

**Az anafázis promoting komplex (APC/C)
katalitikus modulja *Drosophila melanogaster*ben**

Ph.D értekezés

Nagy Olga

Témavezető: Dr. Deák Péter

Biológia Doktori Iskola
MTA SZBK Biokémia Intézet

SZTE TTIK

2012.

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....1

1. Az eukarióta sejtciklus	1
2. A sejtciklus szabályozása.....	3
2.1 A ciklinek és Cdk-k szerepe a sejtciklus szabályozásában	3
2.2 A fehérjelebontás szerepe a sejtciklus szabályozásában.....	5
2.3 Az ubikvitin-függő proteasómális fehérjelebontás.....	6
2.4 A sejtciklus szabályozásában résztvevő ubikvitin-ligázok.....	7
3. Az APC/C aktivitásának szabályozása.....	9
4. Az APC/C célfehérjéi és felismerésük.....	12
5. Az APC/C alegységei	14
6. Az APC/C felépítése.....	17
7. A <i>Drosophila</i> APC/C alegységei	19

CÉLKITŰZÉSEK.....22

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK24

1. Élesztő törzsek és módszerek	24
2. Élesztő kettős-hibrid kísérletek.....	24
3. Élesztő hármashibrid kísérletek.....	25
4. β -galaktozidáz aktivitás kimutatása	25
5. Élesztő komplementációs teszt.....	26
6. Felhasznált <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek	27
7. <i>lmg</i> és <i>Dmube2S</i> deléciós mutánsok előállítása P elem remobilizációval	27
8. Letálfázis meghatározás.....	28
9. A <i>lemming</i> mutánsok fenotípusának menekítése.....	29
10. Szemikvantitatív, reverz transzkripció kapcsolt PCR (RT-PCR)	30
11. Citológiai analízis	31
12. Immunfestés	32
13. 5' és 3'-végi RACE vizsgálatok	33
14. Eritőp konstrukciók és western blot kísérletek.....	33
15. Kolhicin és Docetaxel etetési tesztek.....	34
16. Felhasznált primerek	35

EREDMÉNYEK.....36

1. A <i>lemming</i> funkciójának kiesése bábletalitáshoz és apoptózishoz vezet	36
2. A <i>lemming</i> mutációk természete.....	37
3. A <i>lemming</i> mutánsok mitotikus fenotípusának vizsgálata	39
4. A <i>lemming</i> gén dicisztronus szerkezete az evolúciósan konzerválódott a <i>Drosophilidae</i> családban.....	42
5. A <i>lmgA</i> a <i>Drosophila</i> APC/C Apc11 alegységét kódolja.....	45
6. A mitotikus ciklinek vizsgálata	45
7. A <i>lmgA</i> és <i>lmgB</i> expressziójának vizsgálata az egyedfejlődés során	48
8. A <i>LmgB</i> fehérje expressziójának vizsgálata	49
9. A <i>lemming</i> mutánsok fenotípusának menekítése.....	50

10. A LmgA funkciójának vizsgálata heterológ komplementációs kísérlettel.....	51
11. A LmgA kölcsönhatásának vizsgálata az Apc2 alegységgel.....	52
12. Az APC/C-vel kölcsönható E2 enzimek azonosítása.....	53
13. Genetikai kölcsönhatás vizsgálata az <i>apc2</i> , <i>apc11</i> és <i>vihar</i> között.....	56
14. <i>Dmube2S</i> null mutáns előállítása	58
15. A <i>Dmube2S</i> ^{61/2} genetikai kölcsönhatása a <i>morula</i> , <i>lemming</i> és <i>vihar</i> génekkel.....	59
16. A <i>Dmube2S</i> mutánsok érzékenyek mitózist gátló szerekkel szemben	61
17. A <i>mad2</i> hiánya menekíti az <i>Dmube2S</i> kolhicin érzékenységét	63
 <u>EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....</u>	 <u>65</u>
 <u>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</u>	 <u>72</u>
 <u>ÖSSZEFOGLALÓ.....</u>	 <u>73</u>
 <u>SUMMARY</u>	 <u>77</u>
 <u>IRODALMI HIVATKOZÁSOK.....</u>	 <u>77</u>

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. Az eukarióta sejtciklus

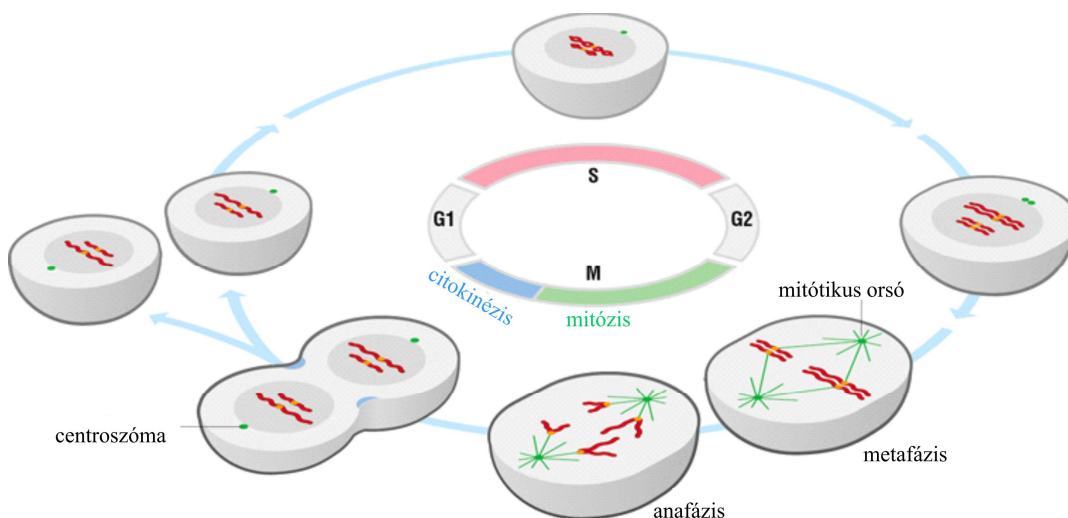
Minden sejt kizárólag már meglévő sejtek osztódásával jöhet létre. A sejtek az osztódás előtt megkettőzik anyagaikat, majd ezt követően két, egymással és a kiindulási anyasejttel szinte teljesen egyforma leánysejt jön létre. A növekedésnek és a sejtosztódásnak ezt a periodikus váltakozását nevezzük sejtciklusnak, amely minden élőlényre alapvetően jellemző folyamat. Egysejtű organizmusok esetében minden osztódás egy teljesen új élőlényt eredményez, míg a többsejtű élőlényeknél számtalan sejtosztódás szükséges ahhoz, hogy egyetlen kiindulási sejtől létrehozzák szöveteiket, szerveiket, illetve elhaló sejtjeiket pótolják.

A sejtciklus részleteiben igen eltérő lehet különböző organizmusokban, azonban alapvető fázisátmenetei és szabályozása konzerválódott az eukarióták evolúciója során. Az örökítő anyag hibátlan duplikálódása, majd azok pontos kettéosztása az utódsejtekbe, a sejtciklust két jól definiálható fázisra osztja. A DNS replikációja és a kromoszómák megkettőződése az S fázisban (szintézis) játszódik le, majd ezt követi a kromoszómák szétválása, és szegregációja az osztódás M fázisában (mitózis).

Az M fázisban a megkettőződött, hosszú, fonálszerű DNS kromoszómákká áll össze (profázis). A sejtmag osztódásakor a sejtmaghártya felbomlik és a kondenzált kromoszómákat alkotó leánykromatida-párok mindegyikéhez hozzákapcsolódnak a mitotikus orsó mikrotubulusai, a húzófonalak. Az ellentétes húzóerők következtében a kromoszómák az orsó felezési síkjába rendeződnek, ott időznek egy kicsit (ezt metafázisnak nevezzük), majd hirtelen szétválásukkal (az anafázis kezdete) megkezdődik a leánykromatidák pólusok felé történő vándorlása. A kromatidák a pólusokhoz érve dekondenzálódnak, majd új sejtmaghártya alakul ki körülöttük. Ezt követően a citoplazma is kettéosztódik (citokinézis), majd a sejt kettéválásával a sejtosztódás befejeződik (1. ábra).

Az S és M fázisokat ún. „gap” fázisok választják el. A mitózist követő szakaszt G1 fázisnak, az S fázist követőt pedig G2 fázisnak nevezzük. Két mitózis közötti időszak az interfázis, amely tehát G1, S és G2 fázisokra tagolódik. A G1 és G2 fázisok biztosítják, hogy a sejtnak legyen elég ideje a növekedéshez és egyéb sejt folyamatok elvégzéséhez. Az

örökítő anyaguk megduplázódása mellett, a sejtorganelleumaik és egyéb makromolekulák megkettőződésére is szükségük van.



1. ábra Az eukarióta sejtciklus fázisai.

