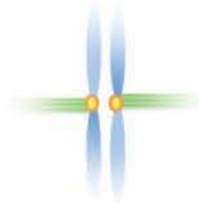


Doctoral Thesis ETH No.18103



Role of CENP-A^{NAC/CAD} network in spindle assembly and spindle checkpoint

Dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZURICH

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
Chilaka Satyarebala

Masters of Science
NAGARJUNA UNIVERSITY, INDIA

Born on 09.12.1978
Rajahmundry, India

Accepted on the recommendation of

Prof. Patrick Meraldi
Prof. Yves Barral
Dr. Jason Swedlow

2008

Abstract

Cell division is a fundamental process where one cell gives rise to two daughter cells. The primary concern of cell division is to maintain the original cell's genome. Before division can occur, the genomic information stored in chromosomes must be replicated, and the duplicated genome separated equally between the daughter cells. The duplicated chromosomes are segregated during mitosis by the microtubules emanating from centrosomes located at the spindle poles. Chromosomes are bipolarly attached and then orientated to form a metaphase plate in the equatorial region of a cell. Only when all the chromosomes are properly attached to microtubules and aligned, anaphase starts and the genomic information is distributed between the two daughter cells. Chromosome-microtubule attachment is mediated by kinetochores, the multiprotein complexes assembled on centromeric DNA (Cleveland et al, 2003).

Kinetochores execute three main functions: (1) they form a structure that is compatible with tight, but dynamic binding to the plus-end of spindle microtubules (MTs). (2) They modulate microtubule dynamics and kinesin-like proteins to generate the forces necessary to power chromosome movement. (3) They generate spindle checkpoint signals that block cells prior to the initiation of anaphase in the presence of unattached or tension-free kinetochores (Musacchio & Hardwick, 2002).

Kinetochores contain over 70 different proteins, but contain a structural core composed of two conserved protein-protein interaction networks: the KMN (KNL1/MIND/NDC80) and the CENP-A^{NAC/CAD} network. The KMN network binds to microtubules directly *in vitro* and is conserved in all eukaryotes (Cheeseman et al, 2006; Meraldi et al, 2006; Wei et al, 2007). In contrast, not much is known about the function of the CENP-A^{NAC/CAD} network. During my thesis I have investigated the function of the CENP-A^{NAC/CAD} network, using a combination of biochemistry and cell biology. I find that CENP-A^{NAC/CAD} is not a single complex but a network of proteins with varied functions. CENP-A^{NAC/CAD} subunits can be assigned to one of the two different functional classes: RNA interference (RNAi) mediated depletion of Class I proteins (Mcm21R^{CENP-O} and Fta1R^{CENP-L}) causes a failure in bipolar spindle assembly. In contrast, depletion of Class II proteins (CENP-H, Chi4R^{CENP-N}, CENP-I and Sim4R^{CENP-K}) prevents the binding of Class I proteins to kinetochores and causes chromosome congression defects, but does not perturb spindle formation. Co-depletion of Class I and Class II proteins restores spindle bipolarity suggesting that Class I proteins regulate or counter-act the function of

Class II proteins. I thus propose that the cooperative action of CENP-A^{NAC/CAD} subunits drives efficient chromosome congression and bipolar spindle assembly during mitosis.

I have also investigated the relationship between CENP-A^{NAC/CAD} and the spindle checkpoint signaling. I find that CENP-A^{NAC/CAD} is required for spindle checkpoint function. Interestingly, the two classes of CENP-A^{NAC/CAD} proteins regulate this process through different mechanisms. The Class I protein Mcm21R^{CENP-O} is required for the stability of the spindle checkpoint protein Mad2, whereas Class II protein CENP-H is required for Mad2 recruitment to kinetochores. Mcm21R^{CENP-O} stabilizes Mad2 during interphase in a kinetochore independent manner and interacts during this time with the Mad2-interactor Mad1, but not Mad2 itself. Strikingly, Mcm21R^{CENP-O} also localizes during interphase to the nuclear pores, where it interacts with the Nup62 complex. Given that Mad1 and Mad2 themselves localize to nuclear pores during interphase, my results suggests a non-kinetochore role of Mcm21R at nuclear pore that is important for Mad2 stability.

