inventar in der Größenordnung von 100 verschiedenen Proteinen aufweisen. Eine besondere Eigenschaft des Centrosoms ist, sich genau einmal pro Zell-

zyklus zu verdoppeln. Diese Verdoppelung ist Voraussetzung für die Ausbildung des bipolaren Spindelfaserapparats bei der Mitose, in welcher die Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen erfolgt.

Aufgrund neuerer Forschungen zur acentrosomalen Spindelbildung geht man inzwischen davon aus, dass die Centrosomen

die Spindelbildung meist nicht allein organisieren, denn es wurde erkannt, dass auch die Chromosomen in Zusammenarbeit mit Chromatin-assoziierten Spindelbildungsfaktoren, Kinesinen und Dynein in der Lage sind, bipolare Spindeln zu organisieren. Auch wenn das Ausmaß des Anteils acentrosomaler und centrosomaler Mechanismen bei der Spin-



▲ **Abb. 2:** Interphase und Zellteilung bei *Dictyostelium*-Zellen. **A**, Immunfluoreszenz-Dekonvolutionsmikroskopie von fixierten *Dictyostelium*-Zellen mit Immunfärbung gegen Mikrotubuli (grün) und dem centrosomalen Markerprotein DdCP224 (rot). Die Centrosomen erscheinen in der gezeigten Überlagerung der Farbkanäle wegen ihrer Ko-Lokalisation mit Mikrotubuli gelb. Die DAPI-gefärbten Zellkerne sind blau dargestellt. Maßstab: 2 μ m. (Abbildung: R. Gräf, www.dictybase.org). **B**, Späte Mitosestadien und Zytokinese. Durch Expression von RFP-Histon 2b und GFP- α -Tubulin werden Chromosomen (rot) und Spindel (grün) sichtbar gemacht. Die Einschnürung des Zellkörpers erfolgt erst in der späten Telophase, Zeitverlauf in Sekunden. **C**, Schematische Darstellung der Beteiligung des Aktinzytoskeletts. Aktin findet sich an den Zellpolen und ist an der Bildung des kontraktiven Rings beteiligt (oben). Aktin-bindende Proteine, wie z. B. Aip1 (*actin-interacting protein 1*), lokalisieren an den Zellpolen (Mitte) oder in der Teilungsfurche, wie Cortesillin (unten). Die Visualisierung erfolgt durch Expression GFP-markierter Fusionsproteine.

delbildung sicher Zelltyp-abhängig ist, besteht kein Zweifel, dass das Vorhandensein überzähliger Centrosomen aufgrund fehlerhafter Centrosom-Duplikation oder Zellteilung die Ausbildung multipolarer Spindeln und inäquatoriale Chromosomensegregation begünstigt. Da überzählige Centrosomen ein Charakteristikum von Tumorzellen sind, ist die Biogenese von Centrosomen und deren Regulation von besonderem Interesse.

Die Morphologie von Centrosomen unterscheidet sich in unterschiedlichen Gruppen von Organismen grundlegend. Centrosomen in Tieren und allen übrigen Organismen mit Zilien oder Flagellen sind durch den Besitz eines Centriolen-Paares charakterisiert. Centriolen sind Hohlzylinder aus Mikrotubuli, die in eine pericentrioläre Proteinmatrix ein-

gebettet sind, die reich an Mikrotubuli-Nukleationskomplexen ist. Davon zu unterscheiden sind die morphologisch variantenreichen acentriolären Centrosomen von Pilzen und niederen Eukaryoten, wie z. B. der Spindelkörper der Bäckerhefe oder das *Dictyostelium*-Centrosom. Da der Großteil der centrosomalen Proteine keine katalytische Aktivität besitzt, ist der Vergleich von Centrosomen in Organismen mit unterschiedlichen centrosomalen Strukturen ein sinnvoller Ansatz zur Erforschung der universellen Funktionen.

