

Aktindynamik und WASP/ WAVE-Proteine

Theresia E. B. Strada¹ und Jürgen Wehland²

¹AG Signaltransduktion und Motilität, ²Abteilung Zellbiologie, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig

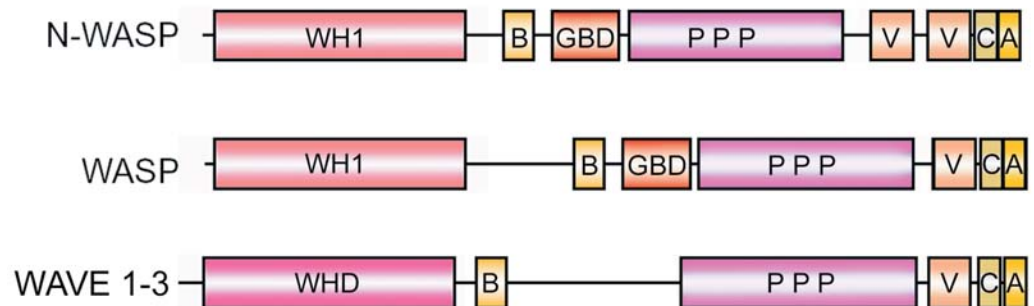


Abb. 1: Modulare Domänenorganisation der WASP-Proteinfamilie in Säugern. Die Familie umfasst fünf Mitglieder in Säugern, das hämatopoetische WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein), das ubiquitär exprimierte so genannte (neuronal) N-WASP sowie drei WAVE(WASP- und Verprolin-homologe)-Proteine. WASP und N-WASP tragen eine WH1(WASP-Homologie 1)-Domäne, wohingegen WAVE-Proteine stattdessen eine WHD (WAVE-Homologie)-Domäne aufweisen. B bezeichnet eine stark basische Region, der F-Aktin- und PIP2-Bindung für WAVES zugesprochen wird. Die GBD (Rho-GTPasen Bindungsdomäne) von WASP und N-WASP erkennt aktiviertes Cdc42 und fehlt in allen WAVE-Proteinen. Eine prolinreiche Domäne (PPP) findet sich in allen Familienmitgliedern und stellt eine Reihe von Interaktionsoberflächen für SH3(Src-Homologie 3)-Domänen-haltige Signalproteine und eine Bindungsstelle für Profilin bereit. V (Verprolin-Homologie), C (Cofilin-Homologie) und A (saure = 'acidic') Regionen bilden gemeinsam die VCA Domäne, die Arp2/3-Komplex-vermittelte Aktinnukleation induziert. (PIP2: Phosphoinositol-4,5-Biphosphat, PIP3: Phosphoinositol-3,4,5-Triphosphat)

Die kontinuierliche Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts durch Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten ist von fundamentaler Bedeutung für viele zelluläre Prozesse wie Zellmigration und Phagozytose. Für die Neubildung von Aktinfilamenten nehmen der Arp2/3-Komplex und Mitglieder der Forminfamilie eine Schlüsselfunktion ein^[1]. Eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli steuert diese Prozesse über unterschiedliche Signalkaskaden, wobei die Mitglieder der Familie der kleinen Rho-GTPasen (z.B. RhoA, Cdc42 und Rac1) als molekulare Schalter eine zentrale Rolle in der Modulation der Aktindynamik spielen. Cdc42 und Rac stimulieren zum Beispiel die Neubildung von Aktinfilamenten, die zur Ausbildung zellulärer Fortsätze wie Filopodien und Lamellipodien führen^[2]. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die über kleine GTPasen die Reorganisation des Aktinzytoskeletts steuern, ist daher von grundlegender Bedeutung für das Verständnis dieses komplexen dynamischen Zellverhaltens.

