

Diss. ETH No. 20586

**INVESTIGATING NUCLEAR MIGRATION WITH THE HELP OF  
MICRO-PATTERNED SURFACES**

A dissertation submitted to the

**ETH ZURICH**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

presented by

**Alexa Kiss**

MSc. in Applied Zoology

Szent István University, Faculty of Veterinary Science

Budapest, Hungary

born: 25.12.1983

Citizen of Hungary

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ulrike Kutay, referee

Dr. Gabor Csucs, co-referee

Dr. Stephan Grill, co-referee

2012

## SUMMARY

Nuclear migration is a general term for the movement of the nucleus toward specific sites in the cell and the phenomenon has been described throughout eukaryotes from yeast to mammals. It plays an essential role in fertilization, cell division, differentiation, and embryonic development. Despite of its central importance, the process is still poorly understood in mammalian cells probably because it is often coupled to general cell movement. Experimentally it is very challenging to separate the movement of the nucleus from the overall cell motility under usual cell culture conditions.

The aim of this thesis was to understand the mechanical processes underlying the nuclear movements in mammalian cells. For this, we adapted a micro-patterning based assay and investigated the process of nuclear movements in two cell types: C6 rat glioma cells and U87 human glioma cells. Cells were forced into a bipolar morphology by surface patterning and a large fraction of them presented nuclear oscillations. In our experiments (mostly using live cell imaging), various parameters of these oscillations were quantified. Furthermore, we performed distinct biochemical perturbations in order to investigate the behavior of several cellular components during the movement of the nucleus.

In the first set of experiments, we addressed the contribution of actin and microtubules to the observed nuclear oscillations by cell-permeable cytoskeletal inhibitors. Next, the examinations were extended to cytoskeletal motor proteins like myosin, dynein, and kinesin-1. Finally, we tested the role of the LINC complex (connecting the nucleus and the cytoskeleton) after depletion of various components of the LINC complex (SUN1, SUN2) using siRNA or overexpression of a dominant-negative protein construct (SYNE2). These perturbation studies indicate that both the actin filaments and microtubules play a role in nuclear migration, but the extent of their contribution is cell type-specific. Especially in U87 cells, the actomyosin cytoskeleton seems to play a dominant role. Moreover, we found that while dynein activity is also necessary for nuclear movements, actomyosin contraction is not required, but it is essential for general cell migration. Perturbation of nucleus-cytoskeletal connections by dominant-negative SYNE2 caused nuclear movement defects in both cell lines, suggesting the importance of these mechanical connections. By organelle tracking experiments, we have further investigated the mechanical coupling of the nucleus and the centrosome (the main microtubule organizing structure in mammalian

## Summary

---

cells). Our observations show that the two organelles must be mechanically coupled as their movement is strongly correlated, but this coupling is not rigid since other characteristic parameters of the movement are less correlated. In these experiments, the centrosome was primarily lagging behind the nucleus indicating that the forces responsible for the movement of the nucleus are not applied via the centrosome. Microtubule inhibitors reduced the correlation between nucleus and centrosome movements, whereas actin or myosin drugs had little effect on them. This observation suggests the significance of microtubules in nucleus-centrosome coupling.

Based on our results, we propose a new model for explaining nuclear oscillations observed in C6 rat glioma cells: they are driven by pulling forces generated by cytoplasmic dynein and a periodic asymmetry of microtubule dynamics. This mechanism is very similar to the meiotic nuclear oscillations described in *S. pombe* and might be evolutionary conserved. The situation is somewhat different in U87 cells where the whole cell was oscillating. However, upon myosin II inhibition these cells displayed also nuclear oscillations relative to the stationary cell extensions. Therefore, we suggest that the previously described microtubule-dependent nuclear migration is present also in this cell line, but it is usually masked by the actomyosin-generated contractile forces.

Generally, our results help to understand the mechanisms behind the phenomenon of nuclear migration and in a wider perspective may enrich our knowledge how the larger cellular organelles move and find their space within the cell.

## ZUSAMMENFASSUNG

Intrazelluläre Zellkernbewegung ist ein allgemeiner Begriff für die gerichtete Bewegung des Zellkerns innerhalb der Zelle. Dieses Phänomen wurde für Eukaryonten von Hefe bis zu Säugetieren beschrieben. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Befruchtung, Zellteilung, Differenzierung und der Embryonalentwicklung. Trotz seiner zentralen Bedeutung ist dieser Prozess in Säugetierzellen kaum verstanden, da die intrazelluläre Zellkernbewegung oft an allgemeine Zellbewegungen gekoppelt ist und es daher experimentell sehr schwierig ist, beide Bewegungsarten voneinander zu trennen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die mechanischen Prozesse der intrazellulären Zellkernbewegung in Säugetierzellen zu verstehen. Dazu wurde eine Mikrokontaktdruck-Untersuchung modifiziert und auf zwei verschiedene Zelltypen angewandt. Durch Strukturierung der Zellkulturoberflächen wurden C6 Rattenglioma- und U87 humane Gliomazellen in eine bipolare Morphologie gezwungen, was eine Zellkernoszillation der meisten Zellen zur Folge hatte. In unseren Echtzeit-Mikroskopieexperimenten haben wir verschiedene Parameter dieser Oszillationen quantifiziert. Zusätzlich führten wir verschiedene biochemische Modifikationen durch, um das Verhalten von mehreren zellulären Komponenten während der Zellkernbewegung zu untersuchen.

