

Formine und Aktinzytoskelett

Jan Faix

Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover

Eukaryotische Zellen werden von filamentären Strukturen durchzogen, die in ihrer Gesamtheit das Zytoskelett bilden und an vielen komplexen Zellfunktionen beteiligt sind. So werden z. B. die Entstehung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und die Zellmigration durch das Aktinzytoskelett vermittelt. Die Polymerisation von G-Aktin und die Assemblierung von F-Aktin zu komplexen Strukturen erfolgt in Bruchteilen von Sekunden und muss daher zeitlich und räumlich präzise koordiniert werden. Neuere Untersuchungen belegen, dass Formine neben dem gut charakterisierten Arp2/3-Komplex (Abb. 1) eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Aktindynamik und der Ausbildung von Filopodien spielen. Diese fingerförmigen Ausstülpungen der Zellmembran sind vermutlich von wesentlicher Bedeutung bei der gerichteten Zellmigration und der Zelladhäsion. Die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen der Formin-vermittelten Filopodienbildung im Zusammenspiel mit anderen akzessorischen Zytoskelettproteinen und kleinen GTPasen ist daher von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis dieser komplexen Zytoskelettstrukturen.

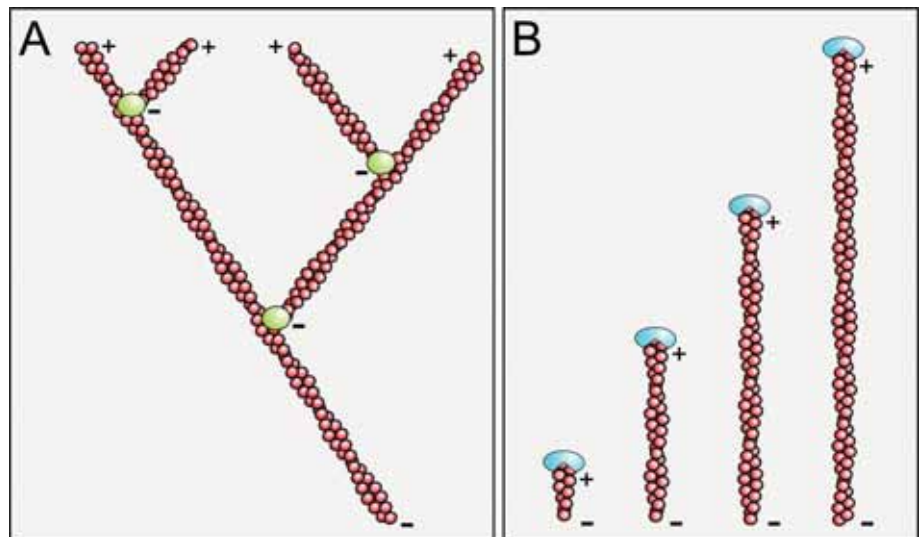


Abb. 1: Der Arp2/3-Komplex und Formine führen zur Ausbildung gänzlich unterschiedlicher zellulärer Aktinstrukturen. (A) Der in dieser schematischen Darstellung grün dargestellte Arp2/3-Komplex lagert sich nur an bereits existierende Aktinfilamente an und induziert dort die Bildung neuer Tochterfilamente, deren weiteres Wachstum rasch durch die Interaktion mit „capping“ Proteinen verhindert wird. Daraus resultiert ein dichtes und verzweigtes Aktinnetzwerk, das insbesondere in den Lamellipodien motiler Zellen gefunden wird und dort bei der Zellmigration eine zentrale Rolle spielt. (B) Im Gegensatz dazu, nukleieren die hier blau dargestellten Formine lineare Aktinfilamente und sind auch in der Lage, Aktin de novo zu assemblieren. Solche unverzweigten Aktinfilamente werden beispielsweise in Aktinkabeln der Hefe, in Stressfasern und in Filopodien gefunden. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen diesen beiden Aktinnukleatoren ist ihre Interaktion mit den unterschiedlichen Enden der Aktinfilamente. Während der Arp2/3-Komplex nur an die Minus-Enden („barbed ends“) bindet, bleiben die Formine dauerhaft mit den schnell wachsenden Plus-Enden („pointed ends“) assoziiert.