WASP/WAVE-Proteine

► Der limitierende Schritt für die Neubildung bzw. Polymerisation von Aktinfilamenten ist die Nukleation, d.h. die Bildung eines Trimers aus drei Aktinmonomeren. Eine Zelle verfügt über verschiedene Faktoren, die regulierend in diesen Prozess eingreifen. Hierbei spielen die Mitglieder der WASP-Proteinfamilie eine zentrale Rolle, da sie die Verbindung zwischen den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac und dem Aktinnukleator Arp2/3-Komplex herstellen. In Säugern umfasst die WASP-Proteinfamilie fünf Mitglieder, das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP), das (neuronal) N-WASP und drei WAVE-Proteine (Abb. 1). Während WASP nur im hämatopoetischen System vorkommt, ist N-WASP ubiquitär exprimiert, ebenso wie die WAVE-Isoform WAVE2, wohingegen WAVE1 und -3 hauptsächlich im Nervensystem vorkommen. Obwohl die WASP- und WAVE-Proteine gemeinsame biochemische und strukturelle Eigenschaften aufweisen (Abb. 1), besonders hinsichtlich der Rekrutierung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes zur Nukleation von Aktinfilamenten durch die konservier-

te C-terminale VCA-Domäne, unterscheiden sie sich in ihrer Aktivierbarkeit durch verschiedene zelluläre Signale.

Die N-Termini der WASP- und WAVE-Proteine unterscheiden sich am stärksten voneinander und sind in allen Spezies evolutiv konserviert. Die N-terminalen WH1(WASP-Homologie 1)-Domänen von WASP und N-WASP weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit den EVH1-Domänen der Ena/VASP-Proteinfamilie auf und binden an prolinhaltige Motive wie z.B. in WIP (WASP-interagierendes Protein). Die WHD (WAVE-Homologie-Domäne) der WAVE-Proteine stellt die Interaktionsoberfläche für Abi-Proteine und somit die Verbindung zu den anderen Komponenten des ubiquitären WAVE-Komplexes dar (Details siehe unten). WASP und N-WASP können über ihre zentrale GTPase-bindende Domäne (GBD) direkt an aktiviertes Cdc42 binden. Diese Bindung führt zu einer Entfaltung bzw. Konformationsänderung von WASP und N-WASP, sodass die VCA-Domäne den Arp2/3-Komplex binden und aktivieren kann (für Details s.u. und Abb. 2B,C). Im Gegensatz zu WASP und N-WASP sind die WAVE-Proteine in den Rac-Signalweg eingebunden, ent-

halten aber keine GBD-Domäne und binden daher nicht direkt an diese GTPase (Abb. 2C). Eine drängende Frage im Aktin-feld während der letzten Jahre betrifft daher den Mechanismus der Rac-vermittelten Neubildung von Aktinfilamenten. Trotz intensiver Untersuchungen konnten erst im letzten Jahr grundlegende Einblicke in die Rac-abhängige Aktivierung von WAVE-Proteinen gewonnen werden^[3].

Der WAVE-Komplex

Die Rolle der WAVE-Proteine für die Ausbildung zellulärer Protrusionen wie Lamellipodien ist schon früh erkannt worden, aber der Modus ihrer Regulation wird noch lebhaft diskutiert. Alle WAVE-Isoformen wurden übereinstimmend an den Spitzen von Lamellipodien lokalisiert^[4,5], obgleich es geringe Unterschiede in der Lokalisation in

verschiedenen Zellsystemen und zwischen den drei Isoformen zu geben scheint. Während WAVE1 und -3 vornehmlich bzw. ausschließlich im Nervensystem exprimiert werden, findet sich das ubiquitäre WAVE2 als einzige Isoform in vielen kultivierten Zelllinien^[6].

Miki und Kollegen haben im Jahr 2000 eine erste mögliche Verbindung von Rac zu WAVE über den Signaladaptor Irs53 be-

