

# N-WASP 通过 polyPro 和 VCA 结构域调控大脑皮层神经元迁移

沈秀莲, 逯宜超, 甲芝莲, 吴强

上海交通大学系统生物医学研究院比较生物医学研究中心, 系统生物医学教育部重点实验室, 上海 200240

**摘要:** 在大脑皮层发育过程中, 神经元迁移是一个动态的复杂过程, 与细胞骨架构建和重塑的调控息息相关。N-WASP 蛋白是 Wiskott-Aldrich 综合征蛋白家族(WASP-WAVE family)的一个重要成员, 又名 WAS-like 蛋白(WASL), 直接参与细胞骨架中肌动蛋白丝状分支的动态调控。本研究通过蛋白免疫印迹检测发现 N-WASP 表达于小鼠胚胎发育时期(E12.5~E18.5)的大脑皮层中, 并且其表达水平随着发育逐渐降低。利用在体子宫内胚胎电转实验, 结果发现过表达或者敲低 N-WASP 均会造成不同程度的大脑皮层神经元迁移障碍, 说明 N-WASP 在大脑皮层神经元迁移中起到关键作用。N-WASP 蛋白主要包含 4 个结构域: WH1、GBD、polyPro 和 VCA。为进一步研究 N-WASP 各结构域在神经元迁移中的调控功能, 设计了一系列的显性负性突变实验。通过过表达结构域删除的 N-WASP 蛋白, 发现 $\Delta$ polyPro、 $\Delta$ VCA 和 $\Delta$ WH1 均能造成神经元迁移障碍。但是, 过表达不能结合 Cdc42 的 N-WASP 蛋白(H208D 突变体)却不能造成明显的神经元迁移障碍。另外, 单独过表达 N-WASP 的结构域 polyPro 或 VCA 能够造成神经元迁移障碍, 而过表达 WH1 结构域却不能影响迁移。最后, 通过过表达 polyPro 和 VCA 结构域同时删除的 N-WASP (WH1-GBD), 发现 WH1-GBD 结构域对神经元迁移没有明显影响。上述结果表明 N-WASP 蛋白主要是通过 polyPro 和 VCA 两个结构域调控大脑皮层神经元的迁移过程。

**关键词:** 大脑皮层神经元迁移; N-WASP; 子宫内胚胎电转技术; 肌动蛋白细胞骨架动态

## N-WASP regulates cortical neuron migration through its polyPro and VCA domains

Xiulian Shen, Yichao Lu, Zhilian Jia, Qiang Wu

Key Laboratory of Systems Biomedicine (Ministry of Education), Center for Comparative Biomedicine, Institute of Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** Cortical neuron migration in the developing mouse forebrain is a complex process, which contains several steps related to cytoskeleton dynamics and remodeling. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP), a member of

收稿日期: 2018-03-15; 修回日期: 2018-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 91519302, 31171015)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 91519302, 31171015)]

作者简介: 沈秀莲, 硕士研究生, 专业方向: 发育神经生物学。E-mail: shenxiulian92@163.com

通讯作者: 吴强, 博士, 教授, 研究方向: 基因表达调控及神经发育。E-mail: qiangwu@sjtu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-066

网络出版时间: 2018/5/4 16:31:54

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180504.1631.001.html>

the WASP-WAVE family, regulates actin cytoskeleton reorganization through the binding of its VCA domain to the Arp2/3 complex. Here we report expression patterns of *N-WASP* gene in the mouse developing embryonic cortex (E12.5~E18.5) and find its expression levels are decreased during embryonic development. By using *in utero* electroporation (IUE) method, we find that either N-WASP overexpression or knockdown impairs cortical neuron migration, and the defects of cortical neuron migration caused by N-WASP overexpression are much more severe than that by its knock-down. N-WASP protein contains four domains: WH1, GBD, polyPro, and VCA. We generated a series of dominant negative N-WASP mutants by modifying these domains. Overexpression of N-WASP mutant lacking domain polyPro, VCA, or WH1, impairs cortical neuron migration. However, overexpression of N-WASP with the H208D point mutation, which abolishes the Cdc42 binding to N-WASP, causes only a marginal defect of cortical neuron migration. Finally, overexpression of the individual domain polyPro or VCA, but not WH1, can recapitulate the defects by N-WASP overexpression. However, overexpression of WH1-GBD fragment has no apparent effect on cortical neuron migration. In conclusion, our data demonstrate that N-WASP regulates cortical neuron migration mainly through its polyPro and VCA domains.

**Keywords:** cortical neuron migration; N-WASP; *in utero* electroporation; actin cytoskeleton dynamics

人类大脑皮层是进化上最晚出现、结构上最为复杂的脑部结构<sup>[1]</sup>, 其在脑的高级认知或执行功能(cognition or executive function)中发挥着重要作用。大脑皮层的发育涉及一系列复杂的过程, 包括神经元的增殖(proliferation)、迁移(migration)和分化(differentiation)等。大脑皮层是由出生于脑室区(ventricular zone, VZ)的兴奋性神经元前体和出生于皮质下区(subpallium)的抑制性神经元前体, 分别通过放射状(radial migration)和切线状(tangential migration)并以先到内侧后到外侧(inside-out)模式迁移形成的板层结构(laminar structure)<sup>[2-7]</sup>。其中, 兴奋性神经元前体放射状迁移模式是一个非常复杂的动态协同调控过程: 首先, 脑室区(ventricular zone, VZ)的神经祖细胞通过不对称分裂产生中间祖细胞(transit amplifying intermediate neuronal progenitor cells); 然后, 这些祖细胞在脑室下区(subventricular zone, SVZ)继续分裂 1~3 次后, 再以多极状态在中间区(intermediate zone, IZ)中迁移; 最后, 祖细胞转变成双极状态沿着神经胶质细胞纤维以放射状迁移的方式到达皮质区(cortical plate, CP)<sup>[8-10]</sup>。该过程需要多种信号通路协同调控细胞骨架的动态平衡来完成<sup>[4]</sup>, 其正常进行对于后续神经元回路以及神经系统功能的正常发挥起着重要作用。而且, 人们发现神经元迁移异常能够导致多种神经精神疾病, 因此研究其分子调控机制对于了解精神疾病的发生原因有着重要

意义<sup>[1]</sup>。

原钙粘蛋白介导的细胞粘连与神经元迁移和神经细胞多样性密切相关<sup>[11-14]</sup>。原钙粘蛋白家族在神经元树突和轴突发育中也起到关键作用<sup>[15-20]</sup>。最近的研究发现原钙粘蛋白可能与 WASP-WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein and WASP-family verprolin-homologous protein)信号通路有关<sup>[13,21]</sup>。WASP 是 Wiskott-Aldrich 综合征(WAS)的致病基因<sup>[22]</sup>, 该疾病是一种包括湿疹(eczema)在内的性染色体连锁的隐性免疫缺陷疾病<sup>[23,24]</sup>。WASP 蛋白家族共包含 11 个成员, 该家族与肌动蛋白的动态调控有关<sup>[25]</sup>, 在各种生理和病理过程中对诸如胞吞(endocytosis)、胞吐(exocytosis)、丝状伪足(filopodia)、板状伪足(lamel-lipodia)、侵袭伪足(invadopodia)等细胞形态的调控起到关键作用<sup>[26]</sup>。细胞接收外界信息通过复杂的信号传递通路最终汇集到 Arp2/3 复合体(actin-related protein 2/3 complex)上, 然后调控肌动蛋白丝状分支的动态组装, 此动态组装对于神经元迁移以及神经细胞的形态发生也是非常重要的<sup>[27,28]</sup>。

