Actieve vezelnetwerken

Van connectie tot contractie

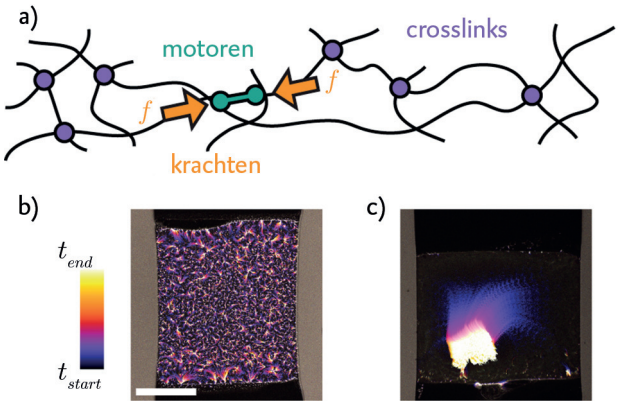
Om te begrijpen hoe biologische cellen zichzelf actief kunnen samentrekken maakten wij een eenvoudig model van het cytoskelet dat cellen vormgeeft. Ons model bestaat uit drie componenten: actinefilamenten, *crosslinkeiwitten* die deze filamenten verbinden en moleculaire motoren. Actieve cytoskeletnetwerken blijken door zelforganisatie robuust kritisch gedrag te vertonen. José Alvarado, Michael Sheinman, Abhinav Sharma, Fred C. MacKintosh, Gijsje H. Koenderink

Vanuit fysisch oogpunt kunnen levende cellen geclassificeerd worden als zachte gecondenseerde materie, zoals colloïdale vloeistoffen, granulaire media, emulsies en polymeren. Deze materialen hebben met elkaar gemeen dat ze gemakkelijk uit evenwicht kunnen worden gedreven door externe krachten, bijvoorbeeld een elektrisch veld of een mechanische kracht. Deze gevoeligheid komt voort uit het feit dat de componenten bijeen worden gehouden door zwakke interacties met een bindingsenergie die vergelijkbaar is met de thermische energie. Levende cellen onderscheiden zich echter van 'dode' zachte materie door de eigenschap dat ze zichzelf *actief* uit evenwicht drijven. Een belangrijke factor daarbij is het cytoskelet, een actieve gel bestaande uit eiwitvezels die stevigheid verleent aan de cel maar ook actief kan samentrekken dankzij moleculaire motoren. Deze activiteit stelt de cel in staat zich te delen en voort te bewegen. Drie componenten zijn in elk geval essentieel voor celcontractie: actinefilamenten, myosinemotoren en *crosslinkeiwitten*. Tot nu toe was de rol van de crosslinkeiwitten in celcontractie echter onduidelijk. Wij vermoedden dat crosslinks nodig zijn om de krachten die de motoren uitoefenen over de hele gel te verdelen. Om dit idee te testen, bouwden we een 'reageerbuismodel' van het cytoskelet [1].

