

# Actieve materiaal-eigenschappen van de levende cel

**Levende cellen zijn elastisch en kunnen grote krachten weerstaan dankzij hun cytoskelet, een elastisch netwerk van stijve eiwitvezels. Cellen gedragen zich echter overduidelijk anders dan kunstmatige polymeernetwerken: ze kunnen zichzelf actief stijver maken door zich als een spier aan te spannen met moleculaire motoren. Wij hebben met reologische metingen aan een simpel modelsysteem van een cel het mechanisme van deze actieve mechanische regulatie opgehelderd. Het blijkt dat de motoren de vezels van het cytoskelet als vioolsnaren strak trekken. De vezels bieden hier een sterke entropische weerstand tegen, die het netwerk stijver maakt. Deze waarneming geeft inzicht in fysische bouwprincipes van de levende cel en biedt daarnaast mogelijkheden om slimme 'levende' kunststoffen te ontwerpen.** Gijsje Koenderink en Fred MacKintosh

146

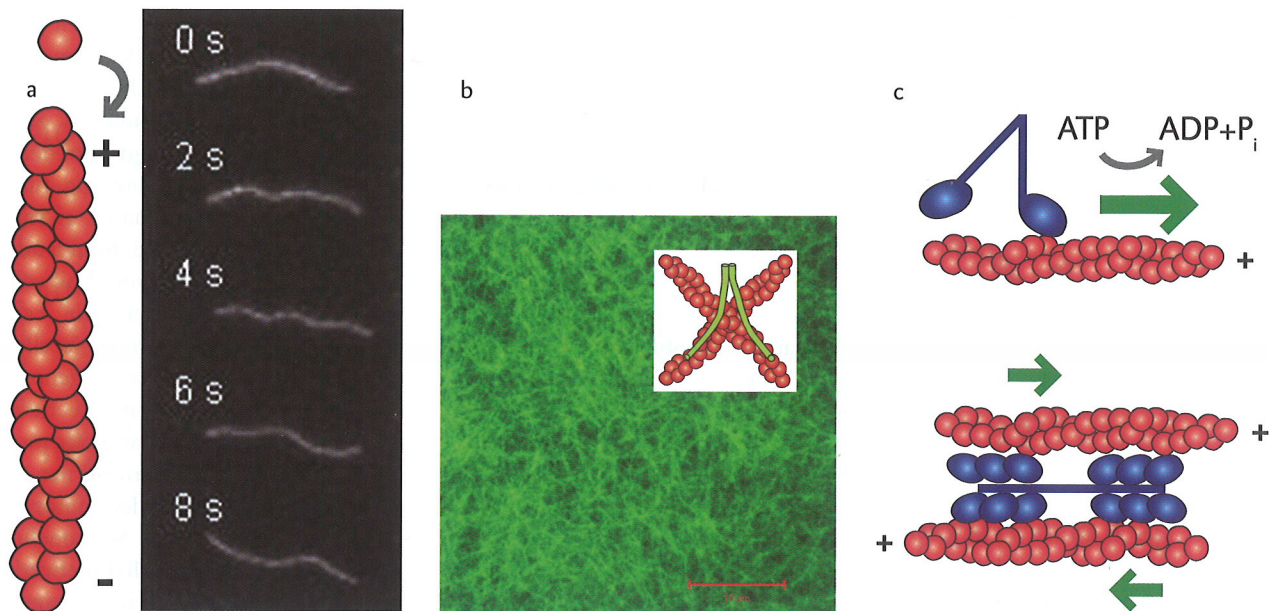
Cellen worden vaak afgebeeld als zakjes water gevuld met eiwitten en organellen, maar in werkelijkheid gedragen ze zich als viscoelastische materialen. Ze hebben een stijfheid die vergelijkbaar is met die van een pudding. Anders dan een pudding kunnen cellen echter grote krachten weerstaan zonder vloeibaar te worden. Integendeel, cellen worden meestal stijver naarmate ze meer worden vervormd. Dit bijzondere elastisch gedrag dankt de cel aan het cytoskelet, een netwerk van eiwitvezels dat de cel overspant.