N-WASP(neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein)是 WASP-WAVE 家族成员之一<sup>[25]</sup>, 最初发现于牛(*Bos taurus*)的脑提取物中, 因其与 WASP 氨基酸序列的高度相似性, 故命名为 N-WASP(神经性 WASP)<sup>[29]</sup>。它是一个广泛表达的蛋白, 不仅在大脑中有丰富的表达, 而且在心脏、肺等其他组织中也

有表达<sup>[29]</sup>。N-WASP 蛋白主要含有 4 个功能性结构域:WH1 (WASP homology 1)、GBD (GTPase-binding domain)、polyPro (proline-rich SH3-adaptor-binding region)和 VCA (verprolin and cofilin homology regions and the acidic domain)<sup>[30]</sup>。研究已证实,WH1 结构域与 N-WASP 被招募到肌动蛋白组装的位点有关<sup>[31]</sup>,而 GBD、polyPro 和 VCA 这 3 个结构域主要调控 N-WASP 蛋白的活性状态<sup>[25,30]</sup>。N-WASP 主要通过构象转换(conformational change)释放出 VCA 结构域激活 Arp2/3 复合体来调控肌动蛋白的组装<sup>[32]</sup>。具体来讲,N-WASP 有激活和未激活两种构象状态:在未激活构象状态下,N-WASP 的 GBD 结构域和 VCA 结构域相互作用而使 VCA 结构域被掩藏,不能与肌动蛋白单体和 Arp2/3 复合体相互作用;在激活构象状态下,VCA 结构域被暴露出来并与 Arp2/3 复合体相互作用,verprolin 结构域上结合的肌动蛋白单体输送到肌动蛋白丝状分支,从而促进肌动蛋白的组装<sup>[30,33]</sup>。一些上游的信号分子可以激活 N-WASP,使其释放出 VCA 结构域。例如,Cdc42 (cell division cycle 42)通过结合 GBD 结构域而释放出 VCA 结构域;Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2),Nck(non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein)等含有 SH3(Src homology 3)结构域的接头蛋白(adaptor proteins)则通过与 polyPro 结构域相互作用,从而解除这种自抑制状态,释放 VCA 结构域<sup>[34-38]</sup>。最后,N-WASP 通过形成二聚体或寡聚体进一步激活 Arp2/3 复合体,从而达到最大的活性<sup>[30,39]</sup>。

N-WASP 敲除会导致小鼠(*Mus musculus*)胚胎致死并伴随神经管形成缺陷<sup>[40]</sup>,在小鼠大脑中条件性敲除 N-WASP 会导致脑积水的症状<sup>[41]</sup>,说明 N-WASP 在小鼠大脑的发育中起着重要作用。此外,之前有报道称 *mDab1* (mouse disabled homologue1)基因突变会导致小鼠大脑皮层发育异常,造成皮层的异位,与摇晃蛋白 *Reelin* 基因敲除小鼠表型一致<sup>[42]</sup>。而体外细胞实验显示 *mDab1* 可与 N-WASP 相互作用诱导丝状伪足(filopodia)的生成<sup>[43]</sup>,说明 N-WASP 可能在神经元迁移中起重要作用,但至今未见有直接的证据。

本研究利用蛋白免疫印迹(Western blot, WB)检测发现 N-WASP 在小鼠大脑皮层的发育过程中持续表达并且呈现逐渐下降的模式,然后采用在体子宫

内胚胎电转技术在 E14.5 的小鼠大脑皮层神经元中过表达与敲低 N-WASP,实验结果均表明会造成神经元迁移障碍,而且过表达 N-WASP 所导致的神经元迁移障碍会比敲低 N-WASP 产生的影响更严重。此外,通过在体子宫内胚胎电转技术过表达显性负性突变蛋白,发现过表达  $\Delta$ VCA,  $\Delta$ polyPro 或者  $\Delta$ WH1 突变体,以及 VCA 或者 polyPro 结构域均会导致神经元迁移障碍,而过表达 WH1,WH1-GBD 结构域以及 H208D 突变体却对神经元迁移没有明显影响。这些实验结果表明 N-WASP 主要是通过 polyPro 和 VCA 结构域的协调作用来调控大脑皮层的神经元迁移。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

C57BL/6 小鼠(南方模式动物中心);HEK293T 细胞(上海细胞库);N-WASP 抗体(Abcam 公司,英国); $\beta$ -actin 抗体、抗鼠以及抗兔二抗(Proteintech 公司,美国);DNA 质粒中抽试剂盒 Compactprep Plasmid Midi Kit(25)(Qiagen 公司,德国);固绿 FCF (Fast Green FCF)、戊巴比妥钠(Sigma 公司,美国);Stbl3 大肠杆菌菌株、脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>3000 以及 Prolong<sup>TM</sup> Gold antifade reagent(Invitrogen 公司,美国);逆转录试剂盒 Reverse Transcription System (Promega 公司,美国);电转仪(Bio-Rad,美国);自动震荡切片机(Leica,德国);共聚焦显微镜(Leica,德国);Western blot 全套装置(Bio-Rad,美国);荧光显微镜(Zeiss,德国)。

### 1.2 质粒构建

全长的 N-WASP cDNA (GenBank No.AJ318416)是通过提取小鼠大脑总 RNA 再经过逆转录 PCR (RT-PCR)获得,并被克隆到 pCAG-Myc 载体中,其突变体 WH1,  $\Delta$ WH1,WH1-GBD, H208D,  $\Delta$ VCA, VCA,  $\Delta$ polyPro, polyPro 通过设计突变引物由全长 N-WASP 突变得到。用于敲低实验的短发夹环 RNA (shRNA)编码序列是克隆到 pLKO.1 载体(Sigma)上的。实验所用引物序列列于表 1。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'→3')
N-WASP shRNA1-F	CCGGAAGACGAGATGCTCCAAATGGCTCGAGCCATTTGGAGCATCTCGTCTTTTTTG
N-WASP shRNA1-R	AATTCAAAAAAGACGAGATGCTCCAAATGGCTCGAGCCATTTGGAGCATCTCGTCTT
N-WASP shRNA2-F	CCGGCAGATACGACAGGGCATTCAACTCGAGTTGAATGCCCTGTCGTATCTGTTTTG
N-WASP shRNA2-R	AATTCAAAAAACAGATACGACAGGGCATTCAACTCGAGTTGAATGCCCTGTCGTATCTG
N-WASP_EcoRI_F	TGGAATTCGACACCATGAGCTCGGGCCAGCAG
N-WASP_HindIII_R	CCCAAGCTTTCGTCTTCCCACTCATCATC
N-WASP_H208D_F	TCCAGGACATTGGGCATGTTG
N-WASP_H208D_R	CCAATGTCCTGGAAATTACTTGG
N-WASP_ΔVCA_R	CCCAAGCTTTCGTTCACCATCAGAAGGCAGGC
VCA_EcoRI_F	TGGAATTCGACACCATGGACCATCAAGTTCCAGC
WH1_HindIII_R	CCCAAGCTTGTCTAGATTGGGACCATTTGGAGCAT
N-WASP_ΔWH1_F	TGGAATTCGACACCATGCTACCCATGGCTACAGTTG
N-WASP_ΔpolyPro_R	CTTGATGGTCTGGTGTCTGTCTTCGGAGTTC
N-WASP_ΔpolyPro_F	ACAAGCACCAGACCATCAAGTTCCAGC
polyPro_EcoRI_F	TGGAATTCGACACCATGAGACAAGCACCACCACCT
WH1_GBD_HindIII_R	CCCAAGCTTGTCTGGTGTCTGTCTTCGGAGTTC
SCR_F	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTG
SCR_R	AATTCAAAAAACAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTG

