



Doctoral Thesis

KIN-18 modulates cortical contractility in the *C. elegans* embryo

Author(s):

Spiga, Fabio Mario

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005981727> →

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.
18654

KIN-18 modulates cortical contractility in the *C. elegans* embryo

A dissertation submitted to ETH ZURICH for the degree of
Doctor of Sciences

presented by **Fabio Mario Spiga**

Laurea in Biotecnologie Vegetali, Università degli studi di Milano

Date of birth: 13.01.1979, citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Yves Barral

Prof. Monica Gotta

Prof. Matthias Peter

Prof. Alex Hajnal

2009

Abstract

Asymmetric cell division is a crucial step in organism development: it allows generation of cellular diversity. In order to achieve asymmetric division cells need to polarize cell fate determinants and to properly orient their mitotic spindle before division.

The *C. elegans* embryo is a powerful and widely used model to study asymmetric cell division. In the embryo the anterior-posterior axis of polarity is determined by the sperm entry site. In the newly fertilized embryo, shortly after meiosis, the cortex is uniformly contractile and the conserved PAR-3/PAR-6/PKC-3 complex (hereafter referred to as the PAR-3 complex) is localised on the entire cortex. Entry of the sperm triggers posterior smoothing and anterior-directed cortical flows. Asymmetric cortical contractions result in the formation of an anterior domain containing the PAR-3 complex, while the posterior-pole cortex, depleted of the PAR-3 complex, is enriched in PAR-2 and PAR-1 proteins. Therefore PAR domains define an anterior and a posterior pole of the embryo in response to cytoskeleton remodelling. Intriguingly, the PAR proteins exert a feedback regulation on cortical contractility.

Despite the central role of cortical contractility and of the PAR-3 complex in cell polarity, little is known on how they regulate each other. The aim of this project is to better understand the regulation of cortical contractions via the PAR-3 complex and thereby how the PAR-3 complex controls cell polarity.

In a Yeast-Two-Hybrid screening we identified several new interactors of PAR-3. Among these we found KIN-18 (KINase). KIN-18 belongs to the Ste20 kinase family. Ste20 kinases have been implicated in actin processes regulated by small G proteins. Interestingly we found that depletion of KIN-18 by RNA interference in wild type worms results in high embryonic lethality, suggesting an important role in embryonic development. Live imaging of embryos depleted of KIN-18 shows that these embryos have a more prolonged cortical contractions, indicating a defect in the regulation of actin-myosin cytoskeleton. *kin-18(RNAi)* embryos show also a delay in cell cycle progression, however the role of the cell cycle delay in the regulation of cortical contractions has to be determined. KIN-18 inhibition of cortical contractility is exerted via RHO-1, and it is inhibited by PAR-3. Intriguingly, KIN-18 localises at the cortex, partially in a PAR-3 dependent manner. RHO-1 activity cycles

Abstract

between GTP active and GDP inactive states, and the switch is regulated by the RhoGEF ECT-2 (Activates) and the RhoGAP RGA-3/4 (inactivates). Depletion of KIN-18 in a ECT-2 constitutively active background further enhances persistence of contractions, suggesting that KIN-18 act in parallel to ECT-2, if not directly to RHO-1.

In conclusion, in many systems cytoskeleton remodelling is at the onset of cell polarization. Conversely, cortical contractility is controlled in a polarized fashion in the *C. elegans* embryo and it depends on the anterior PAR proteins. Here we report a novel link between the conserved cell machineries of polarity and actin-cytoskeleton remodelling via KIN-18. The characterization of this new cytoskeleton-remodelling regulator will improve our understanding of the mechanisms underling the establishment and maintenance of cell polarity, and thereby of asymmetric cell division.

Riassunto

La divisione cellulare asimmetrica è una tappa cruciale nello sviluppo di molti organismi in quanto permette di generare diversità cellulare. Prima di poter effettuare una divisione cellulare asimmetrica la cellula deve polarizzare i fattori che determineranno il destino delle cellule figlie, e orientare propriamente il fuso mitotico.

