

Microtubule dynamics in *S. cerevisiae*

Doctoral Thesis

Author(s):

Rauch, Alexander M.

Publication date:

2012

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007587286>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH NO. 20622

Microtubule Dynamics in *S.cerevisiae*

A dissertation submitted to

ETH Zurich

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

Alexander M. Rauch

Diplom-Biotechnologe

Europäische Konföderation der
Obersrheinischen Universitäten (EUCOR)

Born April 5th 1977

Bern, Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Yves Barral, examiner

Prof. Gábor Székely, co-examiner

Prof. Patrick Meraldi, co-examiner

2012

1 Summary

1.1 Overview

Cell division requires precise coordination between the cleavage plane and the position of the nucleus to properly segregate nuclei between the daughter cells. The equatorial plane of the mitotic spindle in animal cells generally specifies the site of division although variations exist (Almonacid and Paoletti, 2010; Kaltschmidt et al., 2000; Knoblich, 2008, 2010; Uyeda et al., 2004). In budding yeast, the division plane is predetermined by cortical cues that control bud site selection (Chant and Pringle, 1995; Freifelder, 1960). Thus, the predefined budding pattern first establishes polarity and subsequently forces the spindle to align accordingly.

Migration of the yeast nucleus to the bud neck is mediated by astral (cytoplasmic) microtubules, which are nucleated by the spindle pole bodies, the yeast equivalents of centrosomes (Jacobs et al., 1988; Kusch et al., 2002; Miller et al., 1999). Nuclear movement strictly depends on an intact microtubule cytoskeleton since disrupting astral microtubules through specific mutations in the β -tubulin subunit completely ablates nuclear migration (Huffaker et al., 1988). The assembly and disassembly of these microtubules together with associated factors produce the forces required for spindle positioning during cell division (Dogterom et al., 2005).

1.2 Analysis of microtubule dynamics

During the process of spindle positioning, astral microtubules undergo substantial rearrangements, which require changes in their dynamic properties. Analysis of astral microtubule dynamics in budding yeast cells has proven challenging and a rigorous assessment has not yet been done. In the first part of my thesis I present an approach to analyze astral microtubule dynamics at a large-scale high precision data level. Using this approach I analyzed microtubule dynamics in wild type and mutant cells, providing an atlas of each parameter and its variations with respect to covariates such as microtubule length, position and spindle movement.

1.3 Microtubule asymmetry

In preanaphase budding yeast cells astral microtubule organization is highly asymmetric with respect to the two spindle poles. The bud-proximal spindle pole stably grows long astral microtubules while microtubules growing from the bud-distal spindle pole are short in lifetime and length. How microtubule dynamics is differentially regulated on the two spindle poles is not known. In the second part of my thesis, I demonstrate that transitions are important determinants of microtubule length and that transitions are differentially regulated on the two sets of astral microtubules. I show that this differential regulation of microtubule dynamics is achieved through Cdk1, which phosphorylates the kinesin-like motor protein Kip2p and thereby modulates its microtubule-stabilizing activity.

1.4 Initiation of transitions *in vivo*

How transitions are established *in vivo* is largely unknown. Data on a few microtubule-associating proteins inducing a specific type of transition *in vitro* does exist. However, high-resolution data of *in vivo* transitions is still lacking. In the third part of my thesis I discuss how Kip2p and Kip3p establish catastrophes and rescues *in vivo*, showing that at the resolution of light-microscopy transitions appear as two distinct classes. I postulate a model in which so-called transient transitions are precursors of a second class of transitions which are classically observed *in vivo* and which I term persistent transitions.

In summary, this work provides for the first time a spatial quantification of astral microtubule dynamics in mitotic budding yeast cells. It further provides a systematic analysis of all dynamics parameters relevant for spindle positioning at an unprecedented high spatial and temporal resolution and sets these parameters in the context of specific covariates such as microtubule length and position. In addition, this thesis provides the first analysis of the two sets of astral microtubules emanating from the proximal and the distal spindle poles, providing a mechanism that involves Kip2p and Cdk1 to establish microtubule asymmetry in preanaphase budding yeast cells. Finally, this work elucidates how the two types of transitions, catastrophes and rescues, are established and how the kinesin-like motor proteins Kip2p and Kip3p define microtubule assembly and disassembly phases.

2 Zusammenfassung

2.1 Übersicht

Während der Zellteilung muss sichergestellt werden, dass jede Tochterzelle einen Zellkern erhält. Hierfür müssen die Teilungsachse und die Position des Kerns in der Zelle exakt miteinander koordiniert werden. In höheren Organismen wird die Teilungsachse durch die Äquatorialebene der Zelle bestimmt (Almonacid and Paoletti, 2010; Kaltschmidt et al., 2000; Knoblich, 2008, 2010; Uyeda et al., 2004). In Bäckerhefe hingegen wird die Teilungsebene durch Faktoren determiniert, die den Knospungspunkt an der Oberfläche der Mutterzelle bestimmen. Die Zellknospung ist die Basis der Zellpolarität in Hefezellen (Chant and Pringle, 1995; Freifelder, 1960). Deshalb richtet sich die mitotische Spindel an der Teilungsachse aus.

