

Fengwei Wang
Dr.med.

Functional Investigation of *Dictyostelium discoideum* Myosin M Tail Domains in vivo

Geboren am 14.02.65 in Laiwu, V.R. China
Reifeprüfung im Juli 1982 in Laiwu, V.R. China
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1982 bis SS 1987
Physikum im WS 1985 an der medizinischen Fakultät der Shandong Universität, V.R. China
Klinisches Studium an der Shandong Universität
Praktisches Jahr am Shandong Hospital
Staatsexamen im Juli 1987 an der Shandong Universität

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: PD Dr. Thierry Soldati

Das Actomyosin-Cytoskelett spielt eine wichtige Rolle in den verschiedensten zellulären Prozessen wie z.B. bei der Endo- und Exocytose, der Cytokinese und der Zellmotilität. Die Myosinfamilie bekannter actinabhängiger Motorproteine hat sich auf inzwischen 17 strukturelle und phylogenetische Klassen ausgeweitet. Diese lassen sich wiederum in vier funktionelle Kategorien einteilen: Kontraktion, Aufrechterhaltung der Spannung des Zellcortex, Partikel- und Organellentransport sowie Signaltransduktion.

MyoM ist ein neues Myosin, das in *Dictyostelium discoideum* entdeckt wurde. Der MyoM-Schwanz setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen: einer Prolin-Serin-Threonin-reichen Domäne (PST), einer Dbl-homologen Domäne (DH) sowie einer Pleckstrin-homologen Domäne (PH). Die DH-PH Domäne, die typisch für GEFs kleiner Rac/Rho GTPasen ist, katalysiert *in vitro* tatsächlich den spezifischen Nukleotidaustausch bei Rac1-GTPasen.

Zellen, die die gesamte MyoM-Schwanz Domäne überexprimieren, zeigen nach hypoosmotischem Stress verstärkt Actin-getriebene Fortsätze. Wir haben eine Reihe von Proteinen in diesen Ramopodia lokalisiert, die an der Aktin-Polymerisation/ Depolymerisationsmaschinerie beteiligt sind. Unserer Ergebnisse zeigen, dass diese Zellen sowohl in ihrem Wachstum als auch in ihrer Entwicklung eine Verzögerung aufweisen. Um den Beitrag der Schwanzsubdomänen zu untersuchen, haben wir GFP-Chimären der einzelnen Domänen und eines DH-PH-Konstruktes exprimiert. GFP-PST, GFP-DH und GFP-PH wiesen eine anscheinend homogene Verteilung im Cytosol auf, was ein Hinweis darauf ist, dass diese Domänen einzeln nicht in der Lage sind ein Signal weiterzuleiten das zu Oberflächenfortsätzen führt. Eine Analyse der GFP-PH Zellen zeigte auch nach Stimulation mit chemischen Lockstoffen und unter hypoosmotischen Stress-Bedingungen keine klare Lokalisation von GFP-PH an die Plasmamembran.

Mit GFP-DH-PH erhielten wir hingegen keine Transformanten, was sich vermutlich auf einen toxischen Effekt durch die konstitutive Aktivität der GEF-Domäne zurückführen lässt. Nur durch den Einsatz eines kürzlich etablierten Tetracyclin-regulierten Systems war es uns möglich, GFP-DH-PH zu exprimieren. In Gegenwart von Tetracyclin waren die Zellen nicht grün, jedoch 12-24 Stunden nach dessen Entfernung wurden die meisten Zellen grün und zeigten Actin-getriebene Fortsätze. Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes kontinuierlich über die Zeit beobachtet. GFP-DH-PH wurde im Gegensatz zu GFP-DH und GFP-

PH an die Spitze der Fortsätze. an der Plasmamembran rekrutiert. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lokalisation der GEF-Domäne an der Plasmamembran der räumlichen Koordination der PH- und der DH-Domäne bedarf.

Zellen, welche die GEF-Domäne überexprimieren, zeigten eine starke Reaktion gegenüber Stress. Ebenso wie die MyoM-Schwanz-exprimierenden Zellen bildeten sie massiv Aktin-getriebene *Fortsätze*. Ich benutzte die Methode des 'rapid freezings' und der Immunfluoreszenz, um Komponenten zu lokalisieren, die an der Actinpolymerisation bzw. -depolymerisation beteiligt sein könnten. Der Arp2/3- Komplex war am Saum der Fortsätze angereichert, während Coronin (ein Actin-assoziiertes Protein) und der Cofilin-Kofaktor DAip1 sich am hinteren Ende der mit Actin gefüllten Fortsätze befanden. Die Kollokalisierung der GEF-Domäne und Actin an der Plasmamembran weist darauf hin, dass die Fortsätze durch ein aktiviertes Protein der Rac-Familie reguliert werden könnten.

Um die mögliche Funktion der PI3-Kinase zu verstehen, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt. Durch LY294002 wurden sowohl bei MyoM-Schwanz als auch bei DH-PH Zellen die Ausbildung von Oberflächen-Fortsätzen teilweise unterbunden. Interessanterweise lokalisierte in so behandelten Zellen GFP-DH-PH als scharfe Linie an der Plasmamembran. Dies visualisiert ein Phänomen, bei dem sich die Membran einstülpt und anschliessend abschnürt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die MyoM GEF-Domäne an der Endocytose beteiligt sein könnte. Das Ergebnis zeigt ausströme, dass die PI3-Kinase am Signalübertragungsweg zur Ausbildung von Ramopodien beteiligt sein kann. Es bleibt zu klären ob PI3-Kinase ein Ligand am Beginn der Kaskade oder ein Effektor weiter abwärts ist.

Weiterhin zeigen Zellen die die GEF-Domäne exprimieren einen ähnlichen Defekt bezüglich Wachstumsrate und Entwicklung wie die MyoM-Schwanz Zellen. Die PST-Domäne scheint hierbei für die unterschiedliche Expression vom MyoM-Schwanz und DH-PH verantwortlich zu sein.

Zusammengefasst ist MyoM das erste ungewöhnlich Myosin mit einer aktiven Rac-GEF Domäne. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass MyoM an der Grenzfläche des Rac-vermittelten Signalübertragungsweges und der Dynamik des Actin-Cytoskelettes wirkt.