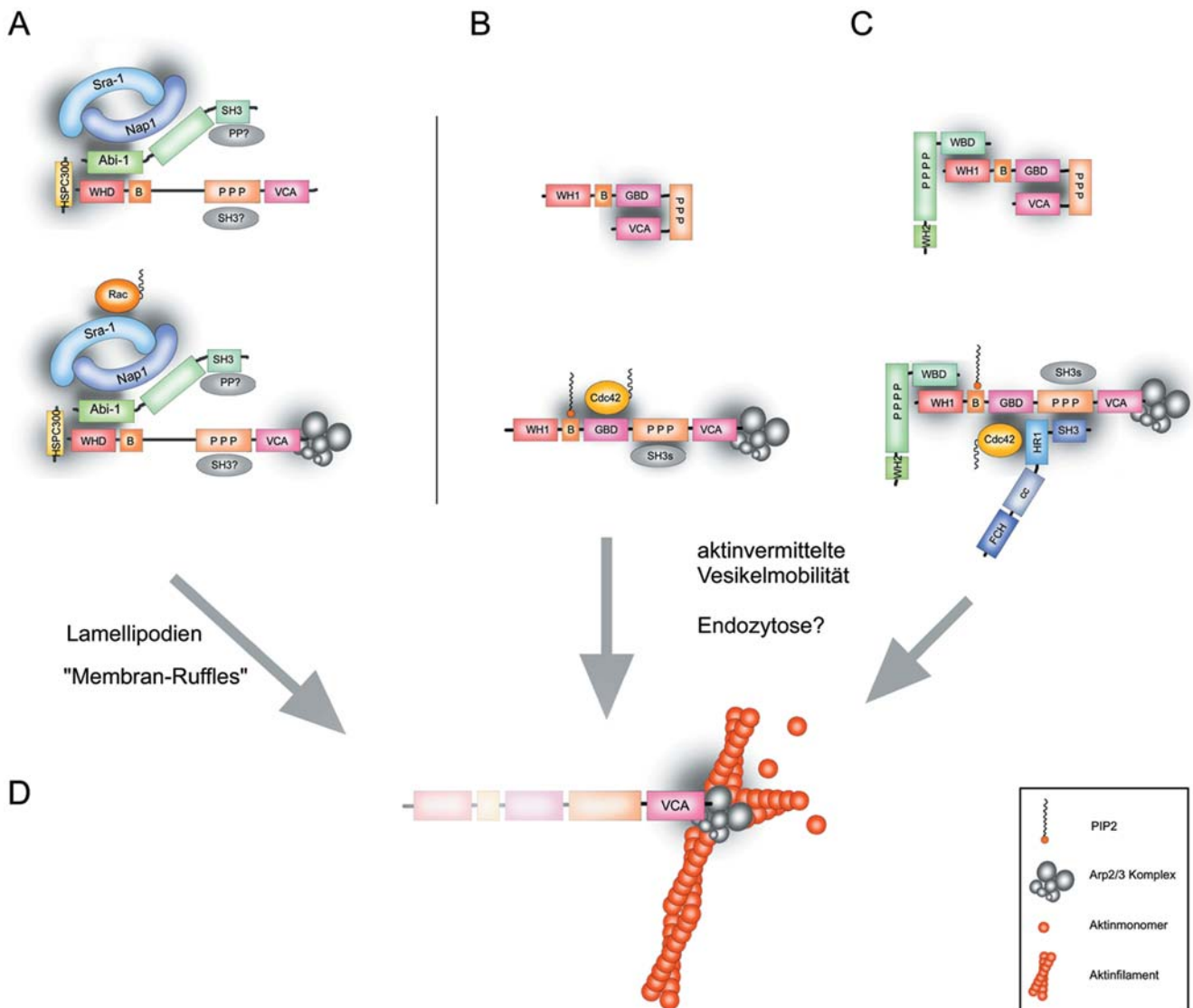


Abb. 2: Modelle zur Aktivierung von WASP/WAVE-Proteinen. (A) WAVE (Rot, Domänen: vergl. Abb. 1) ist konstitutiv an die Proteine Sra-1 (oder die Isoform PIR121, Hellblau), an Nap1 (Blau) und Abi-Proteine (Abi-1 oder Abi-2, Grün) sowie das 9 kDa-Peptid HSPC300 (Gelb) gebunden. Sra-1 ist ein so genannter Rac-Effektor; es erkennt spezifisch die aktivierte Form der GTPase Rac. Dieser Vorgang trägt, soweit zurzeit bekannt, zur Rekrutierung und Aktivierung des gesamten WAVE-Komplexes bei. Mögliche regulatorische Interaktionen der Polyprolin-Domäne von WAVE mit SH3-haltigen Signalproteinen (SH3?,) bzw. der SH3-Domäne von Abi mit anderen prolinreichen Proteinen (PP?) im Kontext des WAVE-Komplexes sind nicht hinlänglich erforscht. (B) Das zurzeit gängige Modell der WASP- und N-WASP-Regulation (Rot, vergl. Abb. 1) geht davon aus, dass diese Proteine in einer autoinhibierten Konformation vorliegen und durch Bindung an die aktivierte GTPase Cdc42 (gelb) aktiviert (geöffnet) werden und so den Arp2/3-Komplex binden und aktivieren können. Die zusätzliche Bindung von SH3-Domänen tragenden Signalproteinen (SH3s, Grau, z.B. von Nck1 und Grb2) oder von PIP2 (Orange) tragen gemeinsam mit weiteren signalabhängigen Modifikationen (Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungen, nicht gezeigt) zur vollen Aktivierung der Moleküle bei. (C) Neuere Studien zeigen, dass WASP und N-WASP (Rot, s.o.) im inaktiven Zustand über die WBD (WASP-Bindedomäne) an die Proteine der WIP-Familie (WASP interacting protein, Grün) gebunden sind. Nach Aktivierung von Cdc42 (gelb) wird dieses im Komplex mit Toca-1 (transducer of Cdc42 dependent actin assembly, Blau) an WASP bzw. N-WASP rekrutiert, wo beide gemeinsam die vollständige Aktivierung von WASP/N-WASP vermitteln. (D) Der Mechanismus der Arp2/3-Komplex-Aktivierung ist, soweit bekannt, bei allen WASP/WAVE-Proteinen zumindest qualitativ gleich, und die Spezifität der zellulären Antwort wird durch differenzielle, signalabhängige Rekrutierung der einzelnen Familienmitglieder vermittelt. Die Verweildauer der WASP/WAVE-Proteine am Arp2/3-Komplex nach dessen Aktivierung ist unbekannt. (cc = coiled coil; WH2 = WASP-Homologie 2; V = Verprolin-Homologie; bekannte molekulare Interaktionen sind grau hinterlegt)

