

Zellbiologie

Molekulare Kontrolle der Zellform und Zellbewegung bei *Drosophila*

MARIKE RÜDER, WIEBKE MILANI, SVEN BOGDAN
INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE, UNIVERSITÄT MARBURG

The development and maintenance of tissues and organs require dynamic changes and adaptations in cell shape. The actin cytoskeleton is pivotal for directional changes in cell shape and cell migration during morphogenesis and pathogenesis. The fruit fly is an ideal genetic model system to identify the regulatory network controlling cell shape and cell migration.

DOI: 10.1007/s12268-019-1306-5
© Springer-Verlag 2019

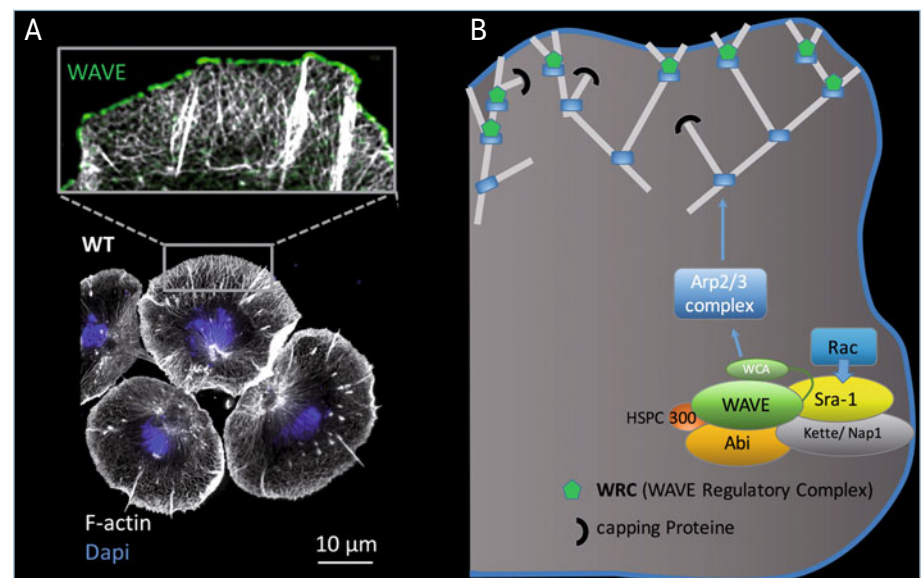
Die Fähigkeit von tierischen Zellen zur Formveränderung und Bewegung spielt eine Schlüsselrolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (z. B. Organ- und Gewebeförderung, Immunsystem und Krebs) [1, 2]. Diese Zellbewegungen umfassen sowohl die amöboide Wanderung einzelner Zellen und das gerichtete Auswachsen von neuronalen Zellfortsätzen (Wachstumskegeln) über ein Substrat als auch die kollektive Zellmigration epithelialer und mesenchymaler Zellverbände während der Morphogenese oder Regeneration von Geweben. Hierbei ist das Aktincytoskelett als Grundgerüst jeder Zelle wesentlich für die äußere Zellform, aber auch die treibende Kraft für viele Bewegungen [3]. Ein wesentliches Merkmal von Aktin ist seine Fähigkeit, helikale Filamente zu bilden. Diese Aktinfilamente (F-Aktin) stellen nicht nur eine wichtige strukturelle Cytoskelettkomponente dar, sondern sie sind auch krafterzeugende Motoren für zelluläre und intrazelluläre Bewegungen [3]. So bilden verzweigte Aktinfilamente blätterartige Membranausstülpungen am Leitsaum motiler Zellen, die als Lamellipodien bezeichnet werden und wesentlich für die Vorwärtsbewegung vieler Zellen sind [4]. Andererseits übernehmen fingerartige Ausstülpungen mit linearen, parallel angeordneten Aktinfilamenten, die Filopodien, wesentliche Funktionen in der Mechanosensation, Zell-Zell-Adhäsion und der zellulären Kommunikation. Neuere Untersuchungen belegen allerdings

auch, dass Filopodien eine wichtige Rolle bei der 3D-Zellmigration und der Invasion metastasierender Tumorzellen übernehmen [5].