### 1.3 细胞培养、转染

HEK293T 细胞的培养基是 DMEM(10% FBS, 100 μg/mL 青霉素/链霉素双抗), 首先使用不含抗生素的培养基培养 HEK293T 细胞, 待细胞密度达到 70%~90% (大约 24 h)即可使用 Lipofectamine™ 3000 进行细胞转染, 24 h 后换液, 48 h 后裂解细胞收取蛋白, 进行 Western blot 实验。

### 1.4 蛋白免疫印迹

配制 10%分离胶(10 mL): 3.97 mL MilliQ 水, 3.33 mL 30%Arc-Bis, 2.5 mL 1.5 mol/L Tris-HCl(pH = 8.8), 100 μL 10%SDS, 100 μL 10%过硫酸铵, 4 μL 四甲基乙二胺(TEMED); 4%浓缩胶(4 mL): 2.39 mL MilliQ 水, 0.53 mL 30%Arc-Bis, 1 mL 0.5 mol/L Tris-HCl (pH = 6.8), 40 μL 10% SDS, 40 μL 10%过硫酸铵, 4 μL 四甲基乙二胺(TEMED); 将样品与 SDS-PAGE 上样缓冲液按比例混合好, 95 变性 5 min 后加入上样孔中;电泳: 80 V, 30 min; 110 V, 120 min; 电泳完毕后, 根据蛋白 Marker 大小, 将包含目的蛋白的 PAGE 胶切下: 110 V, 105 min 将

蛋白转至 NC 膜上; 转膜完毕后, 将膜放入适量的封闭液(5%的脱脂牛奶)中, 室温孵育 1 h; 倒掉封闭液, 加入一抗, 4 孵育过夜; 将膜加入 1×TBST 溶液中, 室温下洗膜 5 min, 重复 4 次; 加入二抗, 室温孵育 1 h; 将膜放入 1×TBST 溶液中, 室温下洗膜 5 min, 重复 4 次; 最后用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫膜成像。

### 1.5 小鼠饲养

C57BL/6J 小鼠的饲养环境为 23 恒温, 12 h (7 : 00~19 : 00)光照和 12 h (19 : 00~7 : 00)黑暗。所有的小鼠实验均符合 Institutional Animal Care and Use Committee 的规定。取成年的雌性与雄性小鼠于下午 16 : 00 后进行合笼, 第二天上午 12 : 00 前检查雌鼠有没有阴道栓, 如果有阴道栓就将时间记为胚胎期(embryonic day 0.5: E0.5)。

### 1.6 胚胎电转

E14.5 时, 向怀孕的母鼠腹腔注射 0.6%的戊巴比妥钠进行麻醉, 期间配制注射的质粒混合物[pCAG-

Myc 质粒(2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )或者 pLKO.1 质粒(4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )、eGFP 质粒(0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )以及 0.3% Fast green]。

将母鼠放在加热板上,用剪刀将母鼠腹部的毛剃干净,再用酒精与碘酒进行消毒。将母鼠腹部剪开一个口子,再将一块灭菌的纱布剪开一个口子并将其放于母鼠腹部开口处,将子宫取出放在纱布上,并加 0.9% 的 NaCl 溶液于胚胎上。然后向胚胎脑室注射配制好的质粒混合物,使用含有钳片电极的电转仪将质粒转到胚胎大脑皮层脑室区的神经祖细胞中。电转使用的程序为电压 37 V,持续时间 50 ms,间隔 900 ms,5 次。

将子宫放回母鼠腹腔中并加 1 mL 0.9% 的 NaCl 溶液,缝合好伤口后将母鼠放在恒温板上,待母鼠醒来后放回饲养笼盒,继续饲养。

### 1.7 取脑、切片、制片及拍片

E17.5 时,将胎鼠的头部剪下,在显微镜下操作取出大脑,放入含有 4% PFA 的离心管中,放于摇床上室温孵育 24 h 进行固定。

使用自动震荡切片机切出 50  $\mu\text{m}$  的脑片,用 DAPI 进行细胞核染色,再用 1 $\times$ PBS 清洗 3 次,然后将脑片放在载玻片上,用封片剂封好。

使用共聚焦显微镜获取处理好的脑片图像。

### 1.8 数据分析

RNA-seq 数据分析:数据下载于 ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements)数据库<sup>[44]</sup>,经 Cufflinks 2.1.1 处理计算分析得到基因表达水平数值。文中使用的数据 Gene Expression Omnibus (GEO)序列号: GEO:GSE82852, GEO:GSE78340, GEO:GSE78323, GEO:GSE78374。

数据分析使用 GraphPad Prism 5.0 软件,各组间平均值差异程度的检验方法用 Student's *t* test 或者 One-way ANOVA 进行检验分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 N-WASP 在小鼠胚胎期大脑皮层中呈现逐渐降低的表达模式

已有研究报道, N-WASP 蛋白的表达在出生后

的大鼠皮层中是逐渐增加的,并在出生后 16 周维持稳定<sup>[45]</sup>,同时有文献报道其对于神经突起的延伸以及突触发生有重要作用<sup>[46~48]</sup>,说明 N-WASP 在大脑发育中起着重要的作用,但 N-WASP 在小鼠胚胎期大脑皮层发育过程中的具体表达情况却未见相关报道。本研究首先提取了不同时期(E12.5、E14.5、E16.5、E18.5 和 P1)的小鼠大脑皮层组织进行免疫印迹实验检测蛋白表达水平,发现 N-WASP 蛋白在胚胎期皮层有表达,并随着胚胎发育呈现下降的模式(图 1A)。然后从 ENCODE 数据库中下载了小鼠(C57BL/6)前脑(forebrain)在不同时期(E12.5、E14.5、E16.5 和 P0)的 RNA-seq 数据<sup>[44]</sup>,使用 Cufflinks 2.1.1 对其进行分析,发现 N-WASP 在 mRNA 水平上有表达并且随着发育过程呈现下降的模式(图 1B),该结果与蛋白免疫印迹实验一致。

### 2.2 N-WASP 过表达或者敲低均会造成小鼠大脑皮层神经元迁移障碍

N-WASP 蛋白在小鼠大脑皮层的表达从 E12.5 到 P1 呈现逐渐下降的模式,其表达量高的时期与大脑皮层神经元迁移的时间段(E11~E16)吻合,预示其可能参与调控神经元的迁移。由此,设计了 2 个不同的 shRNA 进行在体胚胎电转敲低实验。首先,通过 WB 检验了 shRNA 的效率,发现它们能有效敲低 N-WASP 蛋白的表达水平(图 2A)。然后,利用子宫内胚胎电转技术,将 shRNA 表达质粒转入 E14.5 的胎鼠大脑皮层神经祖细胞中,在 E17.5 时取脑并切片观察。与对照组相比,发现 N-WASP 敲低会造成小鼠大脑皮层神经元的迁移缺陷(图 2B)。