A G1 fázis különösen fontos a sejtek életében, mert ekkor dől el, hogy osztódnak, vagy pedig kilépnek a sejtciklusból. Nem megfelelő környezeti feltételek, tápanyag-ellátottság, külső vagy belső gátló jelzések hatására nyugalmi, vagy G0 állapotba kerülnek, ahol akár életük végéig is maradhatnak. Ha azonban a sejt áthalad a G1-fázis egy meghatározott pontján, amit restrikciós, vagy start pontnak neveznek, akkor a sejtciklus mindenképpen lejátszódik, még akkor is, ha közben a körülmények megváltoznak.

Arról, hogy a sejtciklus legfontosabb eseménye - a DNS megkettőződése és pontos kettéosztása az utódsejtekbe - hibátlanul végbemenjen, egy évmilliók alatt tökéletesedő, összetett szabályozási mechanizmus gondoskodik, ami egymással kölcsönható fehérjék láncolatából áll. Ha a rendszer működésében hiba következik be, az végzetes lehet a sejtre nézve. Az ilyen folyamatok vezetnek az abnormális sejtproliferációval járó betegségek kialakulásához is.

2. A sejtciklus szabályozása

Eukariótákban a sejtciklus eseményeinek irányítását szabályozó fehérjékből álló szigorú rendszer végzi. Ez a szabályozó rendszer egy olyan autonóm biológiai órához hasonlítható, amely pontosan be van programozva arra, hogy a sejtciklus eseményei megfelelő helyen és megfelelő időben következzenek, elég időt hagyva, hogy az egyes fázisok ne kezdődjenek el mindaddig, míg az előző be nem fejeződik. A szabályozó mechanizmus központi elemei a ciklin függő kinázok, vagy Cdk-k (cyclin-dependent kinase: Cdk) és az ubikvitin-függő fehérjelebontó rendszer.

2.1 A ciklinek és Cdk-k szerepe a sejtciklus szabályozásában

A sejtciklus szabályozásában a szerin-treonin protein kinázok családjába tartozó ciklin függő kinázoknak kulcsfontosságú szerepe van. A Cdk-k más kináz fehérjékhez hasonlóan, ATP-ből származó foszfát csoport kovalens kötődését katalizálják szubsztrát fehérjékhez. Ez a foszforiláció megváltoztatja a célfehérjék aktivitását vagy kölcsönhatásba lépését más fehérjékkel.

A Cdk-k mennyisége a sejtciklus folyamán szinte állandó, aktivitása azonban jelentős különbségeket mutat. A Cdk-k önmagukban katalitikusan teljesen inaktívak. Mint nevük is jelzi, aktivitásuk speciális aktiváló fehérjétől, a ciklinektől függ. A ciklinek olyan szabályozó fehérjék, amelyeknek szintézisük és degradációjuk sejtciklusonként periodikusan ismétlődik (Hartwell, 1991). Ciklin kötődése nélkül a Cdk aktív centrumát elzárja a C-terminális doménjéből kiemelkedő T-hurok. A ciklin bekötődése konformációs változásokat eredményez a kináz szerkezetében, és részlegesen aktiválódik. Teljes aktivitásához 160-as pozícióban lévő treonin (T160) foszforilálása szükséges. Ez a treonin a T-hurok csúcsán helyezkedik el, amelynek a foszforilálását a Cdk-aktiváló kináz (CAK) végzi. Ezáltal újabb konformációs változások történnek, aminek következtében az aktív centrum maximálisan elérhetővé válik a szubsztrát fehérjék számára.

A Cdk-ciklin komplexek nemcsak a ciklinek degradációjával és a T160-as oldallánc defoszforilálásával inaktiválhatók, hanem a 14. pozícióban lévő treonin (T14) és a következő pozícióban lévő tirozin (Y15) oldalláncok foszforilációjával is. Ezt az

evolúciósan konzerválódott Wee-1 protein kináz végzi, a foszfát csoportok eltávolításához pedig a Cdc25 családba tartozó protein foszfatázokra van szükség (Borgne és Meijer, 1996). A Wee1 kináz és a Cdc25 foszfatáz aktivitásának szabályozását saját szubsztrátjuk, a mitotikus Cdk végzi. A mitotikus Cdk foszforilációval inaktíválja Wee1 kinázt és aktiválja Cdc25 foszfatázt. Ez a visszacsatolós mechanizmus szabályozza a mitotikus Cdk kapcsolószerű aktivációját a mitózis elején, aminek következtében a sejt visszafordíthatatlanul belép a mitózisba. A mitózis elején aktiválódnak a Polo és Aurora kináz fehérjék is, amelyeknek aktivitása a mitotikus Cdk-val együtt szükséges az orsó összeszerelődéshez, a centroszómák szétválásához és a citokinézishez (Barr, 2004). A mitotikus Cdk-k és az Aurora kináz szabályozzák például kinezin fehérjék foszforilációjával a centroszómák szétválását (Meraldi, 2004).

A ciklin-Cdk komplexek aktivitásának további szabályozását teszik lehetővé a specifikus Cdk inhibitorok is (CKI). Az inhibitor molekulák gátló hatásukat úgy érik el, hogy bekötődnek a Cdk-k aktív centrumába.

<u>Ciklin osztályok és Cdk partnereik</u>				
Faj	G1	G1/S	S	M
<i>S. cerevisiae</i>	Cln3 Cdk1	Cln1, 2 Cdk1	Clb5, 6 Cdk1	Clb1, 2, 3, 4 Cdk1
<i>S. pombe</i>	Puc1 Cdk1	Puc1, Cig1 Cdk1	Cig1, Cig2 Cdk1	Cdc13 Cdk1
<i>D. melanogaster</i>	Ciklin D Cdk4	Ciklin E Cdk2	Ciklin E, A Cdk1, 2	Ciklin A, B, B3 Cdk1
<i>X. leavis</i>		Ciklin E Cdk2	Ciklin E, A Cdk1, 2	Ciklin A, B Cdk1
<i>H. sapiens</i>	Ciklin D1, 2, 3 Cdk4, Cdk6	Ciklin E Cdk2	Ciklin A Cdk1, Cdk2	Ciklin B Cdk1

1. táblázat A sejtciklus szabályozásában résztvevő ciklin osztályok és Cdk partnereik.

A sejtciklus különböző fázisaiban különböző ciklinek képződnek.

Megkülönböztetünk G1-, G1/S-, S- és M-ciklineket, valamint az ezeknek megfelelő Cdk-ciklin komplexeket. Szemben az élesztő egyetlen Cdk-fehérjéjével, amely az összes ciklinnel képes komplexet alkotni, *Drosophilában* már háromféle Cdk található, amelyek más-más ciklinekkel alkothatnak komplexet. Gerincesekben viszont négy típust is megkülönböztetnek: kettő a G1 ciklinekkel, egy a G1/S és az S ciklinekkel, egy pedig az M ciklinekkel lép kölcsönhatásba (1. táblázat; Morgan 1997).

A ciklin-Cdk komplexek és szabályozó fehérjéik egy bonyolult hálózatot alkotva biztosítják, hogy a sejtciklus egyes fázisátmenetei kizárólag egy irányba és irreverzibilisen játszódjanak le. A rendszer komponensei olyan biokémiai kapcsolóknak tekinthetők, amelyek aktivációs-inaktivációs lépésekkel, visszacsatolós kölcsönhatásokkal, minden vagy semmi alapon biztosítják a sejtciklus szabályos lefolyását. A szabályozó rendszer robusztussága és a mechanizmusok átfedése biztosítja, hogy még akkor is megbízhatóan működjön, ha az egyik komponense meghibásodik.

2.2 A fehérjelebontás szerepe a sejtciklus szabályozásában

A sejtciklus szabályos lefolyásához nemcsak a különböző Cdk-k megfelelő sorrendben történő aktiválódására van szükség, hanem fontos az aktivitásukat szabályozó fehérjék lebontása is akkor, amikor már nincs szükség rájuk.

A fehérjelebontás szabályozza a sejtciklus két legkritikusabb lépését, a DNS replikációját és a kromoszómák szegregációját. A mitózis késői szakaszában és a G1 fázis elején megtörténik a DNS átírásához szükséges prereplikatív komplexeknek az összeszerelődése a replikációs origókon, aminek elengedhetetlen feltétele a mitotikus ciklinek lebontásával járó Cdk inaktiváció (Fujita, 1999). Ezt követően az S fázisban az S-ciklinek szintjének emelkedése aktiválja az S-Cdk-t, ami számos, a DNS replikációjához szükséges fehérjék szintézisét indukálja. A fehérjelebontásnak nemcsak a mitotikus kinázok aktivitásának szabályozásában van szerepe, hanem indirekt módon biztosítja, hogy ciklusonként csak egyszer következhesen be a DNS replikációja.