L'embrione di *C. elegans* è un modello largamente utilizzato per studiare la divisione cellulare asimmetrica. Nell'embrione l'asse anteriore-posteriore è determinato dal sito d'ingresso dello spermatozooto. Nello zigote appena fertilizzato, poco dopo la meiosi, la corteccia cellulare si contrae in maniera uniforme. Il complesso PAR-3/PAR-6/PKC-3 (da qui chiamato complesso PAR-3) è localizzato sull'intera corteccia cellulare. L'ingresso dello spermatozooto induce un rilassamento nel polo posteriore, e di conseguenza un flusso corticale diretto verso l'anteriore. L'asimmetria delle contrazioni corticali si traduce nella formazione di un dominio anteriore che contiene il complesso PAR-3, mentre il polo posteriore, privo del complesso PAR-3, è arricchito delle proteine PAR-2 e PAR-1. Dunque, i domini delle proteine PAR definiscono il polo anteriore e quello posteriore, rispondendo però a un rimaneggiamento dello scheletro cellulare. Inoltre le proteine PAR inducono una regolazione di risposta sulla contrattilità della corteccia cellulare.

Nonostante il ruolo centrale delle contrazioni corticali e del complesso PAR-3 nella polarizzazione cellulare, non è ancora completamente noto come questi si regolino reciprocamente. L'obiettivo di questo progetto è di capire meglio la regolazione delle contrazioni corticali operata da PAR-3, e quindi come il complesso PAR-3 controlla la polarità cellulare.

In uno screening effettuato tramite la tecnica del doppio ibrido di lievito (Y2H) sono stati identificati diversi nuovi interattori di PAR-3. Tra questi è stata trovata la proteina KIN-18. KIN-18 appartiene alla famiglia delle Ste20 chinasi. Le Ste20 chinasi sono state implicate in processi, regolati da piccole proteine-G, che portano ad una riorganizzazione dell'actina. La deplezione di KIN-18 attraverso interferenza ad RNA (RNAi) in vermi controllo produce un'alta letalità della progenie, indicando che KIN-18 ha un ruolo importante nello sviluppo embrionale. Microscopia live di embrioni privi di KIN-18 ha evidenziato contrazioni corticali prolungate, indicando una de-regolazione dello scheletro cellulare di actina e miosina. Gli

embrioni *kin-18(RNAi)* mostrano anche un ritardo nel progresso della divisione cellulare, sebbene il ruolo di questo nella regolazione delle contrazioni corticali dovrà essere determinato. L'inibizione da parte di KIN-18 delle contrazioni corticali è effettuata tramite RHO-1, ed è inibita da PAR-3. KIN-18 è localizzata sulla corteccia parzialmente via PAR-3. RHO-1 passa da uno stato GTP-attivo a uno GDP-inattivo, e il cambiamento è regolato da proteine dette RhoGEF come ECT-2 (attivano) e RhoGAP come RGA-3/4 (inattivano). La deplezione di KIN-18 in un background genetico con ECT-2 costitutivamente attiva incrementa la persistenza delle contrazioni, suggerendo quindi che KIN-18 agisce in parallelo a ECT-2 possibilmente direttamente su RHO-1.

In conclusione, in molti sistemi il rimodellamento del citoscheletro è all'origine della polarizzazione cellulare. Tuttavia, la contrazione corticale è controllata in modo polarizzato negli embrioni di *C. elegans*, e dipende della proteina PAR. Riportiamo qui un nuovo link tra i macchinari evolutivamente conservati della polarizzazione cellulare e del rimodellamento del citoscheletro di actina attraverso KIN-18. La caratterizzazione di questo nuovo regolatore del citoscheletro aumenterà la conoscenza dei meccanismi che sottostanno alla polarizzazione cellulare, e dunque alla divisione cellulare asimmetrica.