



Doctoral Thesis

The Mechanism of Mitotic Rounding Role of the Actomyosin Cortex

Author(s):

Ramanathan, Subramanian P.

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010348082> →

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 NO. 22341

**THE MECHANISM OF MITOTIC ROUNDING: ROLE OF THE
ACTOMYOSIN CORTEX**

**A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)**

presented by

SUBRAMANIAN PERINKULAM RAMANATHAN

M.Sc., TU Dresden

born on 12.09.1983

citizen of India

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Daniel J. Mueller

Prof. Dr. Renato Paro

Prof. Dr. Periklis Pantazis

2014

SUMMARY

Actomyosin-dependent mitotic rounding occurs both in cell culture and tissue, where it is involved in cell positioning and epithelial organization. While the importance of F-actin for mitotic rounding is established, due to conflicting data, the role of cortical myosin in mitotic rounding is not well understood. Therefore, in the first part of our work, we investigated how actomyosin dynamics shape mitotic cells against surrounding extracellular confinement (Chapter 2). Using atomic force microscopy to characterize the mechanics of single mitotic cells and confocal microscopy to image the cell cortex, we related the intracellular pressure and cortical tension of a rounded cell with the dynamics of the actomyosin cortex throughout mitosis. We found that at mitotic onset, the assembly of a uniform F-actin cortex coincides with initial rounding. Thereafter, cortical enrichment of F-actin remained stable, while myosin II progressively accumulated at the cortex and directly correlated with increasing intracellular pressure. Next, we used Cdk1 inhibitors to force cells arrested in metaphase to exit mitosis and followed the reversal of what happens to the actomyosin cortex during mitotic entry. Cdk1 inhibition reduced the cortical enrichment of myosin II, but not of F-actin, and also decreased the intracellular pressure and cortical tension of mitotic cells. These experiments reveal the dynamics of how cortical myosin II enrichment throughout mitosis correlates closely with intracellular pressure and cortex tension.

Since the progressive enrichment of cortical myosin II is a salient feature of mitotic rounding, in the second part, we wanted to understand the role of myosin II activity in mitotic cell mechanics (Chapter 3). We found that within 10 minutes of myosin II inhibition, the cortex tension and intracellular pressure reduced five-fold. Although myosin activity is known to influence F-actin dynamics in the leading edge of crawling cells, cleavage furrow as well as neuronal growth cones, we found cortical F-actin localization and turnover to be largely unperturbed by myosin II inhibition during mitosis. Furthermore, time-dependent mechanical response to confinement showed that while F-actin devoid of myosin II activity can provide short-term (<10 s) resistance to deformation, myosin II is required to sustain intracellular pressure for longer duration (>60 s). Thus, during mitosis in confined tissue-like

environments, where cells have to maintain round morphology for over 30 minutes, cortical myosin II plays a critical role in resisting deformation.

Given the importance of Cdk1 activity for enrichment of cortical myosin, in the third part, we sought to understand the mechanistic details of how Cdk1 signaling is transduced to bring about changes to the actomyosin cortex (Chapter 4). As expected, inhibition of Ect2, a Cdk1 substrate, resulted in a reduction in not only cortex tension and intracellular pressure but cortical F-actin and myosin II as well. Next, we tested the role of three most prominent Rho GTPases downstream of Cdk1 — RhoA, Rac1 and Cdc42 — in mitotic rounding and found only RhoA to be crucial for the maintenance of cortical F-actin and myosin II. Interestingly, although Ect2 and RhoA regulated both cortical F-actin and myosin II, the RhoA effector — Rho kinase — was essential only for maintaining cortical myosin II enrichment. For maintaining cortical F-actin, mitotic cells required the formin DIAPH1, but not Arp2/3. Finally, we identify p21-activated kinases as negative regulators of cortical myosin II and propose that Cdk1 controls the progressive accumulation of cortical myosin II by linking the opposed activities of Rho kinase and p21-activated kinases.