为进一步研究 N-WASP 调控神经元迁移的具体功能,构建了 N-WASP 真核过表达质粒,然后通过子宫内胚胎电转技术将该质粒转入 E14.5 的胎鼠大脑皮层神经祖细胞中,同样在 E17.5 时切片观察。与对照组相比,发现过表达 N-WASP 也会造成小鼠大脑皮层神经元的迁移缺陷(图 2C)。并且,过表达 N-WASP 造成的神经元迁移障碍比敲低 N-WASP 所造成的神经元迁移障碍更加显著(图 2: B, C)。

上述结果说明, N-WASP 过表达或敲低均会造成神经元迁移障碍,表明其在神经元迁移中起着重要作用。



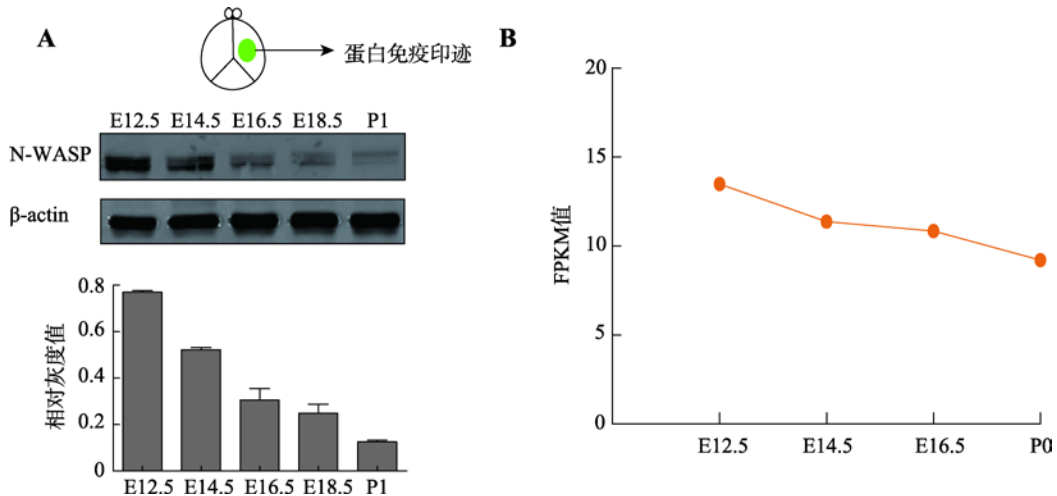


图 1 N-WASP 在小鼠皮层中的表达

Fig. 1 The expression profile of N-WASP in mouse cortex

A: 蛋白免疫印迹检测在胚胎发育过程中 N-WASP 蛋白的表达量, 下方是对蛋白免疫印迹进行的定量分析; B: Cufflinks 2.1.1 分析 N-WASP 在胚胎发育过程中 mRNA 水平。FPKM, fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, 每一百万个 mapped reads 中 map 到 1kb 转录本上的 fragments 个数。FPKM=cDNA fragments/(mapped reads(millions)× transcript length(kb))。

### 2.3 N-WASP 主要通过 polyPro 和 VCA 结构域调控小鼠大脑皮层神经元迁移

N-WASP 主要通过 VCA 结构域结合活化的肌动蛋白以及 Arp2/3 复合体引起肌动蛋白组装<sup>[32]</sup>, 其在未激活的情况下处于自抑制的状态(GBD 与 VCA 相互作用), 需要上游信号 Cdc42 激活并打开这种自抑制状态, 进而引起肌动蛋白的组装<sup>[25,33]</sup>。N-WASP 除了通过上述经典的 GTPase 激活通路之外, 还可以通过 polyPro 结构域与含有 SH3 结构域的接头蛋白结合进行激活<sup>[25]</sup>, 而它的 WH1 结构域主要与 WIP (WASP-interacting protein) 家族相互作用, 该作用与 N-WASP 招募到肌动蛋白组装的地点有关<sup>[31]</sup>。

为更加深入研究 N-WASP 调控神经元迁移的分子机制, 首先构建了 VCA 结构域删除( $\Delta$ VCA)、polyPro 结构域删除( $\Delta$ polyPro)、WH1 结构域删除( $\Delta$ WH1)以及破坏了 Cdc42 结合位点<sup>[34]</sup>(H208D 突变体)的 N-WASP 蛋白表达质粒(图 3A)。然后通过子宫内胚胎电转技术, 将这些质粒分别转到 E14.5 的大脑皮层中, 在 E17.5 时切片观察。结果发现单独过表达  $\Delta$ VCA、 $\Delta$ polyPro 或者  $\Delta$ WH1 的 N-WASP 蛋白均会造成严重的神经元迁移障碍, 而过表达 H208D 突变的 N-WASP 蛋白却没有造成明显的神经元迁移障碍(图 3B)。最后, 利用构建的 VCA 结构域过表达

质粒(VCA)、polyPro 结构域过表达质粒(polyPro)、WH1 结构域过表达质粒(WH1)、WH1-GBD 结构域(同时删除 polyPro 和 VCA 结构域)过表达质粒(WH1-GBD)(图 3A), 进行了类似的子宫内胚胎电转实验。结果表明单独过表达 VCA 蛋白或 polyPro 蛋白均会造成严重的神经元迁移障碍, 但是过表达 WH1 蛋白或 WH1-GBD 蛋白对神经元迁移没有明显影响(图 3C)。

综上所述, N-WASP 是通过 VCA 结构域激活下游信号通路来调控神经元迁移, 并且主要通过 polyPro 结构域接收上游信号调控神经元迁移, 而 Cdc42 激活 N-WASP 进而打开 VCA 的这条信号通路只是部分参与对神经元迁移的调控。此外, WH1 结构域可能不参与 N-WASP 对神经元迁移的调控。

## 3 讨论

大脑皮层的正常发育对于其执行记忆、学习和感觉的功能是非常重要的, 其中神经元迁移是大脑皮层发育中的一个重要过程。神经元迁移是一个高度动态化的协同调控过程, 通过细胞骨架中肌动蛋白的动态组装影响神经元前体的形态进而调控神经元迁移<sup>[28]</sup>。WASP 家族中的 WAVE 蛋白和其他 4 个蛋白可形成一个五聚体复合物(pentameric WAVE

