



Doctoral Thesis

Investigating spatial and temporal coordination of cytokinesis with spindle function

Author(s):

Norden, Caren

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005181392> →

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](#).

Doctoral Thesis ETH No.16349

Investigating spatial and temporal coordination of cytokinesis with spindle function

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

For the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Caren Norden

Diplom Biochemikerin
Universität Hannover, Germany

Born 04.01.1977
Walsrode, Germany

Accepted on the recommendation of

Prof Yves Barral, examiner
Prof Matthias Peter, co- examiner
Prof Peter Philippsen, co- examiner

2005

Summary

Cytokinesis is a multistep process by which a cell physically divides into two. In higher eukaryotes it starts with actomyosin ring contraction at the cleavage plane, which is followed by the cleavage of the plasma membrane, a process called abscission. In yeast cells, which contain a cell wall, abscission is followed by septum degradation. In budding yeast the actomyosin ring is not essential. Cells can separate by mere septum formation.

Chromosome segregation and cell division (cytokinesis) have to be tightly coordinated to ensure proper genetic segregation. We know little about how cells ensure that cytokinesis does not take place before all chromosome arms are pulled out of the cleavage plane.

To understand more about cytokinetic events and the underlying machinery we used two approaches. On the one hand we used an actin-overexpression assay. Actin is the key component of the contractile machinery located at the bud neck together with the type II myosin Myo1. As it was reported that actin overexpression is lethal, we wanted to investigate actin dynamics and turnover in overexpressing cells to study the reason for this lethality. Furthermore, initial experiments suggested that actin overexpression induces a new actin structure, an actin ring that is always in tight association with the nucleus. We wanted to investigate if this structure was related to a cytokinetic *in vivo* actin structure and if this association around the nucleus means that there is a spatial regulation between cortical/cytokinetic factors and the nucleus that regulate cytokinetic onset or execution.

We found that already a four-fold overexpression of actin is toxic. Furthermore, we were able to show that actin overexpression interferes differently with distinct aspects of actin function. Overexpression of actin did not affect the establishment of actin polarity, whereas it abrogated its maintenance.

The new ring-like actin structure was genetically distinguishable from the actomyosin contractile ring. Formation of the actin structure upon actin overexpression was dependent on the septin cytoskeleton, the cytokinetic protein Hof1 and the Arp2/3 complex. In contrast to the actomyosin ring, the ring formed upon actin overexpression required neither Myo1 nor formins to assemble. Hof1 might therefore act as a linker between actin and septins. Furthermore, we found that a Hof1-dependent actin belt is formed at the bud neck of anaphase cells in the absence of actin overexpression. The physiological role of this belt might be related to that of the similar structure observed in dividing fission yeast. In this organism a ring nucleating actin

Summary/Zusammenfassung

structure is seen before cytokinetic actin ring formation, which constricts to a ring and depends on the Hof1 homologue *cdc15*.

As mentioned, an interesting feature of the ring was that it is always associated with the nucleus. We found that certain importins and exportins played a role in its formation. This was an indication that spatial communication between the cytokinetic machinery and the nucleus exists. However, a general necessity of the nucleus to pass into the daughter cell before cytokinesis could not be shown.

In a second approach we investigated how spindle components influence cytokinetic onset and progression. Cells with central spindle defects, like cells mutated for *Ase1*, the kinetochore and central spindle component *Ndc10* as well as cells in which the spindle is completely destroyed like in *mad2Δ* cells treated with nocodazole show a defect in cytokinesis although they start a new cycle.

We were able to pin down this cytokinetic defect to a defect in abscission because actomyosin contraction takes place with similar kinetics as in wild type cells, but the plasma membrane fails to separate.

We investigated the signalling pathway that underlies the abscission defects in cells with spindle midzone defects. We could show that abscission defects depend on the aurora kinase *Ipl1* and the anillin-related proteins *Boi1* and *Boi2*. *Boi1* and *Boi2* localize to the site of cleavage in an *Ipl1*-dependent manner, where they act as abscission inhibitors. Also Polo kinase *Cdc5* and Separase *Esp1* play a role in abscission inhibition.

The inactivation of *Boi1/Boi2* leads to a slight increase in chromosome breakage by the cytokinetic machinery and is lethal in cells with spindle elongation defects. At this point we think that the signalling pathway we found monitors spindle elongation and chromosome separation to ensure that cytokinesis is completed only after that the cleavage plane is cleared of chromatin.

Zusammenfassung

In der Zytokinese teilt sich eine Zelle in zwei neue Zellen. Dies geschieht in mehreren Schritten. In höheren Eukaryonten beginnt die Zytokinese mit dem Zusammenziehen des Aktomyosinringes. Nach dieser Kontraktion wird die Plasmamembran abgeschnürt und geteilt. In Hefezellen, die eine Zellwand haben wird nach der Abschnürung noch die Zellwand abgebaut. In der Bäckerhefe *S.cerevisiae* ist der Aktomyosinring nicht essentiell. Hier kann Zellteilung auch ausschliesslich über die Ausbildung eines Septums stattfinden.

Bevor es zur Zytokinese kommt müssen Chromosomaufteilung und der Beginn der Zellteilung eng koordiniert werden, damit das genetische Material korrekt verteilt ist.