In de afgelopen jaren is een nieuw, interdisciplinair onderzoeksveld opgekomen dat zich richt op de bijzondere fysische eigenschappen van dit cytoskelet. Er zijn verschillende methoden ontwikkeld om de stijfheid

van intacte cellen te meten. De enorm complexe samenstelling van cellen en het grote aantal verschillende celtypen maken het echter moeilijk om algemene principes te identificeren. Recent is veel vooruitgang geboekt met een alternatieve benadering, waarbij onderdelen van de cel worden nagebouwd met opgezuiverde eiwitten. Deze aanpak maakt het mogelijk om systematisch de rol van verschillende eiwitten te bestuderen en de mechanica te meten met standaard meettechnieken uit de polymeerfysica. We kennen inmiddels de belangrijkste factoren die zorgen dat cellen mechanisch robuust zijn. Er is echter één aspect van de cel dat moeilijk na te bootsen is: cellen zijn actieve materialen. Ze genereren actief krachten die de stijfheid van het cytoskelet reguleren. Dit stelt

cellen in staat zichzelf te vervormen (bijvoorbeeld om door nauwe ruimtes te kruipen) en zich aan te passen aan het omringende weefsel. Dit laatste is cruciaal tijdens embryonale ontwikkeling, waarbij cellen naast biochemische signalen ook mechanische signalen gebruiken om te differentiëren tot verschillende celtypen.

Actieve regulatie van cel-elasticiteit berust met name op moleculaire motoren, die chemische energie omzetten in mechanische arbeid (celcontractie). Doordat het cytoskelet voortdurend brandstof verbruikt is het ver buiten thermodynamisch evenwicht. Bestaande theorieën uit de statistische mechanica beschrijven alleen systemen in evenwicht. Het is nog steeds een grote uitdaging om de structuur en dynamica van niet-even-



**Figuur 1** a) Actinefilamenten zijn polymeren van bolvormige actinemonomeren en zijn asymmetrisch (aangeduid met plus- en min-uiteinde). Fluorescentiemicroscopie laat zien dat de filamenten van  $15 \mu\text{m}$  semiflexibel zijn. b) Microscopie-afbeelding van een dicht netwerk van actinefilamenten, bijeen gehouden door filaminecrosslinks (geschetst in de inzet). c) Myosinemotoren binden met hun motor-domeinen (bolletjes) aan actine en lopen naar het plus-uiteinde. Bipolaire filamenten trekken antiparallele actinefilamenten naar elkaar toe.

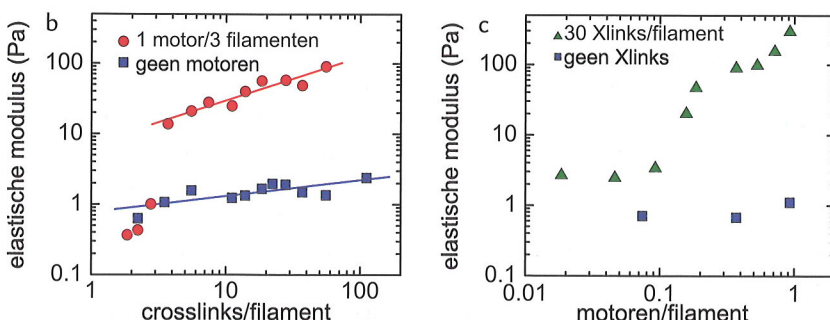
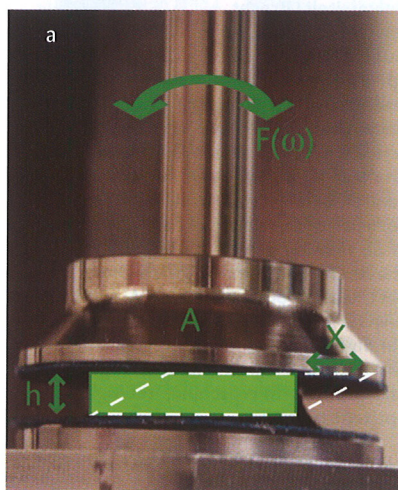
wichtssystemen zoals de cel te beschrijven. In dit artikel laten we zien hoe actieve krachten gegenereerd door moleculaire motoren de stijfheid van het cytoskelet reguleren [1]. We bouwen een minimaal modelsysteem dat zichzelf net als een cel onder spanning kan zetten, en we laten zowel experimenteel als theoretisch zien hoe dit leidt tot actieve regulatie van stijfheid.