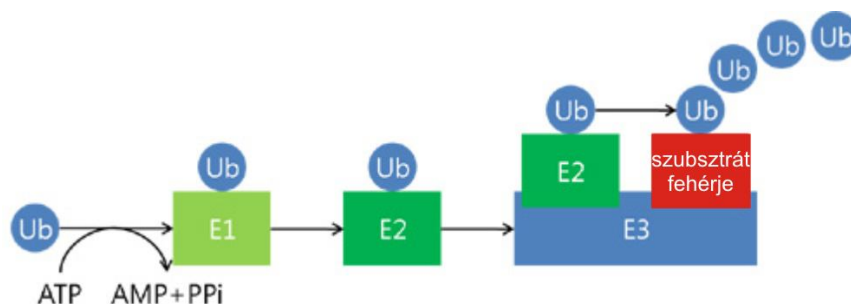
A DNS átírása után a leánykromatidákat egy több alegységes fehérjekomplex, az ún. kohezin tartja össze egészen a metafázis végéig. A kohezin komplexet 4 alegység, az Smc1, Smc3, Scc1 és Scc3 építi fel (Hopfner, 2003). A metafázis-anafázis átmenet során a

leánykromatidák szétválását egy proteáz, a Szeparáz hirtelen aktivációja teszi lehetővé. A Szeparáz az Scc1 hasításával a kohezin komplex szétesését eredményezi, és megindul a kromatidák pólusirányú vándorlása. A sejtciklus alatt, amíg a Szeparáz enzimre nincs szükség, a Szekurin anafázis inhibitor molekula tartja inaktív formában, heterodimer komplexet alkotva vele (Uhlmann, 1999; Yanagida, 2000). A gátló fehérje szabályozott proteolízise teszi lehetővé, hogy a kromoszómaszegregáció megfelelő időben és egyszerre történjen.

A ciklinek, a szekurin és más sejtciklust szabályozó fehérjék lebontását a sejt egy aktív, energiát igénylő folyamattal éri el. A degradáció előtt ezekhez a fehérjékhez ubikvitin molekulák kapcsolódnak, ami feltétele a fehérjék lebontásának (Hershko, 1983).

2.3 Az ubikvitin-függő proteasómális fehérjelebontás

Az ubikvitin molekula egy mindössze 76 aminosavból álló, globuláris szerkezetű fehérje, amely eukariótákban erősen konzerválódott. A fehérjék poszttranszlációs módosítása ubikvitin molekulákkal megváltoztatja azok stabilitását, aktivitását és lokalizációjukat (Pickart, 2004).



2. ábra Az ubikvitin-függő fehérjelebontás mechanizmusa. Az E1 enzim ATP felhasználásával aktiválja az ubikvitint (Ub, kék körök), majd átkerül az ubikvitin-konjugáló enzimre (E2). Az ubikvitinek áthelyezését az E2 enzimről a célfehérjére az E3 ubikvitin-ligáz aktivitása katalizálja.

Az ubikvitin célfehérjékhez történő kötését egy enzimkaszád végzi. A folyamat első lépése az ubikvitin aktiválódása, amelyet az E1 ubikvitin-aktiváló enzim végez. Ennek során, ATP felhasználásával egy nagyenergiájú tioészter kötés jön létre az ubikvitin molekula karboxi-terminálisán lévő glicin, és az E1 ubikvitin-aktiváló enzim aktív centrumában lévő cisztein oldallánca között. Ezután az aktivált ubikvitin átkerül az E2

ubikvitin-konjugáló enzim ciszteinjére, újabb tioészter kötést formálva. Következő lépésben pedig megtörténik az aktivált ubikvitin célfehérjére juttatása. Ehhez a reakcióhoz egy harmadik enzim, az E3 ubikvitin-ligáz aktivitása szükséges, ami kölcsönhatásba lépve a célfehérjével, és az E2-ubikvitinnel, lehetővé teszi az ubikvitin áthelyezését a szubsztrátfehérje valamelyik kitüntetett lizin oldalláncára (2. ábra). Itt az ubikvitin karboxil csoportja és a szubsztrátfehérje lizin oldallánca között izopeptid kötés alakul ki. Ezt követően a fehérjéhez kapcsolt ubikvitin saját lizin oldalláncához több ubikvitin molekula is hozzákapcsolódhat, poliubikvitin láncot alkotva. Attól függően, hogy az ubikvitin hét lizin oldallánca közül melyikkel kapcsolódva hozza létre a poliubikvitin láncot, dől el a fehérje sorsa. Ha a célfehérjén a 48-as (Hochstrasser, 1996), illetve magasabbrendű eukariótákban 11-es pozícióban (Jin, 2008) elhelyezkedő lizin oldalláncukon keresztül kapcsolódó ubikvitin molekulákból álló lánc alakul ki, az degradációs jelként szolgál. Bizonyos fajokban a megfelelő méretű poliubikvitin lánc összeszerelődését egy nemrégiben felfedezett enzimsalád, az E4 ubikvitin-lánc elongációs faktorok segítik (Hoppe, 2005). A poliubikvitilált fehérjéket egy hatalmas fehérjelebontó komplex, a 26S proteaszóma ismeri fel, majd megköti azokat, és 9-21 aminosav hosszúságú peptidekre bontja (Hershko, 1994; Zachariae, 1999). A degradációs jelként szolgáló poliubikvitin láncokat az ún. dezubikvitiláló enzimek (DUB) lehasítják a fehérjékről. Az így felszabadult ubikvitinek újra elérhetőek lesznek az ubikvitin-aktiváló E1 enzim számára (Song és Rape, 2008).

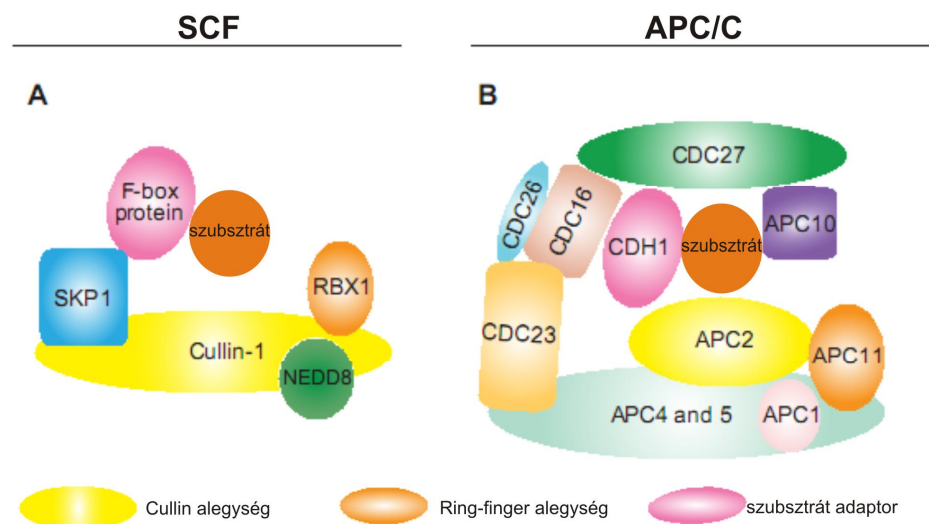
Az E1 ubikvitin-aktiváló enzimből csak egy található a sejtekben, kivéve a gerinceseket, ahol kettő (Pelzer, 2007). Az E2 ubikvitin-konjugáló enzimekből mintegy tucat van, amelyek számos (száznál több) E3 enzimmel léphetnek kölcsönhatásba. Az ubikvitiláló folyamatban az E3 enzimek a célfehérjék és E2 enzimek felismerésével, és megkötésével biztosítják a folyamat specifikitását.

2.4 A sejtciklus szabályozásában résztvevő ubikvitin-ligázok

Az E3 enzimek közül a sejtciklus szabályozásában két E3 ubikvitin-ligáz enzimkomplexet azonosítottak. Az egyik a G1-S és S-G2 fázisátmenetekben ható SCF komplex, amely három alegységének kezdőbetűiből kapta a nevét: Skip1, Cullin és E-box.

A másik E3 enzim pedig a kromoszóma-szegregációt, és a mitózisból való kilépést szabályozó anafázis promoting komplex, vagy APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome; Peters, 1998; Reed, 2003).

Mindkét E3 enzimkomplex az ún. RING finger típusú ubikvitin-ligáz enzimcsaládba tartozik. Szerkezetüket tekintve mindkét E3 aktív centrumának felépítésében részt vesz egy RING finger domént hordozó fehérje. A RING finger domén 4 cink ion megkötésére, és fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására képes. Ezen keresztül valósul meg az ubikvitinnel töltött E2 enzim kötődése. Továbbá mindkét E3 szerkezeti vázát egy cullin fehérje alkotja (3. ábra).



3. ábra A RING finger típusú ubikvitin-ligázok szerkezete megfeleltethető egymásnak, lásd azonos színek (Moccario és Rape, 2012. alapján). **A:** Az SCF komplexnek három központi alegysége van: a Cullin-1, az RBX1 és a SKP1, de számos különböző F-box fehérjével együttműködik. **B:** Az APC/C komplexet legalább 13 alegység építi fel. Aktivitását két szubsztrát adaptor molekula, a Cdh1 és a Cdc20 határozza meg.

