



Vrije Universiteit Brussel

Faculty of Science and Bio-engineering Sciences

Department of Bio-engineering Sciences

Simultaneous peptide and lipid binding controls membrane recruitment of the scaffolding protein syntenin

Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Bio-engineering Sciences

Rodrigo Gallardo

Promoter: Prof. Dr. Dominique Maes
Co-promoter: Prof. Dr. Frederic Rousseau
Prof. Dr. Joost Schymkowitz



March, 2012

SUMMARY

P^{SD-95/Discs-large/ZO-1 (PDZ)} domains are modular protein domains occurring in scaffold molecules essential for processes like cell polarity, neuronal communication and viral pathogenesis. They work as peptide interaction domains and support the formation of functional protein complexes at the membrane. Evidence now emerges that PDZ domains can also bind to lipids like phosphoinositides with important biological implications. Yet the molecular basis of phosphoinositide-PDZ interactions and the relationship between peptide and lipid binding is obscure. Using syntenin PDZ tandem, frizzled 7 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) as a model system, we established by crystallography, calorimetry, microscale thermophoresis and cell biology approaches that the PDZ 2 domain of syntenin can mediate high-affinity simultaneous interactions with peptide and PIP₂, which has direct consequences for plasma membrane targeting of syntenin. This study not only pinpoints a first molecular basis for multiple PDZ-phosphoinositide-peptide interactions but also highlights the role of allosteric regulation between peptide and phosphoinositide binding, which controls PDZ protein localization. This work also indicates that a full understanding of PDZ domain interactions and binding affinities demands studies with tripartite complexes when phosphoinositides are involved.

SAMENVATTING

P^{SD-95/Discs-large/ZO-1 (PDZ)} domeinen zijn modulaire eiwit domeinen die voorkomen in moleculen en die essentieel zijn voor processen zoals celpolariteit, neuronale cel-communicatie en virale pathogenese. Ze fungeren als peptide interactie domeinen en zorgen voor de vorming van functionele eiwit complexen in de nabijheid van de celmembraan. Tevens zijn er studies die aantonen dat PDZ domeinen ook met lipiden zoals fosfoinositiden kunnen binden, wat belangrijke biologische implicaties heeft. Desalniettemin blijft het moleculaire mechanisme van de fosfoinositide-PDZ binding en de relatie tussen peptide en lipide binding onbekend. Gebruik makende van het syntenin PDZ tandem eiwit, frizzled 7 en fosfatidylinositol 4,5-bifosfaat (PIP2) als model, hebben we via kristallografie, thermoforese en celbiologie ontdekt dat het PDZ-2 domein van syntenin een hoge affiniteit heeft voor zowel het peptide als PIP2. Dit heeft directe gevolgen voor het transport van eiwitten naar de plasmamembraan. Onze studie verklaart naast de moleculaire basis van PDZ-fosfoinositide-peptide interactie ook de rol van allosterie regulatie tussen peptide en fosfoinositide binding, dat op zijn beurt PDZ eiwit localisatie aanstuurt. Dit werk toont tevens aan dat een volledige karakterisering van PDZ domein interacties en de bepaling van hun bindingsaffiniteiten vereist dat er met driedelige complexen wordt gewerkt wanneer fosfoinositides hierbij betrokken zijn.