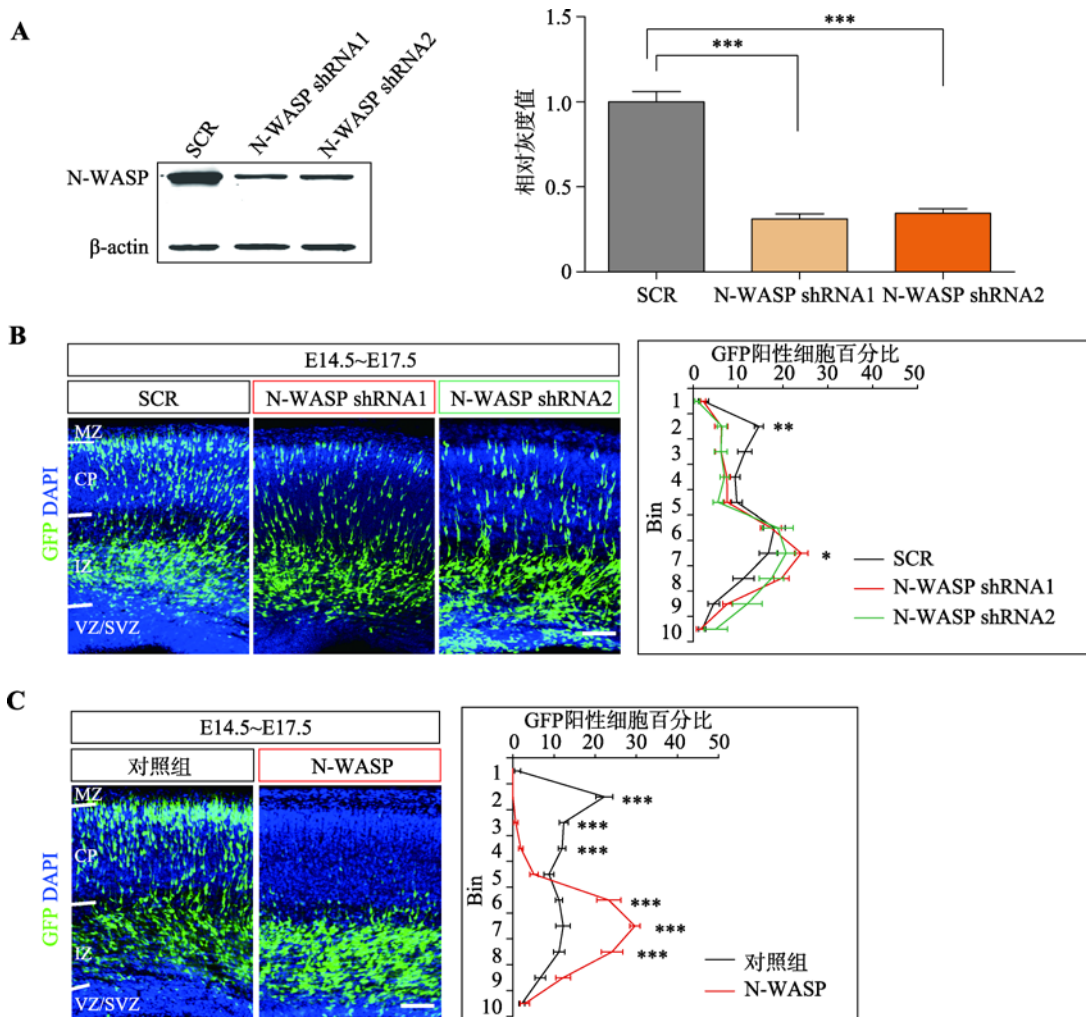


图 2 过表达和敲低 N-WASP 均会造成大脑皮层神经元迁移障碍

**Fig. 2 Both overexpression and knockdown of N-WASP impair cortical neuron migration**

A: 蛋白免疫印迹检测 shRNA 敲低效率, 右图是对蛋白免疫印迹进行的定量分析; B: 子宫内胚胎电转实验观察敲低 N-WASP 对神经元迁移的影响, 右侧为每个区域中 GFP 阳性细胞所占总阳性细胞百分比的统计图, 每组样本数量  $n = 3$  只小鼠胚胎, 显著性表示的是 N-WASP shRNA1 或者 N-WASP shRNA2 与 SCR 之间的对比, SCR: scrambled shRNA, 即不靶向任何基因; C: 子宫内胚胎电转实验观察过表达 N-WASP 对神经元迁移的影响, 右侧为每个区域中 GFP 阳性细胞所占总阳性细胞百分比统计图, 每组样本数量  $n = 3$  只小鼠胚胎。数据结果以  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  表示, 标尺:  $100 \mu\text{m}$ , \*:  $P < 0.05$  表示有统计学差异, \*\*:  $P < 0.01$  表示有显著的统计学差异, \*\*\*:  $P < 0.001$  表示有极其显著的统计学差异。MZ: marginal zone, 边缘区; CP: cortical plate, 皮质区; IZ: intermediate zone, 中间区; SVZ: subventricular zone, 室下区; VZ: ventricular zone, 脑室区。

regulatory complex, WRC), 然后被大约 120 种膜蛋白招募到细胞膜附近, 进而引起肌动蛋白的组装<sup>[21]</sup>。这些膜蛋白包括很多原钙粘蛋白 (protocadherin, PCDH)、Celsr3 (cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3)、Fat3 (FAT atypical cadherin 3) 等<sup>[18,21]</sup>。原钙粘蛋白通过抑制 Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) 的活性而激活 Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) 来调控神经元的树突与树突棘的形

态生成<sup>[16]</sup>。此外, N-WASP 能够调节神经元突起 (neurites) 以及突起的生长锥导向<sup>[49,50]</sup>, 然而其在神经元迁移中的功能和机制依然是不清楚的。

本研究使用在体子宫内胚胎电转技术研究 N-WASP 蛋白在小鼠大脑皮层神经元迁移中所起的作用, 发现 N-WASP 调控神经元迁移主要依赖于 polyPro 和 VCA 结构域。通过提取不同时期的胚胎大脑皮层组织 (E12.5、E14.5、E16.5、E18.5 和 P1)