Das *Dictyostelium*-Centrosom setzt sich zusammen aus einer schachtelförmigen, geschichteten Zentralstruktur mit drei Hauptschichten und einer lockereren Proteinschicht, der Corona, welche die dreilagige Zentralstruktur umschließt (**Abb. 1**). Wie bei

allen vegetativen Zellen ist das Centrosom stets eng mit dem Zellkern assoziiert und befindet sich auf dessen zytosolischer Seite (**Abb. 2A**). Diese Assoziation beruht auf einer Verbindung des Centrosoms über beide Membranen der Kernhülle hinweg mit den als Cluster vorliegenden Centromeren auf der Kerninnenseite. Sie wird unter anderem von dem in beiden Kernhüllenmembranen vorliegenden Protein Sun1 vermittelt und besteht über den gesamten Zellzyklus hinweg. In die Corona sind die γ -Tubulin-haltigen Mikrotubuli-Nukleationskomplexe und weitere bei der Mikrotubuli-Dynamik beteiligte Proteine eingebettet. Anders als bei Centriol-haltigen Centrosomen ist die Centrosom-Duplikation nicht mit der S-Phase, sondern mit dem Übergang zur M-Phase synchronisiert. Sie beginnt mit dem Dissoziieren der Corona und der Depolymerisation aller Mikrotubuli. Die sich replizierende Struktur stellt nun die Zentralstruktur dar, die den Centriolen bzw. der mittleren Lage des Bäckerhefe-Spindelkörpers entspricht [2]. Die beiden mitotischen Centrosomen, die jeweils aus den äußeren Lagen der Zentralstruktur hervorgegangen sind, befinden sich während der Mitose in je einem Fenster (Fenestra) der Kernhülle eingebettet. Die Kernhülle wird bei dieser geschlossenen Form der Mitose nicht aufgelöst.

Inzwischen konnten durch verschiedene Techniken, allen voran der massenspektrometrischen Analyse isolierter Centrosomen, etwa 40 verschiedene centrosomale und Centrosom-assoziierte Proteine von *Dictyostelium* molekular und teilweise auch funktionell eingehender charakterisiert werden [3]. Besonders interessant sind hier Proteine, deren Manipulation zu Störungen der Centrosom-Duplikation, der Spindelbildung oder der Assoziation mit dem Zellkern führen (**Abb. 3A, B**). Zum Beispiel induziert die regulierbare Überexpression des Coronaproteins DdCP224 die reversible Bildung überzähliger Centrosomen. Ähnlich wie Krebszellen mit überzähligen Centrosomen, die Mechanismen entwickelt haben, um schwerwiegende Fehler während der Chromosomensegregation aufgrund multipolarer Spindeln weitestgehend zu verhindern, sind *Dictyostelium*-Zellen in der Lage, die Zahl überzähliger Centrosomen zu reduzieren.

Die Rolle des Zytoskeletts bei der Zytokinese

Unmittelbar nach Abschluss der Mitose, die für die Aufteilung des genetischen Materials auf die Tochterzellen sorgt, erfolgt die Zyto-

kinese, welche durch eine Einschnürung des Zellkörpers und die Bildung der Tochterzellen gekennzeichnet ist (**Abb. 2B**). Durch genetische Studien konnten in *S. pombe* insgesamt 130 an der Zytokinese beteiligte Proteine identifiziert werden [4]. Auch für eine Reihe von Zytoskelettproteinen wurde ihre funktionelle Beteiligung bei der Zellteilung nachgewiesen [5]. Hier waren unter anderem auch Arbeiten an gentechnisch veränderten Mutanten von *Dictyostelium* richtungweisend und haben die Bedeutung spezifischer und zum Teil hoch konservierter Komponenten des Aktinzytoskeletts für die Zellteilung nachgewiesen.

