

Doctoral Thesis ETH No. 18422

**Structure-function relationship of microtubule plus-end tracking
proteins (+TIPs)**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
For the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by
Anke Weisbrich
Dipl. Chemist
TU Braunschweig, Germany
born May the 5th, 1981
in Berlin, Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Fritz Winkler, examiner
Prof. Dr. Yves Barral, co-examiner
Dr. Michel Steinmetz, co-examiner

2009

Summary

Microtubules (MTs) are key components of the cytoskeleton that play an important role in defining cell shape, in cell division and motility as well as in intracellular cargo transport. They form highly dynamic, polar cylinders that are composed of α/β -tubulin heterodimers. MTs constantly switch between phases of growth and shrinkage. This behaviour, called dynamic instability, allows MTs to permanently probe the intracellular space which is fundamental for their biological functions. MT dynamics are regulated by stabilizing and destabilizing proteins. A structurally and functionally diverse group of MT-associated proteins can be classified according to their ability to specifically accumulate at the dynamic MT plus-end, thus called plus-end tracking proteins (+TIPs). +TIPs possess a modular domain composition comprising versatile protein binding domains and repetitive sequence stretches which facilitate the formation of a multitude of protein interactions. Thus, MT plus-ends serve as hubs for an intricate +TIP network which is transient and dynamic in nature. +TIPs influence MT dynamics, they attach MTs to cellular structures like the kinetochore or the cell cortex and they are essential to localize other proteins, e. g. motor proteins like dynein, to MT plus-ends. Summarized, +TIPs spatially and temporally organize the MT network within the cell.

However, our understanding of how +TIPs are localized to MT plus-ends and how their activity is regulated *in vivo* is limited. Furthermore, the molecular basis of the protein recognition modes that govern +TIP interactions remains poorly understood. Therefore, this thesis aims to shed light on the structure – function relationships of +TIPs in complex with their interaction partners. As already indicated, +TIPs are composed of multiple domains and sequence motifs that serve as protein interaction modules. Certain types of “modules” occur in different +TIPs and are believed to convey common properties upon those otherwise functionally diverse +TIPs. Consequently, it was of special interest to us to understand how these protein interaction modules operate and interact and what the structural requirements for the underlying mechanisms are. We biophysically characterized +TIP interactions by providing structural and functional data *in vivo* and *in vitro*.

A subset of +TIPs, e. g. CLIP-170 (cytoplasmic linker protein) and p150Glued (subunit of dynactin), employs CAP-Gly (cytoskeleton-associated glycine-rich) domains to associate with MTs, either directly or by hitch-hiking on other +TIPs like EB1 (end-binding protein 1). In the course of this work we illuminated the structural requirements that

determine these interactions. By employing an integrated approach using different biochemical and biophysical techniques combined with mutational studies we were able to establish an evolutionary conserved GKNDG-sequence motif located within most CAP-Gly domains as recognition site for aromatic/ acidic C-terminal tails, termed EEY/F sequence motifs, which are conserved in CLIP-170, EB1 and α -tubulin. Thereby, we provided the molecular basis for the targeting mechanism of CAP-Gly domain containing +TIPs to MTs including the recruitment of the dynein/dynactin motor complex to MT plus-ends as well as for the formation of an auto-inhibited head-to-tail conformation of CLIP-170. Furthermore, our results explain the regulation of CAP-Gly activity in cells via the post-translational detyrosination/ tyrosination cycle of α -tubulin.

A variety of functionally diverse +TIPs, including motor and non-motor as well as trans-membrane proteins, exhibit extended, basic and serine/proline-rich regions with no or little secondary structure which have been reported to enclose EB1 binding sites. During this work we used structural and functional data to establish a serine-X-isoleucine-proline (SxIP) sequence motif enclosed within the basic and serine/proline- rich regions of several +TIPs as MT tip localization signal (MtLS). We performed mutational and immuno co-localization studies, life cell imaging as well as *in vitro* reconstitution of MT tip-tracking in order to demonstrate that the SxIP-motif is essential for EB1-binding and tip-tracking behaviour *in vivo* as well as *in vitro* and that these processes are negatively controlled by phosphorylation.

Last but not least, we strived to elucidate the structural determinants underlying the recruitment and subsequent un-loading of the dynein/dynactin motor to MT tips by CLIP-170, p150Glued and Lis1 (lissencephaly 1 protein) which plays a crucial role for proper chromosome segregation. We succeeded in providing an atomic model of the CLIP-170-p150Glued complex, albeit the crystal composition of a putative CLIP-170-Lis1 complex remained unresolved in the course of this work. However, by performing isothermal calorimetric titrations (ITC) we demonstrated a direct binding in the lower micro-molar range of the CLIP-170 C-terminus to Lis1 *in vitro* allowing speculations regarding the mechanism of the dynein/dynactin recruitment to MT tips via CLIP-170.

