

Abstract

CLASPs are well-conserved microtubule plus-end-tracking proteins that participate in chromosome segregation through their key role at the kinetochore-microtubule interface. In yeast, *Drosophila*, and *Xenopus*, a single CLASP orthologue is present, which is required for mitotic spindle assembly by regulating microtubule dynamics at the kinetochore. In mammals, however, only CLASP1 has been directly implicated in cell division, despite the existence of a second paralogue, CLASP2. Here we describe the mitotic localization of human CLASP2 in HeLa cells and show that its localization at kinetochores, centrosomes, and spindle throughout mitosis is remarkably similar to CLASP1. Analysis of *Clasp2* KO mouse embryonic fibroblasts revealed that CLASP1 kinetochore localization and Mad2 checkpoint response is not compromised in the absence of CLASP2.

To further understand CLASP roles in mitosis, namely to rule out potential redundant functions, we performed single CLASP depletion by RNAi. Remarkably, single CLASP depletion caused no significant impairment of mitosis, while reducing the levels of both CLASPs by RNAi caused severe mitotic spindle defects (mainly cells with multipolar spindles), and abnormal DNA content (aneuploidy). Overall, these results suggest that CLASP1 and CLASP2 play overlapping roles during mitosis.

In order to understand the molecular mechanisms underlying the function of human CLASPs during mitosis, next we performed a proteomic study for the identification of CLASP1 interacting proteins during mitosis by mass-spectrometry. Our results confirmed the interactions between CLASP1 – CLIP-170 and LL5 β , both described in interphase. Moreover, new interactors were found such as CENP-E, Astrin, GCC185, CENP-J/CPAP, MARK2 and the novel protein KIAA0802.

In interphase cells, CLASPs accumulate at the Golgi apparatus and this accumulation is related to the presence of stabilized microtubules. However, there is little information concerning Golgi function during mitosis. Analysis of GCC185 mitotic distribution showed that in early stages GCC185 localizes around centrosomes, and disperses in metaphase and anaphase. In telophase, GCC185 re-localizes to the perinuclear region and centrosomes. Noteworthy, we found an extensive co-localization between GCC185 and CLASP1 (especially in prophase, prometaphase and telophase). The interaction between GCC185 and CLASP1 was also confirmed in interphase cell extracts.

Finally, many +TIPs like APC, CLIP-170/Restin and EB1 have previously been implicated in aneuploidy and tumourigenesis, forming a complex protein network with CLASPs. To determine the implications of CLASP1 for the mechanisms of tumourigenesis, we performed a mutational screening in a human cell line derived from

cervix carcinoma (HeLa cells). In our mutational analysis we found three deletions: two of them correspond to CLASP1 alternative spliced isoforms (737→1538 and 1125→1164), and the third derives from the partial loss of exon 21 (673→679). These mutations could be related to chromosomal instability leading to random mutations, or may reflect that CLASP1 gene is a main target for mutations. These results encourage a larger survey for CLASP mutations in other tumour cell lines and primary tumours. Overall, we found that CLASP1 and CLASP2 play redundant roles during mitosis, whose absence can originate several mitotic defects, and ultimately lead to aneuploidy. Additionally, we uncovered new molecular interactions with important and novel mitotic proteins and provided the molecular linkage between CLASP function and the still mysterious role of the Golgi apparatus during mitosis.

Resumo

CLASPs são proteínas altamente conservadas que participam na segregação dos cromossomas através do seu papel fundamental na interface cinetocoro-microtúbulo durante a mitose. Em levedura, *Drosophila*, e *Xenopus*, um único ortólogo da CLASP está presente, o qual é necessário para a formação do fuso mitótico através da regulação da dinâmica dos microtúbulos a nível do cinetocoro. Em mamíferos, no entanto, somente a CLASP1 tem sido implicada na divisão celular, apesar da existência de um segundo parólogo, CLASP2. Neste estudo descrevemos a localização mitótica da CLASP2 humana em células HeLa e mostramos que a sua localização nos cinetocoros, centrossomas, e fuso durante toda a mitose é notavelmente semelhante à CLASP1. A análise de fibroblastos embrionários de ratinho KO para a *Clasp2* revelou que a localização da CLASP1 no cinetocoro e a resposta do checkpoint da Mad2 não estão comprometidos pela ausência de CLASP2.

Para melhor compreender as funções das CLASPs em mitose, nomeadamente para determinar potenciais funções redundantes, nós realizamos a depleção de cada CLASP por RNAi. Notavelmente, a depleção isolada de cada CLASP não induziu qualquer erro significativo na mitose; a redução dos níveis de ambas as CLASPs por RNAi causou severos defeitos mitóticos a nível do fuso (principalmente células com fusos multipolares), e conteúdo anormal de DNA (aneuploidia). No geral, estes resultados sugerem que CLASP1 e CLASP2 possuem papéis sobreponíveis durante a mitose.

A fim de compreender os mecanismos moleculares subjacentes à função das CLASPs humanas durante a mitose, nós realizamos um estudo proteómico para a identificação das proteínas interactoras da CLASP1 durante a mitose através de espectrometria de massa. Os nossos resultados confirmaram as interações entre CLASP1 - CLIP-170 e LL5 β , ambos descritas em interfase. Além disso, novas interações foram encontradas como CENP-E, Astrin, GCC185, CENP-J/CPAP, MARK2 e a nova proteína KIAA0802. Em células interfásicas, as CLASPs acumulam-se no aparelho de Golgi e esta acumulação está relacionada com a presença de microtúbulos estabilizados. No entanto, há pouca informação a respeito da função de Golgi durante a mitose. A análise da distribuição mitótica da GCC185 mostrou que em estadios precoces a GCC185 localiza-se em torno dos centrossomas, e dispersa-se em metafase e anafase. Em telofase, a GCC185 realocaliza-se na região perinuclear e nos centrossomas. De notar que nós encontramos uma co-localização extensiva entre a GCC185 e a CLASP1 (especialmente em profase, prometáfase e telofase). A

interacção entre a GCC185 e a CLASP1 foi também confirmada em extractos celulares interfásicos.

