



Doctoral Thesis

Mitotic kinases in nuclear pore complex disassembly

Author(s):

Laurell, Eva

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006032284> →

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. 18754

**MITOTIC KINASES IN NUCLEAR PORE COMPLEX
DISASSEMBLY**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

EVA LAURELL

M.Sc. Eng. Biotechnology,
Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden

Born January 7th 1980

Citizen of Eriswil, BE and Sweden

accepted on the recommendation of

Prof. Ulrike Kutay, examiner

Prof. Ruedi Aebersold, co-examiner

Prof. Patrick Meraldi, co-examiner

2009

Summary

Higher eukaryotic cells undergo a so-called open mitosis, during which the nuclear envelope breaks down and the cytoplasm and the nucleoplasm are mixed. Thereby, tubulin can rapidly enter the nucleus enabling microtubule attachments to kinetochores and formation of a mitotic spindle. Nuclear envelope breakdown (NEBD) marks the transition from prophase to prometaphase and comprises a series of events, including nuclear pore complex (NPC) disassembly, nuclear lamina depolymerization and retraction of the NE into the endoplasmic reticulum (ER). Phosphorylation is hypothesized to trigger many of these events, although the direct consequence of phosphorylation of NE components has only been pinned down for a few kinase targets.

NPCs consist of approximately 30 different proteins, so-called nucleoporins (Nups), which are present in multiple copies in each NPC. During NPC disassembly, which is one of the first steps of NEBD, soluble Nups are released into the cytoplasm. In this study, the role of different mitotic kinases in NPC disassembly was analyzed using an *in vitro* NEBD assay. By inhibition and depletion experiments, we observed that the kinases cyclin dependent kinase 1 (Cdk1), protein kinase C (PKC), polo-like kinase 1 (Plk1) and NIMA related kinase 6 and 7 (Nek6/7) are important for NPC disassembly. Further, mass spectrometry (MS)-based phosphomapping showed that Nup98 is extensively phosphorylated during mitosis on multiple sites corresponding to consensus sequences for Cdk1, Plk1 and Nek kinases. Phosphomimetic mutation of these phosphosites in Nup98 prevented incorporation of Nup98 into the NPC during interphase. Mutation of the Nup98 phosphosites to phosphodeficient alanines resulted in Nup98 variants that remained more strongly associated with the NPC at the onset of NEBD compared to the wild type form. Importantly, nuclei bearing the Nup98 phosphodeficient mutant disassembled slower and showed a delayed loss of the NPC permeability barrier, proving that early removal of Nup98 from the NPC at the onset of mitosis through phosphorylation is a key event in NEBD

allowing for passive diffusion of mitotic factors into the nucleus and for further disassembly of the NPC.

Zusammenfassung

Höhere eukaryotische Zellen führen eine sogenannte offene Zellteilung durch, während der die Kernhülle abgebaut wird und sich Zytoplasma und Nucleoplasma vermischen. Dadurch kann Tubulin rasch in den Kern gelangen, was die Bindung von Mikrotubuli an Kinetochore und die Bildung der mitotischen Spindel ermöglicht. Der Abbau der Kernhülle kennzeichnet den Übergang von der Prophase zur Prometaphase und umfasst eine Folge von Ereignissen wie die Disassemblierung des Kernporenkomplexes, die Depolymerisation der Kernlamina und die Retraktion der Kernmembran ins endoplasmatische Retikulum (ER). Es wird angenommen, dass Phosphorylierung viele dieser Ereignisse auslöst, obwohl die direkten Folgen einer Phosphorylierung von Kernhüllenkomponenten nur für wenige Kinase-Substrate gezeigt wurden.

Kernporenkomplexe bestehen aus zirka 30 verschiedenen Proteinen, sogenannten Nucleoporinen, die pro Kernporenkomplex mehrmals vorkommen. Während der Disassemblierung des Kernporenkomplexes, was einer der ersten Schritte des Kernhüllen Abbaus darstellt, werden lösliche Nucleoporine ins Zytoplasma entlassen. Im Rahmen dieser Studie wurde die Rolle verschiedener Kinasen in der Kernporenkomplex-Disassemblierung mittels eines *in vitro* Systems analysiert. In Inhibitions- und Depletions-experimenten haben wir beobachtet, dass die Kinasen Zyklin-abhängige Kinase 1 (Cdk1), Protein Kinase C (PKC), *Polo-like kinase 1* (Plk1) und *NIMA related kinase 6* und *7* (Nek6/7) wichtig für Kernporenkomplex-Disassemblierung sind. Kartierung der Phosphorylierung mittels Massenspektrometrie hat gezeigt, dass Nup98 während der Zellteilung an mehreren Stellen, die Konsensussequenzen für Cdk1, Plk1 und Nek Kinasen entsprechen, extensiv phosphoryliert wird. Die phosphomimetische Mutagenese der phosphorylierten Reste von Nup98 verhinderte die Inkorporation von Nup98 in den Kernporenkomplex während der Interphase. Mutatagenese der phosphorylierten Reste von Nup98 zu Alanin führte zu einer Stabilisierung von Nup98 im Kernporenkomplex zu Beginn des Kernhüllen-Abbaus. Kerne, die die nicht phosphorylierbare Nup98-Mutante

tragen, zeigten eine verlangsamte Disassemblierung und eine verzögerte Aufhebung der Permeabilitätsbarriere. Dies beweist, dass frühzeitige und durch Phosphorylierung stimulierte Entfernung von Nup98 vom Kernporenkomplex zu Beginn der Zellteilung ein entscheidender Schritt der NPC Disassemblierung ist, der die passive Diffusion in den Kern und für die weitere Disassemblierung des Kernporenkomplexes ermöglicht.