Overall, this thesis provides insights into how recruitment of F-actin and myosin II are coordinated at the cortex to generate cortex tension and intracellular pressure to facilitate mitotic rounding in confined tissue-like environments.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vom Aktomyosin-Kortex abhängige Abrundung mitotischer Zellen lässt sich sowohl in kultivierten Zellen als auch im Gewebe beobachten, sie spielt eine Rolle in der Positionierung sich teilender Zellen sowie in der Organisation des Epithels. Während die Relevanz von F-Aktin in diesem Prozess bekannt ist, wird die Rolle von kortikalem Myosin aufgrund widersprechender Daten bis anhin nicht genau verstanden. Daher untersuchten wir im ersten Teil der hier präsentierten Arbeit wie die Dynamik von Aktin und Myosin es mitotischen Zellen erlaubt, sich gegen die sie einengende extrazelluläre Umgebung zu formen und abzurunden (Kapitel 2). Mithilfe der Kraftmikroskopie zur Charakterisierung der Mechanik einzelner mitotischer Zellen sowie gleichzeitiger Konfokalmikroskopie zur Abbildung des Zell-Kortex konnten wir den intrazellulären Druck und die Kortexspannung der sich abrundenden Zellen in Verbindung setzen mit der Dynamik des Aktomyosin-Kortex während der Mitose. Unsere Beobachtungen zeigten, dass die Ansammlung von F-Aktin zu einem Kortex beim Eintritt in die Mitose zeitlich mit dem Start der Zellrundung zusammenfällt. Danach bleibt die erhöhte kortikale Konzentration von F-Aktin stabil, während Myosin II nach und nach am Kortex angereichert wird, in direkter Korrelation zum ansteigenden intrazellulären Druck. Wir benutzten dann die Inhibition von Cdk1 um in der Metaphase festgehaltene Zellen dazu zu bringen, sich wieder aus der Mitose zurückzuziehen und folgten der Umkehrung der Prozesse, welche am Aktomyosin-Kortex beim Eintritt in die Mitose vor sich gehen. Die Inhibition von Cdk1 reduzierte die kortikale Myosin II – Ansammlung, nicht aber jene von F-Aktin; gleichzeitig verringerte sich der intrazelluläre Druck sowie die Kortexspannung der beeinträchtigten mitotischen Zelle. Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass die Dynamik der Ansammlung von Myosin II am Kortex während der Mitose in engem Zusammenhang steht mit dem intrazellulären Druck und der Kortexspannung.

Da die fortlaufende Anreicherung von kortikalem Myosin II eine auffallende Besonderheit der mitotischen Zellrundung ist, wollten wir im zweiten Teil unserer Arbeit die Rolle von Myosin II in der Mechanik mitotischer Zellen besser verstehen (Kapitel 3). Wir konnten beobachten, dass 10 Minuten nach Inhibition von Myosin II

sowohl die Kortexspannung als auch der intrazelluläre Druck auf ein fünftel reduziert wird. Obwohl die Aktivität von Myosin in anderen Prozessen dafür bekannt ist, die Dynamik von F-Aktin zu beeinflussen – so zum Beispiel im Leitsaum von migrierenden Zellen, in der Teilungsfurche sowie in neuronalen Wachstumskegeln – zeigte sich in unseren Experimenten sowohl die Lokalisierung von F-Aktin als auch dessen Umsatz mehrheitlich unbeeinflusst von der Inhibierung von Myosin II. Des Weiteren zeigte die mechanische Reaktion auf räumliche Einengung einzelner mitotischer Zellen, dass F-Aktin ohne aktives Myosin II diesen kurzzeitig (<10 s) Stabilität verleihen kann, dass aber Myosin II notwendig ist, um den intrazellulären Druck über längere Zeit (>60 s) aufrecht zu erhalten. Daraus folgt, dass in gewebeähnlichen räumlich einschränkenden Umgebungen, in welchen mitotische Zellen ihre runde Form während mehr als 30 Minuten aufrecht erhalten müssen, kortikales Myosin II eine entscheidende Rolle spielt bei der Vermeidung von Zelldeformationen.

Angesichts der Bedeutung der Aktivität von Cdk1 bei der Anreicherung von kortikalem Myosin haben wir im letzten Teil der vorliegenden Arbeit versucht, die mechanistischen Details der Cdk1-Signalübertragung und deren Einfluss auf den Aktomyosin-Kortex besser zu verstehen (Kapitel 4). Wie erwartet führte die Inhibition von Ect2, einem Substrat von Cdk1, zu einer Reduktion nicht nur der Kortexspannung und des intrazellulären Drucks, sondern auch der kortikalen Konzentration von F-Aktin und Myosin II. Als Nächstes untersuchten wir den Einfluss der drei wichtigsten von Cdk1 kontrollierten Rho-GTPasen – RhoA, Rac1 und Cdc42 – auf die Abrundung mitotischer Zellen und entdeckten, dass nur RhoA entscheidend zur Aufrechterhaltung von kortikalem F-Aktin und Myosin II beiträgt. Obwohl Ect2 und RhoA sowohl kortikales F-Aktin als auch Myosin II regulieren, war der RhoA-Effektor – Rho-Kinase – interessanterweise nur für die Anreicherung von kortikalem Myosin II essentiell. Für das Aufrechterhalten kortikalen F-Aktins sind die mitotischen Zellen hingegen auf das Formin DIAPH1, nicht aber auf Arp2/3 angewiesen. Schlussendlich identifizierten wir die p21-aktivierten Kinasen als negative Regulatoren von kortikalem Myosin II und schlagen einen Mechanismus vor, nach welchem Cdk1 die fortlaufende Anreicherung von kortikalem Myosin II

durch die Verbindung der gegensätzlichen Aktivitäten von Rho-Kinase und p21-aktivierten Kinasen kontrolliert.

Zusammenfassend erlaubt die vorliegende Dissertation einen Einblick in die Koordination der Anreicherung von F-Aktin und Myosin II am Kortex zum Aufbau von Kortexspannung und intrazellulärem Druck, welche die Abrundung mitotischer Zellen in einer räumlich einschränkenden gewebeähnlichen Umgebung ermöglichen.