

Diss. ETH No. 20452

**Analysis of Gp135 Segregation into MDCK Daughter Cells  
in Relation to the Older Centrosome and Midbody**

A dissertation submitted to the  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

by  
**Daria Bochenek**

Diploma  
University of Silesia, Poland

born: June, 5th 1984  
citizen of Poland

accepted on recommendation of

Prof. Dr. Ari Helenius, referee  
Dr. Ruth Kroschewski, co-referee  
Prof. Dr. Patrick Meraldi, co-referee  
Prof. Dr. Michel Bornens, co-referee

2012

## Summary

Animals have many distinct types of cells originating from a single cell. The ability of a single cell to divide asymmetrically contributes to this diversity in cell type. Most of the progress in understanding the non-homogenous distribution of proteins and cellular structures within cellular division has come from studies of budding yeast, *Caenorhabditis elegans* embryos, *Drosophila melanogaster* neuroblasts, and mouse neuroepithelial cells. However, the underlying mechanisms and functions of this asymmetry are not completely understood, especially in mammals.

The goal of this work was to identify molecules that segregate unequally during divisions of MDCK cells and to correlate their segregation with the segregation of other proteins and cell division-associated structures. It is remarkable that MEP21, the avian homolog of gp135, is expressed by hematopoietic stem cells but not by most mature blood cells, indicating either unequal segregation of MEP21 into daughter cells during asymmetric divisions or unequal segregation of its transcriptional regulators or its degradation in the differentiating daughter cells. Therefore, this work focused on gp135, a promising candidate to test for unequal protein segregation.

Five types of molecule were analyzed: pp-YFP (plasma membrane marker) and DNA (nuclei stained with Hoechst), which were expected to segregate symmetrically in mitotic cells; and gp135, Numb, and gp114, which were candidates for asymmetric segregation. Numb segregates unequally in asymmetrically dividing *D. melanogaster* neuroblasts and thus was an interesting candidate to test.

An image-based quantitative method was used to identify the unequal segregation of molecules. This method results in a difference index, which depicts the minimal difference in the amount of the molecule type of interest between two daughter cells relative to the total amount of this protein in both cells.

Analysis of fixed MDCK interphase two-cell pairs revealed that of these five markers, gp135 exhibits the highest median difference index, whereas median difference indices for pp-YFP, Numb, gp114 and DNA are similar. Moreover, analysis of 3D cultured interphase two-cell pairs revealed significantly lower median difference index for gp135 and DNA, but similar median for pp-YFP when compared to 2D cultured interphase two-cell pairs. This indicates that the unequal segregation of

gp135 into daughter cells is specific to 2D culture, or that it takes place in the later stages of organogenesis in 3D culture, or that its detection is hampered because of methodological problems.

Analysis of 2D cultured mitotic and interphase two-cell pairs showed that the gp135-enriched cell preferentially inherits the older centrosome. In addition, the interphase cell with the higher level of gp135 most frequently inherits the midbody, suggesting the presence of a cellular mechanism that non-stochastically segregates gp135 during divisions. Co-segregation of the higher level of gp135 and the midbody into the same cell is dependent on ninein downregulation. However, ninein depletion did not alter the frequency of unequal two-cell pairs, suggesting that this mechanism operates independently of ninein downregulation. Upon ninein downregulation gp135 localizes less frequently in the proximity of centrosomes, indicating that centrosomal localization of gp135 is not essential for its unequal segregation into two daughter cells.

Live-cell imaging of cells expressing mRFP-gp135 revealed that in most divisions the protein-enriched cell maintains this unequal amount of mRFP-gp135 until the next mitosis, suggesting that the unequal distribution of mRFP-gp135 persists.

Overall, this work indicates that 2D cultured MDCK cells can divide unequally, segregating gp135 non-randomly into the two daughter cells. This work serves as a foundation for future studies that may mechanistically dissect asymmetric division and provide information on its physiological importance (e.g., the long-term consequences for MDCK tissue culture).