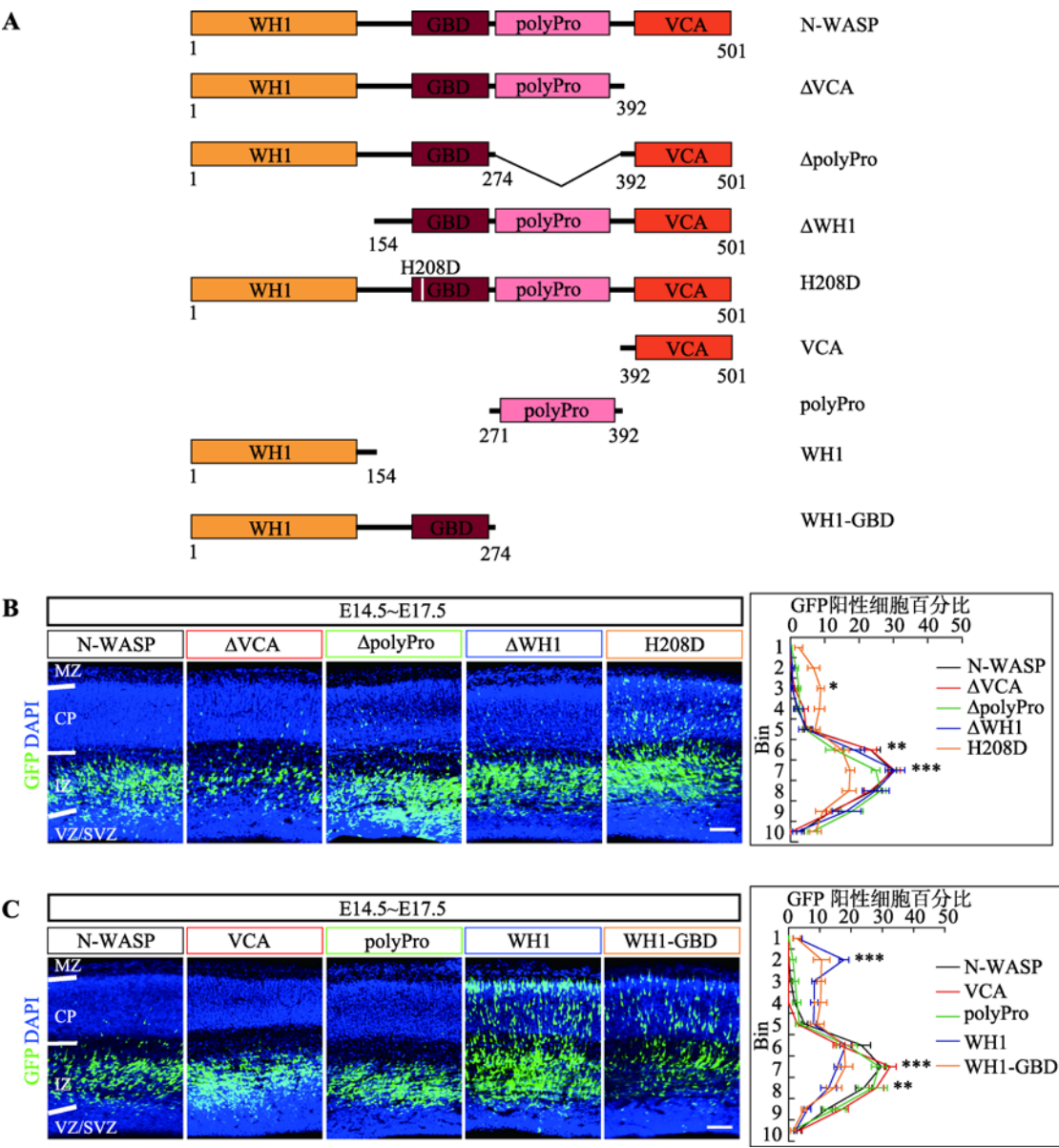


图 3 N-WASP 主要通过 polyPro 和 VCA 结构域调控大脑皮层神经元迁移

Fig. 3 N-WASP regulates cortical neuron migration mainly through its polyPro and VCA domains

A : 实验所用质粒示意图 ; B : 过表达删除或突变各结构域的 N-WASP 蛋白对神经元迁移的影响 , 右侧为每个区域中 GFP 阳性细胞所占总阳性细胞的百分比统计图 , 每组样本数量  $n = 3$  只小鼠胚胎 , 显著性表示的是 H208D 与 N-WASP 之间的对比 ; C : 过表达 N-WASP 蛋白各结构域对神经元迁移的影响 , 右侧为每个区域中 GFP 阳性细胞所占总阳性细胞的百分比统计图 , 每组样本数量  $n = 3$  只小鼠胚胎 , 显著性表示的是 WH1 或 WH1-GBD 与 N-WASP 之间的对比。数据结果以  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  表示 , 标尺 :  $100 \mu\text{m}$  , \* :  $P < 0.05$  表示有统计学差异 , \*\* :  $P < 0.01$  表示有显著的统计学差异 , \*\*\* :  $P < 0.001$  表示有极其显著的统计学差异。MZ : marginal zone , 边缘区 ; CP : cortical plate , 皮质区 ; IZ : intermediate zone , 中间区 ; SVZ : subventricular zone , 室下区 ; VZ : ventricular zone , 脑室区。

进行蛋白免疫印迹实验以及分析胚胎发育不同时期前脑(E12.5、E14.5、E16.5 和 P0)的 RNA-seq 数据 , 发现在胚胎时期的大脑皮层发育过程中 , N-WASP 在 mRNA 和蛋白质水平上均有表达 , 并且其表达随着大脑发育逐渐下降。然后通过在小鼠子宫内胚胎电

转技术过表达和敲低 N-WASP , 发现过表达和敲低 N-WASP 均造成神经元迁移障碍 , 说明其在调控神经元迁移中可能起到了重要作用。本研究观察到敲低 N-WASP 的表型没有过表达明显 , 这可能是因为 N-WASP 没有被完全敲除。



先前研究表明, Lis1 (lissencephaly-1)过表达对神经元迁移没有明显影响,而 Lis1 敲低会导致神经元迁移障碍<sup>[8,51]</sup>;双皮质素(doublecortin, DCX)过表达会促进神经元迁移,而双皮质素敲低会阻止神经元迁移<sup>[8,52]</sup>。有趣的是,本研究发现过表达和敲低 N-WASP 均会造成神经元迁移障碍。神经元迁移是一个高度动态的过程,需要肌动蛋白骨架动态调控,所以 N-WASP 的表达量的平衡对这一过程显得非常重要。此外,有报道称在患有癫痫的人脑组织中 N-WASP 的表达量高于正常水平<sup>[53]</sup>,预示 N-WASP 的表达量过多产生的病理学效应可能参与了疾病的进程。

N-WASP 在未激活时通过分子内的 GBD 与 VCA 相互作用保持自抑制状态。在激活时,其通过接收上游信号刺激释放出 VCA 结构域,暴露出来的 VCA 结构域通过激活 Arp2/3 复合体来引起肌动蛋白的动态化组装。本研究表明在正常的大脑皮层发育状态下, N-WASP 蛋白可能参与调控神经元迁移,而且其表达量的平衡对神经元的迁移也是至关重要的。进一步的研究结果表明分别过表达 VCA 结构域和 $\Delta$ polyPro (含有 VCA 结构域)突变体均会造成神经元迁移障碍,说明 VCA 结构域可能竞争性抑制内源的 N-WASP 蛋白发挥作用。同理,分别过表达 polyPro 结构域和 $\Delta$ VCA (含有 polyPro 结构域)突变体均会造成神经元迁移障碍,说明 polyPro 结构域也可能竞争性抑制内源的 N-WASP 蛋白发挥作用。推测这些突变体可能竞争性地结合了一些与内源 N-WASP 相互作用的蛋白(如含有 SH3 功能域的接头蛋白),从而抑制内源的 N-WASP 发挥作用。与此同时,过表达 WH1-GBD 结构域(不含有 polyPro 和 VCA 结构域)却对神经元迁移没有明显影响。总之,这些结果说明 N-WASP 的 polyPro 和 VCA 结构域参与调控神经元迁移,可能是通过 polyPro 结构域接收上游信号释放出 VCA 结构域,再激活 Arp2/3 复合体影响肌动蛋白的组装进而调控神经元迁移。

N-WASP 的 WH1 结构域主要与 WIP 家族蛋白相互作用,其 GBD 结构域主要通过 Cdc42 GTPase 结合接收上游信号。本研究发现过表达 WH1 结构域对神经元迁移没有明显影响,而过表达 $\Delta$ WH1 则会造成严重的神经元迁移障碍,说明过表达 WH1 结构

域不能竞争性抑制内源的 N-WASP 蛋白发挥作用,而 $\Delta$ WH1(含有 polyPro 和 VCA 结构域)依然能够竞争性抑制内源的 N-WASP 蛋白发挥作用,可能是因为 N-WASP 调控神经元迁移不需要 WH1 结构域的参与。之前有报道称 N-WASP 通过 WH1 结构域参与调控上皮细胞之间连接的肌动蛋白骨架,而经典的 VCA 结构域并不参与其中,这种调控作用主要是通过 WH1 结构域维持肌动蛋白组装后的稳定性<sup>[54]</sup>。此结论与本文的研究结果相一致,因为神经元迁移是一个时刻在变化的过程,其需要肌动蛋白组装的动态平衡来形成合适的细胞骨架网络,而细胞骨架网络对于神经细胞的形态至关重要。N-WASP 的 WH1 结构域可能更侧重于影响肌动蛋白组装后的静态稳定性,而不是调控肌动蛋白的动态组装<sup>[54]</sup>。此外,本研究还发现过表达 H208D 突变的 N-WASP 对神经元迁移有影响,但并非像其他突变体产生明显的影响。由于 H208D 突变的 N-WASP 不能结合 Cdc42,因此推测 Cdc42 激活 N-WASP 引起肌动蛋白的动态调控可能参与了神经元迁移,但并不是主要的信号通路。

