

Doctoral Thesis ETH No. 15762

Molecular analysis of the role of septins and septin dynamics during cell cleavage

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

For the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

JEROEN DOBBELAERE

Licenciaat Biochemie
University of Gent, Belgium

Born 10.10.1977
Gent, Belgium

Accepted on the recommendation of

Prof Yves Barral, examiner
Prof Ari Helenius, co- examiner
Prof Matthias Peter, co- examiner

2004

Abstract

Septins are proteins containing a conserved GTPase domain followed by septin specific sequences. In all organisms where septins were identified, they are involved in cytokinesis. They also function in secretion, cell polarization and plasma membrane dynamics. In budding yeast, septins form filaments at the mother-bud neck. These filaments are required for cytokinesis, act in the morphological checkpoint, form a cortical barrier during bud growth to separate mother and bud cortices, and function as a scaffold for the recruitment of different molecules like chitin synthase, actomyosin ring components and bud-site-selection factors.

Using Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) and a septin temperature sensitive (ts) allele (*cdc12-6*) we studied the dynamics of the septin filaments throughout the cell cycle. Filament dynamics went through different phases during one division cycle. At bud emergence septin localization was dynamic. It became stable during S-phase and septin rings stayed frozen until the cells exited mitosis. Concomitantly with septin ring splitting at the end of anaphase, the septin filaments became dynamic for a few minutes and froze again during cytokinesis. This pattern of septin ring dynamics was paralleled by the phosphorylation state of at least one of the septins (Shs1). Dynamic phases were characterized by hypo-phosphorylation of Shs1, whereas stable filaments contained hyper-phosphorylated Shs1. Inactivation of Gin4, a septin-dependent kinase and Cla4, a PAK-kinase, caused an increase in septin dynamics. Deletion of the regulatory sub-unit (Rts1) of the PP2A phosphatase reduced septin dynamics. Cell cycle regulation of septin dynamics is achieved (at least in part) by controlling the sub-cellular localization of both the kinases and the phosphatase. Interestingly, *cdc12-6* could suppress certain *rts1* mutations and *vice-versa* indicating that septins and PP2A regulate each other. Furthermore, deletion of *RTS1* causes defects in abscission (a late step of cytokinesis involving membrane fusion) but not in actomyosin ring contraction.

The observation of the *rts1-Δ* cytokinetic defect led us to investigate the function of the septin ring during cytokinesis. Exit of mitosis triggers the septin ring at the bud neck to split into two distinct rings. This event creates a space where the cytokinetic

machinery can form and contact the plasma membrane. We show that at this cell cycle stage the two septin rings serve as barriers to maintain cortical factors involved in secretion, cell polarization, cell wall construction and abscission to the bud neck. In contrast, actomyosin ring components were not dependent on the septin barriers. Actomyosin ring constriction and disassembly was slowed down in the absence of functional septin rings, probably due to secretion defects. Supporting this idea, impairment of secretion via a ts-mutant (*sec3-4*) also caused delayed actomyosin contraction.

In conclusion, we could show that septins are essential for late steps in cytokinesis. Furthermore, tight regulation of septin dynamics during the cell cycle is needed for spatial coordination of cytokinetic events.

Zusammenfassung

Septine sind konservierte GTPasen. Sie enthalten spezifische Sequenzen, die innerhalb der Septin-Familie konserviert sind. In allen Organismen, in denen Septine identifiziert wurden, spielen diese Proteine während der Zytokinese eine Rolle. In der knospenden Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bilden Septine Filamente am sogenannten Knospenhals, der Stelle, an der eine neue Zelle durch Knospung aus der Mutterzelle entsteht. Diese Filamente sind essentiell, um eine vollständige Zellteilung zu gewährleisten. Ausserdem spielen sie eine Rolle im Morphogenese-Kontrollpunkt. Septine bilden eine kortikale Barriere während des Knospenwachstums, indem sie das Mutterkompartiment vom Tochterkompartiment trennen. Zudem agieren sie als Gerüst für die Rekrutierung von Molekülen wie der Chitin-Synthase, Komponenten des Actomyosin Ringes und für Moleküle, die eine Rolle bei der Wahl der Knospungsstelle spielen.