In conclusion, our structural data indicate that +TIPs often bind to each other in a bipartite fashion rendering +TIP interactions transient and dynamic in nature albeit being highly target specific. We furthermore show that +TIP interactions and thus their activity in

cells is regulated for instance by phosphorylation as well as by post-translational modifications of tubulin. Moreover, our results corroborate EB1 in its role as master regulator within the +TIP network that mediates the recruitment and the tip-tracking behaviour of other +TIPs.

Thus, this thesis contributes to our current understanding of the molecular recognition modes that govern +TIP interactions by providing structural and functional data that allowed us to define two generally employed binding modes among +TIPs. Consequently, this work sheds light on the organization of +TIP networks and the underlying structure-function relationships.

Zusammenfassung

Mikrotubuli (MTs) sind Teil des Zytoskeletts und übernehmen essentielle Funktionen bei der Mitose, bezüglich der Struktur und Bewegung von Zellen sowie beim intrazellulären Transport von Organellen, Vesikeln oder Proteinen. MTs sind dynamische und polare, röhrenartige Strukturen, aufgebaut aus α/β -Tubulin Heterodimeren. MTs zeichnen sich durch ihre Eigenschaft aus, beständig zwischen Wachstums- und Schrumpfphasen zu wechseln, was allgemein als dynamische Instabilität bezeichnet wird. Dies ermöglicht MT das Zellinnere räumlich und zeitlich zu modellieren. Die dynamische Instabilität von MTs stellt somit eine fundamentale Voraussetzung für deren biologische Funktionen dar und wird reguliert durch Proteine, die stabilisierend oder destabilisierend auf MTs wirken können. Eine strukturell und funktionell vielfältige Gruppe an MT-assoziiierenden Proteinen besitzt die Fähigkeit sich gezielt am dynamische Plus-Ende von MTs zu akkumulieren („tip-tracking“) und werden daher als „plus-end tracking proteins“ (+TIPs) bezeichnet.

+TIPs zeichnen sich aus durch ihren modularen Aufbau aus proteinbindenden Domänen und repetitiven Sequenzbereichen, welche eine Vielzahl an Protein-Protein Interaktionen ermöglichen. Dementsprechend nutzen +TIP MT Plusenden als Ankerpunkt für ein funktionell vielfältiges Protein Netzwerk, welches sich durch seine transiente und dynamische Natur auszeichnet. +TIPs wirken regulierend auf die Dynamik von MTs, verknüpfen MT Plusenden mit zelluläre Strukturen wie dem Kinetochor oder der Zellkortex und sie rekrutieren andere Proteine, z. B. das Motorprotein Dynein, an MT Plusenden. Alles in allem organisieren +TIPs das zelluläre MT Netzwerk zeitlich wie auch räumlich. Allerdings ist bis heute wenig bekannt über den Mechanismus, wie einzelne +TIPs gezielt MT Plusenden

erkennen sowie darüber wie +TIPs reguliert werden *in vivo*. Weiterhin weiss man kaum etwas über die Grundvoraussetzungen für die Erkennung zwischen +TIPs auf molekularer Ebene. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Beziehung zwischen der Struktur und der Funktion von +TIPs in Komplex mit ihren Bindungspartnern zu beleuchten. Wie eingangs erwähnt setzen sich +TIPs modulartig aus verschiedenen Proteindomänen und Sequenzmotiven zusammen, die die Wechselwirkung mit vielerlei Interaktionspartnern ermöglichen. Einige dieser „Proteininteraktionsmodule“ kommen in verschiedenen +TIPs vor und es ist anzunehmen, dass diese jeweils dem gleichen Zweck dienen, obgleich sie in funktionell divergenten +TIPs vorliegen können. Daher galt unser Interesse, zu untersuchen wie diese Proteininteraktionsmodule funktionieren, d.h wie sie interagieren und welche strukturellen Voraussetzungen dafür geschaffen sein müssen. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich +TIP Interaktionen biophysikalisch und funktionell charakterisiert, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*.

