

Summary

Coronins constitute an evolutionary conserved family of WD repeat-domain-containing proteins which can be clearly classified into two distinct groups in mammals, 'short' and 'long' coronins, based on their structural features. Coronin7 (CRN7) is the only long coronin known in mammals and lower eukaryotes, having two beta-propellers in tandem, and has been shown to associate with the Golgi membrane but not with actin filaments, hence making it atypical. Depletion of CRN7 leads to scattered Golgi morphology and most importantly, the knock-down leads to a block of protein export from the Golgi complex. In order to understand the *in vivo* role of CRN7 and to probe for functions during actin-driven cellular events, we generated a knock-out mouse model and performed a phenotypic characterization of primary dermal fibroblasts isolated from adult and neonatal mice. CRN7 deletion led to a disruption of Golgi architecture and peri-centrosomal Golgi association in the knock-out fibroblasts without affecting Golgi-centrosome polarization. Surprisingly, wound-healing and actin content in addition to cell attachment, spreading and actin re-orientation during wounding were enhanced in the absence of CRN7. CRN7 restoration in the knock-out cells rescued the Golgi integrity, cell spreading area and actin density phenotypes to an extent that was comparable to the wild-type levels.

An analysis of the domain structure of CRN7 revealed the presence of a CRIB (Cdc42- and Rac-interactive binding)-like motif between blades 2 and 3 of each of its beta-propellers which assists in CRN7 binding to small Rho GTPases, preferentially in their GDP-loaded forms and selectively with GDP-Cdc42. CRN7 inhibition of cell spreading and actin density were partially relieved upon expression of a constitutively-active mutant of Cdc42 in the wild-type cells. Expression of CRN7 with mutations in both the N- and C-terminal CRIB motifs was associated with abrogated Cdc42 binding, but it could partially rescue the Golgi phenotypes in knock-out cells. However, the mutant failed to restore the actin phenotypes to wild-type levels in our knock-out fibroblasts. These results clearly highlight the importance of an intact CRIB motif in CRN7 interaction with Rho GTPases and thereby regulating actin-mediated cellular processes independent of Golgi structure maintenance. We could show that CRN7 though interacting with GDP-Cdc42, does neither act as a GDI nor a GEF towards Cdc42 but seems to stimulate the activity of a Cdc42-GEF. N-WASP was identified as downstream effector of CRN7-mediated Cdc42 activation and was shown to participate in a direct interaction with CRN7. GTP-Cdc42 is known to

Summary

activate N-WASP by binding to its N-terminal GBD region and the interaction interface of CRN7 and N-WASP was also mapped to the N-terminal regions of both the proteins. In fact, we observed a complete overlap of the binding region of CRN7 and Cdc42 to N-WASP. Ectopic expression of N-WASP demonstrated a rescue of the actin phenotypes in the knock-out cells to wild-type levels, suggesting that CRN7 inhibits Cdc42-activated N-WASP or a loss of CRN7 leads to “hyperactivity” of N-WASP which then activates F-actin assembly leading to an enhancement in actin-driven processes. However, the Golgi phenotypes were alleviated upon ectopic expression of N-WASP in the knock-out background, presumably owing to a steady regulatory pool of Cdc42-activated N-WASP acting at the Golgi in the absence of CRN7.