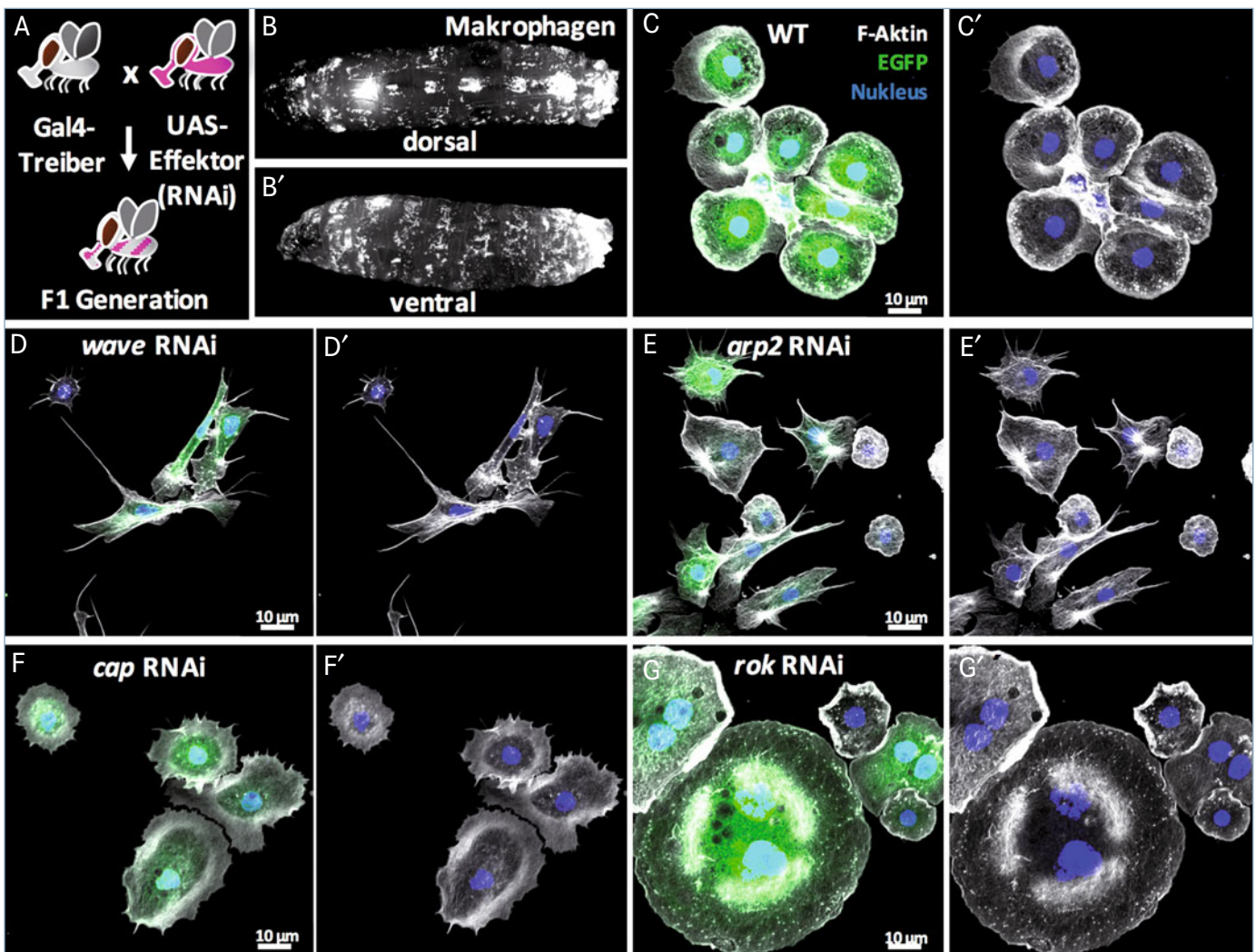
Die Bildung neuer Aktinfilamente aus Aktinmonomeren wird als Nukleation bezeichnet. Bei der Nukleation übernehmen der

actin-related protein(Arp)2/3-Komplex und die Mitglieder der *Wiskott-Aldrich syndrome protein*(WASP)-Familie eine zentrale Rolle. In ihrer Funktion als *nucleation promoting factors* (NPF) aktivieren WASP-Proteine, wie WASP und WAVE, den Arp2/3-Komplex, der selbst nur eine geringe intrinsische Nukleationsaktivität aufweist. Damit kontrollieren die WASP-Proteine räumlich und zeitlich die Aktinpolymerisation in einer Zelle [6, 7].