### Ingrediënten van het cytoskeletmodel

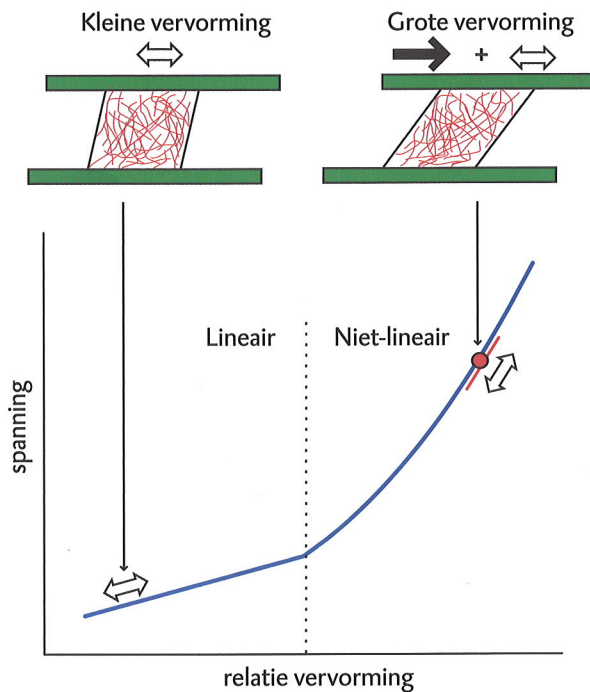
Het basisingrediënt van ons modelsysteem is actine, een eiwit dat essentieel is voor de stevigheid van cellen. Actine is een bolvormig eiwit dat spontaan assembleert tot filamenten met een dubbelhelix-structuur (figuur 1a, links). Buiten de cel kunnen we dit

proces nabootsen door opgezuiverd actine in een fysiologische buffer op te warmen tot kamertemperatuur. Dit levert filamenten op met lengtes van enkele micrometers, die goed zichtbaar zijn met fluorescentiemicroscopie (figuur 1a, rechts). De filamenten zijn voortdurend enigszins gekromd en de krommingen fluctueren in de tijd. Dit is het gevolg van thermische fluctuaties: de moleculen van het oplosmiddel zijn voortdurend in beweging en botsen tegen het filament. Actinefilamenten zijn 'semiflexibele' polymeren. Ze buigen onder invloed van de thermische fluctuaties maar zijn over afstanden van een paar micrometer recht. Bij voldoende hoge concentratie vormen de polymeren een ruimtevullend netwerk (figuur 1b). In de cel krijgt dit netwerk stevigheid door

crosslink-eiwitten, die de polymeren aan elkaar plakken. In ons modelsysteem gebruiken we het crosslink-eiwit filamine, dat in bijna alle cellen van ons lichaam voorkomt. Filamine is V-vormig, met aan de twee uiteinden domeinen die binden aan twee verschillende actinefilamenten (figuur 1b). Als aan het actinenetwerk getrokken wordt, worden de filamenten tussen crosslinks net als vioolsnaren strak getrokken. Het aantal mogelijke buigingstoestanden van elk filament wordt gereduceerd, waardoor de entropie afneemt. Dit levert een sterke, entropische weerstand tegen uitrekken op, waardoor het polymeer (en het netwerk als geheel) stijver wordt. Om het netwerk actief te maken voegen we nog een derde component toe, de moleculaire motor myosine II.



**Figuur 2** Reologie van actieve netwerken. a) Close-up van de reometer: het sample zit tussen de twee metalen platen met oppervlak  $A$  en onderlinge afstand  $h$ . Met de bovenste plaat wordt een spanning  $F$  aangelegd (in werkelijkheid in de rondte), die resulteert in een vervorming over een afstand  $x$ . b) Elasticiteit van actinenetwerken zonder motoren (blauw) en met motoren (rood). c) Elasticiteit van actieve netwerken (met motoren) zonder crosslinks (blauw) en met crosslinks (groen).



**Figuur 3** Actinenetwerken gecrosslinkt met filamine worden stijver naarmate ze meer vervormd worden. De (differentiële) elastische modulus is de helling van de kromme en kan worden gemeten door een kleine oscillerende vervorming te superponeren op een grote vervorming.

