

Doctoral Thesis ETH No. 18738

Structure Function Relationships of Mammalian End Binding Proteins

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by
Christian de Groot
Dipl. Biologist
Friedrich-Alexander University, Erlangen-Nuremberg, Germany
born January the 31st, 1979
in Papenburg, Germany

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Fritz Winkler, examiner
Dr. Anna Akhmanova, co-examiner
Prof. Dr. Raimund Dutzler, co-examiner
Dr. Michel Steinmetz, co-examiner

2009

Zusammenfassung

Mikrotubuli, ein massgeblicher Bestandteil des Zellskeletts, sind polare Filamente, die aus α -/ β -Tubulinheterodimeren aufgebaut sind. Sie besitzen demzufolge zwei funktionell verschiedene Enden, das Plusende und das Minusende. In der Zelle ist das Minusende oft an Mikrotubuliorganisierenden Zentren verankert, wohingegen das Plusende dynamisch den zellulären Raum erkundet, und dabei unregelmässig zwischen Phasen des Wachstums und des Schrumpfens wechselt. Diese Eigenschaft wird als dynamische Instabilität bezeichnet. Die Mikrotubulidynamik ist durch Mikrotubuli-bindende Proteine räumlich und zeitlich streng reguliert. Unter den Mikrotubuli-bindenden Proteinen befindet sich eine strukturell und funktionell sehr unterschiedliche Gruppe von Proteinen, die sich spezifisch am wachsenden Mikrotubuli-Plusende ansammeln und +TIPs genannt werden. Die evolutionär am stärksten erhaltenen und überall zu findenden +TIPs sind Mikrotubuli-Plusende-bindende Proteine, kurz EBs genannt. EBs besitzen zwei Schlüsseleigenschaften, die sie in die meisten, wenn nicht sogar alle Mikrotubuli-basierenden Prozesse, zu denen Chromosomenteilung, Zellpolarisierung und Transport in der Zelle gehören, einbinden. Zum einen sind sie Kernbestandteil dynamischer Mikrotubuli-Plusende-angesiedelter +TIP-Netzwerke, dadurch dass sie beinahe alle anderen bekannten +TIPs zum Mikrotubuliende befördern. Zum anderen sind sie die einzigen bekannten +TIPs, die völlig unabhängig am wachsenden Mikrotubuli-Plusende binden können, indem sie vermutlich charakteristische strukturelle Eigenschaften dieser Enden erkennen.

EBs bestehen aus ca. 300 Aminosäuren und sind modular aufgebaut. Ein Modul ist die evolutionär hochkonservierte globuläre aminoterminaler Calponin-Homologiedomäne (CH), die notwendig und zugleich ausreichend für die Mikrotubulibindung ist. Das andere ist die evolutionär hochkonservierte carboxyterminale Domäne, die die Bindung zu anderen +TIPs vermittelt. Der EB-Carboxyterminus enthält ein α -helikales, paralleles Coiled-Coil („geknäueltes Knäuel“), welches für die EB-Dimerisierung zuständig ist. Dieses überlappt teilweise mit der EB-Homologiedomäne, die ein Vierhelixbündel enthält, dem sich eine nichtstrukturierte carboxyterminale Aminosäuresequenz anschliesst, die in einem sauren EEY/F-Motiv endet. Die aminoternale und die carboxyterminale Domäne sind durch ein wahrscheinlich flexibles Aminosäuresegment (Linker) verbunden.