Annak ellenére, hogy az SCF és APC/C komplexek szerkezetüket és funkciójukat tekintve nagyon hasonlóak, azok a mechanizmusok, amelyek a szabályos működésükhöz szükségesek nagyon különbözőek (Morgan, 2006). A SCF komplex csak foszforilált szubsztrátok megkötésére képes. Az F-box alegysége köti meg a szubsztrátot, és az ubikvitiláláshoz alkalmas pozícióban tartja a RING finger alegység által kötött E2 számára. Az SCF központi alegységeinek aktivitása állandó a sejtciklus alatt. Aktivitását a szubsztrátok foszforiláltsága és az F-box fehérjével szembeni affinitása határozza meg, valamint, hogy rendelkezésére áll-e megköthető E2 enzim (Harper, 2002). Ezzel

ellentétben nem szükséges, hogy az APC/C célfehérjéi foszforiláltak legyenek. Aktivitását az egész sejtciklus alatt alegységeinek foszforiláltsága, valamint különböző aktivátor és inhibitor fehérjék kötődése szabályozza.

Az APC/C komplexre a sejtciklus szabályozásában résztvevő ciklinek és Cdk inhibitorok kutatása során bukkantak rá. Karmosbeka (*Xenopus leavis*) petékből és ehető kagylóból (*Spisula solidissima*) készített sejt kivonatok vizsgálata során megállapították, hogy a Ciklin B ubikvitilálásáért egy hatalmas, mintegy 1500 kDa fehérje komplex felelős (Sudakin, 1995; King, 1995). Ezt a komplexet cikloszómának (cyclosome), illetve a karmosbékában azonosított hasonló tulajdonságú fehérjekomplexet pedig anafázis promoting komplexnek (APC) nevezték el. A két elnevezés egyesítéséből született meg az APC/C jelölés. Szerepét genetikai módszerekkel sarjadzó élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) is igazolták (Irniger, 1995).

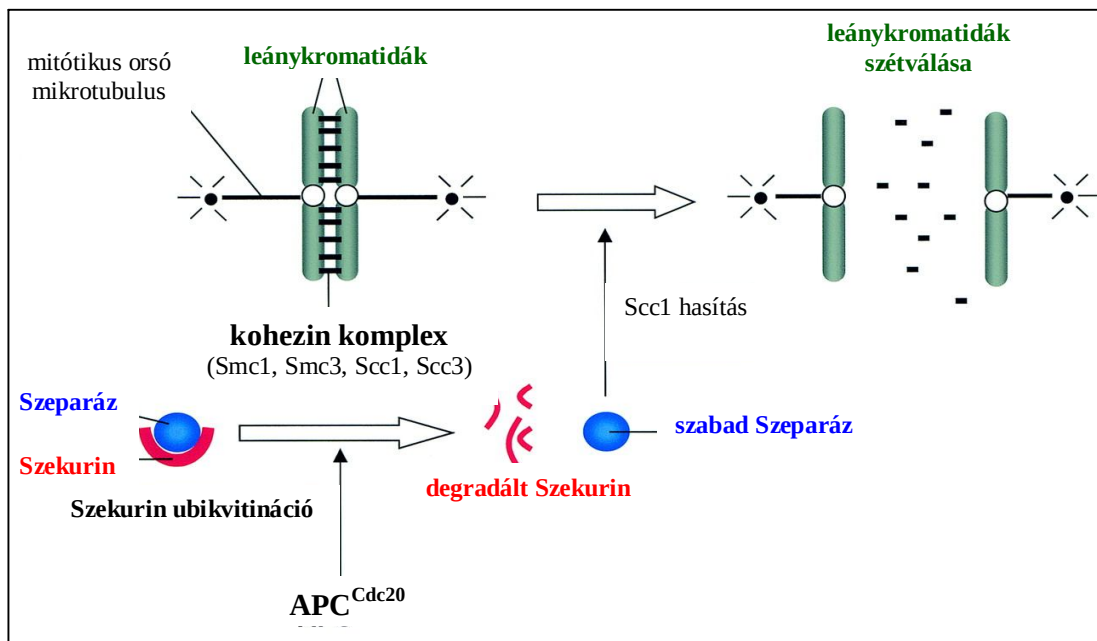
Az APC/C a ma ismert legnagyobb és legbonyolultabb ubikvitin-ligáz. Mérete sokkal nagyobb az SCF komplexnél. Pontos szerkezete még nem ismert, de legalább 13 alegység építi fel. Alegységeit több fajban is azonosították, melyek többsége erősen konzerválódott az evolúció folyamán. Még tisztázatlan, hogy miért ilyen nagy ez a komplex, és az egyes alegységek szerepéről is keveset tudunk.

3. Az APC/C aktivitásának szabályozása

Az APC/C koncentrációja a Cdk-hoz hasonlóan közel állandó a sejtciklus során, azonban csak a metafázis-anafázis átmenet során aktiválódik, és aktivitása fennmarad egészen a G1 fázis végéig (Kramer, 1998). Aktiválásához különböző alegységeinek foszforilációja szükséges, melyeket a mitotikus Cdk és a Polo kináz végez (Yamada, 1997; Kramer, 2000). Az APC maximális aktivitásának eléréséhez aktivátor-alegységek kötődése szükséges. Legfontosabb aktivátor fehérjéi a Cdc20 és a Cdh1 (Visintin, 1997), valamint a meiózis specifikus Ama1 (Cooper, 2000.).

A Cdc20 aktivátor a metafázis-anafázis átmenet előtt kapcsolódik az APC/C-hez, és a kialakult APC/C^{Cdc20} komplex biztosítja a leánykromatidák szétválását, és a mitózisból történő kilépést. Az APC^{Cdc20} ezt úgy éri el, hogy ubikvitilálja a szekurint és a mitotikus ciklineket (4. ábra). A mitotikus ciklinek lebontásával inaktíválódik az M-Cdk. A mitotikus

kináz aktivitásának hiányában csökken az APC/C foszforilálása, aminek következtében disszociálódik a Cdc20. Így az APC/C^{Cdc20} aktivitás eltűnik a késői anafázisra, és a helyét az APC/C^{Cdh1} komplex veszi át (Kramer, 2000).



4. ábra Az APC/C szerepe a leánykromatidák szétválásában (Yeong, 2004. alapján). A metafázis ideje alatt a kromoszómákat egy több alegységes komplex, a kohezin tartja össze. Az APC/C^{Cdc20} komplex ubiquitilálja a Szekurin anafázis inhibitor molekulát, szabaddá téve ezzel a Szeparázt. A metafázis-anafázis átmenet idején a gátlás alól felszabaduló Szeparáz az Scc1 alegység hasításával a kohezin komplex szétesését eredményezi, és megindul a leánykromatidák vándorlása.

A mitózis alatt az APC/C^{Cdc20} komplex az orsó-összeszerelési ellenőrzési pont (spindle assembly checkpoint) szabályozása alatt áll. Ez a rendszer felügyeli, hogy az összes kromoszóma hozzákapcsolódott-e a mitotikus orsó mikrotubulusaihoz. Ha ez nem történik meg, akkor a Mad2 és a BubR1 mitotikus ellenőrző fehérjék gátolják a Cdc20 aktivátor APC/C-hez kötődését, inaktíválva ezzel az APC/C-t (Kramer, 1998).

A Cdh1 aktivátor fehérjét az Emi1 nevű inhibitor, és a Cdk1-Ciklin B által végzett foszforiláció akadályozza az APC/C-hez kapcsolódásban az anafázis kezdetéig. Az inhibitorok azonban az anafázis során lebomlanak. A mitotikus ciklinek lebontásával pedig inaktíválódik a Cdk, aminek következtében megszűnik a foszforiláció, amely az S és G2 fázis alatt inaktív állapotban tartotta (Jaspersen, 1999). A defoszforilált Cdh1 így képes

kötődni az APC/C-hez, a Cdc20 helyére. A kialakuló APC/C^{Cdh1} komplexnek egyik szubsztrátja maga a Cdc20, aminek ubikvitinációjával az anafázis végére teljesen eltűnnek az APC/C^{Cdc20} komplexek. A G1 fázis végéig fennmaradó APC/C^{Cdh1} komplexek az S és M ciklinek ubikvitinációjával lehetővé teszik G1/S-ciklin-Cdk komplexek felhalmozódását, és egy újabb sejtciklus elindulását (Morgan, 2006).

A Cdc20 és Chd1 aktivátorok, az SCF komplex F-box fehérjéjéhez hasonlóan határozzák meg az ubikvitin-ligáz szubsztrát-specifitását. Ezek az aktivátorok egy úgynevezett WD40 domént tartalmaznak, amelyről kimutatták, hogy feltehetően ez lép kölcsönhatásba a szubsztrátokban található ubikvitinációs szignálként szolgáló felismerő szekvenciákkal, létrehozva egy háromkomponensű, APC/C-aktivátor-szubsztrát komplexet (Passmore és Barford, 2005).

Az APC/C ubikvitin-ligáz aktivitásához E2 ubikvitin-konjugáló enzimek együttműködése szükséges. Eddig négy különböző ubiquitin-konjugáló enzim kölcsönhatását igazolták. Ezek az Ubc4/Ubc5 E2 enzimsaládba tartozó UbcH5 (vagy Ubc4), az E2-C családba tartozó UbcH10 (UbcX vagy E2-C) (Rape és Kirschner, 2004; Máthé, 2004), E2-25K (Haldeman, 1997; Seino, 2003), és a nemrégiben azonosított E2S/Ube2S (Steen, 2008; Williamson, 2009; Wu, 2009; Garnett, 2009). Ezek homológjait számos modellorganizmusban azonosították.

