

Dissertation ETH No. 21095

Biophysical characterization of EB and EB mediated interactions

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences (Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Indrani Sen

Master of Science, Dresden University of Technology

11.08.1983

citizen of India

Accepted on the recommendation of

Prof.Dr.Gebhard Schertler, examiner

Prof.Dr.Michel Steinmetz, co-examiner

Prof.Dr. Dario Neri, co-examiner

Dr. Dmitry Veprintsev, co-examiner

2013

Summary

Microtubule plus-end tracking proteins (+TIPs) are a family of structurally and functionally diverse proteins that localize the growing plus ends of microtubules. They are essential for the dynamicity of microtubules, and as such coordinate and regulate different microtubule associated processes including cell division. End Binding proteins (EBs) are an important class of +TIP proteins. An EB molecule encompasses an N-terminal calponin homology domain that is joined by a flexible linker to a C-terminal dimerization domain. The N-terminal domain binds microtubules and confers microtubule plus-end tracking activity of the EBs. The C-terminal domain mediates dimer formation of EB monomers. It encompasses the unique EB homology domain, which is responsible for binding to +TIPs that encompass a so-called SxIP (Ser-x-Ile-Pro) motif. Dimerization is thus a very crucial event for EBs to regulate and coordinate the +TIP network. In my thesis, I wanted to answer two key questions related to EB: What is the sequence activity relationship of EB1-SxIP, a key +TIP interaction mode? Do functionally relevant EB dimers form in the cytoplasm or at the growing microtubule tips?

In the first part of my thesis, I studied the sequence-activity relationship of wild-type proteins containing the canonical SxIP motif. The goal of this part of the thesis was to carry out a sequence profiling of structurally and functionally diverse +TIP family members. To approach this problem, I generated a small library of 40-50 amino acid residue +TIP fragments harboring the putative SxIP motif. The EB-binding affinities of all proteins were assessed by means of a fluorescence polarization displacement assay. The binding affinities obtained varied from low micromolar to millimolar. The *in vitro* data were then correlated with *in vivo* microtubule tip tracking activity. It was seen that the proteins with higher binding affinities tip tracked better than the ones with lower binding affinities. In addition we also measured proteins with more than one SxIP motif both in our *in vitro* and *in vivo* assays. We observed that multiple SxIP motifs either in a dimerized form or in tandem repetitions increase the affinity for EBs and consequently increase the tip tracking activity in cells.

In the second part of the thesis, I wanted to study the stability of EB dimers. I hypothesized two models for the dimerization event. One model suggests that dimerization occurs already in the cytoplasm and is followed by microtubule plus-end localization. In the second model, I hypothesized that the EB protein is a monomer in the cytoplasm and localizes as a monomer to the growing microtubule plus-end where dimerization is subsequently induced due to the local increase in EB concentration at microtubule tips. In order to investigate which model holds, I performed biochemical and biophysical experiments. Using multi-angle light scattering and analytical ultracentrifugation, I determined the oligomerization states and stabilities of different full length EBs and of their C-terminal domains. The data establish that EBs form very stable dimers and thus track growing microtubule ends in the form of dimers in cells.

Overall, the thesis work provides detailed insights into the mechanistic and structural properties of EBs. It further provides an experimental basis for the development of tool compounds aiming at modulating EB-mediated interactions.

Zusammenfassung

Proteine die an das positive, wachsende Ende der Mikrotubuli binden (+TIPs) zeichnen sich durch eine hohe strukturelle und funktionelle Diversität aus. Gemein ist ihnen jedoch die Lokalisierung am wachsenden, positiven Ende der Mikrotubuli. Als wichtige Faktoren für die Dynamik von Mikrotubuli spielen TIPs eine entscheidende Rolle in der Koordinierung und der Regulierung von Mikrotubuli abhängigen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel der Zellteilung. Eine wichtige Klasse innerhalb der TIPs Proteine stellen die „end binding proteins“ (EBs) dar.