Zusammenfassung

Coronine gehören zu der evolutionär konservierten Familie der WD-repeat enthaltenden Proteine, welche bei Säugetieren in zwei Unterfamilien unterteilt werden kann. Basierend auf ihren strukturellen Eigenschaften unterscheidet man zwischen kurzen und langen Coroninen. Coronin7 (CRN7) ist mit zwei hintereinander liegenden β -Propellern das einzige lange Coronin in Säugetieren. Eine weitere Besonderheit von CRN7 ist seine Assoziation mit der Golgi-Membran, jedoch nicht mit Aktinfilamenten. Der Knock-down von CRN7 resultierte neben einer aufgelockerten Morphologie des Golgi-Apparates insbesondere zu einer Blockade des Proteinexports aus dem Golgi-Komplex. Um eine mögliche Rolle von CRN7 während Aktin-abhängiger zellulärer Prozesse zu analysieren, wurde ein Knock-out Mausmodell generiert, primäre dermale Fibroblasten aus adulten und neonatalen Mäusen isoliert und phänotypisch charakterisiert. Die Deletion von CRN7 in Knock-out Fibroblasten resultierte in einer Veränderung der Morphologie und der perizentrosomalen Assoziation des Golgi-Apparats ohne Auswirkungen auf die Polarisierung des Golgi-Apparats und Zentrosoms, Wundheilung und Assemblierung von Aktin. Weiterhin führte das Fehlen von CRN7 zu einer erhöhten Anhaftung und Ausbreitung der Zellen sowie einer gesteigerten Aktinreorganisation während Verletzungen. Die Überexpression von CRN7 in Knock-out Zellen hat die Morphologie des Golgi-Apparats wieder hergestellt und verringerte die Zellausbreitung und Anreicherung von Aktin auf eine Ebene, welche vergleichbar mit dem Level in Wildtyp-Zellen ist.

Die Analyse der Domänen-Struktur von CRN7 ergab das Vorhandensein eines CRIB (Cdc42- and Rac-interactive binding)-ähnlichen Motivs zwischen den jeweiligen Propellerblättern 2 und 3. Dieses Motiv vermittelt die Interaktion von CRN7 mit kleinen Rho GTPasen mit einer Präferenz für die inaktive, GDP-gebundene Form und speziell mit GDP-Cdc42. Die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Cdc42 in Wildtyp-Zellen resultierte in einem Phänotyp, der vergleichbar ist mit dem Phänotyp der Knock-out Zellen. Darüber hinaus verhinderte die Expression von CRN7 mit Mutationen in den N- und C-terminalen CRIB-Motiven sowohl die Cdc42-Bindung als auch die Wiederherstellung des Aktin-Phänotyps, wohingegen der Golgi-Phänotyp in Knock-out Zellen teilweise rekonstruiert werden konnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung des intakten CRIB-Motivs für die Interaktion von CRN7 mit Rho GTPasen und damit die Regulation von Aktin-abhängigen

Zusammenfassung

zellulären Prozessen unabhängig von der Aufrechterhaltung der Struktur des Golgi-Apparats. Trotz der Interaktion von CRN7 mit GDP-Cdc42 fungiert CRN7 weder als GDI noch als GEF, jedoch stimuliert es die Aktivität eines Cdc42-GEF Proteins. Des Weiteren konnte N-WASP als direkter Interaktionspartner von CRN7 identifiziert werden, welcher als nachgeschalteter Effektor an der CRN7-abhängigen Cdc42-Aktivierung beteiligt ist. Die Interaktion erfolgt im N-terminalen Bereich beider Proteine, ebenso wie die Bindung von GTP-Cdc42 an N-WASP, was in der Aktivierung von N-WASP resultiert. Hier konnte eine komplette Überlappung der Bindestellen von CRN7 und Cdc42 an N-WASP beobachtet werden. Mittels ektopischer Expression von N-WASP ließ sich der Aktin-Phänotyp in den Knock-out Zellen auf das Wildtyp-Level zurückführen. Diese Ergebnisse führen zu den Annahmen, dass CRN7 die Cdc42-abhängige Aktivierung von N-WASP inhibiert oder dass das Fehlen von CRN7 zu einer „Hyperaktivität“ von N-WASP führt und folglich die F-Aktin-Assemblierung aktiviert wird und somit F-Aktin-abhängige Prozesse positiv reguliert werden. Nichtsdestotrotz war der Golgi-Phänotyp nach der Expression von N-WASP in Knock-out Zellen verringert, da vermutlich ein stabiler Pool von Cdc42-aktiviertem N-WASP in Abwesenheit von CRN7 am Golgi-Apparat wirken kann.