Emlős sejtvonalakban az UbcH10 inaktivációja az APC/C funkciójának elvesztését eredményezte, az UbcH5 inaktivációja viszont nem vezetett erre az eredményre (Bastians, 1999; Townsley, 1997). Hasadó élesztőben (*Schizosaccharomyces pombe*) és ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) izolálták az UbcH10 homológjainak, az Ubc11 és a Vihar mutánsait, amelyek esszenciálisnak bizonyultak az APC/C működéséhez (Osaka, 1997; Máthé, 2004). Hasadó élesztőben két E2 enzim működése is esszenciálisnak bizonyult. Az UbcP4/Ubc11 monoubikvitilálja a szubsztrátokat, az UbcP1/Ubc4 pedig folytatja a K48-kapcsolt poliubikvitin lánc összeszerelését. Mindkét enzim működése szükséges a Cdc13 mitotikus ciklin ubikvitinációjához (Seino, 2003). Ennek a folyamatnak analógjaként, sarjadzó élesztőben is azonosították a poliubikvitin láncok felépítésében résztvevő Ubc4 lánckezdő, és az Ubc1 lánchosszabbító E2 enzimeket (Rodrigo-Brenni és Morgan, 2007).

Humán és *Drosophila* S2 sejtkultúrákban *in vitro* kísérletekben kimutatták, hogy a K11-kapcsolt poliubikvitin lánc iniciációját az UbcH10 vagy az UbcH5, míg a lánc

hosszabbítását az Ube2S végzi (Wu, 2010; Williamson, 2009). Normális körülmények között az Ube2S nem bizonyult esszenciálisnak, azonban mitotikus gátlás alatt álló sejtekben, hiányában nem történt meg a mitózisból való kilépés, és az APC/C legfontosabb szubsztrátjainak ubikvitinációja (Garnett, 2009). Annak ellenére, hogy számos kísérleti adat rendelkezésünkre áll az APC/C-vel specifikusan együttműködő E2 enzimekről, nem igazán tisztázott miért is ennyire kritikusak az APC/C működéséhez, és hogyan történik meg kapcsolódásuk.

4. Az APC/C célfehérjéi és felismerésük

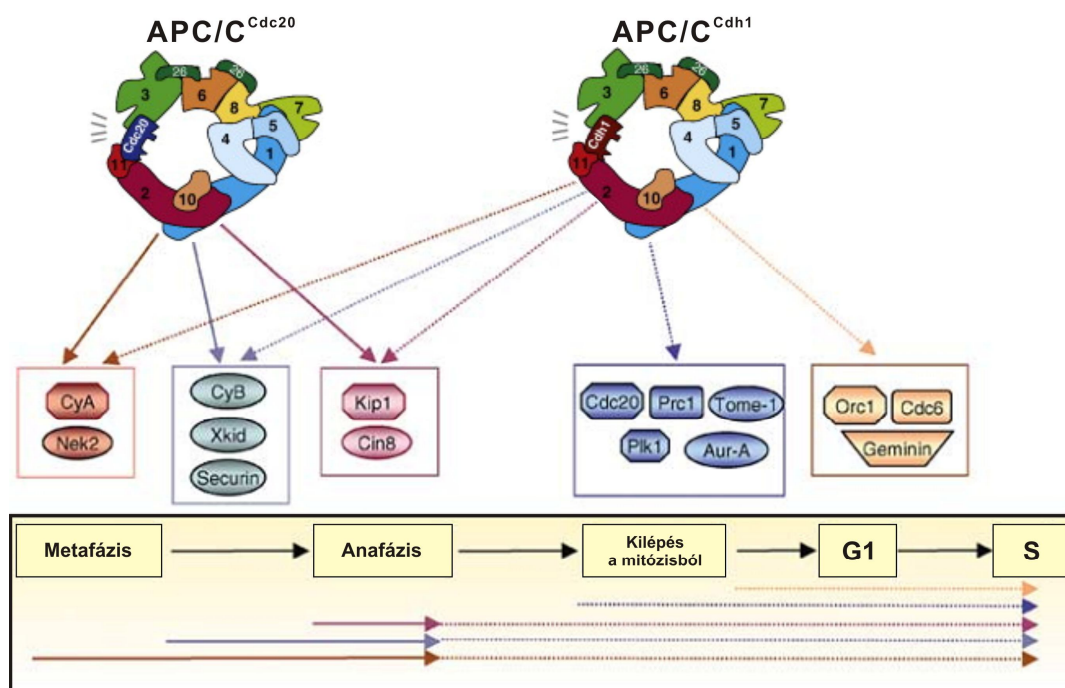
Az APC/C szubsztrát-felismerésének molekuláris mechanizmusa még kevésbé ismert. A célfehérjék tartalmaznak egy néhány aminosavból álló destruktív jelet, vagy degront, amely szükséges az ubikvitinációhoz.

A Ciklin B tanulmányozása során fedeztek fel egy 9 aminosavból álló szekvencia-motívumot, amely szükséges és elengedhetetlen feltétele volt az ubikvitinációnak. Ezt destruktív-box-nak (D-box) nevezték el (King, 1996). Ugyancsak destruktív jelként szolgál az ún. KEN motívum is (KEN-box), amelyet *Xenopus* sejtextraktumokban Pfleger és munkatársai mutattak ki először (Pfleger, 2000). Az eddig ismert APC/C szubsztrátok legalább az egyik degront tartalmazzák. A D-box gyakrabban, a KEN-box általában a D-box-szal együtt fordul elő, de mindkét degron akár több kópiában is jelen lehet a fehérjékben. Ezek a variációk fokozzák az APC/C szubsztrátspecifitását. A D-box-ot az APC/C^{Cdc20} és az APC/C^{Cdh1} komplex is felismeri, a KEN-box valószínűleg csak az APC/C^{Cdh1} felismerő szekvenciája (Pfleger, 2001b).

Az APC/C kölcsönhatását a szubsztrát-fehérjékkel a Cdc20 és Cdh1 aktivátor fehérjék segítik úgy, hogy WD40 doménjeik kölcsönhatnak a célfehérjék destruktív jelét alkotó aminosavakkal. A D-box konszenzus szekvenciája RxxLxxx(I/V)xN, ahol az R arginint, az L leucint, az I izoleucint, a V valint, az N aszparagint jelöl, az x pedig bármilyen aminosav lehet. A KEN-box konszenzus szekvenciája KENxxxE/D/N, a K lizint, az E glutaminsavat, a D prolint jelent (Barford, 2011). *In vivo* kísérletekben kimutatták, hogyha ezekben a destruktív motívumokban a három konzervált arginin, leucin és aszparagin aminosav közül bármelyiket elrontják, az gátolja a fehérje lebontását

(Glotzer, 1991). Azonban az APC/C az aktivátorok bekötődése nélkül is képes néhány szubsztrátja (pl: Nek2A és Ciklin A), és tandem elrendezésű D-box motívumokat tartalmazó szekvencia megkötésére (Hayes, 2006; Geley, 2001; Yamano, 2004). Ezek a megfigyelések azt feltételezik, hogy az APC/C-aktivátor komplexek több szubsztrátkötő helyet is tartalmaznak.

Az APC/C szubsztrátjainak felismerésével, és megfelelő időben történő ubiquitilálásával szabályozza a mitózis legfontosabb lépéseit (5. ábra). A prometafázis idején aktiválódó APC/C^{Cdc20} először a Ciklin A-t és Nek2 mitotikus kinázt ubiquitilálja. Ezután olyan fehérjék következnek, melyeknek lebontása szükséges az anafázisba lépéshez. Ilyenek a Szekurin és kinezin motorfehérjék. Ezeknek a fehérjéknek a lebontása szükséges a leánykromatidák szétválásához, az osztódási orsó megnyúlásához és szétszereléséhez. A Ciklin B lebontásával inaktiválódik a Cdk1, és lehetővé válik a mitózisból való kilépés (Castro, 2005).



5. ábra Az APC/C^{Cdc20} és az APC/C^{Cdh1} célfehérjéi a sejtciklus során (Castro, 2005. és Leuken, 2008. alapján). Az APC/C komplexben sötétbarna szín jelöli az Apc2 és Apc11, narancs szín az Apc10, sárga az Apc8, sötétzöld az Apc3, világoszöld az Apc7, kék az Apc1, világoskék az Apc4 és Apc5 alegységeket. A Cdc20 sötétkéssel, a Cdh1 bordó színnel jelölt. Az azonos színnel jelölt fehérjék lebontása a sejtciklus azonos fázisában kezdődik. A folyamatos nyilak az APC/C^{Cdc20}, a pontozott nyilak az APC/C^{Cdh1} függő degradációt jelölik.

A Cdh1 aktivátor fehérje korai kötődését az APC/C-hez megakadályozza az Emi1 mitotikus inhibitor, és a Ciklin B-Cdk1 által végzett foszforiláció (Di Fiore és Pines, 2008). Az anafázis során a Cdk-k aktivitásának csökkenése, valamint az inhibitorok lebomlása következtében a Cdh1 felszabadul a gátlás alól, és kötődik az APC/C-hez.