schrieben^[7]. Ergebnisse aus anderen Arbeitsgruppen haben dieses Modell aber in Frage gestellt und Irs53 eine Interaktion mit Cdc42 anstelle von Rac sowie eine Rolle bei der Cdc42-vermittelten Filopodienbildung zugeschrieben^[8]. Im Jahr 2002 wurde dann erstmals ein Proteinkomplex aus Gehirngewebe gereinigt, der aus mindestens vier Proteinen, nämlich dem Rac-Bindeprotein Sra-1 (Specifically Rac associated protein 1), Nap1 (Nck associated protein 1), Abi-2 (Abl Interactor-2) und WAVE1. *In vitro*-Aktinpolymerisationsassays mit diesem Komplex legten nahe, dass es sich um einen inhibitorischen Komplex handelt, der durch Zugabe von aktiviertem Rac zerfällt und aktives WAVE freigibt^[9].

Arbeiten von Innocenti und Kollegen^[10] sowie aus unserem Labor^[6] haben aber ergeben, dass alle vier Komponenten nach Rac-Aktivierung (z.B. nach Mikroinjektion oder Überexpression von konstitutiv aktiven Rac-Mutanten) gemeinsam mit WAVE an die lamellipodiale Spitze rekrutiert werden und für die Dauer des lamellipodialen Vorschubs dort verbleiben. Zudem konnten wir zeigen, dass eine RNA-Interferenz (RNAi) vermittelte Reduktion der Proteinnengen der einzelnen Komponenten den gleichen Phänotyp auslöst, nämlich das komplette Fehlen von Lamellipodien. Biochemische Analysen haben außerdem ergeben, dass die eben genannten Komponenten des WAVE-Komplexes sowohl im inaktiven Zustand als auch nach experimentell induzierter Rac-Aktivierung oder sogar nach Zugabe von rekombinantem Rac aneinander gebunden bleiben.

Aus diesen Daten ergibt sich das aktuelle Modell (*Abb. 2A*), in welchem WAVE-Proteine konstitutiv an Sra-1, Nap1 und Abi-Proteine gebunden sind und nach Rac-Aktivierung über Sra-1 als Komplex an die Plasmamembran rekrutiert werden, wo dann lokal der Arp2/3-Komplex aktiviert wird und die Aktinpolymerisation induziert (*Abb. 2D*).

WASP-Funktion in Säugerzellen

Aufgrund der Fähigkeit von WASP und N-WASP an Cdc42 zu binden, wurde lange Zeit angenommen, dass diese Proteine essenziell für die Cdc42-vermittelte Filopodienbildung sind. Umso überraschender war die Feststellung, dass die Mikroinjektion von aktivem Cdc42 auch in N-WASP-Knockout-Zellen zur Filopodienformation führt^[11].

