

Das Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS) ist ein X-chromosomal vererbter Gendefekt mit charakteristischem Auftreten von Ekzemen, Thrombozytopenie und schwerer Immundefizienz (1). Wiederholt auftretende bakterielle und virale Infektionen lassen auf eine Störung von Zellen des Immunsystems, wie z.B. Granulozyten, Lymphozyten oder Makrophagen, schließen.

WAS wird durch Mutationen im Gen für Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASp) hervorgerufen, einem zentralen Regulator des Aktin-Zyto-

freigelegt und kann nun mit dem Aktin-nukleierenden Arp2/3-Komplex (3) interagieren. Über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus wird der aus 7 Untereinheiten bestehende Arp2/3-Komplex aktiviert und initiiert die Bildung neuer Aktin-Filamente (Bild A).

Frühere Arbeiten aus unserem Labor haben gezeigt, daß WASp ein integraler Bestandteil von punktförmigen, Aktin-reichen Adhäsionsstrukturen, sogenannten Podosomen, in primären humanen Makrophagen ist (4). Interessanterweise können Makrophagen von WAS Patienten keine Podosomen ausbilden. In primären humanen Makrophagen sind Podosomen normalerweise als Ring um ein Podosomen-freies Zentrum angeordnet (Bild B). Werden Makrophagen jedoch mit chemoattraktiven bakteri-

ellen Substanzen wie fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) oder LPS (Lipopolysaccharid) stimuliert, zeigen sie dramatische Formveränderungen, die unter dem Oberbegriff der "Zellpolarisation" zusammengefaßt werden: 1) die Zelle verliert ihre Radiärsymmetrie und elongiert, 2) Podosomen werden zum rückwärtigen Ende der Zelle rekrutiert, und 3) am sogenannten "leading edge" der Zelle werden zahlreiche fadenartige Strukturen, Filopodien, gebildet, die als Chemosensoren der Zelle agieren (Bild C, links). Der polarisierte Makrophage ist somit in der Lage, einen Gradienten einer chemoattraktiven Substanz wahrzunehmen und sich darin zu orientieren. Korrekte Polarisation ist daher ein erster, unabdingbarer Schritt für eine gezielte Zellmigration. Wir konnten zeigen, daß WAS Makrophagen bei Stimulierung zwar elongieren, neben fehlender Podosomenbildung aber auch Defekte in der Filopodienbildung aufweisen (Bild C, Mitte). Dieser Befund paßt gut zu Ergebnissen anderer Gruppen, die berichteten, daß WAS Makrophagen sich in einem chemoattraktiven Gradienten nur ungerichtet bewegen können (5,6).

Kürzlich konnten wir zeigen, daß auch der Arp2/3-Komplex spezifisch in podosomalen Adhäsionsstrukturen angereichert ist (Bild B, 7). Dies ließ vermuten, daß Arp2/3 für die Aktinpolymerisation in Podosomen direkt verantwortlich ist und zusammen mit WASp den Podosomen-Aufbau steuert. Um diese Frage weiter zu untersuchen, stellten wir ein GST (Glutathion S-transferase)-Fusionsprotein der WASp A-Domäne her, das den Arp2/3-Komplex binden kann. Mikroinjektion dieses Fusionsproteins in primäre Makrophagen gesunder Spender führt zur Dislokation des

## Orientierungslose Makrophagen

### Die Rolle des Arp2/3-Komplexes bei der gestörten Migration von Immunzellen im Wiskott-Aldrich Syndrom

Stefan Linder<sup>1</sup> und Martin Aepfelbacher<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Kreislaufkrankheiten, Pettenkofer Str. 9, D-80336 München, <sup>2</sup>Max von Pettenkofer-Institut, Pettenkoferstr. 9a, D-80336 München



**Stefan Linder, Dr. rer. nat.**, ist Diplom-Biologe und derzeit Assistent am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München.

stefan.linder@kfp.med.uni-muenchen.de

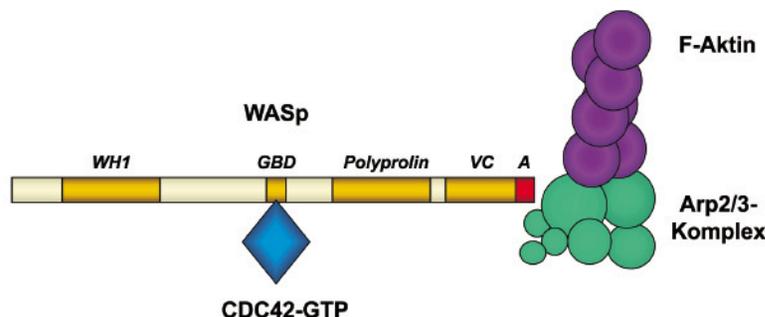
**Martin Aepfelbacher, PD Dr. med.**, ist Medizinischer Mikrobiologe und derzeit Oberarzt am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie der LMU München.

skeletts (2). WASp wird nur in Blutzellen exprimiert, hat aber ubiquitär verbreitete Homologe wie N-WASp oder die Proteine der WAVE/Scar-Familie. Sein Multidomänen-Aufbau (Abb. A) erlaubt WASp vielfache Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen oder auch Bestandteilen der Zellmembran und macht es zu einem idealen Integrator verschiedener Signalketten, die u.a. auf das Aktin-Zytoskelett einwirken.