Um Zytokinese und die ihr zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen arbeiteten wir an zwei verschiedene Ansätzen. Zum einen benutzten wir eine Versuchsreihe, in der wir Aktin in Hefezellen überexprimierten. Aktin ist eine wichtige Komponente des kontraktiles Apparates am Knospenhals und wirkt zusammen mit Typ II Myosin Myo1. Da bereits bekannt war, dass die Ueberexpression von Aktin lethal ist, wollten wir zunächst die Ursache dieser Lethalitaet sowie Umsatz und Dynamik von Aktin in ueberexprimierenden Zellen untersuchen. Unsere vorläufigen Ergebnisse zeigten, dass sich bei der Ueberexpression von Aktin eine bisher unbekannte ringartige Aktinstruktur bildet, die immer in enger Verbindung mit dem Zellkern steht. Wir wollten daraufhin wissen, ob sich diese Struktur aus einer bereits vorhandenen Aktinstruktur entsteht, die eventuell für die Zytokinese relevant ist. Ausserdem wollten wir herausfinden, ob die enge Verbindung mit dem Zellkern die Interaktion zwischen kortikalen Faktoren bzw. der Zytokinesemaschinerie und dem Zellkern räumlich koordiniert. Eine solche Koordination könnte den Beginn oder den Vollzug der Zytokinese regulieren um sicherzustellen, dass einer der Zellkerne die Tochterzelle erreicht.

Wir stellten fest, dass bereits eine vierfache Ueberexpression von Aktin toxisch auf die Hefezellen wirkt. Ausserdem konnten wir zeigen, dass sich die Aktinüberexpression unterschiedlich auf verschiedene Aspekte von Aktin auswirkt. Die Ueberexpression hatte keinen Effekt auf die Entstehung der Aktinpolarität, beeinflusste allerdings deren Aufrechterhaltung.

Die neue, ringförmige Aktinstruktur, die wir bei Ueberexpression beobachteten, war genetisch vom Aktomyosinring unterscheidbar. Die Formation der bei der Ueberexpression beobachteten Struktur hing vom Vorhandensein von Septinen, dem Zytokinese Portein Hof1, sowie dem

Summary/Zusammenfassung

Arp2/3 Komplex ab. Im Gegensatz zum Aktomyosinring benötigte dieser Aktinring für seine Formation weder Myo1 noch Formine. Aus diesen Ergebnissen schlossen wir, dass Hof1 als Bindeglied zwischen Aktin und Septinen agieren könnte. Desweiteren entdeckten wir in der Abwesenheit von Aktin Ueberexpression einen Hof1-abhängigen Aktinring am Knospenhals in Zellen, die die Anaphase durchliefen.

Ein weiteres interessantes Detail des Aktinringes war, dass er immer in enger Assoziation mit dem Zellkern auftrat. Wir fanden heraus, dass einige Importine und Exportine bei der Entstehung des Rings eine Rolle spielen was auf eine räumliche Koordination zwischen der Zytokinesemaschinerie und dem Zellkern hinweist. Wir konnten allerdings nicht zeigen, dass ein Durchschreiten des Zellkerns durch den Knospenhals für den Start der Zytokinese notwendig ist.

Ein anderer Ansatz, den wir verfolgten war herauszufinden, ob und wie Komponenten der mitotischen Spindel den Beginn und das Voranschreiten der Zytokinese beeinflussen. Zellen, die Defekte im Bereich der mittleren Spindel aufwiesen, wie zum Beispiel Zellen in denen das Zentralspindelprotein Ase1 mutiert war, Zellen, die eine Mutation im Kinetochore- und Spindelprotein Ndc10 haben, wie auch Zellen, in denen die gesamte Spindel mit Nokodazol zerstört ist und denen zusätzlich das Checkpoint Protein Mad2 fehlt, entwickeln einen Zytokinesedefekt obwohl sie einen neuen Zellzyklus starten.

Wir stellten fest, dass es sich bei diesem Zytokinesedefekt um einen Defekt in der finalen Abschnürung der Plasmamembran handelt. Die Kontraktion des Aktomyosinringes findet mit der gleichen Kinetik wie in Wildtypzellen statt, doch die Plasmamembran wird nicht geteilt.

Wir untersuchten als nächstes den Signalweg, der verantwortlich für den Abschnürungsdefekt in Zellen mit Fehlern in der zentralen Spindel ist. Wir konnten zeigen, dass dieser Defekt von der Aurora-Kinase Ipl1 sowie den Anillin verwandten Proteinen Boi1 und Boi2 abhängt. Boi1 und Boi2 werden Ipl1 abhängig an den Knospenhals und damit an die Stelle der Zellteilung geliefert, wo sie als Abschnürungsinhibitoren agieren. Ausserdem spielen noch die Polokinase Cdc5 und die Separase Esp1 eine Rolle in der Inhibition der Plasmamembrantrennung.

Werden Boi1 und Boi2 gleichzeitig inaktiviert, so führt dies zum Bruch von Chromosomen, die sich in der Nähe der Zellteilungsebene aufhalten. Zellen, die weder Boi1 noch Boi2 enthalten können ausserdem nicht mit Zellen gekreuzt werden, die Spindeldefekte aufweisen. Die Tripelmutanten sind nicht lebensfähig. Der jetzige Stand unserer Untersuchungen deutet darauf hin, dass die von uns gefundene Signalkaskade Spindelelongation und Chromosomenaufteilung

Summary/Zusammenfassung

überwacht. Dadurch wird sichergestellt, dass die Zytokinese nur stattfindet, wenn alles genetische Material von der Zellteilungsebene wegbewegt wurde.