Formine

► Die in Eukaryoten ubiquitären Formine (Abb. 2A) sind außerordentlich wirksame Regulatoren der Aktindynamik. Diese großen Multidomänenproteine aus bis zu 2.000 Aminosäureresten zeichnen sich durch eine hochkonservierte FH2-Domäne („formin homology domain“ 2) im C-terminalen Bereich aus, der in den meisten Fällen eine Prolin-reiche FH1-Domäne vorgelagert ist^[1, 2]. Durch ihre Prolin-reichen FH1-Domänen können die Formine sowohl mit Profilin als auch mit SH3-Domänen oder WW-Motiven anderer Proteine interagieren. Insbesondere die Rekrutierung von ATP-Aktin aus Profilin-G-Aktinkomplexen durch die FH1-Domäne scheint die Nukleation erheblich zu fördern. Die FH2-Domäne und der zwischen den FH1- und FH2-Domänen liegende Linker sind für die Dimerisierung und für die Nukleation von G-Aktin *in vitro*

notwendig. Um Hinweise auf den molekularen Mechanismus der Formin-vermittelten Aktinnukleation zu erlangen, wurden mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse Raumstrukturen rekombinant exprimierter Forminfragmente bestimmt. Die Kristallstruktur der FH2-Domäne von Bni1p aus der Bäckerhefe machte deutlich, dass sich zwei Untereinheiten zu einem stabilen, aber flexiblen Dimer zusammenlagern (Abb. 3). Dies war im Einklang mit der Arbeitshypothese und experimentellen Befunden, die zeigten, dass die Formine während der Aktinpolymerisation fortwährend mit dem schnell wachsenden Plusende assoziiert bleiben^[3]. Eine zeitgleich publizierte Struktur der FH2-Domäne von mDia1 aus der Maus zeigte frappierende Ähnlichkeiten zur FH2-Domäne von Bni1p^[4] und legte somit den Schluss nahe, dass selbst Formine aus evolutionär weit voneinander entfernten Spezies nach einem gemeinsamen Mechanis-

