

DISS. ETH NO. 21211

**The molecular basis of chromosome segregation regulation
by the p97^{Ufd1-Npl4} complex.**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Science

presented by

GRZEGORZ DOBRYNIN

M.Sc. Eng., Technical University of Lodz

born on the 3rd of April 1984

citizen of Poland

accepted at the recommendation of:

Prof. Dr. Ulrike Kutay, examiner

Prof. Dr. Hemmo Meyer, co-examiner

2013

Summary

Cell division is a fundamental process that leads to a faithful propagation of the duplicated DNA into two daughter cells. Before the division can occur, cells have to ensure that the genetic material was properly replicated during S phase and that the DNA is not damaged. Only then, the duplicated DNA material can be equally separated between the daughter cells. The fidelity of chromosome segregation during mitosis depends on proper bioriented attachments of the sister kinetochores to the microtubules emanating from the opposing spindle poles. Many of the processes during cell division are governed by the ubiquitin-proteasome system (UPS). A central component of the UPS is the AAA+ ATPase p97 chaperone which recognizes the ubiquitylated substrate proteins and targets them for proteasomal degradation. During cell division, p97 has been implicated in regulation of many processes, including DNA replication, DNA damage signaling as well as chromosome segregation. This work aimed at elucidating the molecular basis of the role of p97^{Ufd1-Npl4} complex in chromosome segregation in HeLa cells. During our study we discovered two cellular mechanisms by which the p97 ATPase ensures faithful segregation of the DNA material.

In the first and main part of this thesis, we demonstrate that Ufd1-Npl4 complex antagonizes Aurora B on chromosomes already during early stages of mitosis and that this is crucial for proper chromosome segregation. Depletion of the Ufd1-Npl4 heterodimer by siRNA caused chromosome alignment defects, resulting in missegregated chromosomes and multi-lobed nuclei. Ufd1-Npl4 depletion also led to increased levels of Aurora B on prometaphase and metaphase chromosomes. Importantly, this increase in protein levels was also associated with higher Aurora B activity, as evidenced by hyperphosphorylation of the Aurora B substrate CENP-A, as well as by partial restoration of chromosome alignment in Ufd1-depleted cells by low concentrations of Aurora B inhibitor hesperadin. These results establish p97^{Ufd1-Npl4} as a crucial negative regulator of the Aurora B kinase early in mitosis of human somatic cells and indicated that the activity of Aurora B on chromosomes needs to be restrained to ensure faithful chromosome segregation.

In the second part of this study, we present evidence that the p97^{Ufd1-Npl4} complex is involved in G2/M checkpoint regulation. Depletion of p97, Ufd1 or Npl4 led to G2/M

checkpoint abrogation after ionizing-radiation (IR). Moreover, depletion of Ufd1-Npl4 resulted in compromised Cdc25A phosphatase degradation upon IR-induced DNA damage. Importantly, these findings were further supported by the fact that Cdc25A physically interacted with p97 ATPase, as well as its adapter protein Npl4. Taken together, these findings implicate a novel role of p97^{Ufd1-Npl4} in regulating the cell cycle progression by controlling the degradation of one of the main G2/M checkpoint effector protein, Cdc25A.

Zusammenfassung

Die Zellteilung ist ein grundlegender Prozess, welcher zur exakten Verteilung der duplizierten DNA in zwei Tochterzellen führt. Bevor die Zellteilung statt findet, muss die Zelle sicherstellen, dass das genetische Material während der S-Phase fehlerfrei repliziert wurde. Erst dann wird das duplizierte DNA Material gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt. Die Voraussetzung für eine fehlerfreie Chromosomensegregation ist die biorientierte Verbindung der Schwesterkinetochore an die Microtubuli, welche von den entgegengesetzten Spindelpolen ausgehen. Viele Vorgänge während der Zellteilung werden durch das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) reguliert. Ein zentraler Spieler des UPS ist das AAA+ ATPase p97 Chaperon, welches ubiquitinierte Substrate erkennt und für den proteasomalen Abbau überführt. Die ATPase p97 wurde mit der Regulation vieler Prozesse während der Zellteilung in Verbindung gebracht, wie zum Beispiel DNA-Replikation, die Reparatur von DNA Schäden sowie die Chromosomensegregation. Ziel dieser Arbeit ist es die molekularen Mechanismen der Rolle von p97^{Ufd1-Npl4} in der Chromosomensegregation in HeLa Zellen zu untersuchen. Innerhalb dieser Arbeit konnten wir zwei Mechanismen erschließen in welchen p97 die genaue Aufteilung des genetischen Materials gewährleistet. Im Hauptteil dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass der Ufd1-Npl4 Komplex Aurora B an Chromosomen bereits in frühen Phasen der Mitose antagonisiert und dass dies entscheidend für die genaue Chromosomen Segregation ist. Die Depletion des Ufd1-Npl4 Heterodimers durch siRNA führt zu Fehlern in der Ausrichtung von Chromosomen in der Metaphaseplatte, welche fehlgeordnete Chromosomen und Veränderungen im Phenotyp des Zellkerns nach sich ziehen. Des Weiteren treten erhöhte Mengen von Aurora B an Chromosomen in der Prometaphase und Metaphase auf. Entscheidend ist dabei, dass die Erhöhung auf Proteinebene auch mit erhöhter Aktivität von Aurora B assoziiert war. Anzeichen hierfür ist die Hyperphosphorylierung des Aurora B Substrates CENP-A und die teilweise Wiederherstellung der exakten Chromosomenanordnung in Ufd1 depletierten Zellen in Kombination mit dem Aurora B Kinase Inhibitor Hesperadin. Diese Ergebnisse etablieren p97^{Ufd1-Npl4} als einen entscheidenden negativen Regulator von Aurora B in der frühen Mitose in humanen somatischen Zellen. Weiterhin deuten sie darauf hin, dass die Aktivität von Aurora B an

den Chromosomen reguliert werden muss, um eine exakte Chromosomensegregation zu gewährleisten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit zeigen wir Hinweise darauf, dass der $p97^{Ufd1-Npl4}$ Komplex in der Regulation des G2/M Kontrollpunktes involviert ist. Die Depletion von p97, Ufd1 oder Npl4 führt zum Überschreiten des Kontrollpunktes nach ionisierender Bestrahlung (IR). Des Weiteren resultiert die Depletion von Ufd1 und Npl4 in einer beeinträchtigten Degradation der Cdc25A Phosphatase nach IR-induzierten DNA Schäden. Diese Ergebnisse wurden insbesondere durch den Nachweis der direkten Interaktion von Cdc25A mit p97 und dessen Adaptorprotein Npl4 unterstützt. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine bisher unbekannte Funktion von $p97^{Ufd1-Npl4}$ in der Regulation des Zellzyklus hin.