



Doctoral Thesis

Building SUN-KASH complexes at the nuclear envelope

Author(s):

Rothballer, Andrea

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009752490> →

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](#).

Diss. ETH No. 20644

**BUILDING SUN-KASH COMPLEXES
AT THE NUCLEAR ENVELOPE**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

ANDREA ROTHBALLER

Master of Science in Biochemistry, TU Munich
born May 26th, 1983
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Ulrike Kutay, examiner
Prof. Monica Gotta, co-examiner
Prof. Patrick Meraldi, co-examiner

2012

Summary

The nuclear envelope (NE) separates the nucleoplasm from the cytoplasm in eukaryotic cells. It constitutes an integral element of cellular architecture with functions in intracellular organization, gene expression, and signal transduction. Mutations in various genes of NE proteins cause genetic diseases called nuclear envelopopathies or laminopathies.

The NE is a double membrane associated with various protein complexes. The envelope is formed by the inner nuclear membrane (INM) and the outer nuclear membrane (ONM), which are separated by a regularly-spaced lumen. The ONM is continuous with the membrane of endoplasmic reticulum (ER). Nuclear pore complexes (NPCs) are multi-subunit protein complexes located at sites of INM-ONM fusion. They generate aqueous pores and guide the selective exchange of molecules between the nucleoplasm and the cytoplasm. The nuclear lamina is an intermediate filament network, which lines and supports the inner face of the NE in metazoan cells. A set of integral membrane proteins localizes specifically to the INM and mediates contacts to the lamina and to chromatin. Multiple mechanisms of targeting and retention of INM proteins establish the compositional specificity of the INM. The protein composition of the ONM, in contrast, largely overlaps with that of the ER as most transmembrane proteins diffuse freely between the two membrane regions.

Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complexes establish physical connections between the nucleus and the cytoskeleton. LINC complexes are built from SUN domain proteins in the INM and KASH domain proteins in the ONM. The key element of the complex lies in the lumen of the NE, where the conserved SUN and KASH domains interact. Thereby, LINC complexes bridge the entire NE and connect the nuclear lamina and chromatin to the cytoskeleton. LINC complexes are thought to serve as molecular handles for the cytoskeleton on the nucleus. Consistently, they function in force transduction between nucleoplasm and cytoplasm, in nuclear anchorage and migration, as well as in the chromatin positioning in the nuclear interior. The integrity and functionality of LINC complexes is essential for development, differentiation, and reproduction.

The aim of my PhD thesis was to shed light on the formation and the molecular architecture of LINC complexes in the NE. We deciphered the determinants for the targeting of the human SUN domain protein SUN2 to the INM. Moreover, we defined the molecular requirements for the binding between SUN and KASH domains, and revealed the atomic details of their interaction.

Our study revealed that INM targeting of SUN2 relies on the additive contributions of three elements: First, a cNLS in the nucleo/cytoplasmic portion of SUN2, which directly binds to the nuclear import receptor complex Importin- α/β . Second, an arginine-based Golgi retrieval signal, also in the nucleo/cytoplasmic portion, which binds to the vesicle-coating complex COPI.

And third, the SUN domain of SUN2 in the luminal part of the protein. The localization of SUN domain proteins to the INM determines the formation of LINC complexes in the NE. Luminal interactions between SUN and KASH recruit KASH domain proteins to the ONM, and stabilize the localization of both SUN and KASH.

Our biochemical and structural analyses revealed that LINC complexes are hexamers, composed of three protomers of each SUN and KASH. SUN protomers form a lollipop-shaped trimer. A trimeric coiled-coil precedes and organizes a globular assembly of SUN domains, which is essential for KASH binding. The luminal peptides of KASH domain proteins are buried at the interfaces of SUN domains. Binding pockets on SUN domains anchor the C termini of KASH peptides, and KASH lids on SUN cover stretches of KASH peptides further upstream. Extensive hydrogen bonding occurs between the amino acid side chains of the binding pocket and the terminal carboxyl group of the KASH peptide, as well as between the peptide backbones of the KASH lid and the peptide. Moreover, conserved cysteine residues in SUN and KASH domains form intermolecular disulfide bonds. The sum of non-covalent and covalent interactions between SUN and KASH domains glues the hexameric LINC complex together.

The elaborate architecture of LINC complexes immediately raises a set of questions regarding the biogenesis and turnover of the complexes. It further suggests potential regulatory mechanisms, which may control the life-cycle of the complexes, as well as their function. Moreover, the architecture of LINC complexes bears direct implications for biological processes. Structural and functional principles can further be deduced from the comparison of LINC complexes throughout evolution.

Zusammenfassung

Die Kernhülle trennt in eukaryotischen Zellen das Kernplasma vom Zytoplasma. Sie bildet einen zentralen Baustein der zellulären Architektur, organisiert das Innere der Zelle und erfüllt Funktionen in der Genexpression sowie in der Signalweiterleitung. Mutationen in verschiedenen Genen, welche Proteine der Kernhülle kodieren, führen zu Erbkrankheiten, den sogenannten Kernhüllen-Krankheiten oder Laminopathien.