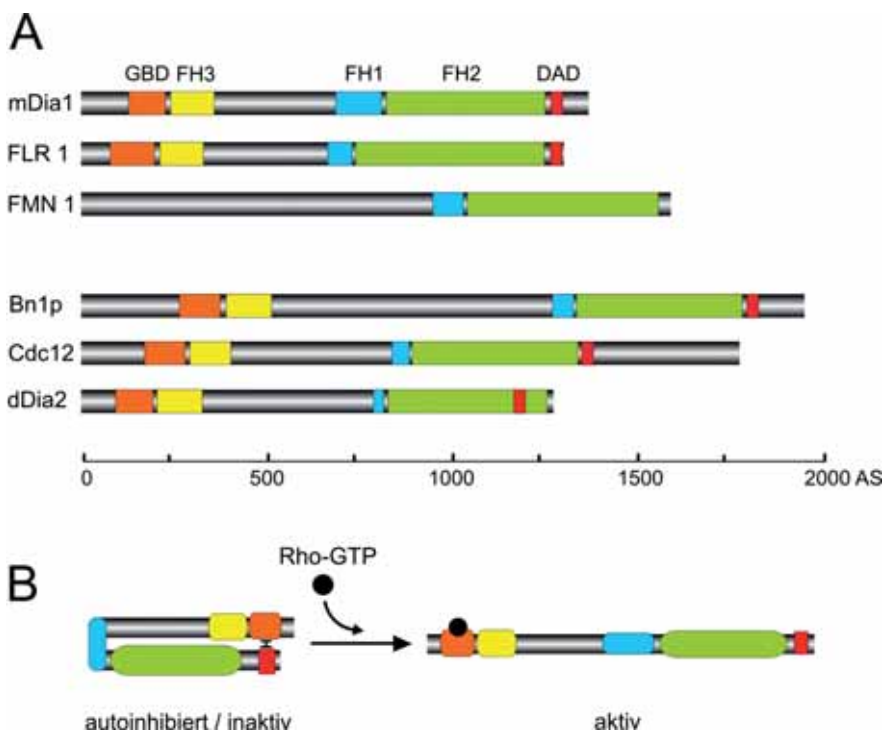


Abb. 2: Modularer Aufbau und Regulation von Forminen. (A) Die drei oben schematisch dargestellten Vertreter sind Formine aus Säugerzellen, während die drei unten gezeigten Formine wichtige Vertreter aus der Bäckerhefe, der Spaltheefe und Dictyostelium sind. Im Gegensatz zu relativ einfach aufgebauten Forminen wie FMN1, das nur FH1- und FH2-Domänen besitzt, enthalten DRFs („Diaphanous-related formins“) zusätzliche Domänen und bilden eine konservierte Unterfamilie regulierter Formine. GBD („GTPase binding domain“); FH3 („formin homology 3“); DAD („Diaphanous autoregulatory domain“). (B) Molekulare Regulation von DRFs durch Rho-GTPasen. In Abwesenheit einer aktivierten Rho-GTPase ist das DRF inaktiv, da es sich durch eine intramolekulare Interaktion der GBD- mit der DAD-Domäne auf sich selbst zurückfaltet. Nach Bindung einer aktivierten, GTP-gebundenen Rho-GTPase wird die autoinhibitorische Konformation aufgelöst und das DRF aktiviert.

mus operieren. In der Tat nukleieren isolierte FH1FH2-Domänen aus verschiedenen Spezies Aktin, jedoch muss hierbei einschränkend erwähnt werden, dass ihr Einfluss auf die Aktinnukleation zum Teil beträchtlich variiert. Profilin stimuliert in den meisten Fällen die Formin-vermittelte Aktinnukleation, im besonderen Fall des Zytokinese-Formins Cdc12 der Spaltheefe führt aber erst die Interaktion mit Profilin zu einem aktiven Formin^[5]. Die konservierten FH2-Domänen nukleieren Aktinfilamente vermutlich durch Stabilisierung des Aktindimers und bleiben aufgrund ihrer hohen Affinität (Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich) dauerhaft mit dem Plusende des wachsenden Filaments assoziiert. Die FH2-Domänen der Formine Bn1p, FLR1, mDia1 und dDia2 sind dadurch sehr wirksame Gegenspieler von „capping“ Proteinen, die ihrerseits durch die Anlagerung an die Plusenden der Filamente die Aktinpolymerisation hemmen. Während aber „capping“ Proteine durch ihre Interaktion mit dem Plusende die kritische Konzentration von Aktin erhöhen, verändern Formine die kritische Konzentration nicht. In Kombination mit Immunogold-Elektronen-

mikroskopie (EM) und Einzelmolekülmessungen von wachsenden Aktinfilamenten in Gegenwart von FH2 führten diese Befunde zum Konzept des „leaky“ oder „processive cappers“, welches postuliert, dass Formine fest mit dem Filament verbunden bleiben während neue Aktinuntereinheiten zwischen der FH2-Domäne und dem Plusende des Filaments eingebaut werden^[2]. Bei diesem Prozess üben Formine Kräfte im Bereich von etwas mehr als einem Piconewton pro Aktinfilament aus und können somit als molekulare Motoren betrachtet werden^[6, 7]. Die vor kurzem entschlüsselte Kristallstruktur der FH2-Domäne im Komplex mit TMR-Aktin (einem Aktinderivat, das nicht mehr in der Lage ist zu polymerisieren) zeigte, dass jede FH2-Domäne zwei Aktinmoleküle in einer Anordnung bindet, die der im Filament sehr ähnlich ist. Dieser Befund stützt somit die Vermutung, dass das FH2-Dimer tatsächlich als Nukleationskeim der Aktinpolymerisation fungiert^[8].