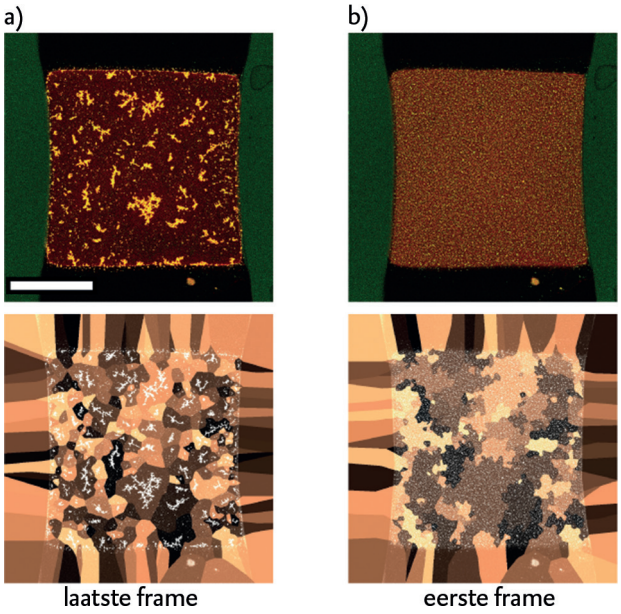
Een reageerbuismodel van het cytoskelet

Het hoofdingrediënt van ons modelsysteem is actine, een globulair eiwit dat spontaan polymeriseert tot lange dunne filamenten (de zwarte draden in figuur 1a). Bij een concentratie van 0,5 mg/ml vormen de filamenten een volumevullend netwerk met een poriegrootte van 0,4 µm. Om het netwerk actief te maken, voegen we myosine-eiwitten toe. Myosine heeft twee motordomeinen die binden aan actinefilamenten. Actinefilamenten hebben een asymmetrische structuur, aangeduid met 'min-' en 'plus-' uiteinden. Elk motordomein van myosine gebruikt chemische energie geleverd door hydrolyse van adenosine triphosphaat (ATP) om stappen te zetten in de richting van het plus-uiteinde van een actinefilament. Myosinemoleculen vormen bipolaire filamenten met de motordomeinen aan beide uiteinden (de groene halters in figuur 1a), zodat ze twee tegengesteld gerichte actinefilamenten naar elkaar toe trekken. Zonder crosslinks verwachtten we echter dat de actinefilamenten vrijuit langs elkaar schuiven. Onze hypothese was dat een zekere minimale dichtheid van crosslinks nodig is om contractie mogelijk te maken. Om deze hypothese te testen deden we experimenten bij een constante myosineconcentratie en varieerden we de connectiviteit van het netwerk door verschillende concentraties van het crosslinkeiwit fascine te gebruiken (de paarse cirkels in figuur 1a).

Om netwerkcontracties zichtbaar te maken met fluorescentiemicroscopie merken we de actinefilamenten met een rode kleurstof en de myosine motoreiwitten met een groene kleurstof. Binnen één minuut na samenvoegen van de componenten vormen de actinefilamenten een homogeen netwerk. Bij lage crosslinkdichtheid trekken de myosinemotoren vervolgens het netwerk samen, maar alleen lokaal (figuur 1b). Bij hoge crosslinkdichtheid zien we daarentegen dat de motoren het gehele netwerk samentrekken tot één grote cluster die de vierkante vorm van de samplehouder behoudt (figuur 1c). De lengteschaal waarop contractie plaatsvindt hangt dus sterk af van de crosslinkdichtheid. We kunnen dit effect interpreteren in termen van de connectiviteit van het netwerk. Bij lage crosslinkdichtheid bestaat het netwerk uit allemaal losse clusters van onderling verbonden filamenten. De motoren trekken daardoor alleen de meest nabijgelegen filamenten samen. Echter, bij hoge crosslinkdichtheid zijn alle filamenten in het netwerk verbonden tot één volumevullende cluster, die als geheel wordt samengetrokken door de motoren. Bij een kritische crosslinkdichtheid – waarbij net voldoende crosslinks aanwezig zijn om



Figuur 1 a) Het experimentele modelsysteem bestaat uit myosinemotoren die een netwerk van actinefilamenten verbonden met crosslinkeiwitten samentrekken. b) Projecties van filmpjes van een samentrekkend netwerk bij lage crosslinkdichtheid (links, filmpje duurt achttien minuten) en hoge crosslinkdichtheid (rechts, filmpje duurt drie minuten).



Figuur 2 We meten de grootteverdeling van clusters die samentrekken, door de myosineclusters (wit) te lokaliseren in het laatste frame, het netwerk onder te verdelen in domeinen (beige) en de expansie van de domeinen te volgen terwijl we het filmpje terug spelen naar het eerste frame.

een samenhangend netwerk te maken – zien we een overgang van lokale naar macroscopische contractie.

Deze overgang doet sterk denken aan een zogenaamde 'percolatieovergang', een generiek fenomeen dat optreedt in random netwerken: bij een kritische connectiviteit vindt een scherpe overgang plaats van een niet-verbonden naar een verbonden fase. Bekende voorbeelden van percolatieovergangen zijn elektrische geleiding in een random netwerk van weerstanden boven een kritische dichtheid van weerstanden, een bos dat geheel in vlammen opgaat boven een kritische beplantingsdichtheid en de verspreiding van een epidemie boven een kritische bevolkingsdichtheid. Voor kleine dichtheid (lage connectiviteit) bestaat zo'n random netwerk uit clusters met een eindige afmeting van verbonden weerstanden, brandende bomen of zieke mensen. Zodra de dichtheid voorbij de percolatieovergang komt, wordt het systeem echter overspannen door een macroscopische cluster die elektriciteit geleidt of een bosbrand of epidemie verspreidt.

