

ABSTRACT

Centrosomes are formed of a pair of microtubule-based centrioles surrounded by a pericentriolar material (PCM) of proteins. Centrosomes function as dominant microtubule organizing centres (MTOCs) in animal cells and are important for spindle microtubule organization and efficient mitosis. During interphase, centrioles serve as an essential template for cilia formation. To maintain the same number of centrioles per cell after cell division, centrioles duplicate during the S-phase by templating new procentrioles on the side of each centriole. To accomplish this, the centrioles assemble a cartwheel structure by the oligomerization of a protein called SAS-6. Loss of function mutations in *Sas-6* in human cells and other organisms lead to centriole duplication failure. Centrioles can also form without pre-existing centrioles using the *de novo* biogenesis pathway, which shares the same core proteins with canonical duplication. During mouse embryonic development, the first centrioles are formed *de novo* in cells of the blastocyst at embryonic day (E) 3.5. However, the loss of centrioles results in lethality ~ E9 due to the activation of a 53BP1-, USP28- and p53-dependent mitotic surveillance cell death pathway. The molecular mechanisms of the mitotic surveillance pathway and the functions of SAS-6 in the mouse have not been defined.

In this doctoral thesis, I show that the *de novo* formed centrioles in the blastocysts gradually assemble appendages and increase the amount of recruited PCM to efficiently drive spindle assembly and template cilia around gastrulation. The gradual centriole maturation correlates with the delayed response to centrosome loss. In addition, using a knock-in reporters in mouse embryonic stem cells (mESCs) and pharmacologically activating the mitotic surveillance pathway, I discovered that the focal accumulations of p53 and 53BP1 that form in mitotic cells are directly associated with p53 upregulation.

Moreover, I show that the loss of SAS-6 in the mouse leads to centriole formation failure and a 53BP1-, USP28- and p53-dependent developmental arrest at mid-gestation. Surprisingly, centrioles start to form while deriving mESCs from *Sas-6*-null blastocysts that lacked centrioles. I show that whereas SAS-6 is not essential for centriole biogenesis in mESCs, it serves an important function in centriole integrity, symmetry and length regulation. In addition, the abnormal SAS-6-deficient centrioles still have the capacity to nucleate microtubules but fail to template cilia. I also demonstrate that the differentiation of mESCs into neural progenitor cells (NPCs) leads to a sharp decrease in the fraction of cells with centrosomes, suggesting that SAS-6-independent centriole formation is directly associated with pluripotency in mESCs. On the other hand, mutating *Sas-6* in somatic mIMCD3 results in centriole duplication failure. Collectively, my data reveal different roles for SAS-6 in the formation and/or integrity of centrioles depending on the cellular context.

ZUSAMMENFASSUNG

Zentrosomen bestehen aus einem Paar von Zentriolen, welche von der perizentriolaren Matrix (PZM) umgeben sind. In tierischen Zellen dienen Zentrosomen als dominante Mikrotubuli-organisierende Zentren (MTOC) und sind somit wichtig für die Bildung des Spindelapparates und folglich für eine effiziente Mitose. Während der Interphase dienen Zentriolen als essenzielle Templates für die Bildung von Zilien. Um die exakte Anzahl der Zentrosomen pro Zelle nach der Zellteilung zu erhalten, duplizieren sich die Zentriolen während der S-Phase durch Anlegen neuer Procentriolen an der Seite jeder Zentriole. Dazu bilden die Zentriolen durch die Oligomerisierung eines Proteins namens SAS-6 zunächst eine Wagenradstruktur. In humanen Zellen sowie in anderen Organismen führen Funktionsverlustmutationen von SAS-6 zum Versagen der Zentriolenduplikation. Zentriolen können jedoch auch *de novo* ohne bereits existierende Zentriolen durch einen Biogeneseweg gebildet werden, welcher dieselben zentralen Proteine wie der kanonische Weg enthält. Während der Embryonalentwicklung der Maus werden die ersten Zentriolen in den Zellen der Blastozyste am Embryonaltag (E) 3,5 *de novo* gebildet. Der Verlust der Zentriolen führt jedoch aufgrund der Aktivierung eines 53BP1-, USP28- und p53-abhängigen mitotischen Überwachungszelltodweges zum Absterben der Embryonen ungefähr an Tag 9 der Embryogenese. Die molekularen Mechanismen des mitotischen Überwachungsweges und die Funktionen von SAS-6 in der Maus sind noch nicht definiert worden.

In dieser Doktorarbeit zeige ich, dass die in den Blastozysten *de novo* gebildeten Zentriolen graduell Fortsätze akquirieren und die Menge an PCM ebenfalls graduell erhöht wird, bis die Zentrosomen in der Gastrulation reif sind um effizient die Bildung des Spindelapparates sowie die Bildung von Zilien zu fördern. Diese graduelle

Reifung der Zentriolen korreliert zudem mit der verzögerten Reaktion auf Zentrosomenverlust. Darüber hinaus habe ich mit Hilfe eines Knock-in-Reporters in embryonalen Stammzellen der Maus (mESCs) und der pharmakologischen Aktivierung des mitotischen Überwachungsweges nachgewiesen, dass die fokalen Akkumulationen von p53 und 53BP1, die sich in mitotischen Zellen bilden, direkt mit der Hochregulierung von p53 verbunden sind.

Des Weiteren zeige ich, dass der Verlust von SAS-6 in der Maus zum Versagen der Zentriolenbildung und damit einhergehend zu einem von 53BP1, USP28 und p53 abhängigen Entwicklungsstopp während der Gastrulation führt. Erstaunlicherweise beginnen sich Zentriolen zu bilden, wenn mESCs aus Sas-6-null-Blastozysten abgeleitet werden, denen Zentriolen fehlen. Ich zeige, dass SAS-6 zwar nicht essentiell für die Zentriolenbiogenese in mESCs ist, aber eine wichtige Funktion für die Integrität, Symmetrie und Längenregulation der Zentriolen hat. Darüber hinaus sind die abnormalen SAS-6-defizienten Zentriolen immer noch in der Lage, Mikrotubuli zu nukleieren, können aber keine Zilien bilden. Ich zeige auch, dass die Differenzierung von mESCs in neurale Vorläuferzellen (NPCs) zu einem starken Rückgang des Anteils von Zellen mit Zentrosomen führt, was darauf hindeutet, dass die SAS-6-unabhängige Zentriolenbildung direkt mit Pluripotenz in mESCs verbunden ist. Andererseits führt eine Mutation von Sas-6 in somatischem mIMCD3 zu einem Versagen der Zentriolenduplikation. Insgesamt zeigen meine Daten, dass SAS-6 je nach zellulärem Kontext unterschiedliche Rollen bei der Bildung und/oder Integrität von Zentriolen spielt.