EBs bestehen im Allgemeinen aus einer N-terminalen Calponin-homologen Domäne, die durch einen flexiblen Linker mit einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne verbunden ist. Die N-terminale Domäne ist für die Bindung an Mikrotubuli verantwortlich und verleiht somit den EBs die Fähigkeit an das positive Ende der Mikrotubuli zu binden. Die C-terminale Domäne ist hingegen für die Dimerbildung von EB Monomeren zuständig. Dazu gehört auch die EB homologe Domäne (EBH), welche ein SxIP (Ser-x-Ile-Pro) Motiv beinhaltet und verantwortlich für die Bindung an die +TIPs ist. Die Dimerisierung ist ein sehr wichtiger Prozess der EBs, unter anderem um das +TIP Netzwerk zu regulieren und zu koordinieren. In dieser These möchte ich zwei Fragen bezüglich EBs beantworten: (1) Welche Beziehung besteht zwischen der Sequenz und der Aktivität von EB-SxIP, einem der wichtigsten +TIP Interaktionsmotive und (2) werden die funktionell relevanten EB Dimere im Zytoplasma oder direkt an den wachsenden Mikrotubuli Enden gebildet?

Der erste Teil meiner Arbeit ist fokussiert auf den Zusammenhang zwischen der Sequenz und der Aktivität von Wildtyp Proteinen, die ein SxIP Motiv enthalten. Das Ziel war es eine Sequenzanalyse von strukturell- und funktionell-diversen +TIP Familienmitgliedern aufzustellen. Zu diesem Zweck wurde eine Bibliothek von 40-50 Aminosäure-langen +TIP Fragmenten die ein potentielles SxIP Motiv enthalten generiert. Die Bindungsaffinitäten von EB an diese Proteine wurde in einem Fluoreszenz-basierten Polarisations-Verdrängungs Experiment getestet. Die erhaltenen Bindungsaffinitäten lagen im mikromolaren bis millimolaren Bereich. Die *in vitro* Daten wurden anschliessend mit der Fähigkeit verglichen, *in vivo* Mikrotubuli-Enden zu binden.

Proteine mit einer geringen Bindungsaffinität zeigten eine bessere Fähigkeit gezielt die positiven Enden der Mikrotubuli zu tracken als diejenigen mit hoher Bindungskonstanten. Des Weiteren wurden in beiden Methoden Proteine mit mehr als einem SxIP Motiv analysiert. Diese zeigten, dass mehrere SxIP Motive, als Dimer oder in Reihe, die Affinität für EB Proteine erhöhen und als Konsequenz auch die Mikrotubuli-Enden besser binden können.

Im zweiten Teil des Projekts wurde die Stabilität von EB-Dimeren evaluiert. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Modelle für die Dimerisierung untersucht. Das erste Modell geht von einer Dimerisierung im Zytoplasma mit anschließender Lokalisierung am positiven Mikrotubuli-Ende aus, wohingegen das zweite Modell von einer Bindung der EB Monomeren am positiven Ende der Mikrotubuli ausgeht, welche durch Erhöhung der lokalen Konzentration die Dimerisierung herbeiführt. Zur Validierung der zwei Hypothesen wurden biochemische und biophysikalische Experimente durchgeführt. Anhand von mehrwinkligen Lichtstreuung- und analytischen Ultrazentrifugationsstudien habe ich den Oligomerisierungsstatus und die Stabilität der unterschiedlichen EBs und deren C-terminalen Domänen ermittelt. Hierdurch wurde gezeigt dass EBs sehr stabile Dimere bilden und intrazellulär in ihrer dimeren Form an die wachsenden Mikrotubuli-Enden binden.

Zusammenfassend bietet diese Arbeit einen detaillierten Einblick in die mechanistischen und strukturellen Eigenschaften von +TIPs. Zudem wurde eine experimentelle Basis für die Entwicklung von spezifischen Wirkstoffen zur Modulierung von EB-induzierten Interaktionen geschaffen.