Klar gezeigt ist hingegen die Rolle von N-WASP bei der Bildung bestimmter anderer Aktinstrukturen an der Plasmamembran und an Endomembranen. Zum Beispiel haben Krankheitserreger wie *Vaccinia Virus*^[12] oder pathogene *E. coli*^[13] Strategien entwickelt, um N-WASP/WASP zu rekrutieren und so Aktinkometenschweife bzw. „Pedestals“ zu induzieren. Zudem konnten wir zeigen, dass die Aktinschweifbildung an Endomembranvesikeln essenziell von N-WASP abhängt, d.h. in N-WASP-Knockout-Zellen komplett fehlt^[14].

Darüber hinaus interagieren WASP und N-WASP mit etlichen endozytischen Proteinen^[15]. In Übereinstimmung mit diesen biochemischen Eigenschaften von N-WASP konnten Merrifield et al.^[16] in TIRF (total internal reflection)-Mikroskopie-Experimenten zeigen, dass die Aktinakkumulation an sich abschnürenden Clathrin-Pits mit einer N-WASP-Rekrutierung einhergeht. Die genaue Funktion von WASP/N-WASP bei der Endozytose ist aber noch unbekannt. Zusammengefasst zeichnet sich aber ab, dass WASP/N-WASP und WAVE bei unterschiedlichen zellulären Prozessen eine Rolle spielen, deren komplexes Zusammenspiel dann in gerichteter Zellmigration bzw. Chemotaxis resultiert.

Die Regulation von N-WASP

N-WASP liegt im Zytoplasma in autoinhibierter Form vor. Diese Autoinhibition beruht auf einer intramolekularen Interaktion der B-GBD mit der C-terminalen VCA-Domäne.





Mit Ausnahme der Mitglieder der WIP-Familie (s.u.) stehen alle bisher beschriebenen Bindungspartner von N-WASP mit seiner Aktivierung bzw. dessen aktiviertem Zustand in Verbindung (z.B. Nck und Grb2). Die zentrale Polyprolin-Region von WASP und N-WASP bindet eine Vielzahl von SH3-Domänen enthaltenden Proteinen wie Nck, Grb2, Intersectin oder Syndapin^[3] (Abb. 2B). Über das CRIB-Motif interagieren WASP und N-WASP spezifisch mit aktiviertem, d.h. GTP-gebundenem Cdc42. In direkter Nachbarschaft zu diesem CRIB-Motif befindet sich die B(basische)-Domäne, die eine Bindung an das saure Phospholipid PIP2 vermittelt. *In vitro*-Aktinpolymerisationsassays haben ergeben, dass autoinhibiertes N-WASP durch die Bindung an GTP-Cdc42 aktiviert werden kann. Diese Aktivierung kann durch Bindung von PIP2 an die B-Domäne kooperativ verstärkt werden. Ähnliches gilt für die Bindung der SH3-Domänen Proteine Nck und Grb2 an die Polyprolin-Domäne, die alleine keine vollständige Aktivierung bewirken können (Abb. 2B). Darüber hinaus kann die Aktivität von N-WASP stabilisiert werden, indem es nach der Aktivierung an Tyrosinresten phosphoryliert wird^[3]. Neue Forschungen haben allerdings ergeben, dass N-WASP im inhibierten Zustand an Proteine der WIP(WASP interacting protein)-Familie gebunden ist. Diese umfassen WIP selbst, WICH (oder WIRE) und CR16. Die N-terminale WH1-Domäne von N-WASP bildet dabei die Interaktionsoberfläche für die Familie der prolinreichen WIPs. Zudem wurde daraus geschlossen, dass die Bindung an WIP die inhibierte Konformation von N-WASP stabilisiert, und dass das neue Protein Toca-1 (transducer of Cdc42 dependent actin assembly) ein essenzieller Kofaktor für die Cdc42-vermittelte Aktivierung des WASP/WIP Komplexes ist^[17]. Dabei kann Cdc42 an die GBD in WAS-Proteinen und an die HR1-Region in Toca-1 binden und die SH3-Domäne von Toca-1 an die prolinreiche Region in WAS-Proteinen (Abb. 2C).

Ob WIP-Proteine an aktives N-WASP gebunden bleiben, wie aus Experimenten mit Vaccinia Virus abgeleitet wurde^[12], oder den aktiven Komplex verlassen, ist jedoch noch unbekannt. Die molekularen Details dieser Interaktionen sowie die Rolle der FCH-Domäne (Fes/CIP4-Homologie-Domäne) in Toca-1 sind noch nicht erforscht.