Myosine II is samen met actine verantwoordelijk voor het samentrekken van spieren, maar zorgt ook voor contractie in bijna alle andere celtypen in ons lichaam. Myosine heeft een staart en twee motordomeinen, die binden aan actine (figuur 1c, boven). De motordomeinen katalyseren de hydrolyse van adenosine triphosfaat (ATP). De motor gebruikt de energie die hierbij vrijkomt om een stap van 5 nm langs het actinefilament te zetten en een kracht van een paar piconewton uit te oefenen. Actinefilamenten hebben een asymmetrische structuur, aangeduid met een min- en een plus-uiteinde. Myosine II loopt altijd naar het plus-uiteinde, maar laat na één stap al los. Myosine zorgt alleen voor celcontractie als meerdere moleculen assembleren tot haltervormige filamenten met de staarten in het midden en de motordomeinen aan beide uiteinden (figuur 1c, beneden). Deze bipolaire filamenten kunnen twee actinefilamenten van tegengestelde polariteit naar elkaar toe trekken. In ons model-systeem bestaan de myosine filamenten uit zo'n 300 motoren.

### Reologiemetingen aan het cytoskeletmodel

De netwerken worden geassembleerd tussen de parallelle platen van een

reometer (figuur 2a). We meten de elasticiteit van het netwerk door een vervorming  $\gamma$  op te leggen met de bovenste plaat en de daarvoor benodigde spanning  $\sigma$  te meten (zie schets in figuur 2a). Voor een puur elastisch materiaal is de elastische modulus gelijk aan  $\sigma/\gamma$ . Dit is een redelijke benadering voor actinenetwerken [1].

Een actinenetwerk zonder crosslinks is een slappe gel met een elastische modulus van minder dan 1 Pa (zo'n honderd maal slapper dan pudding).

De elastische modulus neemt enigszins toe wanneer filamine-crosslinks worden toegevoegd (figuur 2b, blauwe data). De toename is echter gering, omdat filamine een bijzondere crosslinker is. Filamine is zelf een lange, flexibele eiwitketen die ongeveer net zo groot is als de maaswijdte van het actinenetwerk. Omdat de filamineketens veel flexibeler zijn dan de actinefilamenten, domineren ze de elastische respons van het netwerk. Niet de actinefilamenten, maar de filamine-crosslinks worden in eerste instantie uitgerekt als het netwerk wordt vervormd [4].

Wanneer we motoren toevoegen, worden de netwerken plotseling tot honderd maal stijver (figuur 2b, rode data). Ter controle heb-

ben we ook de stijfheid gemeten van actinenetwerken met alleen motoren, dus zonder crosslinkers. Het is namelijk bekend dat motoren zelf ook als crosslinks kunnen optreden. De levensduur van de binding tussen myosine en actine hangt af van de ATP-concentratie, de brandstof. Alle metingen zijn uitgevoerd bij een fysiologische ATP-concentratie van 5 mM. Bij deze concentratie is elke motor slechts 1 milliseconde gebonden aan actine, te kort om effectieve crosslinks te geven. Netwerken met alleen motoren zijn inderdaad net zo slap als netwerken zonder motoren (figuur 2c, blauwe data). We concluderen dat de motoren het netwerk stijver maken door mechanochemische activiteit, niet door crosslinking. Daarnaast kunnen we concluderen dat motoractiviteit alleen tot verstijving leidt als het netwerk voldoende gecrosslinkt is. We vinden drempelconcentraties voor zowel de motorfilamenten (tenminste 1 op elke 5 actinefilamenten) als de crosslinks (tenminste 4 per actinefilament).