Der Vergleich der Genomsequenzen verschiedener Modellorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Dicystostelium* und *Drosophila melanogaster* belegt die starke Konservierung einzelner Mitglieder der WASP-Familie, wie WASP, WAVE und WASH, im Verlauf einiger 100 Millionen Jahre Evolution [8]. Ein gemeinsames Merkmal aller Mitglieder ist die katalytische C-terminale WCA-Domäne, die den Arp2/3-Komplex



▲ **Abb. 1:** *Drosophila*-Makrophagen – ein vielseitiges Werkzeug zur Analyse der Aktin-Dynamik *ex vivo* und *in vivo*. **A**, structured illumination microscopy (SIM)-Aufnahme von isolierten *Drosophila*-Makrophagen. Aktinfilamente wurden mit Phalloidin (weiß), Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Der Detailausschnitt zeigt die Lokalisation von endogenem WAVE (grün) an der Spitze des Lamellipodiums. **B**, schematische Darstellung des dendritischen Aktinnetzwerks im Lamellipodium. Die kleine GTPase Rac aktiviert den WAVE regulatorischen Komplex (WRC) über Bindung an Sra-1. Nach Freisetzung der WCA-Domäne aktiviert WAVE den Arp2/3-Komplex. Der aktivierte Arp2/3-Komplex initiiert die Polymerisation von verzweigten Aktinfilamenten, deren Länge durch capping-Proteine am schnell wachsenden Ende begrenzt wird.



▲ **Abb. 2:** Identifikation neuer Genfunktionen in der Regulation der Zellform mithilfe makrophagenspezifischer Expression von RNAi-Transgenen. **A,** Gal4/UAS-System zur makrophagenspezifischen Expression von RNAi-Transgenen. **B,** L3-Larven mit EGFP-markierten Makrophagen. **C–G,** isolierte larvale Makrophagen, die Aktinfilamente wurden mit Phalloidin (weiß) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert; RNAi-positive Zellen erscheinen grün (EGFP-Expression).

bindet und aktiviert. Die WCA-Domäne assoziiert dabei mit Aktinmonomeren, die gemeinsam mit den beiden Aktin-ähnlichen Arp2- und Arp3-Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes ein Trimer bilden. So dient dieses Trimer am Mutterfilament als Nukleationskeim (Nukleus) für das Wachstum neuer Tochterfilamente. Dagegen unterscheiden sich die WASP-Proteine stark in ihren N-Termini. Dies spiegeln die verschiedenen physiologischen Funktionen der WASP-Proteine sowie deren unterschiedliche molekulare Regulation wider. Trotz ähnlicher biochemischer Aktivität konnten in zahlreichen Zellkulturexperimenten und *in vivo*-Modellsystemen WASP-Proteinen distinkte zelluläre und multizelluläre Funktionen zugeordnet werden [6, 9]. Während WAVE insbesondere an den Spitzen von Lamellipodien zu finden ist und dort deren Bildung reguliert (**Abb. 1A**), übernimmt

WASP essenzielle Funktionen während der rezeptorvermittelten Endocytose und der Bewegung endocytotischer Vesikel [6]. WASH dagegen ist ein wichtiger Arp2/3-Aktivator, der die Reifung, die Sortierung und das Recycling endosomaler und lysosomaler Membrankompartimente kontrolliert [10].

Im Vergleich zu allen bislang bekannten Nukleatoren ist der Arp2/3-Komplex allein in der Lage, ein dendritisches Netzwerk aus verzweigten Aktinfilamenten zu erzeugen. Entsprechend dem dendritischen Nukleationsmodell werden im Lamellipodium neue Arp2/3-induzierte, verzweigte Aktinfilamente kurz nach ihrer Entstehung durch Bindung von *capping*-Proteinen an ihrer weiteren Elongation gehindert. Um dennoch Membranprotrusionen zu erhalten, werden *capped* Filamente schnell durch neue Arp2/3-induzierte Seitenverzweigungen ersetzt (**Abb. 1B**).