Az APC/C^{Cdh1} komplex aktivitása az anafázis végétől a G1 fázis végéig fennmarad. Az APC/C^{Cdh1} ubikvitilálja az anafázis befejezéséhez szükséges fehérjéket, a Wee1 kináz lebontásában szerepet játszó Tome-1-t, és a Polo kináz és Aurora kináz fehérjéket (Ayad, 2003; Castro, 2005). A G1 fázis alatt az APC/C^{Cdh1} aktivitás biztosítja a Cdk-ciklin aktivitás alacsonyszinten tartását. Ez lehetővé teszi az S-Ciklinek felhalmozódását, és a sejt belép az S-fázisba. A G1 fázisban összeszerelődnek Cdt1, Cdc6 és MCM DNS-helikáz fehérjékből álló pre-replikációs komplexek. Azonban a Cdt1 fehérjét a Geminin inhibitor molekula mindaddig inaktív állapotban tartja, míg az APC/C^{Cdh1} nem ubikvitilálja. A pre-replikatív komplexbe be nem épült, szabad Cdc6 fehérjéket is az APC/C^{Cdh1} ubikvitilálja, megakadályozva ezzel a replikáció újraindítását. Később ezt az állapotot a stabilizálódott Geminin tartja fent (Melixetian, 2004). A G1 fázis végén az APC/C^{Cdh1} ubikvitilálja a vele együttműködő UbcH10 E2 ubikvitin-konjugáló enzimet, önmagát inaktíválva ezzel (Rape és Kirschner, 2004).

5. Az APC alegységei

Az APC/C igen nagyméretű, több alegységből álló komplex, pontos alegység-összetétele és szerkezete még nem tisztázott. Alegységeit biokémiai és genetikai módszerekkel már több fajban is izolálták (2. táblázat). Karmosbékában legalább 8, sarjadzó élesztőben 12 alegység építi fel, hasadó élesztőben és humán sejtvonalakban eddig 13 alegységét azonosították (2. táblázat). A különböző fajok APC/C alegységeinek többsége nagyfokú szekvencia-homológiát mutat, ami azt jelzi, hogy az APC/C, a többi sejtciklus szabályozó fehérjéhez hasonlóan, konzerválódott az evolúció során (Castro, 2005).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>Gerincesek</i>	<i>Domén</i>
alegység				
Apc1	Cut4	CG9198/Shattered	Apc1/Tsg24	PC repeat
Apc2/Rsi2	Apc2	CG3060/morula	Apc2	Cullin-domén
Cdc27	Nuc2	CG8610/mákos	Apc3/Cdc27	TPR
Apc4	Lid1	CG32707	Apc4	Szerkezet nélküli
Apc5	Apc5	CG10850/Ida	Apc5	TPR
Cdc16	Cut9	CG6759	Apc6/Cdc16	TPR
-	-	CG14444	Apc7	TPR
Cdc23	Cut23	CG2508	Apc8/Cdc23	TPR
Apc9	-	-	-	-
Doc1	Apc10	CG11419	Apc10/Doc1	Doc-domén
Apc11	Apc11	CG18042/Lemming	Apc11	RING-finger
Cdc26	Hcn1	CG17343	Cdc26	Szerkezet nélküli
Swm1	Apc13	CG6355	Swm1/Apc13	Szerkezet nélküli
-	Apc14	-	-	Nem ismert
-	Apc15	-	Apc16	Nem ismert
Mnd2				Nem ismert
aktivátor				
Cdc20	Cdc20	Fizzy	Cdc20	WD40, IR motívum
Cdh1	Cdh1	Fizzy related	Cdh1	WD40, IR motívum
Ama1	-	Fizzy related2	-	WD40, IR motívum

2. táblázat Az APC/C alegységei és szabályozó fehérjéi.

Az APC/C legnagyobb alegysége a ~200kDa-os Apc1. Az Apc1 a C-terminális végén hét-nyolc, tandem elhelyezkedő, 34-35 aminosavból álló Mgf1 és Mgf2 motívumot hordoz. Ugyanezeket a motívumokat megtalálhatjuk a 26S proteaszóma Rpn1 és Rpn2 alegységeiben, ezért ezeket a közös szekvencia ismétlődéseket a proteaszóma/ciklózóma után “PC repeat”-eknek is nevezik, azonban szerkezetük és funkcionális jelentőségük még nem ismert (Barford, 2010). Mivel ez az egyik legnagyobb alegység, elképzelhető hogy az APC/C szerkezeti vázát alkotja, amihez a többi alegység kapcsolódik (Thronton, 2006).

Az Apc2 alegység szerkezetét tekintve a Cullin fehérjék családjába tartozik, és szekvencia-homológiát mutat az SCF komplex Cdc53/Cullin-1 alegységével. Tisztított fehérjepreparátumok vizsgálatával kimutatták, hogy a Cdc53/Cullin-1 szükséges az SCF komplex és a Cdc34 E2 enzim közötti kölcsönhatás kialakításához (Patton, 1998). Ezért elképzelhető, hogy az APC/C esetében az Apc2 alegység lép kölcsönhatásba az E2 ubikvitin-konjugáló enzimmal.

Az APC/C alegységeiben leggyakrabban előforduló szekvencia motívum az ún. “tetratricopeptide repeat” vagy TPR. Élesztő esetében négy, gerincesekben öt APC/C alegységben: az Apc3/Cdc27, Apc5, Apc6/Cdc16, Apc7 és Apc8/Cdc23 alegységekben

azonosítottak ilyen motívumokat (Lamb, 1994; Yanagida, 2000). Ezek a 34 aminosavból álló szerkezeti motívumok általában 9-10, de akár 12-15 kópiában is jelen lehetnek a fehérjékben. A TPR motívumot az APC/C alegységeken kívül számos más fehérjében is azonosították. Kimutatták, hogy szuperhelikális szerkezetük fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására képes, mintegy szerkezeti vázat alkotva heterooligomer komplexek alegységei között (Blatch és Lassle, 1999). Valószínűleg az APC/C alegységek esetében is ez a szerepük.

Sarjadzó és hasadó élesztőn végzett kísérletek alapján az Apc4 és Apc5 alegységek esszenciálisak, és a TPR alegységeket kapcsolják az APC1-hez (Thornton, 2006; Ohi 2007). Fonalféregben (*Caenorhabditis elegans*) azonosították az Apc4 ortológját, az Emb-30-at, melynek mutánsaiban a mitotikus sejtek metafázisban vesztegelnek (Futura, 2000).

Élesztőben az Apc9, Apc13 és Cdc26 alegységek az APC/C szerkezetének stabilizálását biztosítják. Az Apc9 alegység az Apc3/Cdc27 megfelelő kötődéséhez, míg a Cdc26 alegység csak magas hőmérsékleten szükséges az Apc6/Cdc16, Apc3/Cdc27 és az Apc9 kapcsolódásának fenntartásához (Zacharie, 1998b).

Az Apc10/Doc1 alegységet először sarjadzó élesztőben azonosították (Hwang, 1997), de később megtalálták a humán és hasadó élesztő APC/C komponenseként is (Kominami, 1998; Grossberger, 1999; Kurasawa, 1999). A sarjadzó élesztőben a Doc1 szükséges a Clb2 lebontásához a mitózisból történő kilépés során. Az Apc10/Doc1 alegység DOC doménjét már több olyan fehérjékben is kimutatták, amelyek más ubikvitinációban szerepet játszó doméneket - pl. cullin vagy HECT - is tartalmaznak. Az Apc2 alegységben cullin domén található, ezért elképzelhető, hogy az Apc10/Doc1-el együtt egy funkcionális egységet alkotnak. Egyes kísérleti adatok szerint az Apc10/Doc1 szerepet játszik a szubsztrátok felismerésében és megkötésében (Passmore, 2003).

Az APC/C legkisebb ismert alegysége a 19 kDa-os Apc11. Ez az alegység hordozza a RING finger domént, amely alapján az APC/C-t a RING finger típusú ubikvitin-protein ligázok csoportjába sorolták. Az Apc11-et számos fajban azonosították, és vizsgálták az APC/C felépítésében és működésben betöltött szerepét. Az élesztőben izolált Apc11 hőérzékeny mutánsokban a mitózisban lévő sejtek megrekednek metafázisban, és képtelenek a leánykromatidák szegregációját indukálni (Zacharie, 1998b). Az Apc11-et fonalféregben is azonosították, és az RNS interferencia módszerével csendesítették, aminek következtében a petesejtek osztódása megrekedt az első meiotikus osztódás során (Moore,

2004). Lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) kimutatták, hogy az Apc11 az Apc2 egy heterodimer komplexet alkot (Capron, 2003b).

