

Zusammenfassung

Das Aktincytoskelett spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z. B. der Zellteilung und der Zellmotilität bis zu Membrantransportprozessen. Actin-binding protein 1 (Abp1) und Syndapine sind Src homology 3 (SH3)-Domänen-enthaltende Proteine, die ein Verbindungsglied zwischen Membrantransport und dem Aktincytoskelett darstellen könnten.

Abp1 ist ein F-Aktin bindendes Protein, das in die Internalisierung von Rezeptoren mittels einer Bindung an die für die Vesikelabschnürung essentiellen GTPase Dynamin involviert ist. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Abp1 nicht nur die Fähigkeit zur Bindung von Aktinfilamenten besitzt, sondern die Polymerisation solcher Filamente mittels einer Interaktion mit N-WASP, einem potenten Aktivator des Arp2/3-Komplexes, regulieren kann.

Affinitätsaufreinigungen und Blot-Overlay-Experimente haben demonstriert, dass die Abp1 SH3-Domäne spezifisch und direkt an die Prolin-reiche Domäne von N-WASP bindet. Koimmunpräzipitationsstudien und die Rekonstitution von Abp1/N-WASP-Komplexen an intrazellulären Membranen wiesen die physiologische Relevanz dieser Interaktion nach. Immun-fluoreszenzanalysen in primären, hippokampalen Neuronen zeigten eine Kolo-kalisation von Abp1 und N-WASP an Aktin-reichen Stellen, wie Wachstumskegeln und Synapsen.

Syndapine interagieren mit Komponenten der Endocytose- und Aktinnukleationmaschinerien, wie Dynamin oder N-WASP, und sind in die Internalisierung von Rezeptoren und in die Modulation des Aktincytoskeletts involviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen einer Regulation der Aktincytoskelettdynamik durch Syndapine aufgegliedert.

In vitro Rekonstitutionsanalysen deuten darauf hin, dass sowohl Abp1 als auch Syndapine Aktinpolymerisation in Abhängigkeit ihrer SH3-Domänen induzieren können. Des Weiteren sind die Abp1 und Syndapin SH3-Domänen, nicht aber deren Mutanten die N-WASP nicht mehr binden können, ausreichend, um nach Immobilisierung an Kugeloberflächen Aktinnukleation in Gehirnhomogenaten zu stimulieren. Darüber hinaus zeigen fluorimetrische Analysen von Aktinpolymerisation mit gereinigten Komponenten, dass die SH3 Domänen von Abp1 und Syndapin I mit den kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 in der Stimulierung N-WASP-induzierter Arp2/3-Komplex-vermittelter F-Aktinnukleation kooperieren. Diese Daten legen nahe, dass die Abp1- bzw. Syndapinbindung die autoinhibierte Konformation von N-WASP aufheben und die Arp2/3-Komplex-vermittelte Aktinpolymerisation aktivieren kann.

Während Arp2/3-Komplex-induzierte F-Aktinnukleation bei Membrantransportprozessen über N-WASP vermittelt zu werden scheint, wird die Bildung kortikaler Cytoskelettstrukturen wie z.B. Lamellipodia durch andere Mitglieder der WASP Familie, den Scar Proteinen, reguliert. Im folgenden wurde eine putative Interaktion von Abp1 und Syndapinen mit anderem Komponenten der WASP-Familie untersucht. Kopräzipitations- und Blot-Overlay-Experimente zeigten, dass die Abp1 und Syndapin SH3-Domänen direkt die Prolin-reiche Domäne von Scar 1 binden. Eine Existenz dieser Komplexe in vivo wurde durch Koimmunpräzipitationsanalysen und Rekonstitution in Zellen bestätigt. Abp1 und Syndapine kolo-kalisieren mit Scar in Aktin-reichen Bereichen wie Wachstumskegeln von jungen, hippokampalen Neuronen oder putativen synaptischen Kontakten von reifen Neuronen. Abp1 und Scar, nicht aber Syndapine, wurden verstärkt an Aktin-reichen Strukturen am Zellkörper von reifen Neuronen beobachtet. Diese differentielle Lokalisation weist darauf hin, dass Abp1/Scar- und Syndapin/Scar-Komplexe unterschiedliche physiologische Rollen haben können. Diese Hypothese wurde weiter durch die Aufdeckung von Unterschieden in der Zusammensetzung dieser Komplexe in Koimmunpräzipitationsstudien gestützt.

Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass Abp1 und Syndapine –mittels N-WASP– in die Regulation von Aktindynamik involviert sind, die wesentlich für Membrantransportprozesse ist. Über die Interaktion mit Scar, sind Abp1 und Syndapine an die Regulation der Aktindynamik zur Ausbildung kortikaler Cytoskelettstrukturen beteiligt.