In der ersten Gruppe von Experimenten haben wir den Einfluss von Aktin und Mikrotubuli auf die intrazelluläre Zellkernbewegung mit Hilfe von zellpermeablen Zytoskelett-Inhibitoren untersucht. Darüberhinaus wurde die Rolle von Zytoskelett-Motorproteinen wie Myosin, Dynein und Kinesin-1 eruiert. Schließlich testeten wir die Rolle des LINC-Komplexes (Komplex zur Kopplung des Zytoskeletts an den Zellkern) nach Depletion verschiedener Komponenten (SUN1, SUN2) mit Hilfe der siRNA-Technologie oder durch die Überexpression eines dominant-negativen Protein-Konstrukts (SYNE2).

Diese Perturbationen zeigten, dass sowohl die Aktinfilamente als auch die Mikrotubuli eine Rolle bei der intrazellulären Zellkernbewegung spielen, allerdings so, dass das Ausmaß ihres Beitrags zelltypspezifisch ist. In U87-Zellen scheint das Aktomyosin Zytoskelett eine dominierende Rolle zu spielen. Darüberhinaus fanden wir, dass die Dynein-Aktivität ebenfalls notwendig für die intrazelluläre Zellkernbewegung ist, wohingegen die Aktomyosinkontraktion nicht erforderlich ist. Letztere ist allerdings unerlässlich für die allgemeine Zellmigration. Perturbationen der Zellkern-Zytoskelett-

Kopplung durch dominant-negatives SYNE2 verursachte intrazelluläre Zellkernbewegungsdefekte in beiden Zelllinien, was auf eine wichtige Bedeutung dieser mechanischen Verbindungen hinweist. Mit Hilfe von "Organelltracking" haben wir auch die mechanische Kopplung des Zellkerns und des Zentrosoms (der wichtigsten Mikrotubuli-organisierende Struktur in Säugerzellen) untersucht. Unsere Beobachtungen zeigten, dass diese beiden Organellen mechanisch gekoppelt sind, da ihre Bewegungen stark korrelierten. Allerdings ist diese Kopplung nicht starr, da andere charakteristische Parameter der Bewegung weniger korreliert sind. In unseren Experimenten folgte das Zentrosom dem Zellkern, was darauf hinweist, dass die Kräfte für die Bewegung des Zellkerns nicht vom Zentrosom herrühren. Mikrotubuli-Inhibitoren verringerten die Korrelation zwischen Zellkern- und Zentrosombewegungen, während Aktin- oder Myosinmodifikationen nur geringe Auswirkungen auf die Korrelation hatten. Diese Beobachtungen legen nahe, dass vor allem Mikrotubuli eine Signifikanz für die Zellkern-Zentrosomenkopplung haben.

Basierend auf unseren Ergebnissen schlagen wir ein neues Modell der intrazellulären Zellkernbewegung in C6 Rattengliomzellen vor: Zugkräfte, ausgehend von zytoplasmatischem Dynein, erzeugen eine periodische Asymmetrie der Dynamik der Mikrotubuli und treiben so die intrazelluläre Zellkernoszillationen an. Dieser Mechanismus ist sehr ähnlich zu der intrazellulären Zellkernoszillation, die während der Meiose in *S. pombe* beschrieben wurde, und daher möglicherweise evolutionär konserviert. Dieser Mechanismus ist etwas anders in U87-Zellen, wo die ganze Zelle auf der Oberflächenstruktur oszilliert. Allerdings wurde in diesen Zellen nach Inhibition von Myosin II ebenfalls intrazelluläre Zellkernoszillationen beobachtet, welche relativ zu den stationären Zellausläufern waren. Dies deutet darauf hin, dass die zuvor beschriebene Mikrotubuli-abhängige intrazelluläre Zellkernoszillation auch in dieser Zelllinie vorhanden ist, jene aber von den Actomyosin-generierten kontraktile Kräfte maskiert wird.

Zusammenfassend dienen die Ergebnisse dem besseren Verständnis des Phänomens der intrazellulären Zellkernbewegung. Darüberhinaus bietet diese Studie eine Grundlage die wissenschaftliche Forschung auf dem Gebiet der intrazellulären Organellorganisation zu bereichern.