



Doctoral Thesis

The structure-function relationship of stathmin and EB1: two key proteins regulating microtubule dynamics

Author(s):

Honnappa, Srinivas

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005129716> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Doctoral Thesis ETH No. 16353

The Structure-Function Relationship of Stathmin and EB1- Two Key Proteins Regulating Microtubule Dynamics

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Honnappa Srinivas

MSc. (Biochemistry), UAS, Bangalore

born May 12th, 1975

citizen of India

accepted on the recommendation of
Prof. Fritz K. Winkler, examiner
Prof. Joachim Seelig, co-examiner
Dr. Michel O. Steinmetz, co-examiner

Paul Scherrer Institut, Villigen, 2005

I. Zusammenfassung

Mikrotubuli (MTs) sind Polymere aufgebaut aus $\alpha\beta$ -Tubulin Heterodimere, welche zwischen Wachstums- und Schrumpfphasen wechseln können und deshalb dynamische Strukturen darstellen. Sie sind für eine Reihe von biologischen Prozessen wie Mitose, Zellbewegung, neuronale Differenzierung und Cargo Transport wichtig. Die dynamischen Eigenschaften der MTs sind durch stabilisierende und destabilisierende, zelluläre Faktoren reguliert. Meine Doktorarbeit hat das Verstehen der Struktur-Funktionsbeziehung von zwei Schlüsselproteinen, Stathmin und EB1 (end binding protein 1), welche in der Regulation der Dynamik von MTs eine Rolle spielen zum Ziel. Ich bin spezifische Fragen betreffend der Stathmin Struktur und des Wirkungsmechanismus der Tubulin-Stathmin Wechselwirkung in Abhängigkeit von Phosphorylierung angegangen. Meine Doktorarbeit liefert zudem Einsichten in Strukturbestimmende Elemente der EB1-Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor (APC) Wechselwirkungen.

Stathmin ist ein intrinsisch unstrukturiertes, kleines Protein, welches ternäre Komplexe mit Tubulin bildet, um die MT Polymerisation zu inhibieren. Obwohl die MT destabilisierende Aktivität von Stathmin etabliert ist, fehlen uns Einsichten in den darunter liegenden molekularen Mechanismus. Meine Doktorarbeit liefert eine detaillierte thermodynamische Analyse der Tubulin-Stathmin Wechselwirkung.

Die Aktivität von Stathmin ist über Phosphorylierung von vier Serinen (Ser16, Ser25, Ser38 und Ser63) reguliert. Um Einsichten in die Auswirkung von Phosphorylierung auf die Funktion von Stathmin zu erlangen, habe ich für die Produktion von sieben Stathmin Phosphoisoformen in milligramm Mengen Protokolle entwickelt. Mittels kalorimetrischen und spektroskopischen Methoden, zusammen mit der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur von einem Tubulin-Stathmin Komplex dokumentiere ich in meiner Doktorarbeit die molekulare Basis, um den Effekt von multipler Stathmin Phosphorylierung zu verstehen. Wir haben herausgefunden, dass Phosphorylierung von Ser16 und Ser63 am stärksten zur Inaktivierung der Stathmin Aktivität beiträgt, konsistent mit den publizierten *in vivo* Daten. Die Phosphorylierung von Ser16 hindert sterisch die Wechselwirkung der Aminosäure Seitenkette mit der α -Tubulin Untereinheit. Die Phosphorylierung von Ser63

zerstört die Struktur der Stathmin Helix, ohne die Berührungsfläche von Stathmin mit Tubulin zu beeinflussen.

EB1 ist ein Mitglied der so genannten plus Ende Proteinen (+TIP), welches als Schlüsselspieler für die Modulation der MT Dynamik in allen eukaryotischen Zellen aufgekommen ist. Voraussetzung für die räumliche und temporäre Ansammlung von +TIP Proteinen sind Protein-Protein Wechselwirkungen am wachsenden MT plus Ende. Das Kernstück dieses Netzwerkes ist EB1 und seine Familienmitglieder. Obwohl grosse Fortschritte dazu geführt haben, dass wir die Wechselwirkungsnetzwerke zwischen +TIP Proteine kennen, fehlen uns Einblicke in die strukturelle Basis deren Wirkungsweise.