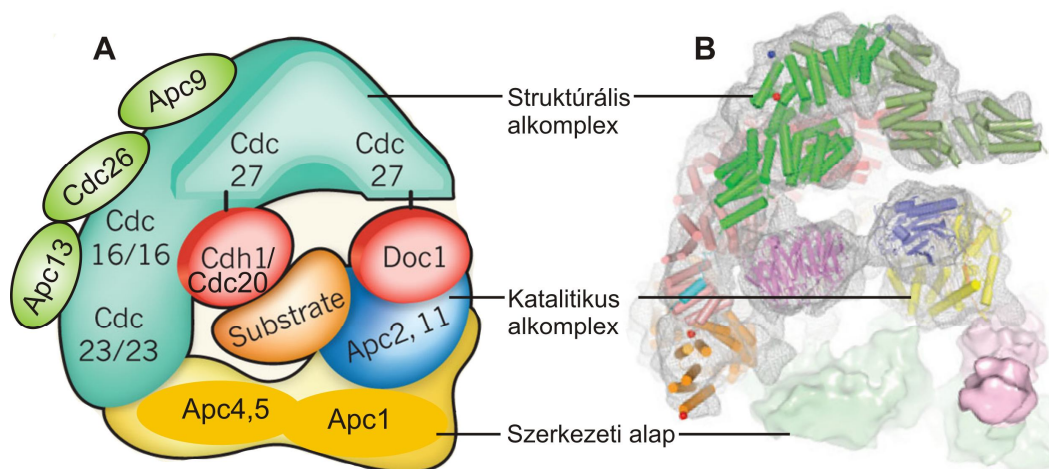
A RING finger domén konzervált cisztein és hisztidin oldalláncokat tartalmaz, amelyek két Zn^{2+} ion megkötésére képesek, és egy felszínt biztosítanak a fehérje-fehérje kölcsönhatások során (Borden és Freemont, 1996). HeLa sejtekben a RING finger domént tartalmazó Apc11-ről hidrogén-peroxid hatására a Zn^{2+} ionok ledisszociálnak, ami megakadályozza, hogy kölcsönhatásba lépjen az Ubc4 E2 enzimmel, és így gátolja az APC/C ubikvitin-ligáz aktivitását (Chang, 2004). Élesztőben és humán sejtvonalakban kimutatták, hogy az Apc11 önmagában, vagy az Apc2 alegységgel, E1 és E2 enzimek jelenlétében ubikvitinációra képes, azonban ez az aktivitás nem mutatott szubsztrát-specifitást. E megfigyelések alapján az Apc2-t és az Apc11-et az APC/C katalitikus alkompexének tekintik (Tang, 2001)

6. Az APC/C felépítése

Az APC/C felépítésére vonatkozó ismereteink nagyrészt sarjadzó és hasadó élesztőben végzett, valamint HeLa sejtekből és karmosbékából izolált APC/C fagyasztásos- és fagyasztásos-negatív festéses elektron mikroszkópos vizsgálatokon alapulnak. Habár a különböző fajokból származó szerkezeti adatok részleteiben eltérőek, összességében mindegyik tanulmány azt mutatja, hogy APC/C alegységei egy háromszögformát képeznek úgy, hogy egy külső fehérjehéjat alkotnak, létrehozva egy központi üreget (Gieffers, 2001).

HeLa sejtekből izolált APC/C vizsgálata alapján azt feltételezik, hogy a központi üreg egy reakciókamra, amelyben az ubikvitilálás történik (Gieffers, 2001). Karmosbeka APC/C-n végzett kísérletek szerint a Cdh1 aktivátor az APC/C külső felületéhez lokalizálódik, közel az Apc2 alegységhez. Ez alapján feltételezhető, hogy az ubikvitináció inkább az APC/C felületén, nem pedig a belsejében történik. Karmosbeka és humán APC/C esetében azt is kimutatták, hogy az APC/C két nagyobb szerkezeti egységből áll, egy asztali lámpához hasonló elrendeződésben, melynek részei flexibilisek, és a Cdh1 aktivátor kapcsolódásával az egyes részek elmozdulnak. Az asztali lámpához hasonlító szerkezet alapját a legnagyobb alegység, az APC1 képezi. Ehhez kapcsolódnak az Apc2 és Apc11

katalitikus alegységek, a TPR motívumot hordozó alegységek pedig együttesen, ezektől távolabb helyezkednek el (Dube, 2005; 6. ábra).



6. ábra Az APC/C szerkezeti modellje (Foe és Toczycki, 2011. alapján). **A:** Az APC/C komplex vázát a legnagyobb alegység, az Apc1 képezi. Ehhez kapcsolódik az Apc2, Apc11 és Apc10/Doc1 alegységek által alkotott katalitikus alkompex, valamint az Apc4 és Apc5 alegységeken keresztül a TPR alegységek által alkotott strukturális alkompex. **B:** Az élesztő APC/C szerkezete elektron mikroszkópos és röntgen kristallográfiás vizsgálatok alapján (Moccario és Rape, 2012. alapján).

Hasonló eredményeket kaptak a sarjadzó élesztő APC/C alegységek topológiájának genetikai és biokémiai módszerekkel végzett vizsgálatával is. Kimutatták azt is, hogy az Apc10/Doc1 az Apc2 alegységhez kapcsolódik, a TPR alegységek pedig az Apc4 és Apc5 alegységeken keresztül kapcsolódnak az Apc1-hez. (Thronton, 2006; Vodermaier 2003). Sarjadzó élesztőben a Cdc26 alegység nem esszenciális az APC/C működéséhez, de magas hőmérsékleten szükséges a Apc6/Cdc16 és a Apc3/Cdc27 kapcsolódásának fenntartásához. Az Apc9, Apc13 és Cdc26 a TPR alegységekhez kötődnek, valószínűleg stabilitási faktorként funkcionálnak (Passmore, 2003; Thornton, 2006; 6. ábra).

Sarjadzó élesztőből izolált APC/C-n végzett izotóp beépülési és natív gélszűrési kísérletek alapján, az APC/C szerkezeti alapját alkotó Apc 1 kivételével az alegységek több példányban is jelen vannak a komplexben. Analitikai ultracentrifugálással azt is kimutatták, hogy az APC/C nem csak monomer, hanem dimer formában is előfordul, és így hatékonyabban végzi az ubikvitinációt (Passmore, 2005). Eredményeik alapján felállított modell szerint a TPR alegységek képezik az APC/C szerkezeti vázát, melynek a közepén

egy üreg jön létre.

Csoportunk korábbi eredményei az *ecetmuslica* APC/C alegységeinek vizsgálatából az első szerkezeti modell helyességét igazolják. Eszerint az APC/C két nagyobb szerkezeti egységből épül fel: egy katalitikus és strukturális alkomplexből, a két alkomplex szerkezeti vázát pedig az Apc1 alkotja. A strukturális alkomplexet a TPR-alegységek, az Apc3/Cdc27 (*Drosophilában mákos*), az Apc6/Cdc16, Apc8/Cdc23 és Apc7 alegységek építik fel (Deák 2003, Pál 2007). A TPR alegységek egy interakciós felületet alkothatnak az APC/C felszínén, melyek a felismerik a Cdc20, Cdh1 aktivátorok C-terminális IR motívumait (Vodermaier, 2003; Matyskiela, 2009). Az Apc2 és Apc11 alegységeken kívül a katalitikus alkomplex feltételezett tagja még az Apc10/Doc1, ami ún. processzivitási faktorként stabilizálja a szubsztrát kölcsönhatását a komplexszel (Carrol és Morgan, 2002).

Az APC/C szerkezetét illetően tisztázatlan még, hogy a háromdimenziós szerkezetét feltáró vizsgálatok által kimutatott központi üregben foglalnak-e helyet az E2 enzimek és a szubsztrátok. Az sem ismert még, hogy az APC/C maximális aktivitását eredményező foszforiláció, és az aktivátor molekulák bekötődése következtében milyen konformációs változások történnek az enzim szerkezetében.

7. A *Drosophila* APC/C alegységei

Csoportunk munkáját megelőzően *Drosophila melanogasterben* még kevés információ állt rendelkezésre az ubikvitin-függő fehérjelebontó rendszerről. Egyetlen E2 enzim, a Vihar, és három APC/C alegység genetikai jellemzése történt meg. Az Apc2/Morula, az Apc5/Ida és az Apc3/Mákos alegységeket kódoló gének mutáns alléljai letális fenotípust eredményeznek az egyedfejlődés késői stádiumában, ami bizonyítja, hogy hasonlóan a humán és élesztő homológjaikhoz, ezek az alegységek létfontosságúak *ecetmuslicában* is. Az eddig tanulmányozott APC/C alegységek mutánsainak fenotípusa nagyon hasonló egymáshoz, de lényeges különbségek is megfigyelhetők közöttük.

A *morula* gén gyengébb alléljeinek nősténysteril fenotípusából arra következtettek, hogy az APC2 alegység nemcsak a metafázis előrehaladásához szükséges, hanem mitotikus eseményeket gátol a nőstény ivarsejtjeiben is, amelyekben S és G fázisok ismétlődnek, és ez sterilitáshoz vezet (Kasehevsky, 2002).

Az Apc5 alegységét kódoló *ida* gén mutánsának tanulmányozása során megállapították, hogy az Apc5 nem szükséges a leánykromatidák szeparációjához, és ez alapján azt feltételezik, hogy az Apc5 funkciója csak bizonyos szubsztrátok lebontásához szükséges, a Szekurin degradációjához nem (Bentley, 2002).