Ausblick

Obwohl seit langem die molekularen Mechanismen, die den dynamischen Veränderungen des Aktinzytoskeletts zugrunde liegen, intensiv untersucht werden, konnten erst während der letzten Jahre entscheidende Durchbrüche erzielt werden. Verantwortlich

hierfür ist die Entwicklung neuer zellbiologischer und molekulargenetischer Methoden (z.B. Expression fluoreszierender Fusionsproteine für die Analyse der Proteindynamik in lebenden Zellen oder die gezielte Anwendung von RNA-Interferenz) und neuer biochemischer Ansätze wie die *in vitro*-Rekonstitution von aktinvermittelter Motilität in zellfreien Systemen. Die Kombination dieser Technologien und deren kontinuierliche Weiterentwicklung werden auch in Zukunft wesentlich dazu beitragen, die komplexen Regulationsmechanismen der dynamischen Aktinreorganisation im Detail zu verstehen und letztendlich zu entschlüsseln.

Literatur

- [1] **Zigmond, S.H.** (2004): Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end. *Curr Top Dev Biol.* 63: 145–88.
- [2] **Hall, A.** (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279(5350): 509–14.



Dr. rer. nat. Theresia Stradal

Studium der Biologie an der Paris-Lodron-Universität Salzburg; 1997–2000 Doktorarbeit am Institut für Molekularbiologie der Österreichischen Akademie der

Wissenschaften, Salzburg, über die kleinen Kalziumbindepoteine der S100-Familie (unter Anleitung von Prof. John Victor Small und Dr. Mario Gimona); seit 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Zellbiologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig; seit April 2005 Leiter der Arbeitsgruppe „Signaltransduktion und Motilität“ an der GBF.



Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Wehland

Studium der Biologie in Göttingen; 1977–1980 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen; 1980–1982

Postdoktorand an den National Institutes of Health, Bethesda, USA; 1983–1989 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen; seit 1989 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig tätig; 1997 gemeinsame Berufung als Bereichsleiter an die GBF und als Professor für Zell- und Immunbiologie an die Technische Universität Braunschweig.

- [3] **Stradal, T.E., et al.** (2004): Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14(6): 303–11.
- [4] **Nozumi, M., et al.** (2003): Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J Cell Sci.* 116(Pt 2): 239–46.
- [5] **Hahne, P., et al.** (2007): Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett.* 492(3): 215–20.
- [6] **Steffen, A., et al.** (2004): Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *Embo J.* 23(4): 749–59.
- [7] **Miki, H., et al.** (2000): IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature.* 408(6813): 732–5.
- [8] **Krugmann, S., et al.** (2001): Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53: Mena complex. *Curr Biol.* 11(21): 1645–55.
- [9] **Eden, S., et al.** (2002): Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418(6899): 790–3.
- [10] **Innocenti, M., et al.** (2004): Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signaling complex mediating Rac-dependent actin remodelling. *Nat Cell Biol.* 6(4): 319–27.
- [11] **Lommel, S., et al.** (2001): Actin pedestal formation by enteropathogenic Escherichia coli and intracellular motility of Shigella flexneri are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep.* 2(9): 850–7.
- [12] **Snapper, S.B., et al.** (2001): N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol.* 3(10): 897–904.
- [13] **Lommel, S., et al.** (2004): Enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cell Microbiol.* 6(3): 243–54.
- [14] **Benesch, S., et al.** (2002): Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem.* 277(40): 37771–6.
- [15] **Qualmann, B. and Kessels, M.M.** (2002): Endocytosis and the cytoskeleton. *Int Rev Cytol.* 220: 93–144.
- [16] **Merrifield, C.J., et al.** (2004): Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 83(1): 13–8.
- [17] **Ho, H.Y., et al.** (2004): Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118(2): 203–16.

Korrespondenzadresse:

Dr. Theresia Stradal
AG Signaltransduktion und Motilität
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
Mascheroder Weg 1
D-38124 Braunschweig
Tel.: 0531-6181 442
ths@gbf.de

Prof. Dr. Jürgen Wehland
Abt. Zellbiologie
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
Mascheroder Weg 1
D-38124 Braunschweig
Tel.: 0531-6181 442
wehland@gbf.de