Die Regulation der Formine

Rho-GTPasen sind als molekulare Schalter in vielfältige Signaltransduktionsprozesse

eingebunden und üben eine zentrale regulatorische Funktion als Schalterelemente des Aktinzytoskeletts aus^[9]. Haben diese Proteine GTP gebunden, sind sie aktiv und damit in der Lage, mit Effektorproteinen zu interagieren, die die Signalweiterleitung vermitteln. Mit der Hydrolyse von GTP zu GDP gehen die kleinen GTPasen in den inaktiven Zustand über, wodurch die Signalweiterleitung beendet wird. Die mit dem *Drosophila*-Protein Diaphanous verwandten Formine oder DRFs („Diaphanous-related formins“) bilden eine Gruppe regulierter Formine, die als Effektoren kleiner GTPasen der Rho-Familie fungieren. In diesen Proteinen werden die FH1- und FH2-Domänen von einer N-terminalen GTPase-Bindungsdomäne (GBD) und einer C-terminalen Diaphanous-Autoregulatorischen Domäne (DAD) flankiert (Abb. 2B). Die Bindung einer aktivierten Rho-GTPase an die GBD-Domäne löst die inhibitorische intramolekulare Interaktion zwischen GBD und DAD auf und führt zu einem aktiven Formin^[10]. Die Mehrzahl der DRFs besitzt zwischen GBD und FH1 zusätzlich eine FH3-Domäne, die eine gemeinsame Faltungseinheit mit der GBD bildet und für die subzelluläre Lokalisation verantwortlich ist^[11].

Formine und Filopodien

Aufgrund ihrer bedeutenden Rolle bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts sind die Formine an zahlreichen Zellfunktionen wie der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und der Zellpolarität, der Zellmigration, am vesikulären Transport und der Zytokinese beteiligt^[1, 2]. Ihre Relevanz für die Bildung von Filopodien war bis vor kurzem allerdings noch weitgehend unklar^[12]. Filopodien sind fingerförmige Ausstülpungen der Plasmamembran und enthalten Bündel paralleler Aktinfilamente, die durch Inkorporation weiterer G-Aktinuntereinheiten an ihrer Spitze wachsen^[13]. Diese hochdynamischen Zellfortsätze werden offenbar von vielen Zelltypen als sensorische Organe benutzt, um Umweltsignale zu erkunden. Darüber hinaus wird derzeit eine Beteiligung von Filopodien an der Zellmigration und der Zellsubstratadhäsion intensiv diskutiert. Eine vorrangige Frage im Aktinzytoskelettfeld der letzten Jahre betraf deshalb den molekularen Mechanismus der Filopodienbildung. Basierend auf EM-Aufnahmen von Aktinfilamenten in der Zellperipherie fixierter Zellen und der Dynamik von GFP-Fusionsproteinen in lebenden Zellen wurde das „convergent elongation model of filopodia formation“ formuliert^[14]. Es postuliert, dass einige der durch den Arp2/3-Komplex nukleierten und danach verkappeten Aktinfilamente wieder selektiv elongiert