### Onttrafeling van het mechanisme van actieve verstijving

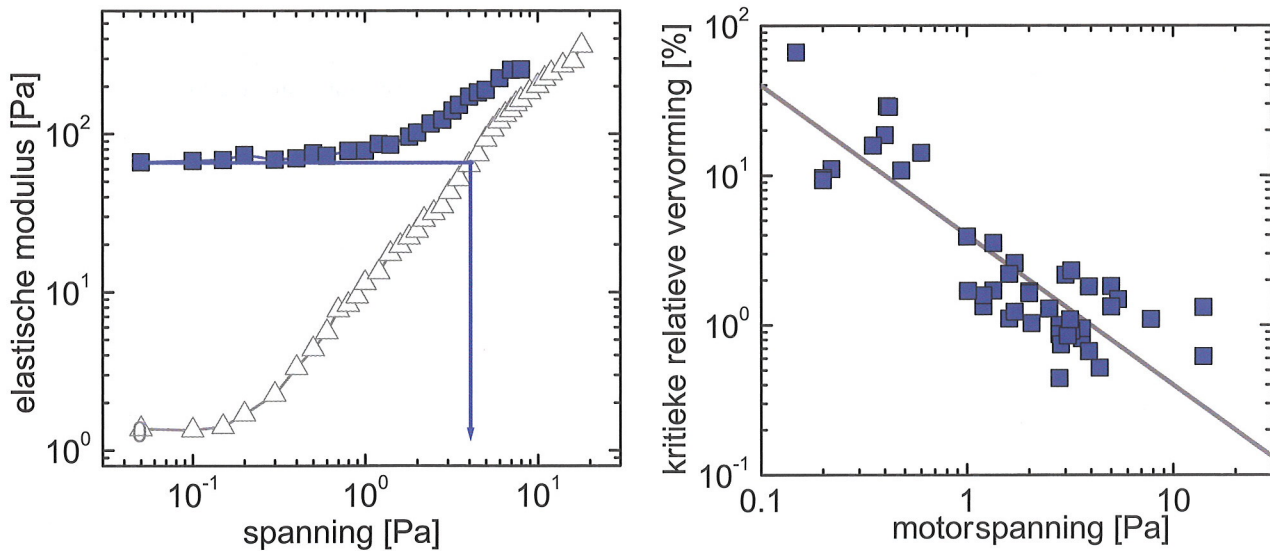
Een motor-filament kan het actinenetwerk beïnvloeden door twee actinefilamenten naar elkaar toe te trekken (figuur 1c). Zonder crosslinks kunnen de actinefilamenten vrijuit langs elkaar schuiven. Dit effect leidt tot het afvoeren van spanning en maakt de gel dus zachter in plaats van stijver. De gel wordt alleen stijver als

Gijsje Koenderink (1974) studeerde in 1998 cum laude af als scheikundige aan de Universiteit Utrecht, waar ze in 2003 cum laude promoveerde, op onderzoek aan



fasengedrag en dynamica van colloïdale suspensies. Ze werkte vervolgens met een Marie Curie- en een FOM/v-subsidie drie jaar als postdoc aan de VU Amsterdam en aan Harvard University (VS). In deze periode verlegde ze haar onderzoek in de richting van de biofysica. In 2006 startte ze een nieuwe groep Biological Soft Matter binnen het FOM Instituut AMOLF. Haar groep tracht de natuurkundige principes van celorganisatie en celmechanica op te helderen, gebruik makend van microscopie, reologie, en optische pincetten.

g.koenderink@amolf.nl



**Figuur 4** Motoren brengen het actinenetwerk intern onder spanning waardoor het netwerk verstijft. a) Elastische modulus als functie van de afschuifspanning zonder motoren (grijs) en met motoren (blauw). De motoren genereren een voorspanning van 4 Pa (blauwe verticale lijn). b) De kritieke vervorming van de actieve netwerken neemt af met toenemende motorgedreven voorspanning.

crosslinks aanwezig zijn, zodat de actinefilamenten niet vrij bewegen. Wanneer een myosinefilament twee filamenten naar elkaar trekt, wordt aan het hele netwerk getrokken. Dit bouwt spanning op in het netwerk (zie kader).

Het was reeds bekend dat actinenetwerken stijver worden wanneer ze vervormd worden in een reometer. Bij kleine vervormingen is de spanning rechtevenredig met de vervorming (figuur 3, links van de verticale lijn), maar bij een grote opgelegde vervorming neemt de spanning sneller dan lineair toe met de vervorming (figuur 3, rechts

van de verticale lijn). Naarmate het materiaal verder vervormd wordt, neemt de helling van de curve, dus de elastische modulus, steeds meer toe.

De motoren genereren binnen in het netwerk een spanning die het actinenetwerk op kan stijven door hetzelfde mechanisme als een externe spanning. We vergelijken in figuur 4a twee netwerken die allebei worden blootgesteld aan steeds grotere afschuifspanningen. Het referentienetwerk zonder motoren (grijs) wordt boven een gegeven kritische spanning steeds stijver. Het actieve netwerk (blauw) begint direct met een bijna honderd maal hogere stijfheid in het lineaire gebied.

Het referentienetwerk laat zien dat de motoren een voorspanning van 4 Pa aanleggen. De maximale voorspanning die we vinden, bij de allerhoogste motor- en crosslinkdichtheden, is 14 Pa. Omgerekend per motor-filament komt dit neer op een kracht van ongeveer 1 pN. Dit is ongeveer wat we kunnen verwachten aangezien één motor onder ideale omstandigheden een kracht van ten hoogste een paar pN kan uitoefenen en dat per motor-filament slechts een paar motoren tegelijk actief zijn.