Die kleinen GTPasen der Rac-Familie sind für die Initiierung und Aufrechterhaltung von Lamellipodien durch die Aktivierung und kontinuierliche Interaktion an Sra-1 (oder PIR121) im heteropentameren WAVE-regulatorischen Komplex (WRC) verantwortlich [11]. Der 440 Kilodalton große WRC ist hochkonserviert und besteht neben Sra-1 (PIR121) aus vier zusätzlichen Untereinheiten: dem namensgebenden Protein WAVE (oder SCAR in *Drosophila*), dem Sra-1/PIR121-Interaktor Nap1 (oder Kette bzw. Hem1), Abi1 und HSPC300 [12–14]. Die Bindung von Rac an Sra-1 hebt eine inhibitorische Wechselwirkung auf, sodass die WCA-Domäne von WAVE freigesetzt und so zugänglich für die Aktin- und Arp2/3-Komplexbindung wird [11].

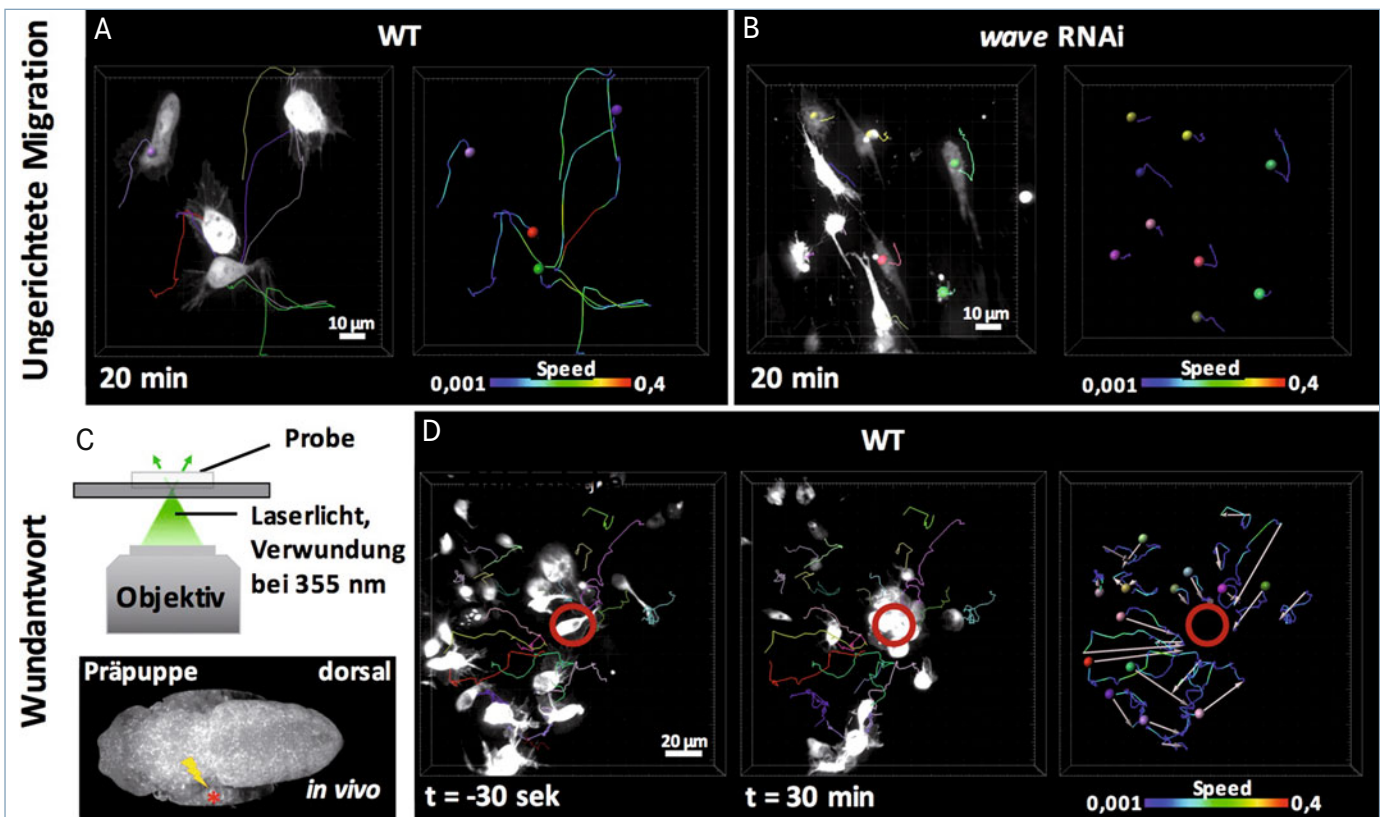
Viele dieser Erkenntnisse wurden durch *in vitro*-Zellkulturmodelle gewonnen. Um die physiologische Bedeutung dieser Prozesse