Meine Doktorarbeit hat das Ziel mittels eines integrierten biophysikalischen und biochemischen Ansatzes, EB1-vermittelte Wechselwirkungsnetzwerken im atomaren Detail zu verstehen. Wir haben herausgefunden, dass EB1 als stabiles Homodimeres mit einem parallelem Coiled Coil vorliegt, und dass die Dimerisation unablässig für die Faltung der C-terminalen EB1 Domäne ist. Zudem berichtet meine Doktorarbeit die erste Kristallstruktur der C-terminalen EB1 Domäne. Diese Domäne besitzt ein einzigartiges, EB1-ähnliches Sequenzmotiv, welches als Wechselwirkungsstelle für andere +TIP Proteine zu Funktionieren scheint. Die dimere Domäne weist einen hoch konservierten Oberflächenbereich mit einer tiefen hydrophoben Furche in der Mitte auf. Meine Doktorarbeit dokumentiert ferner, dass zwei Aminosäuren (Ile2805 und Pro2806) von APC für die Wechselwirkung mit EB1 unablässig sind. Gestützt durch die strukturellen Erkenntnisse schlage ich vor, dass die Isoleucin Seitenkette die hydrophobe Furche besetzt.

Die vorliegende Doktorarbeit liefert ein Beispiel eines experimentellen Ansatzes für die Erforschung von mechanistischen Fragen betreffend intrinsisch unstrukturierten Proteinen, für die Untersuchung der funktionellen Rolle von multipler Proteinphosphorylierung und für die Bestimmung der Affinität und Eigenheiten von dynamischen Protein-Protein Wechselwirkungen.

I. Summary

Microtubules (MTs) are polymers made of $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers that can switch between growing and shrinking phases and thus represent dynamic structures. They are important for widely different processes, which include mitosis, cell migration, neuronal differentiation and transport of cargo. The dynamic properties of MTs are regulated by many stabilizing and destabilizing cellular factors. This thesis aims to understand the structure-function relationship of two key proteins stathmin and EB1 (end binding protein 1) involved in regulating MT dynamics. In particular, I wanted to address specific questions concerning the structure of stathmin and the mechanism of action of the phosphorylation-controlled stathmin-tubulin interaction. In addition, the thesis aimed to investigate structural determinants of the EB1-adematous polyposis coli tumor suppressor (APC) interaction.

Stathmin is an intrinsically disordered small protein that forms ternary complexes with tubulin to inhibit MT polymerization. Although the MT-destabilizing activity of stathmin is well established, the exact molecular mechanism has not been fully resolved. My thesis provides the first detailed thermodynamic analysis of the tubulin-stathmin interaction. The thesis establishes that stathmin primarily regulates MT dynamics by sequestering tubulin subunits.

The activity of stathmin is tightly regulated by phosphorylation of four serine residues (Ser16, Ser25, Ser38, and Ser63). In order to gain insights into the consequences of phosphorylation, I established protocols for the preparation of milligram amounts of seven stathmin phosphoisoforms. Using calorimetric and spectroscopic methods in addition to the recently published X-ray crystal structure of a tubulin-stathmin complex, the thesis provides a molecular basis for understanding the down-regulating effect of multisite stathmin phosphorylation. We found that phosphorylation of Ser16 and 63 contribute most to the inactivation of stathmin consistent with *in vivo* data. Phosphorylation of Ser16 sterically hinders the interaction of the residue side chain with the α -tubulin subunit, and phosphorylation of Ser63 disrupts the stathmin helix structure without compromising the contact interface between the two molecules.

EB1 is a member of so called plus-tip proteins (+TIPs) that emerged as a key player in the modulation of MT dynamics in eukaryotic organisms. Protein-protein interactions at the growing MT plus ends create a dynamic network that is required for spatial and temporal accumulation of +TIP proteins. The core element of this network is EB1 and its family members. Despite the substantial progress that has been made in identifying the interaction networks among +TIP proteins, we still lack insight into the structural basis of their mode of action.

Using an integrated biophysical and biochemical approach, this thesis aims to understand EB1-mediated interaction networks at the atomic level. We found that EB1 is a stable homodimer with a parallel coiled-coil, and showed that dimerization is essential for the folding of its C-terminal domain. In addition, the thesis reports the first crystal structure of the EB1 C-terminal domain. It harbors a unique sequence motif, which is seen to shape a binding site for other +TIP proteins. The highly conserved surface patch displays a deep hydrophobic cavity at its centre. I demonstrate that two residues (Ile2805 and Pro2806) of APC are essential for the interaction with EB1 and based on these structural insights, I propose that the isoleucine side chain occupies this cavity.

The thesis exemplifies experimental approaches for exploring mechanistic questions regarding intrinsically disordered proteins, for studying the role of multi-site phosphorylation and to determine the strength and nature of dynamic protein-protein interactions.