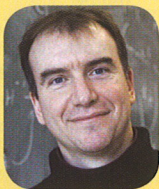
Wat opvalt in figuur 4a is dat het actieve netwerk een groter lineair elastisch regime heeft dan het referentienetwerk: de kritische afschuifspanning schuift van 0,15 Pa naar 1 Pa. Omdat het netwerk echter tegelijk honderd maal stijver

is, is de corresponderende kritische vervorming juist kleiner. De kritische vervorming neemt omgekeerd evenredig af met toenemende voorspanning (figuur 4b). De vervorming is hierbij gedefinieerd als de verschuiving van de bovenste reometerplaat genormeerd door de afstand tussen de platen (zie figuur 2a). Passieve netwerken (zonder motoren) worden stijver bij een kritische vervorming van 30%, terwijl de actiefste netwerken al bij 0,6% vervorming stijver worden. Dit is een belangrijke aanwijzing dat de motoren inderdaad de thermische fluctuaties van de crosslinks grotendeels strak trekken. Een kleine additionele vervorming met de reometer is genoeg om het reeds gespannen netwerk in het niet-lineaire regime te brengen, waar het netwerk stijver wordt naarmate het meer vervormd wordt.

### Cellen zijn altijd gespannen

De meeste cellen in ons lichaam zitten gehecht aan een extracellulaire matrix, meestal een netwerk van collageenvezels. Deze cellen zijn eigenlijk nooit ontspannen: ze bouwen spanning op in hun actine-cytoskelet en trekken daarmee de onderliggende matrix samen. Stijfheidsmetingen aan intacte cellen hebben laten zien dat celstijfheid gecorreleerd is met myosine-activiteit. We hebben nu voor het eerst een fysische verklaring voor deze correlatie. De cel verkeert voortdurend in een niet-lineaire elastische toestand. De stijfheid kan snel en nauwkeurig

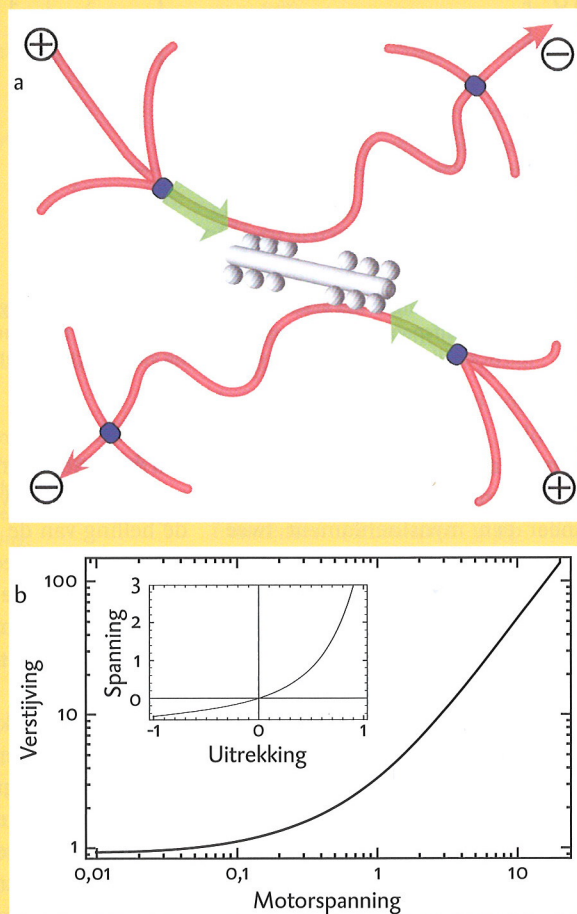
Fred MacKintosh (1962) voltooide de graden van BS in zowel wiskunde als fysica, beide summa cum laude, in 1984 aan de Universiteit van Washington (VS). Hij voltooide zijn PhD in de theoretische fysica aan de Universiteit Princeton (VS) in 1989. Na een postdoctorale beurs van twee jaar bij Exxon Research and Engineering, werd hij assistant professor in fysica in 1991 en Associate Professor with tenure in fysica en biofysica in 1997 aan de Universiteit van Michigan (VS). Hij is sinds 2001 hoogleraar theoretische fysica aan de VU. Hij heeft ook gasthooglerschappen gehad op verschillende universiteiten. Zijn onderzoek concentreert zich op de theoretische fysica van biologische systemen en zachte gecondenseerde materie.



