

# Untersuchungen zur Rolle von Rac1 in der Organisation des Aktinzytoskeletts in U2OS-Tumorzellen

Master-Arbeit von Kamilla Ripkens, Betreuerin: Fr. Prof. Perihan Nalbant

Zentrum für medizinische Biotechnologie, Molekulare Zellbiologie, Universität Duisburg-Essen

## Einleitung

Proteine der Rho-GTPasen-Familie übernehmen als molekulare Schalter eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion. Sie haben Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts, die Regulation von Zellwachstum, -Differenzierung und -Migration und die Genexpression. Die Regulation ihrer Aktivität erfolgt durch eine Vielzahl von übergeordneten Regulatoren und Signale aktivierter Rho-Proteine werden über Effektoren weitergeleitet (s.Abb.1)<sup>1</sup>.

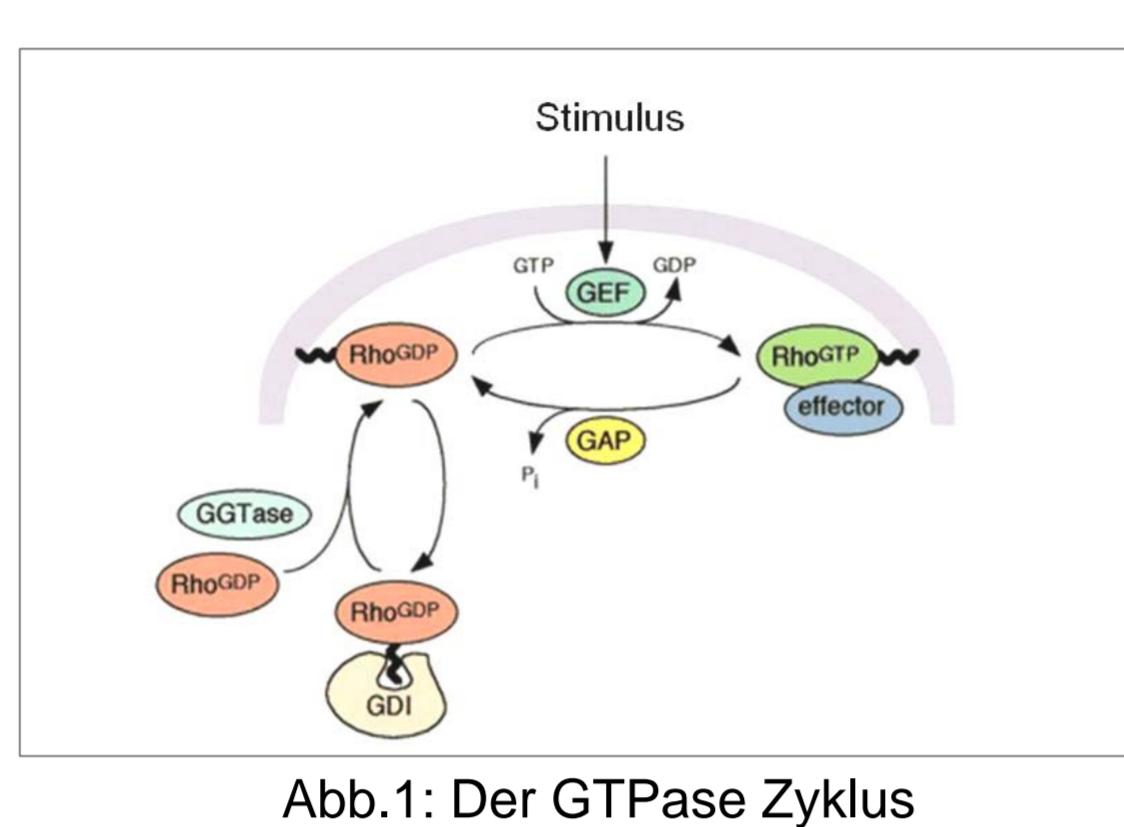


Abb.1: Der GTPase Zzyklus

Zu den drei am besten charakterisierten Rho-GTPasen gehören Cdc42, Rac1 und RhoA. Untersuchungen an migrierenden Zellen haben ergeben, dass Cdc42 zur Zellpolarität und Filopodienbildung beiträgt, Rac1 die Generierung des Aktin-reichen Lamellipodiums reguliert und RhoA maßgeblich für die Bildung von Stressfasern und deren Verankerungspunkte verantwortlich ist. Des Weiteren wird eine reziproke Aktivierung von RhoA und Rac1 benötigt, um die Bildung von dynamischen Fortsätzen und kontraktilen Fasern während der Zellmigration zu koordinieren.