Die Kernwanderung zur Teilungsebene benötigt astrale Mikrotubuli, die an den Polkörpern der Spindel (Zentrosomen in höheren Eukaryoten) gebildet werden (Jacobs et al., 1988; Kusch et al., 2002; Miller et al., 1999). Versuche, bei denen die β -tubulin-Untereinheit von Mikrotubuli mutiert wurde, haben gezeigt, dass die Kernwanderung ein intaktes Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt (Huffaker et al., 1988). Der dynamische Auf- und Abbau von Mikrotubuli erzeugt dabei die für die Positionierung des Spindelapparates benötigten Kräfte (Dogterom et al., 2005).

2.2 Analyse der Dynamik von astralen Mikrotubuli

Während der Kernwanderung verändert sich die Organisation der astralen Mikrotubuli laufend. Diese Änderungen basieren auf einer adaptiven Regulierung der Mikrotubuli-Dynamik. Im ersten Teil meiner Doktorarbeit stelle ich ein System vor, mit dessen Hilfe habe ich die Dynamik von astralen Mikrotubuli in Hefezellen mit einer sehr hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung analysiert. Durch die Untersuchung von Wildtyp Hefezellen und solchen, in denen verschiedene regulierende Faktoren deletiert wurden, konnte ich die Abhängigkeit des dynamischen Verhaltens von Mikrotubuli von ihrer Länge und Position in der Zelle nachweisen. Die Abhängigkeit von Bewegungen der Spindel in der Zelle vom dynamischen Verhalten ihrer Mikrotubuli wird ebenfalls diskutiert.

2.3 Asymmetrie des astralen Mikrotubuli-Zytoskeletts

Während der Metaphase ist das astrale Mikrotubuli-Zytoskelett asymmetrisch organisiert, da meist nur der Polkörper Mikrotubuli ausbildet, der näher an der Teilungsachse liegt. Dieser Polkörper generiert stabile, langlebige Mikrotubuli, während am gegenüberliegenden Polkörper höchstens temporär Mikrotubuli beobachtet werden können. Wie diese Asymmetrie zustande kommt und während der gesamten Metaphase aufrechterhalten wird, ist unbekannt. Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit zeige ich, dass die Übergänge zwischen Auf- und Abbau von Mikrotubuli die Stabilität von astralen Mikrotubuli und deren Asymmetrie während der Metaphase bestimmen. Diese Übergänge werden je nach Polkörper unterschiedlich reguliert, was dazu führt, dass Mikrotubuli, die

auf dem distalen Polkörper gebildet werden, weniger stabil sind. Die unterschiedliche Dynamik der Mikrotubuli auf den beiden Polkörpern wird durch die Regulation des Motorproteins Kip2p mittels Phosphorylierung erreicht.

2.4 Übergänge zwischen Auf- und Abbau von Mikrotubuli *in vivo*

Wie die Übergänge zwischen Mikrotubuli Auf- und Abbau *in vivo* initiiert werden ist weitgehend unbekannt. Für bestimmte Mikrotubuli-bindende Faktoren sind *in vitro* Modelle bekannt, eine *in vivo* Verifizierung dieser Modelle fehlt jedoch bis heute. Im letzten Teil meiner Doktorarbeit analysiere ich wie die beiden Proteine Kip2p und Kip3p solche Übergänge *in vivo* initiieren. An der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze können zwei Gruppen von Übergängen unterschieden werden, transiente und persistente Übergänge. Transiente Übergänge bewirken nur kurzfristige Änderungen des dynamischen Zustands von Mikrotubuli, während persistente Übergänge längerfristige Wechsel zwischen Mikrotubuli Auf- und Abbau einleiten. Das von mir vorgeschlagene Modell verbindet diese zwei Gruppen und postuliert, dass transiente Übergänge Vorläufer persistenter Übergänge sind.

Die vorliegende Arbeit ermöglicht zum ersten Mal eine quantitative Analyse der Dynamik von astralen Mikrotubuli in Hefezellen. Die technischen Werkzeuge, die in dieser Arbeit entwickelt wurden, ermöglichen die Analyse verschiedener Dynamik-Parameter mit sehr hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung, welche auch die Identifizierung und Charakterisierung von wenig offensichtlichen

Phänotypen erlaubt. Zudem wurden in dieser Arbeit erstmals Dynamiken der Mikrotubuli an den verschiedenen Polkörpern analysiert und verglichen. Die Analyse zeigt auf, dass vor allem die Übergänge zwischen Auf- und Abbauphasen von Mikrotubuli die Organisation der Metaphasenspindel bestimmen. Dabei sind die Motorproteine Kip2p und Kip3p entscheidend für Regulation der Dynamik von Mikrotubuli.