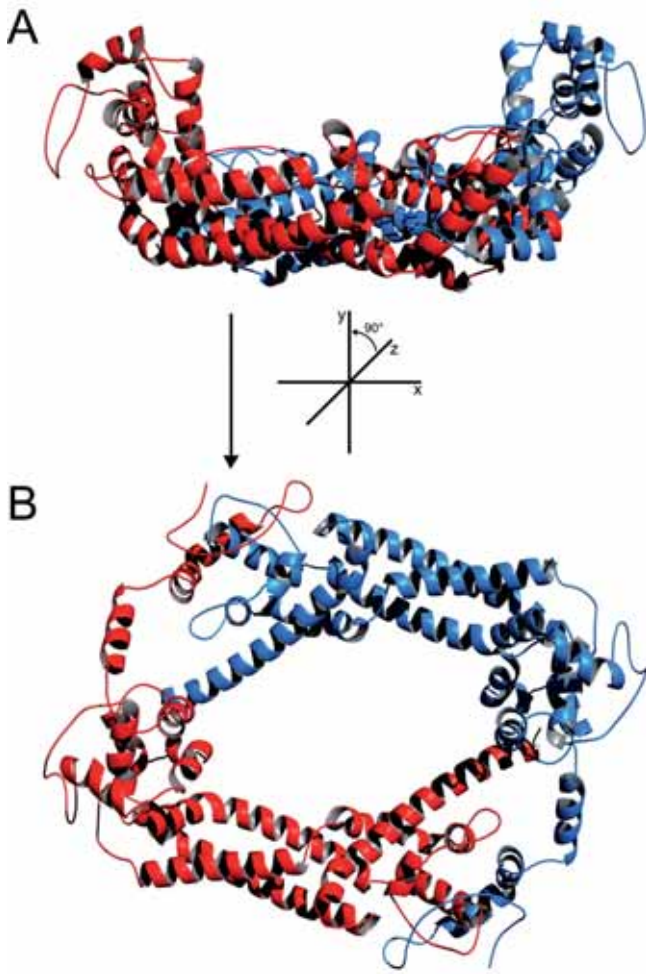


Abb. 3: Dreidimensionale Struktur der FH2-Domäne des Formins Bni1p aus *Saccharomyces cerevisiae*. Das Proteinfragment bildet ein Homodimer mit 419 Aminosäureresten pro Untereinheit. (A) Bändermodell des FH2-Dimers in Seitenansicht. Die unterschiedlichen Aminosäureketten sind in rot (vorne liegend) und blau (hinten liegend) dargestellt. (B) Die Aufsicht nach einer 90° Rotation veranschaulicht die ringförmige Struktur des Dimers mit seiner zentralen Öffnung. Da diese Öffnung zu klein ist, um Aktinfilamente zu umschließen, bindet das FH2-Dimer als hochaffine Kappe ans Plusende. Die Bilder wurden mit dem von in der RCSB Protein Datenbank (PDB) hinterlegten Koordinatensatz 1UX5^[3] und mit Hilfe der Programme „O“ und „Pymol“ erstellt.

nur noch sehr eingeschränkt in der Lage waren, Filopodien zu bilden. Die Expression des GFP-dDia2 Fusionsproteins in den Null-Mutanten führte dagegen wieder zur Bildung von Filopodien. Somit war zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression eines Formins und der Bildung von Filopodien nachgewiesen^[18]. dDia2 interagiert mit Profilin II und ist ein Effektor der kleinen GTPase Rac1, die ihrerseits für die Bildung von Filopodien in *Dictyostelium*-Zellen verantwortlich ist^[19]. Die biochemische Charakterisierung eines rekombinanten FH1FH2-Fragments zeigte, dass dDia2 die Nukleation von Aktin stimulierte, sehr wirkungsvoll „capping“ Proteine vom Plusende verkappter Aktinfilamente entfernte und die Depolymerisation von F-Aktin hemmte, welches unter die kritische Konzentration verdünnt worden war. Diese Befunde sprechen eindeutig für eine dauerhafte Assoziation von dDia2 mit dem Plusende des wachsenden Filaments. Ein anderes Protein, das mit dDia2 interagiert und bei der Filopodienbildung in *Dictyostelium* und Säugern eine Schlüsselrolle spielt, ist VASP („vasodilator-stimulated phosphoprotein“). Obwohl die exakte molekulare Funktion dieses Proteins *in vivo* weiterhin unklar ist, wurde postuliert, dass es „capping“ Proteine von Aktinfilamenten entfernt und dadurch das lange Wachstum filopodialer Filamente ermöglicht^[15, 16]. Unsere neuesten Arbeiten belegen dagegen eindeutig,

werden und sich zu Bündeln aneinander lagern, um Filopodien zu bilden. Ein wesentlicher Aspekt dieses Modells ist das Entfernen der „capping“ Proteine durch Mitglieder der Ena/VASP-Familie^[15, 16].

Unsere Arbeiten konzentrieren sich auf die Übertragung von Signalen auf das Zytoskelett und die Charakterisierung der Formine im *Dictyostelium*-Modell. Die Zellen von *Dictyostelium* sind einfach zu kultivieren, haploid, genetisch leicht manipulierbar und zeigen viele Ähnlichkeiten zu menschlichen Nichtmuskelzellen, wie z. B. Lymphozyten oder polymorphnukleären Granulozyten^[17]. Um die physiologische Funktion der zehn Formine in *Dictyostelium* zu ermitteln, wurden die korrespondierenden Gene durch homologe Rekombination inaktiviert und zeitgleich die subzelluläre Verteilung der einzelnen Vertreter durch die Expression von GFP-Fusionsproteinen bestimmt. Die Untersuchungen der GFP-Zelllinien zeigten, dass das DRF dDia2 stark an den Enden filopodialer Aktinfilamente angereichert war und legten den Schluss nahe, dass ein reguliertes Formin für die Elongation von Filopodien verantwortlich ist (Abb. 4). Diese Befunde wurden durch die Analyse dDia2-defizienter Mutanten gestützt, die