N-WASP 在参与信号通路发挥作用时,需要从未激活状态转变成激活状态。N-WASP 的高度激活需要两个步骤,首先通过接收上游信号分子(如 Cdc42 或含有 SH3 结构域的接头蛋白)的激活进行变构调节,释放出 VCA 结构域结合 Arp2/3 复合体,然后通过连接蛋白使得 N-WASP 进行二聚化或者寡聚化增加与 Arp2/3 复合体的亲和力来调控肌动蛋白的组装<sup>[39]</sup>。结合最近的研究发现一个 VCA 结构域结合 Arp2/3 复合体的背面而另一个 VCA 结构域结合该复合体的底面<sup>[55]</sup>,本文提出一个可能的 N-WASP 调控神经元迁移的模型: Cdc42 和含有 SH3 结构域的蛋白可能协同结合 N-WASP 蛋白使其进行变构释放出 VCA 结构域,再通过多价的含有 SH3 结构域的蛋白结合 polyPro 结构域使得 N-WASP 进行二聚化或者寡聚化,最终激活肌动蛋白的组装调控神经元的迁移(图 4)。

综上所述,本研究发现 N-WASP 在大脑皮层神经元前体放射状迁移中起到重要作用,并且其主要是通过 polyPro 和 VCA 结构域动态调控细胞骨架中肌动蛋白丝状分支的构建影响神经元迁移。

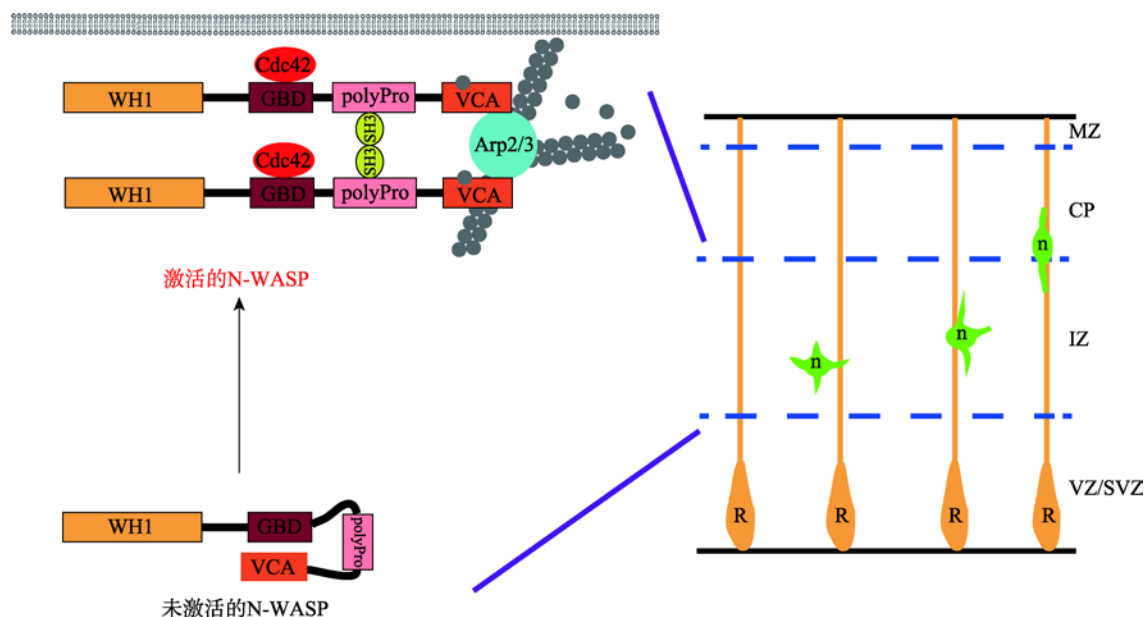


图 4 N-WASP 蛋白调控大脑皮层神经元迁移机制的模式图

Fig. 4 A model for N-WASP regulating cortical neuron migration

N-WASP 由上游信号分子(含有 SH3 结构域的接头蛋白和 Cdc42)激活, 释放出 VCA 结构域, 结合 Arp2/3 复合体, 再通过含有 SH3 结构域的接头蛋白进行二聚化或者寡聚化<sup>[39]</sup>, 释放出来的两个 VCA 结构域分别结合 Arp2/3 复合体的背面和底面<sup>[55]</sup>, 从而高度激活 Arp2/3 复合体引起肌动蛋白的组装来调控神经元的迁移。MZ: marginal zone, 边缘区; CP: cortical plate, 皮质区; IZ: intermediate zone, 中间区; SVZ: subventricular zone, 室下区; VZ: ventricular zone, 脑室区; n: neuron, 神经元; R: radial glial cell, 放射状胶质细胞。

## 参考文献(References):

- [1] Wang S, Xu ZH. Progress in the study of molecular mechanisms of developmental cortex malformations. *Chin J Cell Biol*, 2011, 33(8): 837–846.  
王硕, 许执恒. 大脑皮层发育畸形及分子遗传机理研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(8): 837–846. [DOI]
- [2] Angevine JB Jr, Sidman RL. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 1961, 192: 766–768. [DOI]
- [3] Marín O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*, 2003, 26: 441–483. [DOI]
- [4] Marín O, Valiente M, Ge XC, Tsai LH. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(2): a001834. [DOI]
- [5] Ayala R, Shu TZ, Tsai LH. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, 2007, 128(1): 29–43. [DOI]
- [6] Huang Z. Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Mol Cell Neurosci*, 2009, 42(1): 11–22. [DOI]
- [7] Tissir F, Goffinet AM. Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(8): 525–535. [DOI]
- [8] LoTurco JJ, Bai JL. The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci*, 2006, 29(7): 407–413. [DOI]
- [9] Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*, 2011, 146(1): 18–36. [DOI]
- [10] Tabata H, Nakajima K. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, 2003, 23(31): 9996–10001. [DOI]
- [11] Li W, Wu Q. Protocadherin and the diversity of neurons. *Sci Technol Vision*, 2013, (27): 14.  
李伟, 吴强. 原钙粘蛋白分子与神经元的多样性. *科技视界*, 2013, (27): 14. [DOI]
- [12] Ying GX, Wu S, Hou RQ, Huang W, Capecchi MR, Wu Q. The protocadherin gene *Celsr3* is required for interneuron migration in the mouse forebrain. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(11): 3045–3061. [DOI]
- [13] Peek SL, Mah KM, Weiner JA. Regulation of neural cir-