Gijsje Koenderink promoveerde in 2003 aan de Universiteit Utrecht (cum laude) op het gebied van fysische chemie van colloïdale materie. Na een postdoc aan de Vrije Universiteit Amsterdam en Harvard University (Verenigde Staten) startte ze in 2006 de groep Biological Soft Matter binnen het FOM-Instituut AMOLF.

G.Koenderink@amolf.nl

Fred MacKintosh voltooide zijn promotie in theoretische fysica aan Princeton University (Verengigde Staten) in 1989. Na een postdoc bij Exxon Research and Engineering werd hij Assistant Professor (1991) en vervolgens Associate Professor (1997) aan de Universiteit van Michigan in de Verenigde Staten. Hij is sinds 2001 hoogleraar Theoretische Fysica van (biologische) zachte gecondenseerde materie aan de Vrije Universiteit.

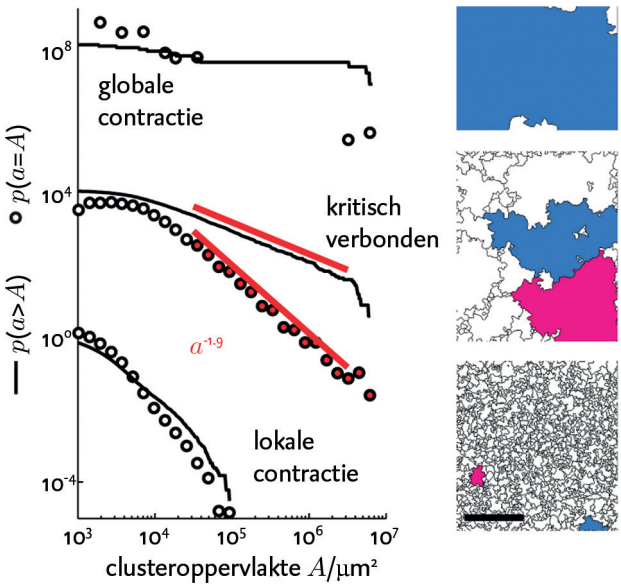
José Alvarado deed zijn promotieonderzoek in de groep van Gijsje Koenderink op AMOLF en promoveerde in juni 2013 aan de Vrije Universiteit. Hij is momenteel werkzaam als postdoc in de groep van Hosoi aan het MIT (VS).

Michael Sheinman is werkzaam als postdoc aan het Max Planck Institute for molecular genetics in Berlijn. Hij promoveerde aan het Technion in Haifa op het gebied van theorie van genregulatie en verrichtte daarna als postdoc onderzoek in de groep van Fred MacKintosh aan de Vrije Universiteit.

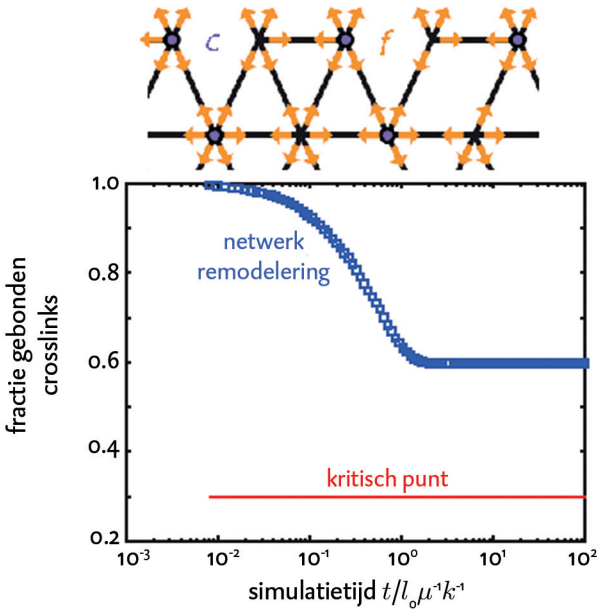
Abhinav Sharma is postdoc in de groep van MacKintosh aan de Vrije Universiteit. Hij promoveerde in 2011 aan de Technische Universiteit Eindhoven op het gebied van modellering van Organic Field Effect Transistors.