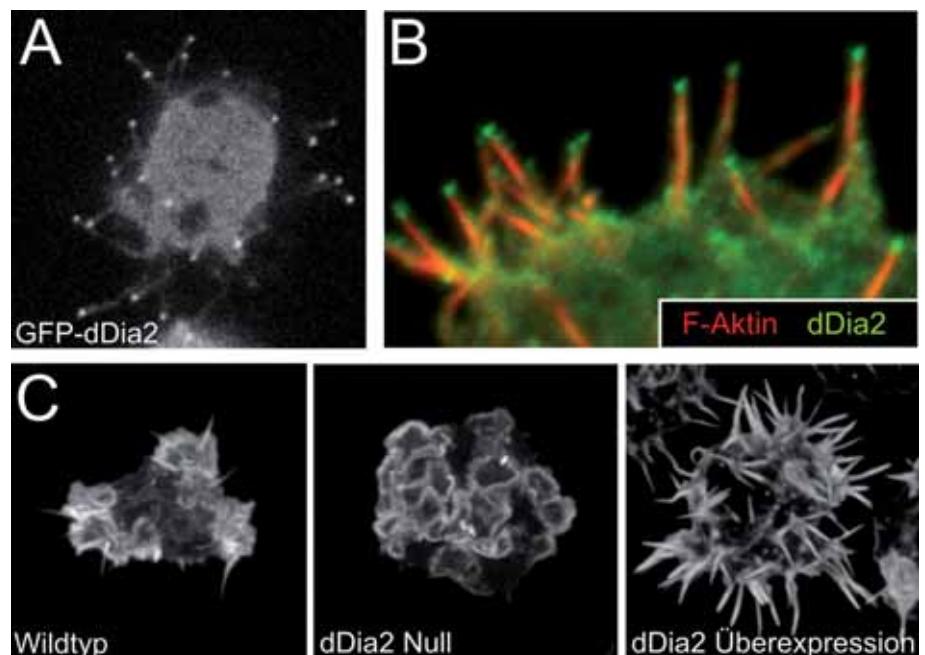


Abb. 4: Das Formin dDia2 aus *Dictyostelium* ist an den Spitzen von Filopodien stark angereichert und ist sowohl für die Ausbildung als auch Aufrechterhaltung dieser fingerförmigen Strukturen notwendig. (A) Lokalisation von GFP-markiertem dDia2 in einer lebenden *Dictyostelium*-Zelle. Eine konfokale Ebene ist gezeigt. (B) Nach Fixierung einer *Dictyostelium*-Zelle wurde F-Aktin mit Rhodamin-Phalloidin rot und dDia2 mit Antikörpern grün angefärbt. (C) Die Expression von dDia2 korreliert mit der Bildung von Filopodien. Im Vergleich zum Wildtyp ist in dDia2-null Zellen die Ausbildung von Filopodien stark reduziert, wogegen sie in dDia2-überexprimierenden Zellen deutlich erhöht ist.

dass VASP aus *Dictyostelium* wie humanes VASP zwar Aktinfilamente bündelt, aber weder an die Plusenden von Aktinfilamenten bindet noch mit „capping“ Proteinen konkurriert. Interessanterweise sind VASP-Mutanten, die nicht mehr fähig sind, Aktinfilamente zu bündeln, auch nicht mehr in der Lage, den Filopodiendefekt von VASP-null-Mutanten zu komplementieren. Aufgrund dieser Resultate ist vielmehr ein alternativer Mechanismus zur Bildung von Filopodien wahrscheinlich, bei dem sowohl die nukleierende und die „uncapping“ Aktivität des Formins dDia2 als auch die bündelnde Aktivität von VASP benötigt werden. Nur das Zusammenwirken dieser Aktivitäten erlaubt vermutlich die Stabilisierung der Filopodienspitze, die eine beachtliche Kraft aufbringen muss, um die Plasmamembran nach außen zu drücken.