Finalmente, muitas +TIPs como o APC, CLIP-170/Restin e EB1 têm sido implicadas em processos de aneuploidia e tumorigénese, formando uma complexa rede proteica com as CLASPs. Para determinar as implicações da CLASP1 nos mecanismos de tumorigénese, realizamos uma pesquisa mutacional numa linha celular humana derivada do carcinoma do cérvix (células HeLa). Na nossa análise mutacional encontramos três deleções: duas correspondem a isoformas da CLASP1 resultantes de splicing alternativo (737→1538 e 1125→1164), e a terceira deriva da perda parcial do exão 21 (673→679). Estas mutações podem estar relacionadas à instabilidade dos cromossomas que conduz a mutações aleatórias, ou podem reflectir que o gene CLASP1 é um alvo principal para mutações. Estes resultados incentivam a um exame maior para mutações da CLASP noutras linhas celulares tumorais e tumores primários. No geral, nós encontramos que a CLASP1 e CLASP2 possuem papéis redundantes durante a mitose, cuja ausência pode originar diversos defeitos mitóticos, conduzindo em último efeito à aneuploidia. Adicionalmente, descobrimos novas interacções moleculares com importantes proteínas mitóticas e fornecemos a ligação molecular entre a função da CLASP e o papel desconhecido do aparelho de Golgi durante a mitose.

Resumen

CLASPs son proteínas bien-conservadas del microtúbulo que participan en la segregación del cromosoma con su papel dominante en el interface del cinetocoro-microtúbulo. En levadura, *Drosophila*, y *Xenopus*, un solo ortólogo de la CLASP está presente, que es requerido para el montaje del huso mitótico regulando la dinámica del microtúbulo en el cinetocoro. En mamíferos, sin embargo, solamente CLASP1 ha estado implicada directamente en la división de la célula, a pesar de la existencia de un segundo paralog, CLASP2. Aquí describimos la localización mitótica de CLASP2 humana en células HeLa y demostramos que su localización en los cinetocoros, los centrosomas, y el huso a través de la mitosis es notable similar a CLASP1. El análisis de los fibroblastos embrionarios del ratón KO para la *Clasp2* reveló que la localización de CLASP1 en el cinetocoro y la respuesta del checkpoint de Mad2 no están comprometida en ausencia de CLASP2.

Para mejor entender los papeles de CLASPs en mitosis, a saber para determinar potenciales funciones redundantes, realizamos la depleción de cada CLASP por RNAi. Notable, la depleción sola de CLASP no causó ningún error significativo en la mitosis, mientras que la reducción de los niveles de ambas CLASPs por RNAi causó defectos mitóticos severos del huso (principalmente células con husos multipolares), y contenido anormal de la DNA (aneuploidia). En general, estos resultados sugieren que CLASP1 y CLASP2 desempeñen papeles superpuestos durante la mitosis.

Para entender los mecanismos moleculares subyacentes a la función de las CLASPs humanas durante la mitosis, realizamos un estudio proteómico para la identificación de las proteínas interactoras CLASP1 durante mitosis por espectrometría de masa. Nuestros resultados confirmaron las interacciones entre CLASP1 - CLIP-170 y LL5 β , ambos descritos en interfase. Por otra parte, nuevos interactores fueron encontrados por ejemplo CENP-E, Astrin, GCC185, CENP-J/CPAP, MARK2 y la nueva proteína KIAA0802.

En células interfásicas, las CLASPs se acumulan en el aparato de Golgi y esta acumulación se relaciona con la presencia de microtúbulos estabilizados. Sin embargo, hay poca información referente a la función de Golgi durante la mitosis. El análisis de la distribución mitótica de GCC185 demostró que en los primeros tiempos GCC185 se localiza alrededor de centrosomas, y que se dispersa en metafase y anafase. En telofase, GCC185 re-localiza a la región perinuclear y a los centrosomas. Significativo, encontramos una co-localización extensa entre GCC185 y CLASP1 (especialmente en profase, prometafase y telofase). La interacción entre GCC185 y CLASP1 también fue confirmada en extractos celulares interfásicos.

Finalmente, muchas +TIPs como el APC, CLIP-170/Restin y EB1 han estado implicados previamente en la aneuploidia y tumorigenesis, formando una compleja red proteica con las CLASPs. Para determinar las implicaciones de CLASP1 para los mecanismos del tumorigenesis, realizamos un análisis mutacional en una línea celular humana derivada del carcinoma de cervix (células HeLa). En nuestro análisis mutacional encontramos tres deleciones: dos de ellas corresponden a las isoformas de CLASP1 derivadas de splicing alternativo (737→1538 y 1125→1164), y la tercera deriva de la pérdida parcial del exon 21 (673→679). Estas mutaciones se podrían relacionar con la inestabilidad cromosómica que conducía a las mutaciones aleatorias, o pueden reflejar que el gene CLASP1 es un destino principal para las mutaciones. Estos resultados sugieren un examen más cuidado para las mutaciones de CLASP en otras líneas celulares tumorales y tumores primarios.

En general, encontramos que CLASP1 y CLASP2 desempeñan papeles redundantes durante la mitosis, cuya ausencia puede originar varios defectos mitóticos, conduciendo en última instancia a aneuploidia. Además, encontramos nuevas interacciones moleculares con las importantes proteínas mitóticas y proporcionamos la conexión molecular entre la función de CLASP y el papel desconocido del aparato de Golgi durante la mitosis.