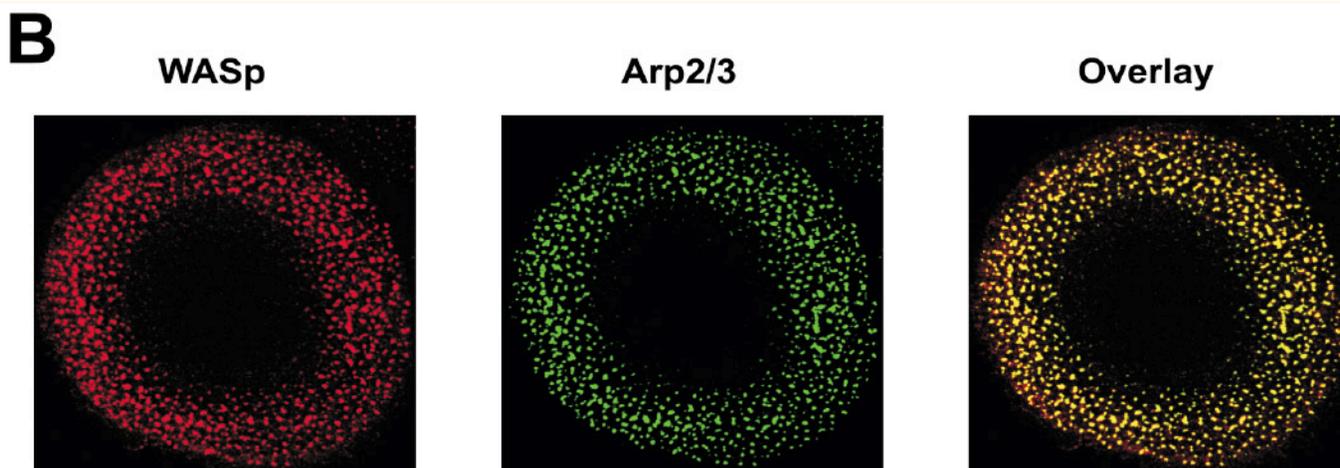
Die Aktivität von WASp wird von CDC42Hs, einer GTPase der Rho-Familie gesteuert. Diese bindet in ihrem aktiven, GTP-gebundenen Zustand an die GTPase Bindungs-Domäne (GBD) von WASp und führt so zur Öffnung des im Ruhezustand rückgefalteten WASp Moleküls (Bild A). Dadurch wird die Azidische Domäne (A-Domäne)

ellen Substanzen wie fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) oder LPS (Lipopolysaccharid) stimuliert, zeigen sie dramatische Formveränderungen, die unter dem Oberbegriff der "Zellpolarisation" zusammengefaßt werden: 1) die Zelle verliert ihre Radiärsymmetrie und elongiert, 2) Podosomen werden zum rückwärtigen Ende der Zelle rekrutiert, und 3) am so-

A



**Abbildung A:** Schema der Aktin-Polymerisation (vereinfacht). WASp (gelb) ist ein Multidomänen-Protein (einzelne Domänen orange; WH1: WASp Homologie Domäne 1; GBD: GTPase Bindungs-Domäne; Polyprolin: Polyprolin-Domäne; VC: Verprolin-ähnliche und "Central"-Domäne; A: Azidische Domäne (rot)). Interaktion mit der RhoGTPase CDC42Hs in ihrem aktiven, GTP-gebundenen Zustand (blau) über die WASp-GBD führt zur Entfaltung des WASp Moleküls. Die dadurch freigelegte A-Domäne kann nun mit dem Arp2/3-Komplex (grün) interagieren. Dies führt schließlich zur Bildung von Aktin-Filamenten (violett).



**Abbildung B:** WASp und der Arp2/3-Komplex sind integrale Bestandteile von podosomal Adhäsionsstrukturen in primären humanen Makrophagen. Konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen eines 6 Tage alten primären humanen Makrophagen; die optische Schnittebene ist in der Ventralseite der Zelle, unmittelbar am Substratkontakt. Gefärbt sind WASp (links; rot) und p34-Arc (Mitte; grün), eine Untereinheit des Arp2/3-Komplexes. Eine Überlagerung beider Bilder (rechts) zeigt Kolokalisation von WASp und p34-Arc (gelb). Jeder distinkte Punkt entspricht einem Podosome. Seitenlänge der Bilder: 50 µm.

Arp2/3-Komplexes aus Podosomen und zum vollständigen Verlust dieser Adhäsionsstrukturen. Stimuliert man diese mikroinjzierten Makrophagen mit fMLP, so zeigen sie deutliche Defekte in der Zellpolarisation. Es findet zwar Elongation statt, jedoch sind die Zellen frei von Podosomen und weisen zudem nur noch wenige, unvollständig ausgebildete Filopodien auf (Bild C, rechts). Der Phänotyp dieser mit der WASp A-Domäne injizierten Zellen ist damit dem Phänotyp von WAS Makrophagen sehr ähnlich.