- cuit formation by protocadherins. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(22): 4133–4157. [DOI]
- [14] Wu Q, Li W. From human genome to the development of brain: the regulation and function of protocadherin in the development of brain. In: Qiao ZD, He L, ed. *The Enlightenment of the Frontier Life*. Beijing: Science Press, 2016: 461–477.  
吴强, 李伟. 从人类基因组到大脑发育: 原钙粘蛋白在大脑发育中的调控与功能研究. 见: 乔中东, 贺林. *前沿生命的启迪*. 北京: 科学出版社, 2016: 461–477. [DOI]
- [15] Garrett AM, Schreiner D, Lobas MA, Weiner JA.  $\gamma$ -protocadherins control cortical dendrite arborization by regulating the activity of a FAK/PKC/MARCKS signaling pathway. *Neuron*, 2012, 74(2): 269–276. [DOI]
- [16] Suo L, Lu HN, Ying GX, Capecchi MR, Wu Q. Protocadherin clusters and cell adhesion kinase regulate dendrite complexity through Rho GTPase. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4(6): 362–376. [DOI]
- [17] Lefebvre JL, Kostadinov D, Chen WV, Maniatis T, Sanes JR. Protocadherins mediate dendritic self-avoidance in the mammalian nervous system. *Nature*, 2012, 488(7412): 517–521. [DOI]
- [18] Jia ZL, Guo Y, Tang YX, Xu Q, Li BJ, Wu Q. Regulation of the protocadherin *Celsr3* gene and its role in globus pallidus development and connectivity. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(20): 3895–3910. [DOI]
- [19] Yu Y, Suo L, Wu Q. Protocadherin  $\alpha$  gene cluster is required for myelination and oligodendrocyte development. *Zool Res*, 2012, 33(4): 362–366.  
于钰, 索伦, 吴强. PCDH $\alpha$  在髓鞘形成和少突胶质细胞发育中的作用. *动物学研究*, 2012, 33(4): 362–366. [DOI]
- [20] Chen WV, Nwakeze CL, Denny CA, O'Keeffe S, Rieger MA, Mountoufaris G, Kirner A, Dougherty JD, Hen R, Wu Q, Maniatis T. Pcdhac2 is required for axonal tiling and assembly of serotonergic circuitries in mice. *Science*, 2017, 356(6336): 406–411. [DOI]
- [21] Chen BY, Brinkmann K, Chen ZC, Pak CW, Liao YX, Shi SY, Henry L, Grishin NV, Bogdan S, Rosen MK. The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell*, 2014, 156(1/2): 195–207. [DOI]
- [22] Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, 1994, 78(4): 635–644. [DOI]
- [23] Thrasher AJ. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(9): 635–646. [DOI]
- [24] Aldrich RA, Steinberg AG, Campbell DC. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics*, 1954, 13(2): 133–139. [DOI]
- [25] Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(1): 37–48. [DOI]
- [26] Alekhina O, Burstein E, Billadeau DD. Cellular functions of WASP family proteins at a glance. *J Cell Sci*, 2017, 130(14): 2235–2241. [DOI]
- [27] Kessels MM, Schwintzer L, Schlobinski D, Qualmann B. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(11): 926–933. [DOI]
- [28] Kawauchi T, Hoshino M. Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons. *Dev Neurosci*, 2008, 30(1/3): 36–46. [DOI]
- [29] Miki H, Miura K, Takenawa T. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*, 1996, 15(19): 5326–5335. [DOI]
- [30] Padrick SB, Rosen MK. Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79(1): 707–735. [DOI]
- [31] Moreau V, Frischknecht F, Reckmann I, Vincentelli R, Rabut G, Stewart D, Way M. A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(7): 441–448. [DOI]
- [32] Carlier MF, Ducruix A, Pantaloni D. Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem Biol*, 1999, 6(9): R235–R240. [DOI]
- [33] Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA, Rosen MK. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, 2000, 404(6774): 151–158. [DOI]
- [34] Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, 1998, 391(6662): 93–96. [DOI]
- [35] Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 1999, 97(2): 221–231. [DOI]
- [36] Carlier MF, Nioche P, Broutin-L'Hermite I, Boujemaa R, Le Clainche C, Egile C, Garbay C, Ducruix A, Sansonetti

- P, Pantaloni D. GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem*, 2000, 275(29): 21946–21952. [DOI]
- [37] Rohatgi R, Ho HY, Kirschner MW. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol*, 2000, 150(6): 1299–1310. [DOI]
- [38] Okrut J, Prakash S, Wu Q, Kelly MJS, Taunton J. Allosteric N-WASP activation by an inter-SH3 domain linker in Nck. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(47): E6436–E6445. [DOI]
- [39] Padrick SB, Cheng HC, Ismail AM, Panchal SC, Doolittle LK, Kim S, Skehan BM, Umetani J, Brautigam CA, Leong JM, Rosen MK. Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins. *Mol Cell*, 2008, 32(3): 426–438. [DOI]
- [40] Lommel S, Benesch S, Rottner K, Franz T, Wehland J, Kühn R. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep*, 2001, 2(9): 850–857. [DOI]
- [41] Jain N, Lim LW, Tan WT, George B, Makeyev E, Thanabalu T. Conditional N-WASP knockout in mouse brain implicates actin cytoskeleton regulation in hydrocephalus pathology. *Exp Neurol*, 2014, 254: 29–40. [DOI]
- [42] Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T. Scrambler and yotari disrupt the *disabled* gene and produce a *reeler*-like phenotype in mice. *Nature*, 1997, 389(6652): 730–733. [DOI]
- [43] Suetsugu S, Tezuka T, Morimura T, Hattori M, Mikoshiba K, Yamamoto T, Takenawa T. Regulation of actin cytoskeleton by mDab1 through N-WASP and ubiquitination of mDab1. *Biochem J*, 2004, 384(Pt 1): 1–8. [DOI]
- [44] The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012, 489(7414): 57–74. [DOI]
- [45] Tsuchiya D, Kitamura Y, Takata K, Sugisaki T, Taniguchi T, Uemura K, Miki H, Takenawa T, Shimohama S. Developmental expression of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and WASP family verprolin-homologous protein (WAVE)-related proteins in postnatal rat cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci Res*, 2006, 56(4): 459–469. [DOI]
- [46] Abe T, Kato M, Miki H, Takenawa T, Endo T. Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 1): 155–168. [DOI]
- [47] Pommereit D, Wouters FS. An NGF-induced Exo70-TC10 complex locally antagonises Cdc42-mediated activation of N-WASP to modulate neurite outgrowth. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 15): 2694–2705. [DOI]
- [48] Wegner AM, Nebhan CA, Hu L, Majumdar D, Meier KM, Weaver AM, Webb DJ. N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 15912–15920. [DOI]
- [49] You JJ, Lin-Chao S. Gas7 functions with N-WASP to regulate the neurite outgrowth of hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 2010, 285(15): 11652–11666. [DOI]
- [50] Mohamed AM, Boudreau JR, Yu FPS, Liu J, Chin-Sang ID. The *Caenorhabditis elegans* Eph receptor activates NCK and N-WASP, and inhibits Ena/VASP to regulate growth cone dynamics during axon guidance. *PLoS Genet*, 2012, 8(2): e1002513. [DOI]
- [51] Tsai JW, Chen Y, Kriegstein AR, Vallee RB. LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J Cell Biol*, 2005, 170(6): 935–945. [DOI]
- [52] Bai JJ, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci*, 2003, 6(12): 1277–1283. [DOI]
- [53] Xiao F, Wang XF, Li JM, Xi ZQ, Lu Y, Wang L, Zeng Y, Guan LF, Yuan J. Overexpression of N-WASP in the brain of human epilepsy. *Brain Res*, 2008, 1233: 168–175. [DOI]
- [54] Kovacs EM, Verma S, Ali RG, Ratheesh A, Hamilton NA, Akhmanova A, Yap AS. N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(8): 934–943. [DOI]
- [55] Luan Q, Zelter A, MacCoss MJ, Davis TN, Nolen BJ. Identification of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) binding sites on the branched actin filament nucleator Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(7): E1409–E1418. [DOI]