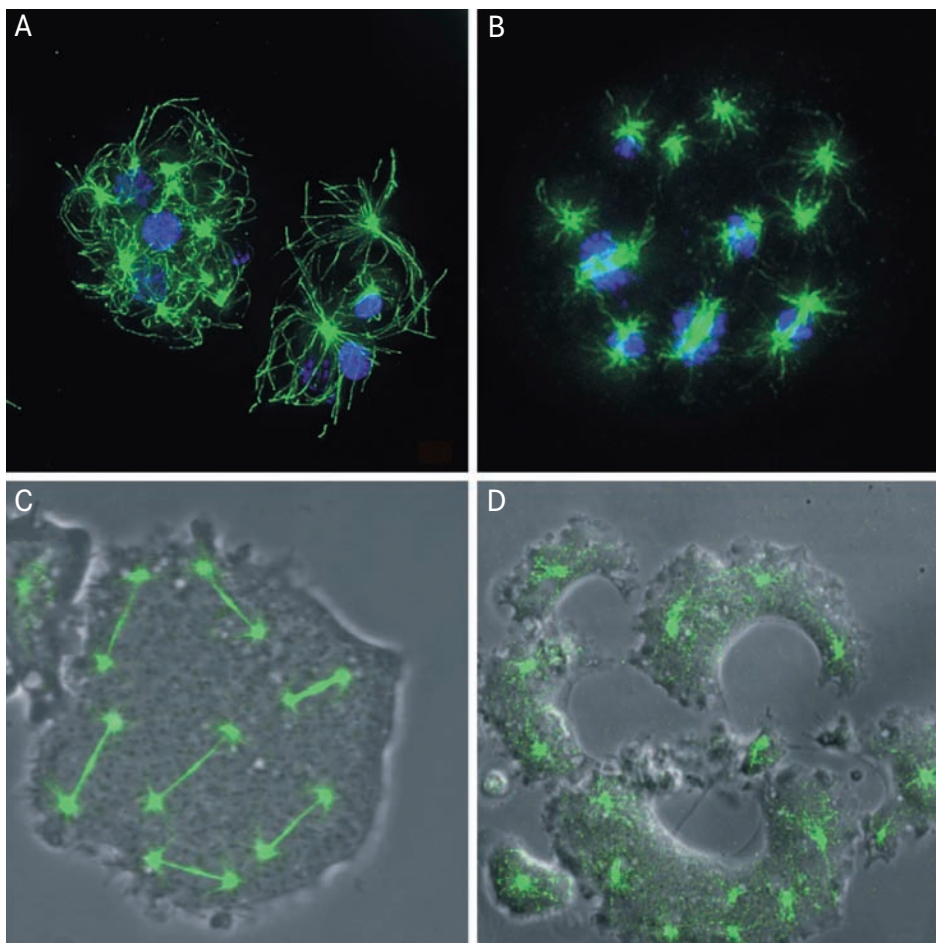
Die Zytokinese lässt sich in folgende Abschnitte gliedern: (1) die Positionierung der Teilungsfurche, (2) die Ausbildung eines kontraktiven Aktin-Myosin-Rings, (3) die Einschnürung und Disassemblierung des kontraktiven Rings und (4) die Trennung der Tochterzellen durch Membranfusion. Bei *Dictyostelium* und bei tierischen Zellen sind Mikrotubuli an der Festlegung der Teilungsfurche beteiligt. Dabei positioniert die mito-

tische Spindel die Teilungsfurche in der Mitte der longitudinalen Spindelachse im Bereich der sogenannten *midzone*. Die *midzone* ist der Bereich, in dem Nicht-Kinetochor-Mikrotubuli beider Spindelpole während der Anaphase überlappen. Die mitotische Spindel sendet zwei aufeinanderfolgende Signale aus, welche für die Positionierung der Teilungsfurche bedeutend sind [6]. Die astralen Mikrotubuli, die den Kontakt zwischen den Spindelpolen und dem Zellcortex herstellen, vermitteln ein erstes Signal, die *midzone* ein zweites; diese Signale beeinflussen sich gegenseitig und steuern Prozesse, die zur Einschnürung des Zellcortex führen.

Der Mechanismus der Zellteilung mittels eines kontraktiven Rings aus Aktin, Myosin II und weiteren assoziierten Proteinen (**Abb. 2C**) muss sich bereits vor Millionen von Jahren in einem gemeinsamen Vorfahren von Pilzen, Amöben und tierischen Zellen entwickelt haben. Myosin II assembliert als Motorprotein zu Minifilamenten, die an Aktinfilamenten entlanggleiten und ähnlich wie im Muskel

die kontraktile Kraft erzeugen, welche die Einschnürung der Furche vorantreibt. Die Funktion von Nicht-Muskel-Myosin II und dessen universelle Bedeutung für die Zytokinese wurde erst durch Arbeiten an *Dictyostelium* offensichtlich, in denen gezeigt wurde, dass ohne Myosin II keine regulären Teilungsfurchen gebildet werden (**Abb. 3C**). Dennoch ist die Ausbildung des Aktomyosin-Rings zumindest bei *Dictyostelium* nicht essenziell, da Zellen, die an einem festen Substrat anhaften, noch in der Lage sind, sich durch einen Myosin-II-unabhängigen Mechanismus zu teilen. Dabei sind auch Aktin-regulierende Proteine beteiligt, die während der Zytokinese entweder an den Zellpolen lokalisiert sind, wie z. B. Coronin oder Aip1, oder aber in der Teilungsfurche, wie Cortexillin (**Abb. 2C**). Null-Mutanten dieser Proteine weisen typische Zellteilungsdefekte auf.