## Ziel der Arbeit

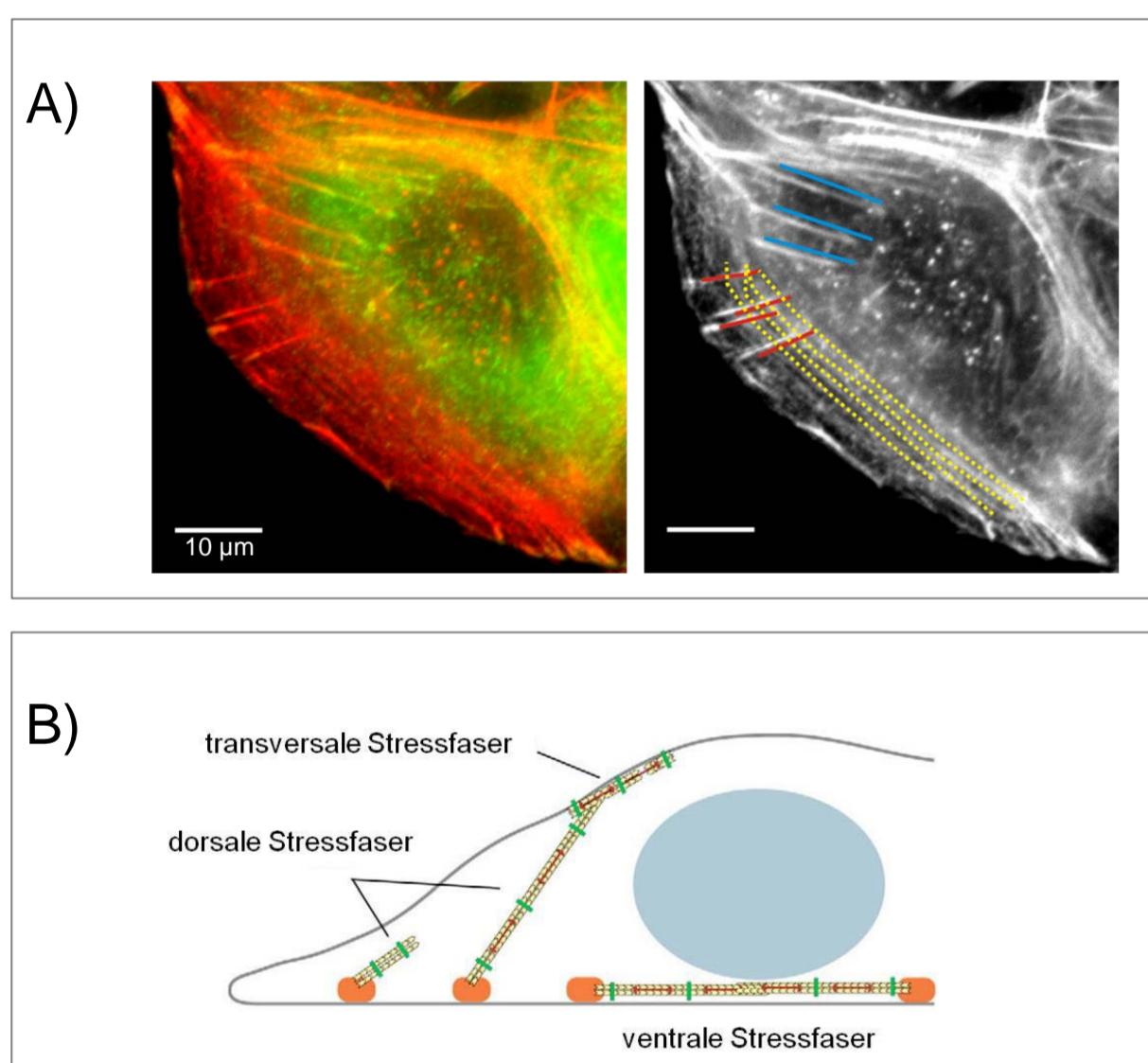


Abb.2: Das Aktinzytoskelett der U2OS Tumorzelle

Für diese Arbeit wurde die Osteosarkom-Zelllinie U2OS gewählt. Diese Zellen zeigen ein strukturiertes Aktinzytoskelett mit unterschiedlichen Arten von Aktinfasern (A)). Man unterscheidet drei Arten von Stressfasern(B))<sup>2</sup>, welche während des Migrationsprozesses dynamisch umorganisiert werden.