Säugerzellen besitzen drei EB-Proteine, EB1, EB2 und EB3. Bis zum heutigen Zeitpunkt haben sich die meisten funktionellen Studien auf EB1 konzentriert. In der vorliegenden Doktorarbeit haben wir umfassend und im Detail, sowohl *in vitro*, als auch in Zellen, den Einfluss aller drei Säuger-EBs auf die Mikrotubulidynamik untersucht, um ihnen unterschiedliche Rollen zuweisen und eine funktionelle Hierarchie unter ihnen erstellen zu können. Zu diesem Zweck haben wir lebende Zellen zeitabhängig dokumentiert, RNAi-Analysen und Mikrotubulinachbau-Experimente durchgeführt und konnten daraufhin zeigen, dass die Unterdrückung der Mikrotubulikatastrophe, nämlich der Wechsel von Phasen des Wachstums zu Phasen des Schrumpfens, die Hauptaktivität von EBs *in vivo* ist. EB2 war deutlich weniger in der Lage gleichmässiges Mikrotubuliwachstum zu gewährleisten, als EB1 oder EB3. Röntgenstrukturanalysen in Verbindung mit Mutationsanalysen konnten aufklären, dass dieser funktionelle Unterschied teilweise auf eine andere Aminosäuresequenz in der CH-Domäne von EB2 zurückzuführen ist. Obwohl wir sowohl *in vivo*, als auch in Zellen aufzeigen konnten, dass eine einzige

CH-Domäne in der Lage ist am wachsenden Mikrotubuli-Plusende zu binden und dass diese Fähigkeit für EB-Konstrukte, die den Linker enthalten, verstärkt war, erwies sich die Dimerisierung als notwendige Voraussetzung für die Antikastropheaktivität von EBs. Dieser Teil meiner Doktorarbeit wurde in Zusammenarbeit mit A. Akhmanova, EMC Rotterdam bearbeitet.

Die carboxyterminale EB-Dimerisierungsdomäne (EBc) ist eine dominante Negativmutante und wurde in zahlreichen Zellstudien als Werkzeug verwendet, die Wechselwirkung zwischen +TIPs und endogenen EBs zu verhindern. Die molekulare Basis der EB-Dimerisierung und der Mechanismus der dem dominanten negativen Effekt der EBc-Domäne zugrunde liegt sind wenig bekannt. Das Wissen über diese Eigenschaft ist wichtig zum allgemeinen Verständnis von EB-Funktionen und für das Interpretieren der Daten, die in der Gegenwart von überexprimierten EBc-Domänen in Zellen erhalten wurden.

Um die Dimerisierungseigenschaften der drei Säuger-EBs zu untersuchen haben wir eine Analysemethode entwickelt, die auf Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) basierte. Wir fanden heraus, dass rekombinant hergestellte EBc-Domänen ihre Aminosäureketten in Lösung leicht austauschten, ein Vorgang, der durch EB-bindende +TIPs unterschiedlich stark unterdrückt wird. Kernspinresonanz-spektroskopie-Experimente erlaubten uns ein Modell der EB-Kettenaustauschkinetik zu postulieren. Die FRET-Daten zeigten auch, dass die carboxyterminalen Domänen von EB1 and EB3 vorzugweise Heterodimere bilden, wohingegen diejenige von EB2 keine Heterodimere formt. Thermo-dynamische und kinetische Studien in Kombination mit Röntgenstrukturanalysen, Modellierung und Mutagenese ergaben, dass strukturelle Eigenschaften in den EBc-Domänen die Bildung beziehungsweise die Verhinderung von Heterodimeren bestimmten. Als letzten Schritt, konnten wir die Heterodimerisierung zwischen Vollängen-EB1 and -EB3, sowohl in vitro, als auch in Zellen nachweisen.

Zusammengefasst, liefern unsere Ergebnisse die molekulare Basis zum Verständnis des dominanten Negativeffekts der EBc-Domänen und etablieren die Heterodimerisierung der EBs als neuartigen Regulationsmechanismus, der zu ihrer funktionellen Vielfalt beiträgt.