Eine Gruppe von +TIPs – wie z. B. CLIP-170 (cytoplasmic linker protein) und p150Glued (Untereinheit von Dynaktin) – benutzen sogenannte CAP-Gly (cytoskeleton-associated glycine-rich) Domänen, um an MTs zu assoziieren, entweder direkt oder aber via ein zweites +TIP wie EB1 (end binding protein 1). Im Verlauf dieser Arbeit gelang es uns, die strukturellen Voraussetzungen für diese Interaktionen zu ermitteln. Anhand von verschiedensten biochemische und biophysikalische Techniken zusammen mit Mutationsstudien konnte im Rahmen dieser Arbeit ein GKNDG-Sequenzmotiv, welches in vielen CAP-Gly Domänen evolutionär konserviert ist, als Erkennungsstelle von C-terminalen, aromatisch/aziden Aminosäuresequenzen etabliert werden, die konserviert sind in den +TIPs CLIP-170, EB1 sowie in α -Tubulin. Unsere Resultate erklären auf molekularer Ebene wie +TIPs, welche CAP-Gly Domänen besitzen (wie CLIP-170 und p150Glued), mit MT assoziieren, warum CLIP-170 als intramolekularer Ring in auto-inhibierte Form vorliegt, auf welche Weise der Dynein/Dynaktin Motor Komplexes an MT Plus-Enden rekrutiert wird sowie auf welche Weise der post-translationalen Detyrosinierungs/Tyrosinierungs Zyklus von α -Tubulin die Aktivität solcher CAP-Gly Domänen besitzender Protein reguliert.

Eine Vielzahl von funktionell divergenten +TIPs, einschliesslich Motor und Transmembranproteinen, weisen ausgedehnte, basische und serin-/prolinreiche Regionen mit wenig oder keiner Sekundärstruktur auf, die wie uns bekannt ist wichtig sind für die Bindung an EB1. Anhand von strukturellen und funktionellen Daten ist es uns gelungen, ein Serin-x-Isoleucin-Prolin (SxIP) Motiv, welches in basische und serin-/prolinreiche Regionen einiger

+TIPs eingebettet ist, als „MT Plusende Lokalisations Signal“ zu etablieren. Anhand von Mutations- und immuno Co-Lokalisationsstudien, Lebendzellbildgebungsverfahren und *in vitro* Rekonstitution von MT tip-tracking konnten wir zeigen, dass SxIP-Motive essentiell sind für die Bindung an EB1 und für MT tip-tracking sowohl *in vivo* als auch *in vitro* und dass diese Prozesse biologisch reguliert werden durch Phosphorylierung.

Weiterhin habe ich mich im Laufe meiner Dissertation der Frage bezüglich der strukturellen Voraussetzungen, welche die Rekrutierung des Dynein/Dynaktin Motors an MT Plus-Enden via CLIP-170, p150Glued und Lis1 (Lissencephaly 1 Protein) bestimmen, gewidmet. Diese Interaktion spielt eine entscheidende Rolle für die korrekte Aufteilung des Chromosomensatzes während der Zellteilung. Es gelang uns, die Kristallstruktur von CLIP-170 in Komplex mit p150Glued zu lösen. Andererseits konnte im Rahmen dieser Arbeit die Kristallzusammensetzung eines vermeintlichen CLIP-170-Lis1 Komplexes nicht geklärt werden. Mittels isothermer, kalorimetrischer Titrations (ITC) haben wir eine Bindungsaffinität zwischen C-terminalen Fragmenten von CLIP-170 und Lis1 im niedrigen, micromolaren Bereich feststellen können, was uns erste Spekulationen bezüglich des Rekrutierungsmechanismus von Dynein/Dynaktin an MT Plusenden via CLIP-170 erlaubte.

Unsere Resultate demonstrieren, dass +TIPs oftmals über zwei Kontaktflächen einander binden, auf Grund dessen +TIP Interaktionen transient und dynamisch auf der einen Seite, aber dennoch targetspezifisch auf der anderen Seite sind. Des Weiteren haben wir gezeigt, dass +TIP Interaktionen und folglich auch ihre zelluläre Aktivität reguliert wird durch Phosphorylierung als auch durch post-translationale Modifikationen von Tubulin. Darüber hinaus untermauern die Ergebnisse dieser Arbeit die Schlüsselrolle von EB1 innerhalb des +TIP Netzwerkes, welches essentiell ist, um andere +TIPs an MT Plusenden zu rekrutieren und somit das MT tip-tracking andere +TIPs erst ermöglicht.

Alles in allem gibt diese Arbeit Aufschluss über die Erkennungsmodi von +TIPs auf molekularer Ebene. Anhand struktureller und funktioneller Daten gelang es, zwei allgemeine Bindungsmodi von +TIPs zu definieren und somit neue Erkenntnisse bezüglich der Beziehung zwischen der Struktur und der Funktion von +TIP Netzwerken und deren zellulärer Organisation und Regulierung zu liefern.