

Biochemical characterization of – Filippi syndrome mutated protein – CKAP2L

CKAP2L is a spindle associated protein that has been demonstrated to localize at the microtubules of the spindle pole and at the midbody during cytokinesis. It was the first protein to be connected to the Filippi syndrome, by identifying six point mutations in the corresponding *CKAP2L* gene in five unrelated families. Currently, it was postulated to be tightly regulated during cell cycle and interphase due to the identification of cellular defects upon overexpression and knockdown. Its localization in other cell lines, potential binding partners and the detailed effects of the *CKAP2L* mutation remain to be elucidated.

To decipher the function and subcellular localization of the protein, I transfected GFP labelled CKAP2L in HeLa cells. Overexpression of the full-length protein revealed aberrant cellular shape and thickened microtubules. However, the underlying mechanism for these observations remains to be investigated.

To identify binding partners of CKAP2L, immunoprecipitation and mass spectrometry assays were conducted. I was able to identify six novel *in vitro* binding partners of CKAP2L. Three of them, FLNA, ARP2 and FLII, stabilize or even contribute to the construction of actin filaments inside the cytoskeleton. These findings suggest that CKAP2L may play a vital role for the proper cytoskeleton assembly and thus for proper mitosis. Another binding partner, NPM1, accomplishes crucial functions during cell cycle, amongst others maintaining genomic stability, DNA repair, and responses to cellular stress. Moreover, we identified CK2 α and CK2 β – catalytic and regulatory subunits of the CK2 holoenzyme – as novel binding partners. Data revealed that CKAP2L could be a novel substrate for CK2.

To investigate the effects of the *CKAP2L* mutation, RNA_{seq} analysis in combination with real-time PCR was conducted. Massive transcriptional changes in the Filippi syndrome mutated LCLs were detected. Critical developmental genes from the canonical Wnt signaling pathway, genes involved in DNA damage response and the genes coding for the novel identified binding partners were significantly differentially regulated. Supporting these results, significant changes in the mutants during cell proliferation, apoptosis and in DNA damage response could be observed.

Taken together these studies show two highly interesting outcomes:

First that the *CKAP2L* mutation results in impaired cell proliferation, higher vulnerability against cellular stress and increased apoptosis.

Second, CKAP2L is suggested, in combination with its binding partners – ARP2, FLNA and FLII – to be crucial for the cytoskeleton, particularly for the constructions and stabilization of actin filaments.

Biochemische Charakterisierung des – Filippi syndrome mutierten Proteins – CKAP2L

CKAP2L ist ein Spindel-assoziiertes Protein, das während der Zytokinese an den Mikrotubuli des Spindelpols und im Mittelkörper lokalisiert wurde. Es ist das erste Protein, welches mit dem Filippi Syndrome in Verbindung gebracht wurde. Im CKAP2L Gen wurden sechs Punktmutationen in fünf nicht verwandten Familien identifiziert. Gegenwärtig wird postuliert, dass es einer strikten Regulierung während des Zellzyklus und der Interphase unterliegt. Die Lokalisierung in anderen Zelllinien, potenzielle Bindungspartner und die detaillierten Auswirkungen der CKAP2L - Mutation müssen noch untersucht werden.

Um die Funktion und die subzelluläre Lokalisation des Proteins zu entschlüsseln, wurde GFP-getaggt CKAP2L in HeLa Zellen transfiziert. Die Überexpression des Proteins in voller Länge zeigte Veränderungen in der Form der Zellen und verdickte Mikrotubuli. Der zugrunde liegende Mechanismus für diese Beobachtungen bedarf weiterer Untersuchungen.

Um die Bindungspartner von CKAP2L zu identifizieren, wurden Immunpräzipitations- und Massenspektrometrietests durchgeführt. Dadurch konnten sechs neue *in vitro* Bindungspartner von CKAP2L identifiziert werden. Drei von ihnen, FLNA, ARP2 und FLII, stabilisieren die Aktinfilamente im Zytoskelett, oder tragen sogar zum Aufbau dieser bei. Diese Befunde legen nahe, dass CKAP2L eine wichtige Rolle bei der richtigen Entwicklung des Zytoskeletts und damit beim Ablauf der korrekten Mitose spielt. Ein weiterer Bindungspartner, NPM1, erfüllt unter anderem während des Zellzyklus wichtige Funktionen, indem er die genomische Stabilität, die DNA-Reparatur und die angemessenen Reaktionen auf zellulären Stress aufrechterhält. Darüber hinaus konnten CK2 α und CK2 β – katalytische und regulatorische Untereinheiten des CK2-Holoenzym – als neue Bindungspartner identifiziert werden. Die Daten zeigten, dass es sich bei CKAP2L um ein neues Substrat für CK2 handeln könnte.

Um die Auswirkungen der CKAP2L Mutation zu untersuchen, wurde eine RNA_{seq}-Analyse in Kombination mit einer real-time PCR durchgeführt. In den LCLs der Filippi Syndrom Patienten konnten massive transkriptionelle Veränderungen nachgewiesen werden. Kritische Gene für die Embryonalentwicklung aus dem kanonischen Wnt-Signalweg, Gene, die an der DNA Schadensantwort beteiligt sind, und die Gene, die für die neu identifizierten Bindungspartner kodieren, wurden signifikant unterschiedlich reguliert. Durch die Beobachtung signifikanter Veränderungen in den Mutanten während der Zellproliferation, Apoptose und DNA Schadensantwort konnten die vorherigen Ergebnisse weiter gestützt werden.

Zusammengenommen zeigen diese Studien zwei hoch interessante Ergebnisse:

Erstens führt die CKAP2L Mutation zu einer gestörten Zellproliferation, einer höheren Anfälligkeit für Zellstress und einer erhöhten Apoptose.

Zweitens legen die Ergebnisse nahe, dass CKAP2L in Kombination mit seinen Bindungspartnern ARP2, FLNA und FLII für das Zytoskelett von entscheidender Bedeutung ist, insbesondere für die Konstruktion und Stabilisierung von Aktinfilamenten.