Ausblick

Eine wesentliche Herausforderung zukünftiger Forschungsvorhaben wird die Ermittlung des gesamten bei der Filopodienbildung erforderlichen Repertoires an regulatorischen und strukturellen Zytoskelettproteinen sein. Darüber hinaus stellt sich gegenwärtig auch die interessante Frage, ob die Formin-vermittelte Aktinnukleation außer in Filopodien ebenfalls in den strukturell verwandten Mikrovilli und Stereozilien zum Tragen kommt.

Literatur

- [1] **Wallar, B.J. and Alberts, A.S.** (2003): The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13: 435–446.
- [2] **Zigmond, S.H., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Dar, A.C., Sichei, F., Forkey, J. and Pring, M.** (2003): Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr. Biol.* 13: 1820–1823.
- [3] **Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L. and Eck, M.J.** (2004): Crystal structures of a formin homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* 116: 711–723.
- [4] **Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I.R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M.A. and Wittinghofer, A.** (2004): The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol Cell* 13: 511–522.
- [5] **Kovar, D.R., Kuhn, J.R., Tichy, A.L. and Pollard, T.D.** (2003): The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J. Cell Biol.* 161: 875–887.
- [6] **Kovar, D.R. and Pollard, T.D.** (2004): Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 14725–14730.
- [7] **Romero, S., Le Clairche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. and Carlier, M.F.** (2004): Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 119: 419–429.
- [8] **Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Pantaloni, S.C., Machius, M. and Rosen, M.K.** (2005a): Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* 433: 488–494.
- [9] **Hall, A.** (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509–514.
- [10] **Alberts, A.S.** (2007): Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J. Biol. Chem.* 276: 2824–2830.
- [11] **Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M.R. and Wittinghofer, A.** (2005): Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* 435: 513–518.
- [12] **Peng, J., Wallar, B.J., Flanders, A., Swiatek, P.J. and Alberts, A.S.** (2003): Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr. Biol.* 13: 534–545.
- [13] **Mallavarapu, A. and Mitchison, T.** (1999): Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J. Cell Biol.* 146: 1097–1106.
- [14] **Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M. and Borisy, G.G.** (2003): Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.* 160: 409–421.
- [15] **Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fassler, R., Wehland, J. and Gertler, F.B.** (2000): Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 101: 717–728.
- [16] **Mejillano, M.R., Kojima, S., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M. and Borisy, G.G.** (2004): Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 118: 363–373.



Jan Faix

Studium der Biologie an der Universität Regensburg, 1990–1993 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried; 1993–1996 Postdoc und 1996–1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter am selben Institut;

1999–2001 „Staff Scientist“ an der University of Madison-Wisconsin, USA; 2001–2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Ludwig-Maximilians-Universität in München; 2002 Habilitation an der Universität Regensburg im Fach Zellbiologie und seit 2005 Leiter der Arbeitsgruppe Zytoskelettdynamik am Institut für Biophysikalische Chemie an der Medizinischen Hochschule Hannover.

[17] **Eichinger, L., Lee, S.S. and Schleicher, M.** (1999): *Dictyostelium* as a model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc. Res. Tech.* 47: 124–134.

[18] **Dumontier, M., Hoecht, P., Mintert, U. and Faix, J.** (2000): Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 113: 2253–2265.

[19] **Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. and Faix, J.** (2005): The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nature Cell Biol.* 6: 619–625.

Danksagung

Ich danke Dr. Gregor Witte für die Anfertigung der Bilder der FH2-Kristallstruktur von Bni1p, Dr. Ute Curth für das kritische Lesen des Artikels und meinen früheren Arbeitskollegen in der Abteilung Zellbiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. rer. nat. Jan Faix
Institut für Biophysikalische Chemie, OE4350
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Str. 1
D-30625 Hannover
Tel.: 0511-532-2928
Fax: 0511-532-5966
faix@bpc.mh-hannover.de