Unter Benutzung der Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) Technik und einer temperatursensitiven Septin Mutante *cdc12-6* haben wir die Dynamik von Septin Filamenten am Knospenhals während des Zellzyklus studiert. Während des Teilungszyklus durchlief das Filament Phasen unterschiedlicher Dynamik. Bei der frühen Entstehung der Knospe war die Lokalisation der Septine sehr dynamisch. Während der S-Phase wurde diese Lokalisation stabil und Septin Ringe blieben in diesem sogenannten „eingefrorenen“ Zustand bis die Zelle die Mitose abgeschlossen hatte. Gleichzeitig mit der Teilung des Septin Ringes am Ende der Anaphase wurde der Septin Ring wieder dynamisch und ging erst während der Zytokinese wieder in den „gefrorenen“ Zustand über. Dieses Dynamikmuster des Septin Ringes während des Zellzyklus ging einher mit dem Phosphorylierungszustand von mindestens einem der in Hefe vorkommenden Septine: Shs1. Dynamische Phasen waren charakterisiert durch die hypo-Phosphorylierung von Shs1 während stabile Filamente eine hyper-phosphorylierte Form von Shs1 enthielten. Die Inaktivierung der Kinasen Gin4 und Cla4 bewirkte einen Anstieg der Septin Dynamik, während die Entfernung der regulatorischen Untereinheit von PP2A, Rts1, die Dynamik reduzierte. Zellzyklusabhängige Regulation der Septin Dynamik wurde von der Zelle zumindest teilweise dadurch erreicht, dass die Lokalisation innerhalb der Zelle von

diesen Kinasen beziehungsweise der Phosphatase kontrolliert wurde. Interessanterweise konnte die Mutation in *cdc12-6* den Phänotypen von einigen *rts1* Mutationen unterdrücken und umgekehrt. Dieses weist darauf hin, dass Septine und PP2A sich gegenseitig regulieren. Ausserdem sorgt die Entfernung von Rts1 für Defekte in der endgültigen Abtrennung der Tochter von der Mutterzelle. Es gibt allerdings keine Defekte während der Kontraktion des Actomyosinringes.

Die Beobachtung des Zytokinesedefektes von *rts1-Δ* brachte uns auf die Idee, die Funktion der Septine während der Zytokinese zu untersuchen. Das Verlassen der Mitose führte zur Aufspaltung des Septin Ringes in zwei Ringe am Knospenhals. Dieses Ereignis erzeugte ein Abteil, in dem sich die Zytokinese Maschinerie bilden und die Plasmamembran kontaktieren kann. Wir konnten zeigen, dass während dieser Phase des Zellzyklus die beiden Septin Ringe als Barrieren dienen, die Faktoren, die für das Abschneiden der Tochter von der Mutterzelle verantwortlich sind, in diesem Bereich zurückhalten. Des weiteren werden auch Proteine dort immobilisiert, die eine Rolle bei Sekretionsprozessen, der Polarisierung der Zellwand und der Zellwandsynthese spielen. Demgegenüber waren Proteine, die Teil des Actomyosinringes sind, nicht auf die Bildung der Septinbarriere angewiesen.

Es ist jedoch zu bemerken, dass die Ringkonstriktion und der Abbau des Actomyosinringes verlangsamt ist, wenn es keine funktionelle Septin Barriere gibt. Dieses liegt vermutlich daran, dass es zu Sekretionsdefekten kommt, wenn die Barriere nicht vorhanden ist. In Einklang mit dieser Idee konnten wir zeigen, dass eine Beeinträchtigung der Sekretion unter Benutzung der temperatursensitiven Mutante *sec3-4* auch zu langsamerer Actomyosinkontraktion führt.

Zusammenfassend bleibt zu bemerken, dass wir in dieser Arbeit zeigen konnten, dass Septine essentiell sind für späte Ereignisse in der Zytokinese. Ausserdem ist eine strikte Regulation der Dynamik von Septinen während des Zellzyklus unabdingbar für erfolgreiche Zytokinese.