Mit Hilfe von bildgebenden Verfahren wurden die morphologischen Änderungen in U2OS-Zellen nach Depletion von Rac1 untersucht. Hierbei wurde besonders die Organisation der Stressfasern charakterisiert. Als kritische Komponente der Migration wurde des Weiteren die Dynamik dieser Strukturen mittels fluoreszenzmikroskopischen Lebendzellanalysen untersucht.

## Die Dynamik des Einbaus von Aktin-Molekülen ist nach Rac1-Depletion verringert

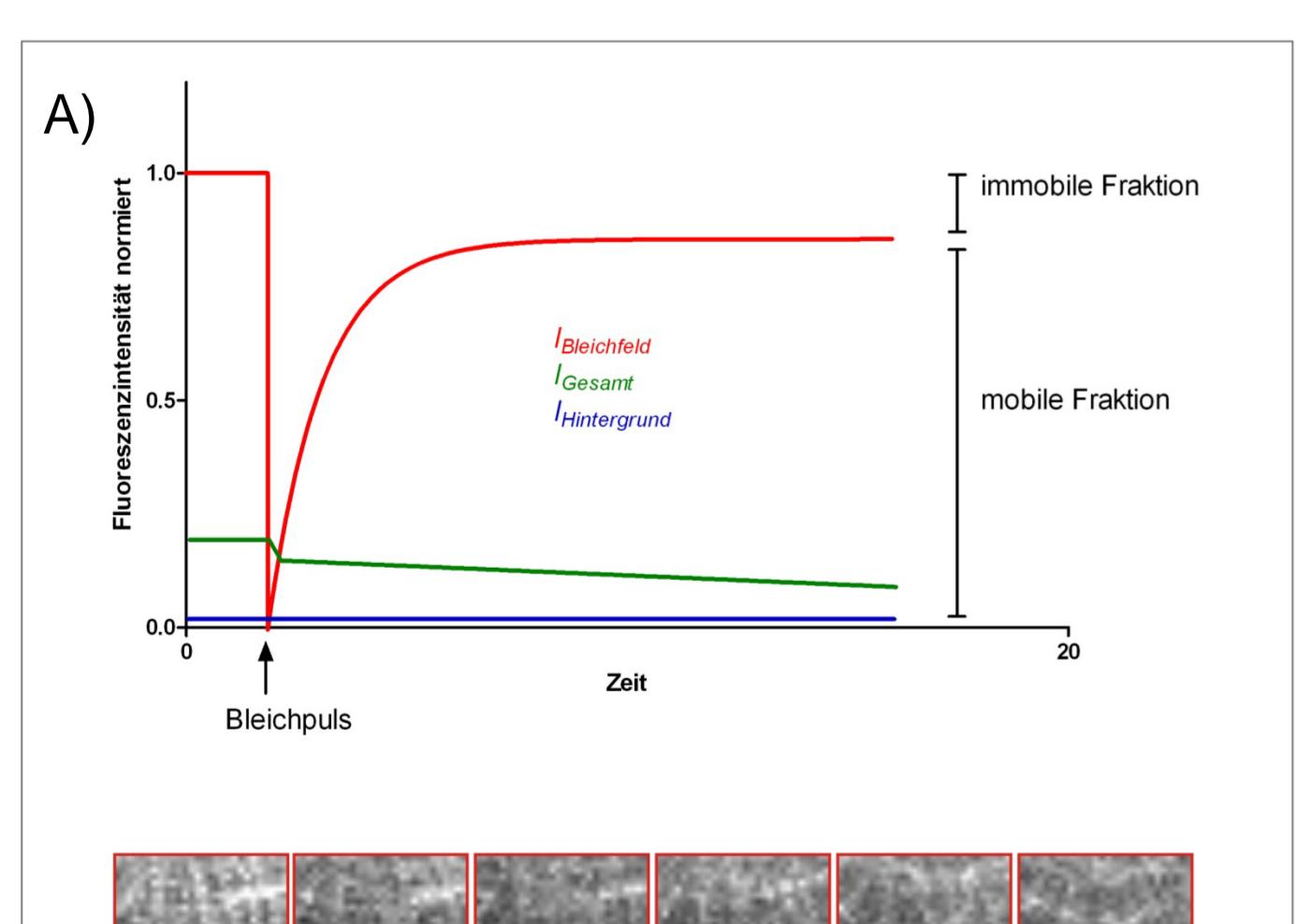


Abb.3: FRAP-Daten zeigen eine verringerte Dynamik von Aktin

A) Bei FRAP-Experimenten (fluorescence recovery after photobleaching) werden fluoreszierende Moleküle mit einem starken Laserstrahl irreversibel ausgeblendet. Sind die fluoreszenzmarkierten Proteine in diesem Bereich beweglich, wird die Fluoreszenzintensität im Laufe der Zeit wieder zunehmen, da gebleichte Moleküle durch neue fluoreszierende Moleküle ersetzt werden. Über den Anstieg der Fluoreszenzintensität im gebleichten Feld kann indirekt eine Aussage über die Dynamik der Moleküle gemacht werden. Neben der Geschwindigkeit der Fluoreszenzrückkehr ist die Fluoreszenzintensität nach vollständiger Erholung (mobile Fraktion) ein Maß für die Beweglichkeit der Proteine. B) Mit Hilfe von Daten aus FRAP-Experimenten wurde die Dynamik des Einbaus von Aktin-Molekülen in die Stressfasern analysiert. Die Wiederherstellungskurven der Fluoreszenzintensität von Kontroll- und Rac1-depletierten Zellen zeigen, dass die immobile Fraktion nach Verlust von Rac1 signifikant erhöht ist ( $p=0,037$ ). Die hieraus resultierende verringerte Wiederherstellung der Fluoreszenz kann als Hinweis für eine Verringerung der Aktin-Dynamik in den gemessenen Stressfasern interpretiert werden.

