

Spindle orientation control by pVHL and its role in renal cell carcinoma

Doctoral Thesis

Author(s):

Duda, Maria Anna

Publication date:

2013

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010099034>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 21543

**SPINDLE ORIENTATION CONTROL BY pVHL AND
ITS ROLE IN RENAL CELL CARCINOMA**

A dissertation submitted to ETH ZÜRICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

Maria Anna Duda

Master of Biotechnology, Technical University of Lodz, Poland

15.06.1985

citizen of Poland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wilhelm Krek

Prof. Dr. Patrick Meraldi

Prof. Dr. Monica Gotta

2013

4. ABSTRACT

The von Hippel-Lindau (*VHL*) tumour suppressor is the most commonly mutated gene in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). The gene product, von Hippel-Lindau protein (pVHL), has been implicated in the control of multiple cellular processes that when distorted contribute to tumour progression. One of its functions is to control mitotic spindle orientation as demonstrated in HeLa and renal cancer cells. In this study we provide evidence for role of pVHL in suppression of mitotic spindle rotation in a broad range of epithelial systems. We show that loss of pVHL induces spindle misalignment *in vitro* in non-transformed epithelial cells, three-dimensional epithelial cell cultures and *in vivo* in kidney tubules. To further gain an understanding of the possible mechanisms underlying the pVHL-spindle orientation function, we perform a spindle orientation screen and RNA sequencing of pVHL null renal cancer cells transduced with control or pVHL overexpression vector. Based on the results of these studies we can now propose a novel molecular pathway linking pVHL regulation of dynein heavy chain 11 (*DNAH11*) transcription with spindle orientation control.

Spindle orientation has been implicated in the regulation of cell fate and tissue morphogenesis in development and disease. However, until now demonstration of a causal link between spindle orientation and the establishment of tissue architecture remains elusive. Defective spindle orientation promotes cell detachment and migration from the epithelial monolayer into the luminal space. In this study we show that loss of pVHL induces spindle misorientation concomitant with cell polarity defects, consequent of asymmetric localisation of atypical protein kinase zeta (aPKCz). As a consequence pVHL deficient cells acquire an aberrant gross morphology and polarity defects reminiscent of human VHL disease. Co-culture of control and pVHL-depleted cells confirms the specific role of pVHL-inactivation in mediating these phenotypic changes. To further decipher the *in vivo* conservation and significance of pVHL function in control of spindle orientation, we challenged the kidney specific Vhl knockout mice with ischemic injury, an insult which induces cell death followed by proliferation, allowing to study mitotic events in otherwise quiescent adult kidneys. We observed an increase in frequency of spindle misorientation events specifically in Vhl-deficient kidneys. Furthermore, four months post injury Vhl-deficient kidneys displayed a heterogeneous pattern of precancerous lesions including cysts, clear cell-type cells, and dysplasia. We propose that pVHL is a critical determinant of three-dimensional structural morphology through regulation of mitotic spindle misorientation and maintenance of cellular apical-basal polarity.

5. KURZFASSUNG

Die von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressor ist das am häufigsten mutierte Gen in klarzelligen Nierenzellkarzinom. Sein Genprodukt, das von Hippel-Lindau Protein (pVHL), ist an der Steuerung mehrerer zellulärer Prozesse beteiligt. Die Deregulierung jener Prozesse wurde mit der Bildung von Tumoren in Verbindung gebracht. Wie in HeLa- und Nierenkrebszellen gezeigt wurde, ist eine Aufgabe von pVHL, die Orientierung des Spindelapparats zu steuern. In dieser Studie erbringen wir den Nachweis für eine Rolle von pVHL in der Unterdrückung der Rotation des Spindelapparates in einem breiten Spektrum von epithelialen Systemen. Wir zeigen, dass der Verlust von pVHL Spindelmisorientierungen *in vitro* in nicht-transformierten Epithelzellen und dreidimensionalen epithelialen Zellkulturen sowie *in vivo* in Nierentubuli im Mausmodell induziert. Um die möglichen Mechanismen der pVHL-abhängigen Spindel-Orientierung besser zu verstehen, führten wir einen Spindel-Orientierungs-Screen und RNA-Sequenzierung in einer pVHL-negativen Nierenkrebszelllinie, welche mit einem pVHL Überexpressionsvektor oder einer Kontrolle infiziert wurde. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien können wir jetzt einen neuartigen molekularen Signalweg, der pVHL und die Regulierung der Transkription von dynein heavy chain 11 (*DNAH11*) mit der Kontrolle der Spindel-Orientierung verknüpft, vorschlagen.

Die Orientierung des Spindelapparates wurde mit der Beeinflussung des Zell-Schicksal und Gewebemorphogenese in Entwicklungsprozessen und bestimmten Krankheiten in Verbindung gebracht. Allerdings erweist sich ein Nachweis eines ursächlichen Zusammenhangs zwischen Spindel-Orientierung und dem Aufbau der Gewebe-Architektur als schwierig. Defekte in der Spindel-Orientierung fördern die Zellablösung und Migration aus der epithelialen Zellschicht in der luminalen Raum. In dieser Studie zeigen wir, dass der Verlust von pVHL Spindel-Fehlorientierung und zeitgleich die Zellpolarität verändert via einer asymmetrischen Lokalisierung der atypischen Proteinkinase zeta (aPKCz), induziert. In der Folge erwerben pVHL-defiziente Zellen eine anomale Gewebemorphologie und -polarität, welche in ihrer Ausprägung an das Krankheitsbild menschlicher VHL-abhängiger Syndrome erinnert. Co-Kultur-Experimente mit Kontroll- und Zellen mit reduzierter pVHL-Konzentration bestätigen die besondere Rolle der pVHL-Inaktivierung bei der Vermittlung dieser phänotypische Veränderungen. Um die Bedeutung und Konservierung der Funktion von pVHL in der Steuerung der Spindel-Orientierung *in vivo* weiter zu unterstützen, induzierten wir eine

ischämische Verletzung in Nieren von nierenspezifischen Vhl Knockout-Mäusen, was zu Zelltod und Replikation führt, so dass die Untersuchung von mitotischen Ereignissen in ansonsten quieszenten erwachsenen Nieren möglich ist. Wir beobachteten eine Zunahme der Häufigkeit der Spindel-Fehlorientierung speziell in Vhl-defizienten Nieren. Darüberhinaus zeigte sich vier Monate nach der Verletzung in Vhl-defizienten Nieren ein heterogenes Muster von histologischen Krebsvorstufen einschl. Zysten, klarzellige Zellen, und Dysplasie. Wir schlagen daher vor, dass pVHL eine kritische Komponente in der Regulation der dreidimensionalen strukturellen Morphologie durch Regulierung der Spindelorientierung und Erhaltung von zellulären apikalen-basalen Polarität ist.