Zusammenfassung

Die Zellteilung ist ein grundlegender Vorgang der Biologie, bei dem aus einer Zelle zwei Tochterzellen entstehen. Der wichtigste Aspekt der Zellteilung ist es, den Tochterzellen eine exakte Kopie des Originalgenoms weiterzugeben. Daher muss vor der Zellteilung die genomische Information, die auf den Chromosomen gespeichert ist, dupliziert werden, um danach gleichförmig auf beide Tochterzellen verteilt zu werden. Die duplizierten Chromosomen werden dabei während der Mitose durch Mikrotubuli, die von den beiden Zentrosomen an den Polen der Spindel entspringen, getrennt. Die Chromosomen werden von den Mikrotubuli beidseitig gebunden und in der Mitte der Zelle platziert, wo sie die Metaphase-Platte bilden. Nur wenn sämtliche Chromosomen korrekt an Mikrotubuli gebunden und auf einer Metaphase-Platte aufliert worden sind, kann die Anaphase beginnen, um dabei die genomische Information auf die beiden zukünftigen Tochterzellen zu verteilen. Die Bindung zwischen den Chromosomen und den Mikrotubuli erfolgt durch Kinetochore, Protein-Komplexe, die sich auf der sogenannten zentromeren DNA ansiedeln. Kinetochore haben drei Hauptfunktionen: (1) Sie bilden eine Struktur, die das positive Ende der Mikrotubuli gleichzeitig fest und flexibel binden können. (2) Sie koordinieren die Dynamik der gebundenen Mikrotubuli und erzeugen dabei die Kräfte, die die Chromosomen fortbewegen. (3) Solange Kinetochore nicht von Mikrotubuli gebunden sind oder nicht beiden Seiten durch Mikrotubuli unter Spannung gesetzt werden, senden sie Signale zum Spindel-Checkpoint – ein Kontrollmechanismus, der die Zellen daran hindert, vorzeitig in Anaphase zu gehen.

Kinetochore bestehen aus über 70 verschiedenen Proteinen, besitzen aber in ihrem strukturellen Kern zwei konservierte Protein-Interaktionsnetzwerke: das KMN (KNL1/MIND/NDC80) und das CENP-A^{NAC/CAD} Netzwerk. Das KMN Netzwerk steht in direktem Kontakt zu Mikrotubuli und ist in sämtlichen Eukaryonten konserviert. Im Gegensatz dazu ist über die Funktion des CENP-A^{NAC/CAD} Netzwerkes viel weniger bekannt. Im Laufe meiner Doktorarbeit habe mit Hilfe von biochemischen und zellbiologischen Methoden die Funktion des CENP-A^{NAC/CAD} Netzwerkes untersucht. Ich konnte zeigen, dass CENP-A^{NAC/CAD} nicht einen einheitlicher Komplex, sondern ein Netzwerk von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen darstellt. CENP-A^{NAC/CAD} können in zwei Klassen unterteilt werden: Das Ausschalten mittels RNA-Interferenz von Klasse I Proteinen (Mcm21R^{CENP-O} und Fta1R^{CENP-L}) führt zu einer Missbildung der bipolaren mitotischen Spindel. Das Ausschalten

von Klasse II Proteinen (CENP-H, Chl4R^{CENP-N}, CENP-I und Sim4R^{CENP-K}) hingegen verhindert die Bindung von Klasse I Proteinen an Kinetochore, führt zu einer fehlerhaften Auflinierung von Chromosomen auf der Metaphase-Platte, aber beeinflusst nicht die Bildung der bipolaren Spindel. Das gleichzeitige Ausschalten von Klasse I und Klasse II Proteinen ermöglicht wieder die korrekte Bildung einer bipolaren Spindel, was darauf hindeutet, dass Klasse I Proteine der Wirkung von Klasse II Proteinen entgegenwirken. Aus diesen Resultaten komme ich zum Schluss, dass die kooperative Zusammenarbeit der verschiedenen Untereinheiten des CENP-A^{NAC/CAD} Netzwerkes für die korrekte Bildung einer bipolar Spindel und das korrekte Auflinieren der Chromosomen in einer Metaphase Platte essentiell ist.

Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit habe ich das Verhältnis zwischen dem CENP-A^{NAC/CAD} Netzwerk und dem Spindel-Checkpoint untersucht. Ich konnte zeigen, dass das CENP-A^{NAC/CAD} Netzwerk für das Funktionieren des Spindel-Checkpoint notwendig ist. Interessanterweise beeinflussen verschiedene CENP-A^{NAC/CAD} Proteine den Spindel Checkpoint auf unterschiedliche Art und Weise. Das Klasse I Protein Mcm21R stabilisiert das Spindel Checkpoint Protein Mad2, wohingegen das Klasse II Protein CENP-H für die korrekte Bindung von Mad2 an die Kinetochore benötigt wird. Ferner konnte ich zeigen, dass Mcm21R Mad2 schon während der Interphase (der Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen) und unabhängig von Kinetochoren stabilisiert, und dass es dabei mit Mad1 interagiert, einem weiteren Spindel Checkpoint Protein, welches eng mit Mad2 zusammenwirkt. Mcm21R befindet sich während der Interphase nicht nur an Kinetochore, sondern auch an den Kernporen, wo es mit dem Nup62 Komplex interagiert. Da Mad1 und Mad2 während der Interphase ebenfalls an den Kernporen lokalisiert sind, liegt aufgrund der von mir dargebrachten Ergebnisse die Vermutung nahe, dass das CENP-A^{NAC/CAD} Protein Mcm21R neben seiner Funktion am Kinetochor zusätzlich während der Interphase an den Kernporen zur Stabilisierung von Mad2 beiträgt.