

Abstract

Mitotic spindle orientation is essential for the positioning of daughter cells within tissues during morphogenesis, regenerative homeostasis and repair. In addition, spindle positioning has been linked to cell fate regulation. Although the molecular control of spindle orientation has been relatively well defined in lower organisms, whether similar mechanisms operate in vertebrates is less clear. Previously, the Niessen laboratory showed that mammalian atypical PKCs promote planar spindle orientation and that aPKC λ regulates cell fate in the mouse epidermis. Proteomic analysis revealed a novel aPKC λ phosphosite (S1221) in the coiled-coil domain of NuMA, a major regulator of spindle orientation that together with LGN recruits force generators to the cell cortex. The central aim of this thesis is to address how aPKC λ regulates spindle orientation and specifically ask whether aPKC-dependent NuMA-S1221 phosphorylation controls spindle orientation. To achieve this aim, I established a spindle orientation analysis cell culture system using primary and immortalized mouse keratinocytes isolated from control and aPKC λ epidermal knock-out mice that also expressed GFP-NuMA in basal cells. This analysis showed that loss of aPKC λ also increased spindle angle in cell culture and reduced cortical localization of the spindle orientation machinery proteins NuMA, LGN, and G α i3. Importantly, the phosphomimetic NuMA-S1221D mutant (NuMA-SD) but not the NuMA-SA phosphomutant rescued planar spindle orientation. Interestingly, NuMA-SD not only rescued cortical NuMA, but also LGN localization. Vice versa, LGN knock-down itself also resulted in loss of NuMA from the cortex but did not alter spindle orientation, indicating that localization of NuMA and LGN at the cortex are not required to promote planar spindle orientation. In contrast, knock-down of LGN in aPKC^{AKO} cells prevented the increase in spindle angles, which could now no longer be rescued by co-expression of NuMA-SD. Interestingly, loss of the LGN homolog Ags3 also increased spindle angles similar to aPKC^{AKO} cells, which again was rescued by NuMA-SD. Together, our results show that aPKC and Ags3 control spindle orientation through phosphorylation of the NuMA coiled-coiled domain, and suggest that LGN and NuMA mutually reinforce their cortical localization in mitosis, even though this localization is not essential for spindle orientation. Instead, the results indicate a model in which aPKC λ functions through NuMA-S1221 phosphorylation and Ags3 regulation to inhibit LGN and mediate planar spindles.

Zusammenfassung

Die Ausrichtung der mitotischen Spindel ist für die Positionierung der Tochterzellen im Gewebe während der Morphogenese, der regenerativen Homöostase und der Reparatur von wesentlicher Bedeutung. Darüber hinaus ist die Spindelpositionierung mit der Regulierung des Zellschicksals verknüpft. Obwohl die molekulare Kontrolle der Spindelorientierung bei niederen Organismen gut erforscht ist, ist weitreichend unbekannt, ob ähnliche Mechanismen auch bei Wirbeltieren wirken. Die Arbeitsgruppe Niessen konnte in Säugetieren bereits zeigen, dass atypische PKCs die planare Spindelorientierung fördern und dass α PKC λ das Zellschicksal in der murinen Epidermis reguliert. Eine durchgeführte Proteomanalyse ergab eine neue α PKC λ -Phosphorylierungsstelle (S1221) in der Coiled-Coil-Domäne von NuMA, einem Hauptregulator der Spindelorientierung, der zusammen mit LGN die Kraftgeneratoren im Zellkortex rekrutiert. Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, wie α PKC λ die Spindelorientierung reguliert, und insbesondere zu klären, ob die α PKC-abhängige NuMA-S1221-Phosphorylierung die Spindelorientierung steuert. Hierfür wurde ein Zellkultursystem zur Analyse der Spindelorientierung etabliert. Unter Verwendung von primären und immortalisierten murinen Keratinozyten, die aus Kontroll- und α PKC λ -epidermalen Knock-out-Mäusen isoliert wurden und zugleich GFP-NuMA in Basalzellen exprimieren. Diese Analyse zeigte, dass *in vitro* der Verlust von α PKC λ den Spindelwinkel erhöhte und die kortikale Lokalisierung von NuMA, LGN und Gai3 verringerte. Wichtig ist, dass die phosphomimetische NuMA-S1221D-Mutante (NuMA-SD), nicht jedoch das NuMA-SA-Phosphomutante die planare Spindelorientierung wiederherstellen konnte. Interessanterweise konnte NuMA-SD nicht nur kortikales NuMA wiederherstellen, sondern auch die LGN-Lokalisierung. Umgekehrt führte der Abbau von LGN selbst, auch zum Verlust von NuMA aus dem Kortex, änderte jedoch nicht die Spindelorientierung, was darauf hinweist, dass die Lokalisierung von NuMA und LGN im Kortex für die planare Spindelorientierung nicht essentiell ist. Im Gegensatz dazu verhinderte der Abbau von LGN in α PKC λ KO-Zellen die Zunahme der Spindelwinkel, die durch Koexpression von NuMA-SD nicht mehr wiederhergestellt werden konnten. Interessanterweise erhöhte der Verlust des LGN-Homologen Ags3 ebenfalls die Spindelwinkel ähnlich der α PKC^{AKO}-Zellen, die wiederum durch NuMA-SD wiederhergestellt werden konnten. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass α PKC und Ags3 die Spindelorientierung durch Phosphorylierung der NuMA-Coiled-Coiled-Domäne steuern, und legen nahe, dass LGN und NuMA ihre kortikale Lokalisation bei Mitosen gegenseitig verstärken, obwohl diese Lokalisation für die Spindelorientierung nicht erforderlich ist. Stattdessen deuten die Ergebnisse auf ein Modell hin, bei dem α PKC λ durch NuMA-S1221-Phosphorylierung und Ags3-Regulation LGN hemmt und planare Spindeln vermittelt.