Die Kernhülle ist eine Doppelmembran, die mit zahlreichen Proteinkomplexen assoziiert ist. Die Hülle besteht aus der inneren Kernmembran und der äußeren Kernmembran, welche durch einen gleichmäßig breiten Raum getrennt sind, der als Lumen bezeichnet wird. Die äußere Kernmembran geht in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) über. Zudem sind die innere und die äußere Kernmembran an zahlreichen Stellen verbunden, welche von multimeren Proteinkomplexen, den sogenannten Kernporenkomplexen, besetzt sind. Diese bilden wässrige Poren, durch die der selektive Austausch von Molekülen zwischen dem Kernplasma und dem Zytoplasma erfolgt. Die Kernlamina ist ein Intermediär-Filament-Netzwerk, das die Innenseite der inneren Kernmembran auskleidet und diese mechanisch unterstützt. Eine Reihe von Transmembran-Proteinen sind spezifisch in der inneren Kernmembran lokalisiert und vermitteln Kontakte zur Kernlamina und zum Chromatin. Verschiedene Mechanismen stellen sicher, dass Proteine an die innere Kernmembran gesteuert und dort festgehalten werden. Im Gegensatz dazu können die meisten Transmembran-Proteine frei zwischen der äußeren Kernmembran und der ER-Membran diffundieren. Folglich überlappt die Proteinzusammensetzung dieser beiden Membranbereiche weitestgehend.

LINC (*Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*, engl. für "Verknüpfer von Kernskelett und Zytoskelett")-Komplexe bilden Verbindungen zwischen dem Zellkern und dem Zytoskelett. LINC-Komplexe bestehen aus SUN-Domänen-Proteinen in der inneren Kernmembran und KASH-Domänen-Proteinen in der äußeren Kernmembran. Das Schlüsselement des LINC-Komplexes liegt im Lumen der Kernhülle, wo die evolutionär konservierten SUN- und KASH-Domänen miteinander interagieren. Auf diese Weise überbrücken die Komplexe die gesamte Kernhülle und verbinden die Kernlamina und das Chromatin mit dem Zytoskelett. Man stellt sich vor, dass LINC-Komplexe als molekulare Griffe für das Zytoskelett am Kern dienen. Damit einhergehend erfüllen die Komplexe Funktionen in der Kraftübertragung zwischen zellulären Kompartimenten, in der Verankerung und Bewegung des Zellkerns in der Zelle, sowie in der Positionierung von Chromatin im Kern. Die Integrität und Funktionalität von LINC-Komplexen ist unabdingbar für die Entwicklung, Differenzierung und Fortpflanzung von Organismen.

Das Ziel meiner Doktorarbeit war es, die Ausbildung und die molekulare Architektur von LINC-Komplexen in der Kernhülle zu verstehen. Zunächst haben wir die Mechanismen entschlüsselt, welche das menschliche SUN-Domänen-Protein SUN2 zur inneren Kernmembran steuern. Im weiteren haben wir die molekularen Voraussetzungen für die Bindung zwischen SUN- und KASH-Domänen ermittelt und die atomaren Details ihrer Interaktion enthüllt.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Steuerung von SUN2 zur inneren Kernmembran auf den additiven Beiträgen von drei Elementen beruht: Erstens, einem klassischen Kernlokalisierungssignal im kern- bzw. zytoplasmatischen Teil von SUN2, welches direkt an den Kernimport-Rezeptor-Komplex Importin- α/β bindet. Zweitens, einem Arginin-basierten Golgi-Rückgewinnungs-Signal, welches ebenfalls im kern- bzw. zytoplasmatischen Teil von SUN2 enthalten ist, und an den Vesikel-Hüllkomplex COPI bindet. Und drittens, der SUN-Domäne von SUN2 im lumenalen Teil des Proteins. Die Lokalisation von SUN-Domänen-Proteinen an die innere Kernmembran ist entscheidend für die Ausbildung von LINC-Komplexen in der Kernhülle. Interaktionen zwischen SUN- und KASH-Domänen im Lumen der Kernhülle rekrutieren KASH-Domänen-Proteine an die äußere Kernmembran und stabilisieren die Lokalisation sowohl von SUN als auch von KASH.

Unsere biochemischen und strukturellen Analysen haben gezeigt, dass LINC-Komplexe Hexamere sind, welche aus je drei Untereinheiten von SUN und KASH bestehen. Die SUN-Untereinheiten bilden Lollipop-förmige Trimere. Die SUN-Domänen lagern sich zu einer globulären Anordnung zusammen. Eine trimere Coiled-Coil liegt vor den SUN-Domänen und organisiert deren räumliche Ordnung, was entscheidend für die KASH-Bindung ist. Die lumenalen Peptide der KASH-Domänen-Proteine sind in den Zwischenflächen der SUN-Domänen eingebettet. Bindetaschen in den SUN-Domänen verankern die C-Termini der KASH-Peptide und "KASH-Deckel" in SUN bedecken weiter aufwärts gelegene Abschnitte der Peptide. Zwischen den Aminosäure-Seitenketten der Bindetasche und der terminalen Carboxylgruppe des KASH-Peptides, sowie zwischen den Peptid-Rückgraten des "KASH-Deckels" und des KASH-Peptides, liegen zahlreiche Wasserstoffbrücken vor. Darüber hinaus bilden konservierte Cysteinreste in den SUN- und KASH-Domänen intermolekulare Disulfidbrücken zueinander aus. Die Summe aus nicht-kovalenten und kovalenten Wechselwirkungen kleistert den hexameren LINC-Komplex zusammen.

Die ausgefeilte Architektur der LINC-Komplexe wirft unmittelbar eine Reihe von Fragen bezüglich der Biogenese und des Umsatzes der Komplexe auf. Sie legt weiterhin mögliche Regulationsmechanismen nahe, die den Lebenszyklus und die Funktionen der Komplexe kontrollieren könnten. Darüber hinaus wird die direkte Bedeutung der LINC-Komplex-Architektur für biologische Prozesse deutlich. Strukturelle und funktionelle Wirkungsprinzipien können zudem aus evolutionären Vergleichen zwischen LINC-Komplexen erschlossen werden.