



Doctoral Thesis

## **Mechanisms controlling mitotic spindle formation and positioning**

**Author(s):**

Toso, Alberto

**Publication Date:**

2009

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006066582> →

**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 N° 18531

# **Mechanisms controlling mitotic spindle formation and positioning**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

**Alberto Toso**

Date of birth 30.09.1980

**Accepted on the recommendation of :**

Supervisor Professor. **Patrick Meraldi**

Co-referee Professor. **Monica Gotta**

Co-referee Professor. **Ulrike Kutay**

2009

## **Abstract**

Cell division is a process in which a single cell divides into two identical daughter cells. The process of cell division takes place during the M-phase of the cell cycle and can be divided into two parts: mitosis and cytokinesis. Moreover, the mitotic process can be divided into five phases: prophase, prometaphase, metaphase, anaphase and telophase. An essential element required for a functional mitosis is the mitotic spindle.

The mitotic spindle is a microtubule-based structure developed by nature to ensure proper chromosome alignment and segregation in mitosis. During prometaphase the nuclear envelope disassembles and microtubules of the spindle invade the nuclear space. At this stage, kinetochores capture and bind the plus-ends of spindle microtubules, the microtubules organize into a bipolar spindle structure and the chromosomes convene along the metaphase plate. When all the chromosomes are aligned (metaphase), anaphase occurs leading to the separation of sister chromatids and distribution of genomic information between the two daughter cells.

During my PhD, I studied the processes that regulate mitotic spindle formation and positioning in human cells. To study these processes, I used a combination of techniques such as live-cell imaging, immunofluorescence and siRNA-mediated protein depletion.

In the first part of my PhD, I investigated the role of kinetochore proteins in the process of bipolar spindle assembly using different biochemical techniques and time-lapse video microscopy. Until now, Kinetochores were seen as passive elements in bipolar spindle formation. However, my work shows for the first time that kinetochores are actively involved in this process, generating pushing forces that separate centrosomes during prometaphase and thus promoting bipolar spindle formation.

In the second part of my PhD, I studied how the von Hippel-Lindau protein (pVHL) contributes to faithful chromosome segregation and spindle orientation. In interphase, pVHL was previously shown to localize to and stabilize the microtubules forming the primary cilia. My work shows that pVHL also localizes to the mitotic spindle and astral microtubules during mitosis. Depletion of pVHL led to a mis-orientation of the

spindle due to the destabilization of astral microtubules. Furthermore we showed that pVHL depletion led to aneuploidy and genomic instability by reducing the protein levels and kinetochore localization of the spindle checkpoint protein Mad2.

In summary, this thesis describes: a new role for kinetochore proteins in the process of bipolar spindle formation, and a new dual role for pVHL controlling mitotic spindle orientation and checkpoint integrity in mitosis.

## Abstract

La divisione cellulare è un processo nel quale una singola cellula si divide per dare origine a due identiche cellule figlie. Il processo di divisione cellulare ha luogo durante la fase M del ciclo cellulare che può essere divisa in due parti: mitosi e citochinesi. Inoltre, la mitosi può essere divisa in cinque fasi: profase, prometafase, metafase, anafase e telofase. Un elemento essenziale richiesto per una mitosi funzionale è il fuso mitotico.

Il fuso mitotico è una struttura formata da microtubuli ed è stata sviluppata dalla natura per garantire un corretto allineamento e una corretta segregazione dei cromosomi durante la mitosi. Durante la prometafase l'involucro nucleare si disassembla e i microtubuli del fuso invadono lo spazio nucleare. A questo stadio, i chinetocori catturano e legano le estremità positive dei microtubuli del fuso, i microtubuli si organizzano in una struttura bipolare e i cromosomi convergono verso il piatto mitotico. Quando tutti i cromosomi sono allineati (metafase) l'anafase inizia portando alla separazione dei cromatidi fratelli e l'informazione genetica viene distribuita nelle due cellule figlie.

Durante il mio PhD ho studiato la formazione e la morfologia del fuso mitotico in cellule umane. Per studiare questi processi ho usato una combinazione di metodi come la microscopia *in vivo*, l'immunofluorescenza e la deplezione di proteine mediante l'uso di siRNA.

Nella prima parte del mio PhD ho studiato il contributo fornito dai chinetocori nel processo di formazione del fuso mitotico. Precedentemente si pensava che i chinetocori avessero un ruolo passivo in questo processo. Il mio lavoro mostra per la prima volta che i chinetocori sono attivamente coinvolti nel processo di formazione

del fuso mitotico, generando forze che spingono e separano i centrosomi durante la prometafase.

Nella seconda parte della mia tesi ho studiato come la proteina von Hippel-Lindau (pVHL) contribuisce alla segregazione dei cromosomi e all'orientazione del fuso mitotico. È stato mostrato in precedenza che pVHL si localizza, stabilizzandoli, ai microtubuli della cilia primarie in interfase. Il mio lavoro mostra che pVHL si localizza anche sul fuso mitotico e i microtubuli astrali durante la mitosi. La deplezione di pVHL causa una scorretta orientazione del fuso dovuta alla destabilizzazione dei microtubuli astrali. Inoltre abbiamo mostrato che la deplezione di pVHL causa aneuploidia e instabilità genomica dovuta alla riduzione della proteina Mad2 ai chinetocori.

Riassumendo, questa tesi descrive: un nuovo ruolo dei chinetocori nel processo di formazione del fuso; e un nuovo ruolo di pVHL nel controllo dell'orientazione del fuso mitotico e dell'integrità del checkpoint in mitosi.