



Doctoral Thesis

The role of Nup53 during nuclear envelope breakdown

Author(s):

Marino, Joseph

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009773781> →

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 Nr. 20877

The Role of Nup53 during Nuclear Envelope Breakdown

A dissertation submitted to

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Joseph Marino

Master of Science in Biology, University of Zurich, Switzerland

born 25.07.1980

citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ulrike Kutay, examiner

Prof. Dr. Yves Barral, co-examiner

Dr. Gábor Csúcs, co-examiner

Dr. Urs Ziegler, co-examiner

2012

Summary

The genetic material of eukaryotic cells is enclosed by a lipid bilayer termed nuclear envelope (NE), which is penetrated by large nuclear pore complexes (NPCs) that mediate nucleocytoplasmic transport of macromolecules. NPCs are each composed of about 30 nucleoporins (Nups) that occur in multiples of eight. During mitosis, the NE of higher eukaryotes is dismantled in order to allow chromosome attachment to the mitotic spindle. The process of nuclear disassembly is referred to as nuclear envelope breakdown (NEBD). One of the first steps of NEBD comprises the gradual dissociation of Nups into the cytoplasm leading to an increased nuclear permeability. A growing body of evidence indicates that disruption of Nup-Nup interactions and nuclear disassembly are triggered by phosphorylation of Nups and other NE components.

A variety of mitotic phosphorylation sites has been previously detected in numerous Nups, one of which is Nup53. In the present study, we investigated the role of Nup53 phosphorylation during NEBD. *In vivo* phospho-site mapping by mass spectrometry confirmed that Nup53 is extensively phosphorylated during mitosis, in particular on sites that match the CDK1 minimal consensus motif. *In vitro* kinase assays showed that Nup53 is indeed phosphorylated by CDK1 and to some extent also by PLK1. Moreover, Nup53 containing phosphomimetic mutations in all 16 predicted CDK1 and all 3 potential PLK1 phosphorylation sites (Nup53-16+3E) failed to be efficiently recruited to the NE. In addition, the interaction between the phosphomimetic Nup53-16+3E mutant and its Nup93 subcomplex binding partners were significantly reduced. Conversely, phospho-deficient Nup53-16A containing mutations in all 16 potential CDK1 sites displayed a prolonged NE association compared to wild type Nup53 at the onset of NEBD. As a result, other Nups such as Nup107, a member of the Nup107-160 subcomplex, remained longer associated with the NPC. Furthermore, nuclei harbouring Nup53-16A displayed a delayed loss of NE permeability barrier at mitotic entry, demonstrating that mitotic phosphorylation of Nup53 represents a rate-limiting step in NPC disassembly. However, the retarded release of Nup53-16A from the NE had no influence on the retraction of the nuclear membrane protein Lap2 β into the mitotic endoplasmic reticulum at the onset of mitosis. Finally, further investigations showed that cells expressing Nup53-16A display a faster metaphase-to-anaphase transition, indicating that phosphorylation of Nup53 might have a function in regulating mitotic progression.

Zusammenfassung

Das genetische Material eukaryotischer Zellen ist von einer doppelten Kernmembran umhüllt, welche durch zahlreiche Kernporenkomplexe perforiert ist. Diese Poren steuern den nukleo-zytoplasmatischen Transport von Makromolekülen und bestehen aus ca. 30 sogenannten Nukleoporinen, die in achtfacher Kopienzahl pro Kernporenkomplex vorkommen. Während der Mitose löst sich die Kernhülle höherer Organismen auf, damit der Spindelapparat und die Chromosomen in Kontakt kommen können. Einer der ersten Schritte des Kernhüllenabbaus umfasst die Freisetzung von löslichen Nukleoporinen in das Zytoplasma was zu einer erhöhten Permeabilität der Kernmembran führt. Wissenschaftliche Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die Auflösung der Protein-Protein Interaktion zwischen Nukleoporinen als auch der Zusammenbruch der Kernhülle durch Phosphorylierung von Kernhüllenkomponenten ausgelöst wird.

Eine Vielzahl von mitotischen Phosphorylierungen in Nukleoporinen, wie beispielsweise Nup53, wurden kürzlich nachgewiesen. Im Rahmen dieser Studie haben wir die Rolle von Nup53 während des Kernhüllenabbaus analysiert. Mittels massenspektrometrischer Analyse wurde bestätigt, dass Nup53 während der Mitose extensiv phosphoryliert wird, insbesondere an Stellen, die den Konsensussequenzen für CDK1 entsprechen. Wir konnten zeigen, dass Nup53 tatsächlich von CDK1 und teilweise auch PLK1 *in vitro* phosphoryliert wird. Nup53 mit phosphomimetischen Mutationen in allen 16 potentiellen CDK1 und allen 3 möglichen PLK1 Phosphorylierungsstellen (Nup53-16+3E) wurde nicht mehr in den Kernporenkomplex inkorporiert. Die Interaktion zwischen phosphomimetischen Nup53 Mutanten und Mitgliedern der Nup93 Untereinheit war zudem stark reduziert. Die phospho-defiziente Nup53 Mutante hingegen, mit Mutationen in allen 16 potentiellen CDK1 Phosphorylierungsstellen (Nup53-16A), wies zu Beginn des Kernhüllen-Abbaus im Vergleich zum Wildtyp eine verlängerte Verweildauer an der Kernmembran auf. Dies führte zu einer Stabilisierung anderer Nukleoporine wie Nup107, ein Mitglied der Nup107-160 Untereinheit, im Kernporenkomplex. Zudem blieb die Permeabilitätsbarriere in den Zellen mit der phospho-defizienten Nup53 Mutante länger aufrecht erhalten. Das zeigt, dass die Phosphorylierung von Nup53 zu Beginn der Mitose ein entscheidender Schritt im Abbau der Kernporenkomplexe darstellt. Die verlangsamte Dissoziation von Nup53 hatte jedoch keine Auswirkung auf die Umverteilung von Lap2 β , ein Protein der inneren Kernmembran, in das mitotische Endoplasmatische Retikulum. Dennoch zeigten Zellen, die die phospho-defiziente

Nup53-16A Mutante exprimieren, einen beschleunigten Metaphase-zu-Anaphase Übergang. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von Nup53 eine mögliche Rolle im Ablauf der Mitose spielt.