ETH zürich

ETH Library

Mitotic exit control in human cells

Doctoral Thesis

Author(s):
Schmitz, Michael Hannes Andreas

Publication date:
2010

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-006079464

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. 18812

MITOTIC EXIT CONTROL IN HUMAN CELLS

a dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Michael Hannes Andreas Schmitz

Dipl. zool., University of Zurich

born 22.05.1979

citizen of Meilen and Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Daniel W. Gerlich

Prof. Dr. Yves Barral

Dr. Silke Hauf

2010

Summary

Mitosis is the process by which dividing cells distribute duplicated chromosomes equally between two daughter cells. This must be precisely regulated to prevent cell death or tumour formation in higher eukaryotes. Mitotic entry depends on the activation of cyclin dependent kinase 1 (Cdk1). In association with its mitotic cyclin co-activators, Cdk1 phosphorylates a wide range of substrates, which leads to a gross re-organization of the cell, including chromosome condensation and mitotic spindle assembly. Mitotic exit requires inactivation of Cdk1 by destruction of cyclin B through the anaphase-promoting complex (APC). Concomitantly, mitotic Cdk1 substrate phosphorylations must be reversed to allow cells to re-establish an interphase state. It is unclear which Cdk1-counteracting phosphatase(s) mediate mitotic exit in vertebrate cells.

In this PhD project, live imaging-based RNAi screening technology was developed to identify mitotic exit regulators in human cells.

In a first pilot screen against a set of about 100 known mitotic regulators, the APC co-activator Cdc20 was identified as factor contributing to mitotic exit at both pre- and post-anaphase stages. Depletion of Cdc20 delayed spindle disassembly, nuclear envelope and Golgi reassembly, as well as decondensation of chromatin, even though cyclin B1 degradation was completed in these cells at anaphase onset. Nevertheless, the post-anaphase delay was suppressed by chemical inhibition of Cdk1. This suggests that another Cdk co-activator must sustain Cdk1 activity at late stages of mitosis in human cells.

Next, a genome-wide set of phosphatases was screened by RNAi. This led to the identification of the trimeric PP2A-B55α complex as an essential factor for timely postmitotic reassembly of the nuclear envelope, the Golgi apparatus, decondensation of chromatin, as well as mitotic spindle breakdown, and G1 progression. In contrast to Cdc20-depleted cells, chemical inhibition of Cdk1 did not suppress the mitotic exit delay, suggesting that PP2A-B55α functions downstream of Cdk1 inactivation. This demonstrates that PP2A-B55α is a key phosphatase for mitotic exit in human cells.

In conclusion, this study sheds new light on mitotic exit control and the regulation of postmitotic reassembly mechanisms. Moreover, it demonstrates the power of automated live imaging-based screening for the identification of transient and dynamic phenotypes.

Zusammenfassung

Die Mitose ist der Prozess bei dem eine sich teilende Zelle ihr dupliziertes Genom gleichmässig auf zwei Tochterzellen verteilt. Dies muss präzise reguliert sein, um Zelltod oder Tumorformation in höheren Eukaryoten zu vermeiden. Die Mitose wird eingeleitet durch die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (Cdk1). Im Zusammenspiel mit seinen Co-Aktivatoren (Cyclinen) phosphoryliert Cdk1 eine Reihe von Substraten. Dies führt zur Reorganisation der Zelle, bei welcher unter anderem die Chromosomen kondensieren und eine mitotische Spindel aufgebaut wird. Um die Mitose zu beenden (Mitotic Exit), muss Cdk1 inaktiviert werden, indem ihr Co-Aktivator Cyclin B durch den Anaphase Promoting Complex (APC) zur Degradation markiert wird. Um nach der Zellteilung wieder in die Interphase eintreten zu können, muss die Zelle die Phosphorylierungen der Cdk1 Substrate rückgängig machen. Es ist unklar, welche Phosphatase(n) den Austritt aus der Mitose in Zellen von Vertebraten vermittelt.

In dieser Dissertation wurden Technologien entwickelt, um Regulatoren für Mitotic Exit zu identifizieren, indem der zeitliche Ablauf der Mitose mittels Videomikroskopie in lebenden Reporterzelllinien verfolgt und Proteine mittels RNAi depletiert wurden.

In einem ersten Pilotscreen, wurden ca. 100 bekannte mitotische Regulatoren für eine Funktion während Mitotic Exit geprüft. Dabei wurde der APC Co-Aktivator Cdc20 als Faktor identifiziert, der vor und nach Anaphase Beginn zu Mitotic Exit beiträgt. Depletion von Cdc20 verzögerte den Abbau der Spindel, den Aufbau einer Kernmembranhülle und des Golgi Apparates, sowie die Chromatin Dekondensierung, obwohl die Cyclin B1 Degradation abgeschlossen war. Diese post-Anaphase Verzögerungen konnten jedoch durch chemische Inaktivierung von Cdk1 unterdrückt werden. Dies deutet darauf hin, dass erhöhte Expression eines anderen Cdk Co-Aktivators die Cdk1-Aktivität während später Mitose Stadien aufrecht erhält.

Als nächstes wurde ein genomweites Set von Phosphatasen mittels RNAi untersucht. Dies führte zur Identifizierung des trimeren PP2A-B55α Komplexes als wichtigen Faktor für den Aufbau der Kernmembranhülle und des Golgi Apparates, der Dekondensation von Chromatin, als auch für den Abbau der mitotischen Spindel und den Ablauf der G1-Phase. Im Gegensatz zu Cdc20-depletierten Zellen, konnte die chemische Inaktivierung von Cdk1 die Mitotic Exit Verzögerungen nicht unterdrücken, was darauf hindeutet, dass PP2A-B55α nach Cdk1 Inaktivierung wirkt. Dies zeigt, dass PP2A-B55α eine zentrale Phosphatase ist für Mitotic Exit in humanen Zellen.

Zusammenfassend zeigt diese Studie neue Aufschlüsse über die Kontrolle von Mitotic Exit und die Regulation von post-mitotischen Aufbauprozessen. Zudem konnte die Leistung der automatisierten Echtzeit-Videomikroskopie demonstriert werden zur Identifizierung von transienten und dynamischen Phänotypen.