Kwantitatieve beeldanalyse van netwerkcontracties

Om te testen of de percolatietheorie van toepassing is op de actieve netwerken meten we de grootte van de clusters die we met microscopie waarnemen door middel van automatische beeldanalyse. Beginnend bij het laatste frame van elk filmpje identificeren we alle motorclusters en verdelen we het netwerk onder in territoria die elk bij een motorcluster horen (figuur 2a). Vervolgens spelen we het filmpje achteruit af en volgen de 'expansie' van alle territoria, net zolang totdat we bij het eerste frame arriveren waar het netwerk homogeen is (figuur 2b). Hiermee kunnen we de clusters identificeren die elk intern verbonden zijn zodat de motoren deze cluster als één geheel samentrekken.



Figuur 3 Verdeling van clustergroottes $p(a = A)$ in termen van oppervlak A voor drie netwerken met toenemende crosslink-concentratie, samen met representatieve voorbeelden (met het grootste cluster in blauw). De getrokken zwarte lijnen geven de cumulatieve verdelingen, $p(a > A)$.



Figuur 4 Moleculairedynamicasimulaties laten zien dat actieve netwerken (met crosslinkconcentratie c en motorkracht f) gaandeweg hun verbondenheid verliezen doordat motoren de crosslinks lostrekken. De simulatietijd is dimensieloos door te herschalen met de lengte van de lijnsegmenten l_o, hun stijfheid k en de mobiliteit van de knooppunten μ.

Bij lage crosslinkdichtheid vinden we alleen clusters met kleine oppervlaktes (figuur 3 onder). Bij hoge crosslinkdichtheid vinden we een bimodale verdeling met een paar clusters ter grootte van het hele systeem (~2,5 mm) en een aantal zeer kleine clusters (figuur 3 boven). Tussen deze twee limieten vinden we een heel speciale verdeling van clustergroottes, met clusters van alle groottes van klein tot groot. De waarschijnlijkheid om een cluster met oppervlak a te vinden volgt een machtsfunctie van a met een exponent van -1,9 (figuur 3 midden). Dit gedrag komt overeen met de percolatietheorie: in een kritisch verbonden random netwerk verwachten we een machtsfunctie, met een exponent van -2. Tot onze grote verrassing zagen wij dit kritische gedrag echter over een enorm breed gebied van crosslinkdichtheden, terwijl de percolatietheorie een extreem scherpe overgang voorspelt.

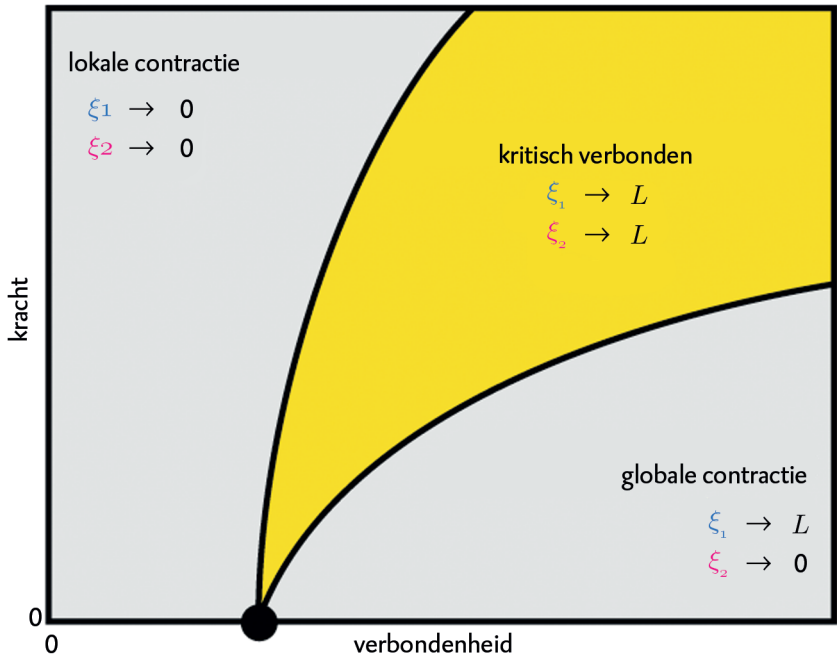
Uitbreiding van percolatietheorie voor actieve netwerken

Een belangrijke aanname binnen de percolatietheorie is dat de connectiviteit constant is. Voor een actinenetwerk in thermisch evenwicht is de gemiddelde connectiviteit inderdaad constant: de crosslinkeiwitten binden weliswaar niet permanent, maar ze binden en ontbinden met een constante snelheid. Fascine blijft typisch een aantal seconden gebonden aan een actinefilament. Op basis van *single molecule*-experimenten, waarbij met optische pincetten aan enkele moleculen wordt getrokken, weten we echter dat de dissociatiesnelheid meestal verhoogd wordt als een binding onder spanning staat. Het is daarom zeer aannemelijk dat de myosinemotoren de crosslinks kunnen lostrekken, zodat een netwerk dat begint met een hoge crosslinkdichtheid gaandeweg zijn verbondenheid verliest.