besser zu verstehen, sind Experimente in multizellulären Organismen wesentlich. *Drosophila*-Makrophagen stellen ein hervorragendes genetisches *in vivo*-Zellmodell zur Analyse von direktonaler Zellmigration und angeborener Immunantwort dar [15–17]. Dieses System erlaubt die genaue Analyse bekannter Gene, aber auch die Identifizierung neuer Genfunktionen in der Regulation der Zellform und -migration *in vivo* [17]. Es ermöglicht die Kombination von hochauflösender Mikroskopie (*structured illumination microscopy*, SIM) mit *Spinning-Disk-Lebendzellmikroskopie*. Die Herstellung mutanter Fliegen bezüglich positiver Kandidatengene erlaubt zudem eine weitergehende funktionelle Analyse von Genfunktionen im Einzelzellkontext (Zellmigration der Makrophagen) sowie im multizellulären Kontext während der Immunantwort oder der Entwicklung. Insekten wie *Drosophila* besitzen ein offenes Blutkreislaufsystem, das heißt das Blut bzw. die Hämolymphe fließt in allen Entwicklungsstadien frei durch den extrazellulären Raum, das Hämocoel. Das Hämocoel enthält sowohl zirkulierende als auch sessile, am Integument festsitzende Blutzellen, die als Hämocyten bezeichnet werden. Ähnlich wie beim Menschen erfolgt die Hämatopoese bei *Drosophila* räumlich und zeitlich in unterschiedlichen Phasen aus hämatopoetischen Stammzellen. Embryonale Blutzellen expandieren während der Larvalentwicklung in hämatopoetischen Taschen (**Abb. 2B**) und werden mit Beginn der puppalen Entwicklung in großer Zahl in die Hämolymphe freigesetzt. Der Großteil dieser Blutzellen entspricht in ihrer Form und Funktion den vom Knochenmark abgeleiteten Makrophagen bei Vertebraten [18].

Mithilfe des Gal4/UAS-Systems können Makrophagen aus *Drosophila* mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen spezifisch markiert werden und sowohl *ex vivo* nach Isolierung als auch *in vivo* in Larven oder Puppen untersucht werden. Die makrophagenspezifische Expression von RNAi-Transgenen erlaubt es zudem, gezielt die Expression von Genen in Makrophagen auszuschalten bzw. zu supprimieren (**Abb. 2A**). Hochauflösende Mikroskopie ermöglicht es, die Funktion unterschiedlicher Aktin-Regulato-

ren für die Morphologie von Makrophagen zu untersuchen. So führt die Suppression der Funktion des *wave*-Gens zu einem Verlust von Lamellipodien. Die Zellen zeigen einen stellaren Phänotyp, der durch lange herausragende Filopodien gekennzeichnet ist (**Abb. 2D**). Der Verlust von Komponenten des Arp2/3-Komplexes phänokopiert *wave*, eine Beobachtung, die die wesentliche Bedeutung von WAVE bei der Bildung von Arp2/3-abhängigen Lamellipodien zeigt. Auch andere mögliche Einflüsse auf das Aktincytoskelett können anhand der morphologischen Analyse untersucht werden. Vergleichbare RNAi-Experimente belegen die wichtige Rolle der *capping*-Aktivität bei der Elongation von Aktinfilamenten. Der Verlust dieser Funktion zeigt sich morphologisch durch die Bildung eines wesentlich dichteren Aktincytoskeletts im Zelleitsaum (**Abb. 2F**) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (**Abb. 2C**). Die Polymerisation von Aktin ist aber auch an anderen Prozessen, wie z. B. der Zellteilung, beteiligt. So führt ein Funktionsverlust der Rho-abhängigen Kinase (Rok) aufgrund der fehlenden Aktivierung von Myosin II und somit durch eine Hemmung der kontraktilen Aktinfilamentbündel zu Defekten der Cytokinese. Die Folge ist die Bildung gigantischer mehrkerniger Zellen (**Abb. 2G**).