Summary

Microtubules (MTs), key components of the cytoskeleton, are intrinsically polar filaments composed of α - β -tubulin heterodimers with two functionally distinct ends, the plus-end and the minus-end. In cells, the minus-end is often anchored at MT organizing centres, while the MT plus-end dynamically explores the cellular space stochastically switching from phases of growth and shrinkage, a behaviour called dynamic instability. MT dynamics is tightly regulated both spatially and temporally by MT associated proteins (MAPs). Among MAPs, a functionally and structurally diverse group of proteins accumulates specifically at growing MT plus-ends, collectively termed MT plus-end tracking proteins (+TIPs). The evolutionary most conserved and ubiquitous +TIPs are end binding proteins (EBs).

EBs encompass two key features implicating them in most if not all MT-based processes including chromosome segregation, cell polarity and intracellular trafficking. They are the only +TIPs reported so far that autonomously track growing MT plus-ends, by probably recognizing a characteristic structural feature of growing MT plus-ends, and they are the core component of dynamic MT plus-end localized +TIP interaction networks by recruiting almost all known other +TIPs to MT tips.

EBs are approximately 300-residue proteins consisting of modules. The highly conserved globular N-terminal calponin homology (CH) domain is necessary and sufficient for MT binding and the highly conserved C-terminal domain mediates binding to other +TIPs. The EB C-terminus contains a parallel, α -helical coiled coil, which mediates EB dimerization. It partially overlaps with the unique EB homology domain that contains a four-helix bundle and a disordered C-terminal tail that terminates in an acidic EEY/F motif. Both, the N- and C-terminal domains are connected by a 60-70 residue putatively flexible linker.

In mammalian cells three EB proteins, EB1, EB2 and EB3 are expressed. So far, functional analysis has mostly focused on EB1. In the present thesis I comprehensively compared in detail the effects of the three mammalian EBs on MT dynamics both in cells and *in vitro* in order to assess putative different roles and a functional hierarchy. For this purpose we carried out live cell imaging analysis, RNAi depletion experiments and MT reconstitution assays and could show that suppression of MT catastrophe, the switch from the growing to the shrinkage phase, is the major activity of EBs *in vivo*. EB2 was significantly less potent to promote persistent MT growth compared to EB1 and EB3. X-ray crystallography in combination with mutational analysis revealed that this functional difference was at least partially due to amino acid substitutions in the CH domain of EB2. Although we could demonstrate both *in vivo* and *in vitro* that a single CH domain is able to track growing MT plus-ends and that this capability was enhanced for EB constructs containing the adjacent linker sequence, we showed that dimerization was necessary for the EB-mediated anti-catastrophe activity. This part of my thesis was done in collaboration with A. Akhmanova, EMC Rotterdam.

Furthermore, the C-terminal EB dimerization domain acts as dominant negative mutant and has been used in numerous cellular studies as tool with the idea to interfere with the binding of +TIPs

to endogenous EB proteins. However, the molecular basis of EB dimerization and the mechanism underlying the dominant negative effect of C-terminal EB domains is poorly understood. Gaining knowledge of these properties is important to understand the function of mammalian EB proteins and to correctly interpret and understand data obtained from studies transiently overexpressing EB C-terminal domains in cells.

To further deepen our understanding of the dimerization properties of the three mammalian EB proteins I developed a Förster resonance energy transfer (FRET) based assay. I demonstrated that recombinant C-terminal EB domains readily exchange their chains *in vitro* and that this process was differentially suppressed by +TIP binding partners. The FRET data also showed that C-terminal domains of EB1 and EB3 preferentially heterodimerized while the C-terminal domain of EB2 did not significantly form heterotypic complexes. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) allowed us to postulate a model of EB strand exchange. Thermodynamic and kinetic experiments in combination with X-ray crystallography, structure modelling and site-directed mutagenesis revealed that structural properties controlled homo- or heterodimer formation, respectively, of EB C-termini. Last but not least, we could show that heterodimers between full-length EB1 and EB3 not only exist *in vitro* but also in cells.

In conclusion, our findings provide a molecular basis for understanding the dominant negative effect of C-terminal EB domains and established heterodimerization of EB proteins as a novel regulatory mechanism contributing to the functional diversity of the mammalian EB proteins.