Omdat deze hypothese experimenteel lastig te testen is, besloten we om een computermodel te implementeren waarin we naar believen de invloed van motoren op de bindingskinetiek van de crosslinks kunnen variëren. We modelleren het actinenetwerk als een tweedimensionaal rooster van knooppunten verbonden door lijnsegmenten [2]. Elk lijnsegment wordt samengetrokken door een paar van tegengestelde krachten f op de twee knooppunten. Elk kruispunt wordt gecrosslinkt met een waarschijnlijkheid p die afhangt van de crosslinker-concentratie c en elke crosslink laat los met een dissociatiesnelheid die exponentieel toeneemt met de spanning die erop staat. Als we de motoractiviteit (f) constant houden en de crosslinkconcentratie c variëren, vinden we dezelfde drie regimes terug die we ook experimenteel zien: lokale contractie, opbreking in clusters met groottedistributie beschreven door een machtsfunctie en macroscopische contractie. Bovendien vinden we net als in het experiment een brede percolatieovergang. De netwerkconnectiviteit neemt tijdens de simulatie af met de tijd tot op een punt waar het netwerk geen spanning meer kan dragen en crosslinkdissociatie stopt (figuur 4b). Verrassenderwijs neemt de connectiviteit minder af dan verwacht op basis van *random bond dilution*. De goede overeenkomst tussen de simulatie en het experiment suggereert dat de motoren een goed verbonden netwerk vanzelf naar het kritische punt drijven. Op dit punt worden de krachten niet langer door het hele netwerk doorgegeven en scheurt het netwerk zichzelf uiteen.

'Fasediagram' voor actieve vezelnetwerken

Op basis van onze data concluderen we dat samentrekking van cytoskeletnetwerken door moleculaire motoren afhangt van een balans tussen de motoren en de crosslinks die het netwerk verbinden (figuur 5). Spierachtige samentrekking van het netwerk treedt alleen op als de verbondenheid groot is en de motoractiviteit laag. De spanning op de crosslinks is dan laag en het netwerk heeft na het loslaten van een crosslink voldoende tijd om



Figuur 5 Schematisch fasediagram voor contractie van actieve netwerken, waarbij ξ_1 en ξ_2 de afmetingen weergeven van het grootste en op een-na-grootste cluster en L de afmeting van het systeem.

spanning te relaxeren voordat een volgende crosslink loslaat. Als het netwerk aan alle kanten vastzit aan een wand bouwt het geleidelijk spanning op totdat het uiteindelijk breekt door de nucleatie van één grote scheur op een zwak punt. Als de motoractiviteit daarentegen hoog is, ontstaan overal in het netwerk kleine scheuren doordat de crosslinks zo snel los worden getrokken dat het netwerk tussentijds niet voldoende tijd heeft om spanning te relaxeren. Zelfs als de crosslinkconcentratie in principe boven de percolatieovergang ligt, zal het netwerk toch in stukken uiteenscheuren.

Zelfbrekende netwerken in de biologie

Kritisch gedrag over een breed parameterbereik (soms aangeduid als *self-organized criticality*) is in allerlei biologische systemen gerapporteerd, variërend van fasescheiding van lipiden in het celmembraan tot netwerken van metabolische eiwitten in bacteriën en het vuren van groepen van zenuwcellen. Meestal is de microscopische oorsprong van dit gedrag onbekend. In dit geval kunnen we het robuuste kritische gedrag van actieve netwerken herleiden tot een simpel microscopisch mechanisme. Dit mechanisme kan helpen om defecten die kunnen optreden in celcontractie te herleiden tot een moleculaire oorsprong.

Referenties

1 J. Alvarado, M. Sheinman, A. Sharma, F.C. MacKintosh en G.H. Koenderink, *Molecular motors robustly drive active gels to a critically connected state*, *Nature Physics* **9** (2013) 591-597.

2 M. Sheinman, C.P. Broedersz en F.C. MacKintosh, *Actively stressed marginal networks*, *Phys. Rev. Lett.* **109** (2012) 238101.