Zwei bis vier Stunden nach der Puppenbildung ist es möglich, direkt durch die Puppenhülle das ungerichtete Migrationsverhalten markierter Makrophagen *in vivo* hochauflösend und quantitativ zu untersuchen (**Abb. 3A**). Moderne Bildanalyse- und Tracking-Software erlauben es, die genaue Position und Pfade der Zellen über die Zeit automatisch zu erfassen und wichtige Parameter wie die Geschwindigkeit oder die Direktionalität der Zellen aus den Daten zu extrahieren. So kann auch in Zahlen sichtbar gemacht werden, dass der Verlust von WAVE nicht nur dramatische Auswirkungen auf die Morphologie, sondern auch auf das Migrationsverhalten der Makrophagen hat. Der Verlust von Lamellipodien führt zu einer deutlichen Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit – sie sind jedoch weiterhin zu einer ineffizienten Fortbewegung mittels Filopodien fähig (**Abb. 3B**). Im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt es zur massiven Freisetzung



▲ **Abb. 3:** Analyse des *in vivo*-Migrationsverhaltens von *Drosophila*-Makrophagen. **A**, Wildtyp, **B**, *wave*-RNAi; ungerichtete Migration von EGFP-markierten Makrophagen in der Präpuppe, die Pfade zeigen die Geschwindigkeit der Zelle an. **C**, **D**, Wundantwort. Ablation einer einzelnen Zelle im puppalen Flügel (roter Stern, **C**). Gerichtete Migration (**D**). Aufnahme vor der Verwundung, der Wundantwort und 30 Minuten nach der Ablation der Zelle im roten Kreis. Die Pfade zeigen die Geschwindigkeit der Zelle an, die grauen Pfeile weisen auf die Migrationsrichtung hin.

und Verteilung der Makrophagen in der Puppe.

Ähnlich wie beim Menschen aktivieren septische und aseptische Wunden patrouillierende Makrophagen dazu, in das betroffene Gewebe einzuwandern [17, 18]. Mithilfe eines präzisen UV-Schneidelasers können gezielt einzelne Zellen ablatiert oder epitheliale Wunden erzeugt werden (**Abb. 3C, D**). Zellen im nahen Umfeld der Wunde (**Abb. 3D**, roter Kreis) reagieren unmittelbar und zeigen ein gerichtetes Zellmigrationsverhalten. Nach ca. 30 Minuten hat ein Großteil der Makrophagen die Wunde erreicht, und sie phagozytieren die verbliebenen Zellreste. Der Wechsel des Migrationsverhaltens lässt sich anhand der Migrationspfade der Zellen darstellen und genauer analysieren. Parameter wie die Richtionalität zur Wunde oder das Taumeln der Zellen während der Migration eröffnen die Möglichkeit, den Einfluss von Kandidatengen auf die Wundantwort genau zu analysieren (**Abb. 3C, D**).

Die quantitative Analyse der gerichteten Zellmigration der Makrophagen erlaubt nicht nur eine gezielte Funktionsanalyse einzelner Aktin-Regulatoren, sondern auch eine syste-

mische Analyse der Mechanismen und regulatorischer Netzwerke der zugrunde liegenden Wundantwort.

Perspektiven

Der fundamentale Zusammenhang zwischen Zellform und -funktion erschließt sich nicht nur auf der Ebene einzelner Zellen, sondern ist wesentlich für die Gestaltbildung von Geweben. Die Untersuchung des Cytoskeletts und der beteiligten Moleküle, Signalkomplexe sowie regulatorischen Mechanismen sind wesentlich für ein tief greifendes Verständnis der molekularen Physiologie von Geweben und Organen und der Pathologie menschlicher Erkrankungen (unter anderem Infektionen, akute und chronische Entzündungen, Immunerkrankungen, Tumorinvasion). Die funktionelle Analyse und Visualisierung dieser Prozesse im lebenden Organismus beinhaltet ein hochaktuelles Gebiet der biomedizinischen Forschung und erfordert hochauflösende, bildgebende nicht-invasive Techniken. Eine Kombination mit genetischen und biochemischen Methoden ermöglicht es dabei, quantitative Modelle veränderten Zellverhaltens zu erstellen und zugrunde liegende mole-

kulare Regulations- und Steuerungsmechanismen zell-dynamischer Prozesse zu entschlüsseln. ■