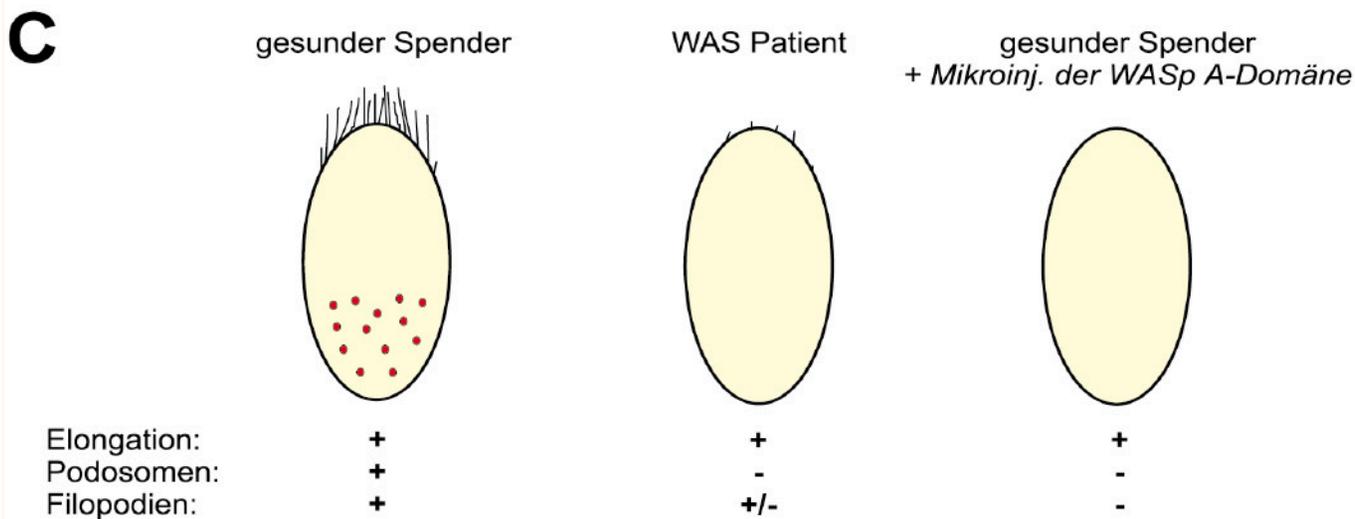
Wir vermuten, daß durch die Mikroinjektion der Arp2/3-bindenden A-Domäne dem zellinternen WASp der Arp2/3-Komplex als Interaktionspartner

entzogen wird. Im Fall der WAS Zellen dagegen ist oft durch fehlendes (Vollängen-)WASp keine Arp2/3-Bindung an WASp mehr möglich (mutationsbedingte Instabilität der WASp mRNA oder des Proteins). In beiden Fällen scheint also dem Arp2/3-Komplex die Bindung an den funktionsfähigen Interaktionspartner zu fehlen, der die lokalisierte Aktin-Polymerisation steuert. Die Polarisations-Defekte von WAS Makrophagen beruhen daher wohl letztendlich auf dem Unvermögen der Zellen, den Arp2/3-Komplex an Orte zu lokalisieren, an denen Aktin-Polymerisation initiiert werden soll, um Podosomen oder Filopodien zu bilden.

Diese Befunde legen nahe, daß die korrekte Lokalisation des Arp2/3-Komplexes in der Polarisation und damit auch in der gerichteten Migration von Immunzellen eine entscheidende Rolle spielt. Dem Arp2/3-Komplex kommt daher in den klinischen Manifestationen von WAS eine zentrale Bedeutung zu.

● **LITERATUR**

1. Ochs HD The Wiskott-Aldrich syndrome. Springer Sem. Immunopath. 19, 435, 1998
2. Bi E et al. Curr Biol 9, R160, 1999
3. Machesky LM et al. Curr Biol 8, 1347, 1998
4. Linder S et al. PNAS USA 96, 9648, 1999
5. Badolato R et al. J Immunol 161, 1026, 1998
6. Zicha D et al. Brit J Haematol 10, 659, 1998
7. Linder S et al. J Immunol 165, 221, 2000



**Abbildung C:** Phänotypen fMLP-stimulierter primärer humaner Makrophagen. Typisches morphologisches Kennzeichen einer Stimulation ist die Zellpolarisation, gekennzeichnet durch Zellelongation, Umverteilung der Podosomen zum rückwärtigen Zellende und Bildung zahlreicher Filopodien am gegenüberliegenden "leading edge". Makrophagen gesunder Spender weisen alle drei Merkmale auf (links), während WAS Makrophagen zwar elongieren, aber keine Podosomen und nur vereinzelte Filopodien bilden (Mitte). Ein ähnlicher Phänotyp läßt sich durch Mikroinjektion der WASp A-Domäne als GST-Fusionsprotein in Makrophagen gesunder Spender hervorrufen (rechts).