Ein entscheidender Aspekt einer erfolgreichen Zellteilung ist die perfekte Koordination der Kernteilung mit der Zytokinese. Hierbei auftretende Fehler führen zu Aneuploidien



◀ **Abb. 3:** Centrosomale Aberrationen und Störungen der Zellteilung. **A, B,** Immunfluoreszenz-Dekonvolutionsmikroskopie von fixierten *Dictyostelium*-Zellen, die das Kernhüllenprotein Sun1 überexprimieren. Die Überexpression führt zur Aufhebung der Centrosom-Zellkernverbindung. Die betroffenen Zellen sind häufig mehrkernig und enthalten mehr als ein Centrosom pro Zellkern (blau). Die Centrosomen werden hier als MTOCs in der Immunfärbung gegen Mikrotubuli (grün) visualisiert. **B,** mitotische mehrkernige Zelle. Zu erkennen ist, dass die überzähligen Centrosomen, wenn sie nicht Kernassoziiert sind, nicht mit der Chromosomen-segregation interferieren. **C,** *Dictyostelium*-Zellen ohne Myosin II zeigen synchrone Mitosen, bilden aber keine Teilungsfurchen. **D,** *Dictyostelium*-Zellen, denen die Kinase SepA fehlt, bilden oftmals keine regulären Teilungsfurchen und sind durch extrem asymmetrische Furchungen gekennzeichnet, die zur Zerteilung sehr großer Zellen führen. Die Zellen in **C** und **D** exprimieren GFP- α -Tubulin (grün) zur Visualisierung mitotischer Spindeln.

und Polyploidien. Von universeller Bedeutung sind hier die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und die Polo-Kinase. Zudem wurde in *Dictyostelium* ein Signaltransduktionsweg identifiziert, der dem SIN(*septation initiation network*)-Signalweg von *S. pombe* ähnelt. In *S. pombe* kontrolliert dieser Signalweg Vorgänge am Ende der Mitose und initiiert die Einschnürung des kontraktiven Rings, welcher zur Ausbildung des Septums notwendig ist. Zentral für die Untersuchungen des SIN-homologen Signalwegs bei *Dictyostelium* war eine Cdc7p-homologe Kinase (SepA), die in einem Screen für Zellteilungsstörungen identifiziert wurde [7]. Dabei zeigte sich, dass die SepA-Kinase an der Ausbildung der Teilungsfurche beteiligt ist (**Abb. 3D**). Die Mechanismen, die an der Regulation der Zytokinese beteiligt sind und letztlich die Reorganisation im Zellcortex bewerkstelligen und zur Bildung einer Teilungsfurche beitragen, sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. ■

Literatur

- [1] Doxsey S, McCollum D, Theurkauf W (2005) Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:411–434
 [2] Gräf R (2009) Microtubule Organization in *Dictyostelium*. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.

- [3] Schulz I, Erle A, Gräf R et al. (2009) Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskel* 66:915–928
 [4] Pollard TD, Wu JQ (2010) Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nat Mol Cell Biol* 11:149–155
 [5] Glotzer M (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307:1735–1739
 [6] Bringmann H (2005) Cytokinesis and the spindle midzone. *Cell Cycle* 4:1709–1712
 [7] Müller-Taubenberger A, Ishikawa-Ankerhold HC, Kastner PM et al. (2009) The STE group kinase SepA controls cleavage furrow formation in *Dictyostelium*. *Cell Motil Cytoskel* 66:929–939

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Annette Müller-Taubenberger
 Institut für Anatomie und Zellbiologie
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 Schillerstraße 42
 D-80336 München
 Tel.: 089-218075-873
 Fax: 089-218075-882
 amueller@lrz.uni-muenchen.de

AUTOREN



Annette Müller-Taubenberger

Jahrgang 1960. 1979–1984 Biologiestudium an der Universität Stuttgart. 1985–1988 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 1989–2004 Postdoc und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Biochemie. 2005–2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Adolf-Butenandt-Institut, LMU München. Seit 2007 Gruppenleiterin am Institut für Zellbiologie, LMU München.



Ralph Gräf

Jahrgang 1965. 1984–1990 Biologiestudium an der TU München. 1991–1994 Doktorarbeit am Zoologischen Institut der LMU München. 1995–1996 Postdoc an der Temple University, Philadelphia und der LMU München. 1996–2005 Assistent und Oberassistent am Institut für Zellbiologie der LMU München. 2005–2006 Laser-Scanning-Mikroskopie-Spezialist bei der Carl Zeiss Microimaging GmbH. Seit Oktober 2006 Professor für Zellbiologie an der Universität Potsdam.