

ABSTRACT

Centrosomes are the major microtubule organizing centers of animal cells and are composed of a pair of centrioles and a surrounding pericentriolar material of proteins. Centrioles duplicate once per cell cycle using a defined set of proteins, including SAS-4. During interphase, the centrioles provide an essential template for cilia. Whereas during mitosis, centrosomes are important, but not absolutely essential, for cell division. We have previously generated and analyzed *Sas-4* null mouse embryos which died at mid-gestation (E9.5) with widespread p53-dependent cell death. In addition, a short nocodazole treatment led to p53 upregulation in cultured wild-type embryos. Recent published literature in human cell lines established the existence of a novel p53-dependent mitotic surveillance pathway that is activated through 53BP1 and USP28 upon centriole loss or prolonged mitosis. How and when the mitotic surveillance pathway is activated are still open questions.

In this doctoral thesis, I characterized the mitotic surveillance pathway *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, my data showed that p53 upregulation was initiated around E7.0 in *Sas-4*^{-/-} embryos. I also showed that, consistent with findings in cultured cells, *53bp1* or *Usp28* mutations were able to rescue the p53 upregulation and the associated phenotypes in *Sas-4*^{-/-} embryos. The data confirmed the establishment of the mitotic surveillance pathway *in vivo* around gastrulation and associated with centriole maturation, more efficient mitosis, and cilia formation.

In vitro, I derived primary mouse embryonic stem cells (mESCs) from wild-type and *Sas-4*^{-/-} blastocysts. Surprisingly, *Sas-4*^{-/-} mESCs were successfully derived and propagated in pluripotent conditions in culture. However, they were growth-retarded and had higher levels of p53, especially upon partial differentiation. The growth kinetics in *Sas-4*^{-/-} mESCs were p53-dependent and correlated with mitotic duration. Overall,

the data showed that mESCs were a surrogate system to the mouse embryo to study the molecular mechanisms of the mitotic surveillance pathway in acentriolar cells.

In addition, my data showed that the mitotic surveillance pathway can be induced in the E14 mESC cell line using a pharmacological treatment to prolong mitosis. In this respect, a low dose and short treatment with nocodazole followed by chase was sufficient to significantly increase p53, which was also dependent on 53BP1 and USP28. *Interestingly, the nocodazole treatment that arrested the cells in prometaphase resulted in focal accumulations of p53 that colocalized with 53BP1 and USP28, and their formation was dependent on 53BP1. The identity of the mitotic p53 foci is still unknown, but they may be important in sensing prolonged mitosis and subsequently upregulating p53.*

Finally, in order to identify new molecular players in the mitotic surveillance pathway using unbiased approaches, I performed immunoprecipitation and whole proteomic analyses in E14 mESCs, which yielded interesting candidates for further investigation. Collectively, my data expand our understanding and provide the foundation for future research on the molecular mechanism of the novel mitotic surveillance pathway in mouse embryos and mESCs.

ZUSAMMENFASSUNG

Centrosomen sind die Hauptorganisationszentren von Mikrotubuli in Tierzellen. Sie bestehen aus einem Paar Centriolen und sind von perizentriolärem Material umgeben. Centriolen verdoppeln sich einmal im Zellzyklus mithilfe bestimmter Proteine, z.B. SAS-4. Während der Interphase dienen Centriolen als essenzielle Vorlagen für die Cilienbildung. Im Gegensatz dazu sind Centrosomen während der Mitose wichtig, aber nicht essenziell für die Zellteilung. Zuvor hatten wir Mausembryos mit einer *Sas-4*-Nullmutation erzeugt, welche in der Schwangerschaftsmitte (E9.5) aufgrund von großflächigem p53-abhängigen Zelltod starben. Darüber hinaus führte eine kurze Behandlung mit Nocodazol zu einer Hochregulierung von p53 in kultivierten Wildtyp-Embryonen. Kürzlich veröffentlichte Studien in humanen Zelllinien legten erstmals einen bislang unbekanntem p53-abhängigen mitotischen Überwachungssignalweg offen, welcher infolge des Verlusts der Centriolen oder verlängerter Mitose, durch 53BP1 und USP28 aktiviert wird. Zeitpunkt und Mechanismus der Aktivierung dieses Kontrollpunktes sind bislang nicht bekannt.

In dieser Doktorarbeit habe ich den mitotischen Überwachungssignalweg *in vivo* und *in vitro* charakterisiert. Meine *in vivo*-Studien zeigen, dass die Hochregulierung von p53 in *Sas-4*^{-/-}-Embryonen ungefähr am Embryonaltag 7.0 erfolgt. Außerdem konnte ich aus meinen Studien die Erkenntnis ziehen, dass Mutationen von *53bp1* oder *Usp28* die Hochregulierung von p53 und die damit verbundenen Phänotypen in *Sas-4*^{-/-}-Embryonen aufheben konnten. Diese stimmen mit den Erkenntnissen aus *in vitro*-Studien überein. Meine Ergebnisse bestätigen zudem die Etablierung des mitotischen Überwachungssignalweges *in vivo* während der Gastrulation, wie auch seine Assoziation mit der Reifung der Centriolen, effizienter Mitose, und Cilienbildung.

Für meine *in vitro*-Studien habe ich embryonale Stammzellen der Maus (mESCs) von Wildtyp- und *Sas-4*^{-/-}-Blastozysten bezogen. Wider meine Erwartungen konnten *Sas-4*^{-/-}-mESCs erfolgreich entnommen und unter pluripotenten Bedingungen kultiviert werden. Jedoch wiesen diese, vor allem nach unvollständiger Differenzierung, ein verlangsamtes Wachstum und einen erhöhten p53-Spiegel auf. Die Wachstumskinetik in *Sas-4*^{-/-}-mESCs war p53-abhängig und stand im Zusammenhang mit der Mitosedauer. Insgesamt haben sich mESCs als geeignetes System alternativ zum Mausembryo herausgestellt, um die molekularen Mechanismen des mitotischen Überwachungssignalweges in acentriolen Zellen zu erforschen.

Zudem haben meine Studien gezeigt, dass der mitotische Überwachungssignalweg auch in E14 mESC-Zelllinien durch pharmakologische Mitose-verlängernde Behandlung induziert werden kann. In diesem Zusammenhang reichte eine geringe Dosis und ein kurzer Behandlungszeitraum aus, um den p53-Spiegel signifikant und in Abhängigkeit von 53BP1 und USP28 zu erhöhen. Interessanterweise führte die Behandlung mit Nocodazol, welche den Stillstand des Zellzyklus in der Prometaphase veranlasste, zu einer Bildung fokaler Akkumulationen von p53. Diese kolokalisieren mit 53BP1 und USP28 und sind in ihrer Bildung abhängig von 53BP1. Die Identität dieser Akkumulationen ist noch nicht bekannt, jedoch ist eine Bedeutung für die Wahrnehmung der Mitoseverlängerung und die darauffolgende Hochregulierung von p53 nicht ausgeschlossen.

Um schließlich mithilfe unvoreingenommener Methoden weitere Proteine zu identifizieren, die am mitotischen Überwachungssignalweg beteiligt sind, habe ich Immunpräzipitation und gesamt-proteomische Analysen in E14 mESCs durchgeführt, welche neue Hinweise auf Effektoren dieses Signalweges erzielten. Insgesamt erlauben meine Erkenntnisse die Erweiterung unseres Wissens über den mitotischen Überwachungssignalweg und bieten eine Grundlage für zukünftige Studien.