

Dissecting the mechanism of the mitotic surveillance pathway in mouse embryonic stem cells

Abstract

Cell cycle checkpoints are surveillance mechanisms that monitor the order, integrity, and fidelity of key cell cycle events, including cell division. Recently, a new p53-dependent mitotic surveillance pathway (MSP) was described that monitors the duration of mitosis to prevent the survival or propagation of cells that experience prolonged mitosis. The MSP is activated after centrosome loss-of-function or pharmacologically prolonging mitosis. The current model is centered on the scaffold protein p53-binding protein 1 (53BP1) that binds the deubiquitinase USP28 and p53 during mitosis, presumably enabling de-ubiquitination and stabilization of p53. However, the upstream players and other mediators of the MSP are still unknown. We have previously established a mouse *in vitro* system to study the MSP and described the formation of mitotic foci during a prolonged mitosis, which harbored all of the known players of the pathway as well as PLK1, AURKA and AURKB in a subset of the observed foci (Xiao 2020). In this doctoral dissertation, I investigated the establishment of the MSP *in vivo* and examined its mechanism in mESCs *in vitro*. To identify novel players in the MSP, I performed proximity labeling of potential mitotic endogenous p53 interactors followed by MS analysis. I defined three broad categories of protein functions: 1) Transcription and mRNA processing, 2) Spindle assembly and microtubule trafficking and 3) DNA damage response; and examined the potential involvement of the first two categories in MSP activation. While my data largely excluded a role for transcription and mRNA processing in MSP activation, I provide evidence that PLK1 might act upstream of 53BP1 in activating the MSP in mESCs. Additionally, I show that the mitotic foci form within 2 h of the mitotic arrest and positively correlate with p53 stabilization in the subsequent G1 phase. Examination of the ultrastructure of mitotic foci revealed that they are likely formed of protein aggregates surrounded by vesicular structures. Interestingly, I also provide evidence that the formation of visible mitotic foci is not a strict prerequisite for p53 stabilization. Moreover, I observed that in mESCs, although the formation of visible mitotic foci is completely abolished, the phosphorylation of three amino acids in the BRCT domain of 53BP1 is not essential for p53 stabilization, unlike reports in human RPE-1 cells. Finally, I performed additional unbiased immunoprecipitation screens to identify novel MSP-dependent 53BP1 interactors and phosphorylation sites, which expand our understanding of MSP activation. Together, these findings contribute to the development of a

model centered on 53BP1 and its modification during MSP activation, and open up new avenues for future studies of 53BP1 and MSP.

Zusammenfassung

Zellzyklus-Checkpoints dienen der Überwachung der Reihenfolge, Vollständigkeit und Genauigkeit der verschiedenen Phasen des Zellzyklus, einschließlich der Zellteilung. Kürzlich wurde ein neuer p53-abhängiger mitotischer Signalüberwachungsweg (MSP) beschrieben, der die Dauer der Mitose überwacht, um das Überleben oder die Proliferation von Zellen mit verlängerter Mitose zu verhindern. Der MSP wird entweder durch Zentrosomenverlust oder durch pharmakologische Verlängerung der Mitose aktiviert. Das aktuelle Modell konzentriert sich auf das Gerüstprotein p53-binding protein 1 (53BP1), das während der Mitose die Deubiquitinase USP28 und p53 bindet und dadurch vermutlich die Deubiquitinierung und Stabilisierung von p53 ermöglicht. Weitere Upstream-Akteure und Mediatoren des MSP sind jedoch noch unbekannt. Wir haben ein Maus-*in vitro*-System etabliert, um den MSP zu studieren und haben die Bildung von mitotischen Foci während einer verlängerten Mitose beschrieben, die alle bekannten Akteure enthalten. Einige dieser Foci enthalten auch PLK1, AURKA und AURKB (Xiao 2020). In dieser Doktorarbeit habe ich die Etablierung des MSP *in vivo* und seine Mechanismen in embryonalen Stammzellen der Maus (mESCs) *in vitro* untersucht. Um neue Akteure des MSP zu identifizieren, habe ich potenzielle mitotische Interaktoren von p53 mittels Proximity Ligation Assays, gefolgt von massenspektrometrischen Analysen, identifiziert. Ich habe drei übergreifende Kategorien von Proteinfunktionen definiert: 1) Transkription und mRNA-Prozessierung, 2) Spindle-Assembly und Mikrotubuli-Transport und 3) DNA-Schadensreaktion; und ich habe die mögliche Beteiligung der ersten beiden Kategorien an der MSP-Aktivierung untersucht. Während meine Daten eine Rolle der Transkription und mRNA-Prozessierung bei der MSP-Aktivierung weitgehend ausschließen, zeige ich, dass PLK1 an der Aktivierung des MSP in mESCs upstream von 53BP1 beteiligt sein könnte. Zusätzlich zeige ich, dass die mitotischen Foci innerhalb von 2 h nach dem mitotischen Arrest entstehen und positiv mit der p53-Stabilisierung in der folgenden G1-Phase korrelieren. Die ultrastrukturelle Untersuchung der Foci ergab, dass diese wahrscheinlich aus Proteinaggregaten bestehen, die von vesikulären Strukturen umgeben sind. Interessanterweise konnte ich auch zeigen, dass die Bildung sichtbarer mitotischer Foci keine strikte Voraussetzung für die p53-Stabilisierung ist. Außerdem habe ich beobachtet, dass drei Aminosäuren in der BRCT-Domäne von 53BP1 in mESCs, im Gegensatz zu menschlichen RPE-1-Zellen, nicht essenziell für die p53-Stabilisierung sind, obwohl fast keine mitotischen Foci gebildet werden, wenn diese Aminosäuren mutiert sind. Schließlich habe ich zusätzliche Immunpräzipitationsscreens durchgeführt, um neue MSP-abhängige 53BP1-Interaktoren und Phosphorylierungsstellen zu identifizieren, die unser Verständnis der MSP-Aktivierung erweitern. Zusammengefasst tragen diese Ergebnisse zur Entwicklung eines Modells bei, das

auf 53BP1 und seinen Modifikationen während der MSP-Aktivierung basiert und neue Wege für zukünftige Studien von 53BP1 und des MSP eröffnet.