Literatur

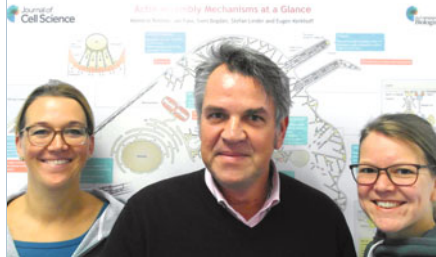
- [1] Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA (2017) Emerging biological principles of metastasis. *Cell* 168:670–691
- [2] Aman A, Piotrowski T (2010) Cell migration during morphogenesis. *Dev Biol* 341:20–33
- [3] Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326:1208–1212
- [4] Small JV, Auinger S, Nemethova M et al. (2008) Unravelling the structure of the lamellipodium. *J Microsc* 231:479–485
- [5] Jacquemet G, Hamidi H, Ivaska J (2015) Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr Opin Cell Biol* 36:23–31
- [6] Rottner K, Faix J, Bogdan S et al. (2017) Actin assembly mechanisms at a glance. *J Cell Sci* 130:3427–3435
- [7] Bruser L, Bogdan S (2017) Molecular control of actin dynamics *in vivo*: insights from *Drosophila*. *Handb Exp Pharmacol* 235:285–310
- [8] Veltman DM, Insall RH (2010) WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. *Mol Biol Cell* 21:2880–2893
- [9] Rottner K, Stradal TE (2011) Actin dynamics and turnover in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 23:569–578
- [10] Nagel BM, Bechtold M, Rodriguez LG et al. (2017) *Drosophila* WASH is required for integrin-mediated cell adhesion, cell motility and lysosomal neutralization. *J Cell Sci* 130:344–359
- [11] Chen Z, Borek D, Padrick SB et al. (2010) Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* 468:533–538
- [12] Bogdan S, Klambt C (2003) Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development* 130:4427–4437

- [13] Rogers SL, Wiedemann U, Stuurman N et al. (2003) Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol* 162:1079–1088
- [14] Kunda P, Craig G, Dominguez V et al. (2003) Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol* 13:1867–1875
- [15] Sander M, Squarr AJ, Risse B et al. (2013) *Drosophila* pupal macrophages – a versatile tool for combined *ex vivo* and *in vivo* imaging of actin dynamics at high resolution. *Eur J Cell Biol* 92:349–354
- [16] Buchon N, Silverman N, Cherry S (2014) Immunity in *Drosophila melanogaster* – from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* 14:796–810
- [17] Ruder M, Nagel BM, Bogdan S (2018) Analysis of cell shape and cell migration of *Drosophila* macrophages *in vivo*. *Methods Mol Biol* 1749:227–238
- [18] Wood W, Martin P (2017) Macrophage functions in tissue patterning and disease: new insights from the fly. *Dev Cell* 40:221–233

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Sven Bogdan
 Institut für Physiologie und Pathophysiologie
 Abteilung für Molekulare Zellphysiologie
 Philipps-Universität Marburg
 Emil-Mannkopff-Straße 2
 D-35037 Marburg
 Tel.: 06421-28-26-816
 sven.bogdan@staff.uni-marburg.de

AUTOREN



Wiebke Milani, Sven Bogdan und Marike Rüder
 (v. l. n. r.)

Marike Rüder

2009–2013 Bachelorstudium Biologie, 2013–2015 Masterstudium Biologie an der Universität zu Kiel. 2016–2017 Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Bogdan am Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Universität Münster. Seit 2017 Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Bogdan, Abteilung Molekulare Zellphysiologie, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Marburg.

Wiebke Milani

1996–1999 Humanbiologiestudium (Diplom) an der Universität Marburg. 1999–2004 Promotion

im Georg-Speyer-Haus, Frankfurt a. M. 2004–2007 Postdoc in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Liss, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Marburg. 2007–2017 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Daut, seit 2017 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Bogdan, und Lehrbeauftragte der Humanbiologie, Abteilung Zellphysiologie, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Marburg.

Sven Bogdan

1997 Biologiestudium (Diplom) an der Ruhr-Universität Bochum. 1997–1998 DFG-Stipendiat des Graduierten-Kollegs „Normale und maligne Systeme“ am Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen; dort 1997–2000 Promotion am Institut für Zellbiologie/Tumorforschung. 2000–2002 Postdoc am Institut für Neurobiologie, Universität Münster, dort 2002–2008 Hochschuldozent (C1) und 2009–2011 Akademischer Oberrat (A14). 2009 Habilitation in Zellbiologie/Neurobiologie. 2012–2016 Heisenberg-Stipendiat der DFG. Seit 2017 Universitätsprofessor (W3) und Leiter der Abteilung Molekulare Zellphysiologie am Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Marburg.