fcm@nat.vu.nl

## Krachtdipoolmodel voor actieve netwerken

We modelleren de contractie-activiteit van een myosinefilament als een krachtdipool geplaatst in een elastische matrix (figuur 5a) [5]. Hoewel de krachten in balans zijn, wordt toch een spanning in het netwerk geïnduceerd. In een niet-lineair elastisch netwerk zal dit leiden tot een lokale verstijving van de elastische matrix. Op dit moment hebben we dit effect alleen kwantitatief berekend in de limiet van rigide crosslinks, waarbij de motoren de actinefilamenten strak trekken (figuur 5b). In de praktijk zal de dipolaire motor-activiteit ruimtelijk niet uniform zijn. De spanning en resulterende netwerkverstijving zullen gelokaliseerd zijn in een gebied van een paar micrometers rondom een myosinefilament. Daarnaast is de motoractiviteit niet constant in de tijd. Elke motor bouwt slechts gedurende een periode van een paar seconden spanning op. De combinatie van vele motoren in een random netwerk leidt er echter toe dat het netwerk gemiddeld toch onder spanning staat en dus stijver is dan een ontspannen gel. Gemiddelde krachten van een paar piconewton per myosinefilament leiden tot een factor honderd verstijving.



**Figuur 5** a) Contractie van een netwerk van actinepolymeren (rood) door motoren (grijs) die lopen naar het plusuiteinde (+) van actine. Dit kan gemodelleerd worden als een dipoolkracht met twee gelijke, tegengesteld gerichte krachten (groene pijlen) gescheiden door een afstand tussen de crosslinks (blauw). b) Voorspelde toename van de stijfheid (elastische modulus) van een netwerk van semiflexibele polymeren tengevolge van motoractiviteit als functie van de motorspanning. Deze toename volgt uit de niet-lineaire relatie tussen spanning en uitrekking (ten opzichte van volledig uitgerekt) van de semiflexibele polymeren (inzet). De motorspanning is genormaliseerd naar de klassieke Eulerknikkraft voor de polymeersegmenten tussen crosslinks.

150

gereguleerd worden door het cytoskelet meer of minder aan te spannen. Ons werk toont aan dat de spanning afhangt van de activiteit van de motoren en van de crosslinkdichtheid. De cel kan beide grootheden precies reguleren met een scala aan hulpwitten. De cel kan zo op verschillende tijdschalen reageren op veranderingen in de omgeving.

### Materialen met een zelf-regulerende stijfheid

Levende cellen onderscheiden zich van kunststoffen zoals plastic, rubber en beton door de eigenschap zichzelf te kunnen aanpassen. Ons werk laat zien hoe eigenschappen van cellen nagebootst kunnen worden om dode materialen 'levende' eigenschappen te geven. De twee cruciale elementen

zijn een niet-lineair elastische polymeregel en enzymen met mechanochemische activiteit. Beide elementen kunnen tegenwoordig synthetisch gebouwd worden met (supramoleculaire) chemie. Materialen die hun eigen stijfheid reguleren zouden bijvoorbeeld gebruikt kunnen worden als schakelbare materialen.

### Referenties

- 1 G.H. Koenderink, Z. Dogic, F. Nakamura, P. Bendix, F.C. MacKintosh, J. Hartwig, T. Stossel en D.A. Weitz, *An active biopolymer network controlled by molecular motors*, PNAS **106** (2009) 15192-7.
- 2 F.C. MacKintosh, J. Kas en P.A. Janmey, *Elasticity of semiflexible biopolymer networks*, Phys. Rev. Lett. **75** (1995) 4425-4428.
- 3 C.P. Brangwynne, G.H. Koenderink, F.C. MacKintosh en D.A. Weitz, *Nonequilibrium microtubule fluctuations in a model*

cytoskeleton, Phys. Rev. Lett. **100** (2008) 118104.

- 4 C.P. Broedersz, C. Storm en F.C. MacKintosh, *Nonlinear elasticity of composite networks of stiff biopolymers with flexible linkers*, Phys. Rev. Lett. **101** (2008) 118103.
- 5 F.C. MacKintosh en A.J. Levine, *Nonequilibrium mechanics and dynamics of motor-activated gels*, Phys. Rev. Lett. **100** (2008) 018104.