## Zusammenfassung

Tiere bestehen aus vielen verschiedenen Zelltypen, welche alle aus einer einzelnen Zelle hervorgehen. Die Fähigkeit einer einzelnen Zelle, sich asymmetrisch zu teilen, trägt zu dieser Erweiterung der Diversität der Zelltypen bei. Den grössten Fortschritt im Verstehen von nicht-homogener Verteilung von Proteinen und zellulärer Strukturen innerhalb einer Zelle ergeben sich aus Studien mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* Embryonen, Neuroblasten in *Drosophila melanogaster*, und mit Mäuse-Neuroepithelzellen. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen und oft auch die Funktionen der Asymmetrien, vor allem in Säugern, noch nicht vollständig verstanden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Moleküle zu identifizieren, welche asymmetrisch während der Zellteilung von MDCK-Zellen segregieren und deren Segregation mit der Aufteilung von anderen Proteinen und zellteilungsassoziierten Strukturen korreliert. Bemerkenswerterweise ist MEP21, das Vogel-Homolog zu gp135, in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, jedoch nicht in der Mehrheit der vollständig differenzierten Blutzellen. Dies weist darauf hin, dass MEP21 während asymmetrischer Zellteilungen möglicherweise ungleich auf beide Tochterzellen verteilt wird oder dass dieser Unterschied durch die ungleiche Segregation ihrer transkriptionalen Regulatoren beziehungsweise durch Degradation in der differenzierten Tochterzelle hervorgerufen wird. Aus diesem Grund konzentriert sich diese Arbeit auf gp135, das als vielversprechender Kandidat zum Test für die asymmetrische Segregation von Proteinen erscheint. Analysiert wurden fünf Moleküle: pp-YFP (Plasmamembranmarker) und DNA (mit Hoechst gefärbter Zellkern), von denen eine symmetrische Segregation in mitotischen Zellen erwartet wird; und gp135, Numb, und gp114, welche als Kandidaten für asymmetrische Segregation auftreten. Numb segregiert ungleichmässig in sich asymmetrisch teilenden *Drosophila melanogaster* Neuroblasten und war deshalb ein interessanter Testkandidat. Um eine asymmetrische Verteilung von Molekülen während der Zellteilung zu identifizieren, wurde eine bildbasierte quantitative Methode etabliert. Diese Methode ergibt einen Differenz-Index (DI), welcher die minimale Differenz in der Menge eines Moleküls zwischen zwei Tochterzellen relativ zur Gesamtmenge dieses Moleküls in beiden Zellen wiedergibt.

Die Analyse von fixierten interphase MDCK-Zellpaaren liess erkennen, dass unter diesen fünf Markern gp135 den grössten Median des Differenz-Index aufweist während die Medians der Differenz-Indizes für pp-YFP, Numb, gp114 und DNA

ähnliche Werte besitzen. Ausserdem zeigte die Analyse von in 3D kultivierten interphase Zellpaaren einen signifikant niedrigeren Median Differenz-Index für gp135 und DNA im Vergleich zu 2D kultivierten Zellpaaren. In Verbindung mit einem fast unverändertem Median für pp-YFP zwischen 2D und 3D kultivierten Zellen zeigt dies, dass die Segregation von gp135 spezifisch für 2D Zellkultur ist, beziehungsweise, dass sie in späteren Phasen der 3D Organogenese stattfindet, oder dass die Detektion durch methodische Probleme verhindert wird.

Die Analyse von in 2D kultivierten mitotischen und interphasen Zellpaaren zeigte, dass eine Zelle, welche mehr gp135 aufweist, bevorzugt auch das ältere Zentrosom erbt. Ausserdem erbt die Interphase Zelle mit mehr gp135 am häufigsten den Midbody, was das Vorhandensein eines zellulären Mechanismus suggeriert, der gp135 während der Zellteilung auf nicht zufällige Art verteilt. Es wurde ermittelt, dass die Co-Segregation von mehr gp135 mit dem Midbody in eine Zelle abhängig von der Herunterregulation von Ninein ist. Jedoch ändert die Abnahme von Ninein nicht die Häufigkeit von asymmetrischen Zellpaaren für gp135, was einen alternativen Mechanismus für die asymmetrische Aufteilung von gp135 in zwei Tochterzellen anzeigt. Durch die Herunterregulation von Ninein lokalisierte gp135 weniger häufig in der Nähe der Zentrosomen, was darauf hinweist, dass die zentrosomale Lokalisation von gp135 nicht essentiell für dessen Segregation in die beiden Tochterzellen ist.

“Life-cell imaging” von Zellen, welche mRFP-gp135 exprimieren, zeigte, dass in den meisten Zellteilungen die Zelle, welche mehr gp135 geerbt hat, diese relative asymmetrische Menge bis zur nächsten Mitose aufrecht erhält und sich diese Zelle auch als Erste teilt.

Insgesamt liefert diese Arbeit Indizien, dass sich MDCK-Zellen asymmetrisch teilen und dabei auf nicht zufällige Art gp135 auf die zwei Tochterzellen verteilt wird. Diese Arbeit dient als Grundlage für zukünftige Studien, die die asymmetrische Zellteilung mechanistisch analysieren und Hinweise auf die physiologische Bedeutung erbringen werden, zum Beispiel die Langzeitfolgen in MDCK-Zellkulturen betreffend.