## Die Depletion von Rac1 führt zum Verlust von dynamischen Fortsätzen in der *leading edge*

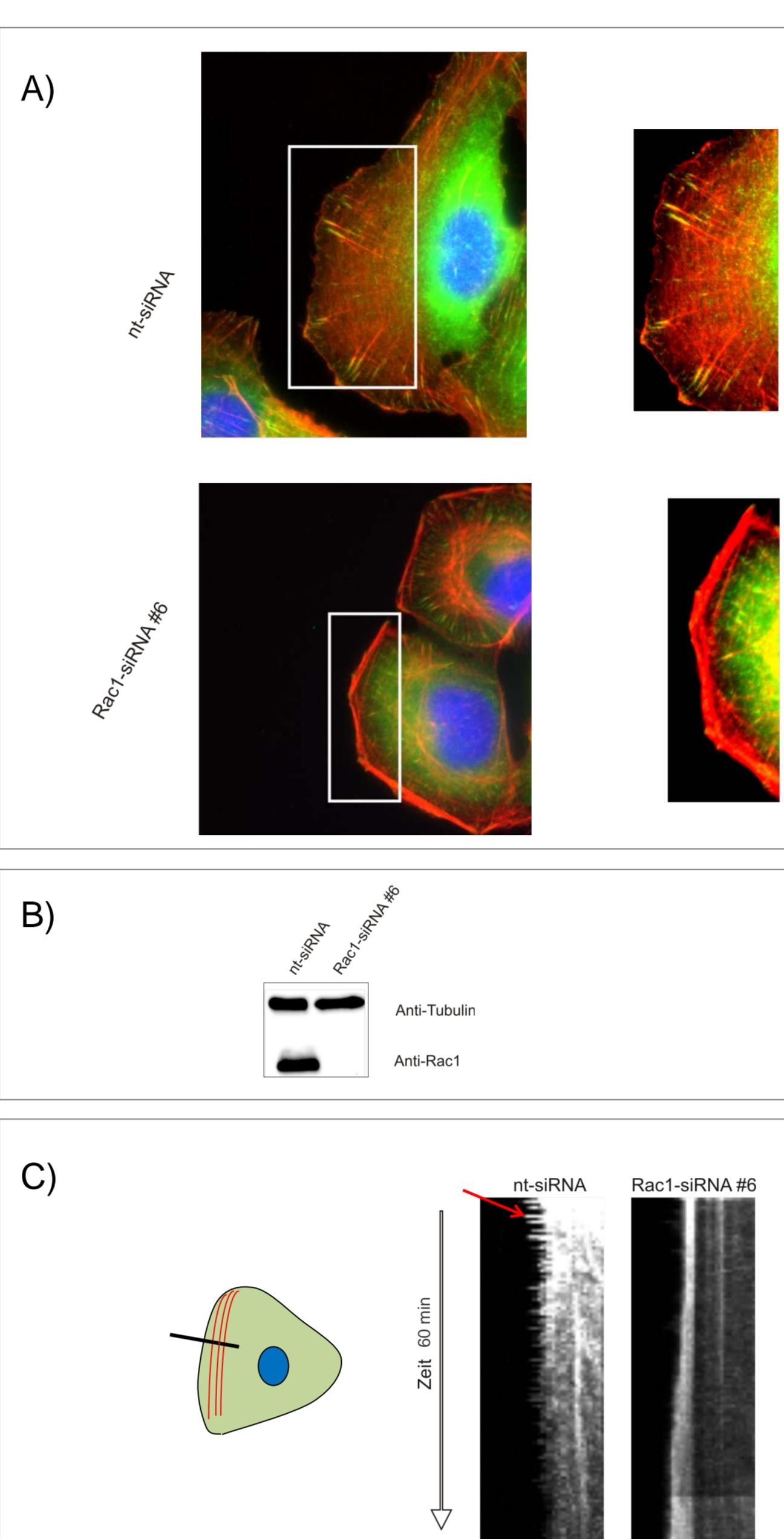


Abb.4: Die Rac1-Depletion führt zu Aktin-Akkumulationen

A) Um den Effekt der Rac1-Depletion im Hinblick auf die Organisation der Aktin-Strukturen zu untersuchen, wurden Bildaufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Die Analyse der Aufnahmen liefert Hinweise, dass das Aktinzytoskelett nach Behandlung mit Rac1- siRNA verändert wurde. Die behandelten Zellen zeigen eine wenig bis kaum deutlich ausgebildete Zellfront. Häufig sind anstelle einer strukturierten *leading edge* lediglich Anhäufungen von Aktin-Molekülen am Zellrand zu erkennen, welche bei Kontrollzellen fehlen. Die Rac1-depletierten Zellen zeigen insgesamt eine deorganisierte Struktur der Aktinfilamente. B) Die Rac1-Depletion wurde mit Hilfe eines spezifischen Rac1-Antikörpers in Western Blots nachgewiesen. C) Eine wichtige Eigenschaft migrierender Zellen ist die Ausbildung von Zellausstülpungen und dynamischen Vorwärtsbewegungen an der *leading edge*. Die über Rac1-vermittelte Aktinpolymerisation spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Mithilfe eines Kymographen wurde gezeigt, dass dieses dynamische Verhalten in Rac1-depletierten Zellen nicht vorhanden ist. Hierzu wurde eine Linie senkrecht zum Zellrand durch den vorderen Teil der Zelle gezogen und der Kymograph mittels einer Software erstellt. Der Kymograph veranschaulicht die Bewegungsabläufe entlang dieser Linie über die Zeit (s. Pfeil). Die Kontrollzellen zeigen sehr deutliche Vorwärtsbewegungen am Zellrand. Die Rac1- depletierten Zellen hingegen lassen keine Dynamik am Zellrand erkennen.

## Der Verlust von Rac1 führt zur Verringerung von dynamischen und Anreicherung von undynamischen Stressfasern

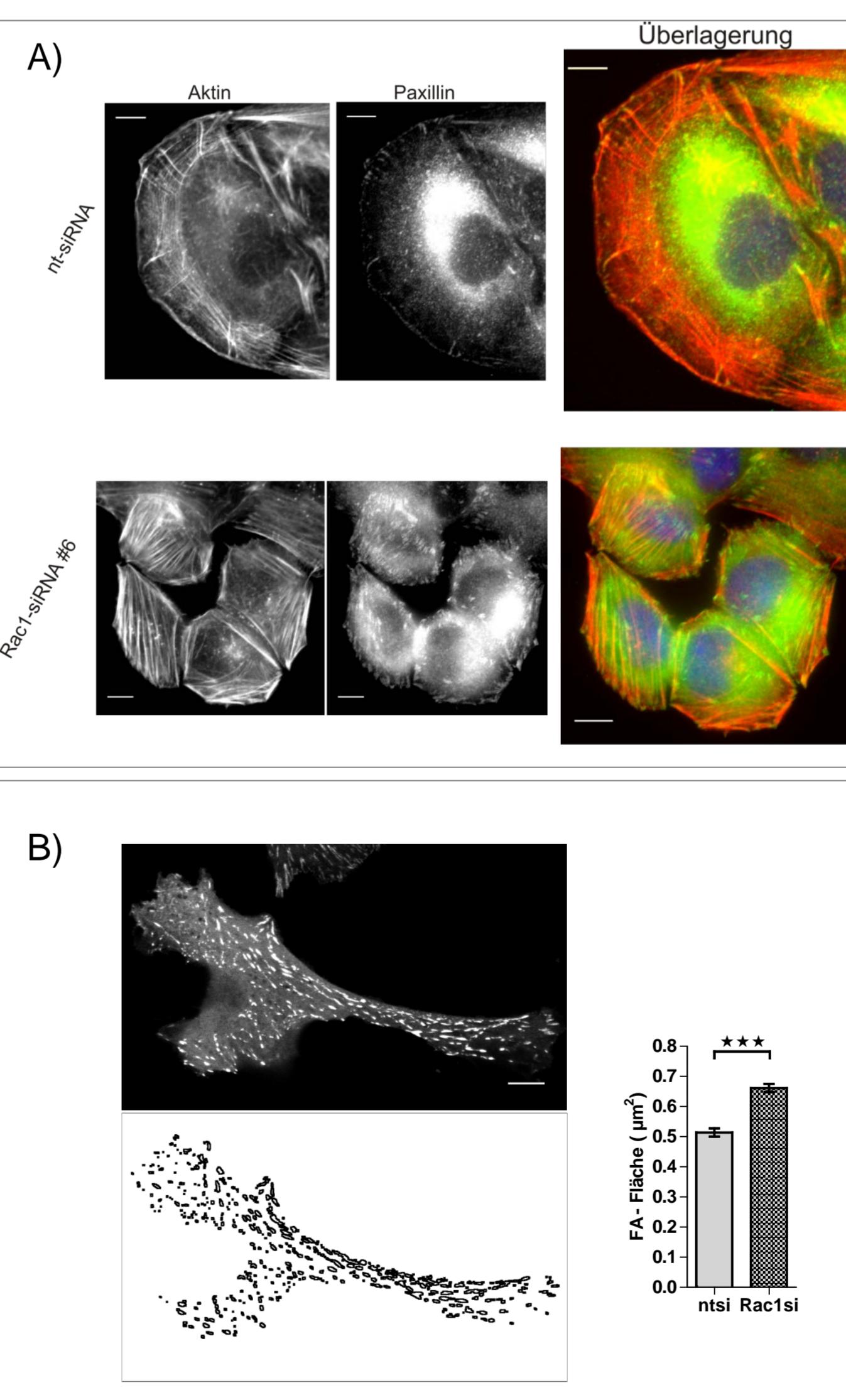


Abb.5: Die Rac1-Depletion führt zu ventralen Stressfasern

A) Die genauere Untersuchung von Stressfasern ergab eine deutliche Veränderung der Zusammensetzung der Stressfaserpopulation in Rac1-depletierten Zellen. Die unterschiedlichen Arten der Stressfasern in U2OS-Zellen sind durch ihre Verankerung an andere Stressfasern und assoziierte Adhäsionsplaques charakterisiert. Die Überlagerung von gefärbten Aktinstrukturen und Adhäsionsplaques deutet darauf hin, dass Rac1-depletierte Zellen überwiegend undynamische ventrale Stressfasern enthalten, die einen kontinuierlichen Fluss von dynamischen Fasern verhindern und dadurch die Zellmigration beeinträchtigen. B) Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass Rac1 eine Rolle in der Assemblierung von Adhäsionsplaques spielt. Um diese Plaques zu charakterisieren wurden sie mit einem spezifischen Antikörper angefärbt und mithilfe einer Software ihre Fläche ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass diese in Rac1- depletierten Zellen signifikant vergößert sind ( $p<0,0001$ ). Die Vergößerung spricht für eine erhöhte Kontraktilität der verbundenen Aktinfasern, und diese ist wiederum ein Maß für die Aktivität der GTPase RhoA. Diese Ergebnisse sprechen für eine gegenseitige Beeinflussung der beiden GTPasen Rac1 und RhoA.

## Zusammenfassung

Die Depletion von Rac1 führt

- zu einer verringerten Dynamik der Aktin-Moleküle
- zum Verlust der *leading edge* und fehlenden Zellausstülpungen
- zur Veränderung der Stressfaser-Population
- zur Anhäufung von undynamischen Stressfasern und Verringerung von dynamischen Stressfasern
- zu vergrößerten Adhäsionspunkten