Az Apc3/Cdc27 és Apc6/Cdc16 TPR alegységeket az RNS interferencia módszerével tanulmányozták *Drosophila* S2 sejt kultúrában, valamint zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein, GFP) nyomkövetővel ellátott Apc3/Cdc27 és Apc6/Cdc16 alegységeket hordozó embriókban. Megfigyelték, hogy az Apc3/Cdc27 a mitotikus kromoszómákhoz kapcsolódik, az Apc6/Cdc16 pedig nem. Ebből arra következtettek, hogy az a két alegység talán nem minden esetben kapcsolódik egymáshoz, így eltérő összetételű APC/C komplexek alakulhatnak ki *Drosophila* embrióban. A mitotikus gátlásban kapott eltérő morfológiai és biokémiai változások arra utalnak, hogy ezeknek az alegységeknek különböző feladataik lehetnek (Huang, 2002).

Az Apc3/Cdc27 alegységet kódoló *mákos* (*mks*) gén mutációja szintén a mitózis feltartóztatását okozza, a kromoszómák egy metafázis-szerű állapotban vesztegelnek, hibás a mitotikus ciklinek degradációja, de a leánykromatidák elválása esetenként elindul (Deák, 2003).

Nemrégiben izolálták az Apc1 homológjaként azonosított *shattered* (*shtd*) gén mutáns alléljeit. A *shtd* funkciójának kiesése az állatok letalitását, és a szemdiszkszuszban megemelkedett apoptózis miatt, az összetett szemfejlődési rendellenességeit okozza. A mitotikus ciklinek és a String fehérje stabilizálódása miatt a szem R8 fotoreceptorai rendellenesen osztódnak (Tanaka-Matakatsu, 2007).

Csoportunk bioinformatikai módszerekkel azonosította a humán és az élesztő APC/C alegységeket kódoló gének homológjait *Drosophila melanogaster*-ben.

Az Apc6/Cdc16 és Apc8/Cdc23 alegységeket kódoló géneket transzgenikus RNS interferencia módszerével csendesítettük, aminek következtében az állatok korai bábállapotban elpusztultak (Pál, 2007a). Mitotikus, osztódó sejtjeikben az *apc3/mákos* mutánshoz hasonlóan, a kromoszómák túlkondenzálódnak és megrekednek a metafázisban. Ezekben a mutánsokban sem történt meg a Ciklin B lebontása, azonban ellentétben az *apc3/mákos* mutánsban tapasztaltakkal, a Ciklin A lebontása normálisan zajlott.

A *Drosophila* genomban, az élesztő TPR alegységeinek homológjai mellett, azonosítottunk még egy fehérjét, ami a gerincesekre jellemző APC7 alegységgel mutatott homológiát. Az

Apc7 alegységre P elem remobilizációval null mutánst állítottunk elő, amely meglepetésünkre életképes és fertilis volt, bennük a mitotikus ciklinek lokalizációja és lebontása megegyezett a vad típusú állatokban tapasztaltakkal. Különböző molekuláris nyomkövetőkkel ellátott APC/C alegységekkel sikerült kimutatnunk *Drosophila* S2 sejtekben, hogy az Apc7 alegység időlegesen kötődik az APC/C komplexhez, az Apc8/Cdc23 alegység pedig legalább két kópiában van jelen a komplexben (Pál, 2007a).

Az Apc10/Doc1 alegységet kódoló génben homológ rekombinációval állítottunk elő mutációt, ami az állatok korai báb letalitását eredményezte. A mutáns lárváknak kisebb méretű agya, és elcsökevényesedett imágókorongjaik voltak. Gyakran megfigyeltünk poliploid és aneuploid sejteket is, amelyek arra utalnak, hogy ezekben a sejtekben a mitózist követően nem történik meg a citokinézis (Pál 2007b).

Az Apc13 és Cdc26 alegységeket *Drosophilában* eddig még nem írták le, homológjaikat a genomproject nem azonosította a *Drosophila* genomban. Élesztő és humán fehérjeszekvenciákkal homológia-keresést végezve, sikerült azonosítanunk egy olyan fehérjét, ami nagyfokú hasonlóságot mutatott az eddig több fajban is azonosított Apc13 alegységekkel. A fehérjét kódoló CG6355 gén P elem inszerciós alléljai a többi APC/C alegységhez hasonló korai letális, és erős mitotikus fenotípust mutatnak (nem közölt adat). A Cdc26 alegységekre jellemző N-terminális konzervált régióval homológ szakaszt tartalmazó fehérjéből kettőt is azonosítottunk a *Drosophila* genomban. Ezeket a CG17343 és CG3457 gének kódolják. A CG17343 gén egy 84, a CG3457 gén pedig egy 188 aminosavból álló fehérjét kódol. Ezek mérete megfelel az eddig ismert Cdc26 alegységekre jellemző a 65-194 aminosavas mérettartománynak. Mindkét gén kódoló szekvenciáját kiejtve null alléleket állítottunk elő, és ezek fenotípusát vizsgáltuk. A CG17343 null mutáns a többi esszenciális APC/C alegység mutánsaihoz hasonló fenotípust mutat. Ezzel szemben a CG3457 nem bizonyult létfontosságúnak, funkciójának kiesése ellenére is az állatok életképesek és fertilisek maradtak. Azonban a CG3457 génről képződő fehérjét túltermelve menekíthető a CG17343 mutánsok letális és mitotikus fenotípusa is (nem közölt adat).

CÉLKITŰZÉSEK

A sejtciklus szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszó anafázis promoting komplex (APC/C) funkciójáról, szabályozásról és felépítéséről már vannak ismereteink, de számos kérdés még megválaszolatlan. Nem tudjuk még, hogy miért van szükség ilyen sok alegységre az APC/C komplexben, és az egyes alegységek hogyan járulnak hozzá a szubsztrátok ubikvitilálásához. Az ubikvitilálás mechanizmusa nem feltétlenül igényelne ilyen bonyolultságot, hiszen ismerünk számos E3 aktivitással rendelkező, de csak egyetlen polipeptidláncból álló ubikvitin-ligáz enzimet is (Hochstrasser, 1996).

Az APC/C komplexet ehető kagyló és karmosbeka petéből, élesztőből, valamint humán sejtekből készített kivonatokban vizsgálták biokémiai módszerekkel. Genetikai analízise eddig csak az egysejtű élesztőben történt meg. Ezek alapján az APC/C alegység-összetétele és szerkezete nagyfokú homológiát mutat. A különböző fajokból izolált APC/C komplexek hasonlósága azt mutatja, hogy a sejtciklus szabályozásában résztvevő fehérjék mellett, az ubikvitin-függő fehérjelebontó rendszer is konzerválódott az élesztőtől egészen az emberig. Noha az APC/C felépítése és általános funkciója konzervált az élesztőtől az emberig, az egyes alegységeknek azonban eltérő szerepe lehet a komplexben. Ezért az APC/C egyes alegységeinek funkcionális vizsgálata hozzájárulhat APC/C és az ubikvitilálás mechanizmusának jobb megértéséhez egy többsejtű eukarióta modellorganizmusban, a *Drosophila melanogaster*ben.

A *Drosophila melanogaster*, vagy ecetmuslica az egyik elsőként használt, és mintegy évszázados laboratóriumi múltra visszatekintő, jól kezelhető és igen közkedvelt modellorganizmus. Az ecetmuslica széles genetikai eszköztárral rendelkezik, ami lehetővé teszi gének mutációinak hatékony előállítását. A mutánsok fenotípusa könnyen vizsgálható, és azokból következtethetünk a gének funkciójára, a genetikai interakciókból pedig a folyamatokban résztvevő molekulák kapcsolataira, és szerepére.

A *Drosophila* modellorganizmus a genetikai analízis mellett, kiválóan alkalmas a sejtciklus résztvevőinek sejtbiológiai módszerekkel történő tanulmányozására is. Imaginális szöveteik diploid sejtjei folyamatosan osztódnak, amelyeknek jól látható, kondenzált kromoszómáik, mitotikus orsóik és centroszómáik vannak. A mitózis egyes fázisai könnyen megkülönböztethetőek, és azonosíthatóak egyszerű fénymikroszkóp használatával.

A *Drosophila* genomprojektnek köszönhetően, az ecetmuslica teljes

genomszekvenciája ismert és adatbázisokból elérhető. Így bioinformatikai módszerekkel, és a fent említett technikákkal együtt, lehetőségünk van a sejtciklus szabályozásában résztvevő szereplőket azonosítani, és vizsgálni egy többsejtű, intakt modellorganizmusban.

Csoportunk munkájának célja az APC/C felépítésének és szerepének vizsgálata *ecetmuslica* modellben. Az APC/C alegységeket kódoló gének kiejtésével célunk, hogy a funkcióvesztéses mutánsok fenotípusából következtessünk az egyes alegységek szerepére a komplexben, és további ismereteket szerezzünk az APC/C felépítéséről és működéséről. Az én feladatom az APC/C katalitikus alkomplexét felépítő Apc11 alegység vizsgálata volt a következő lépéseken keresztül:

1. Apc11 hipomorf mutánsok fenotípusának genetikai, sejtbiológiai és citológiai jellemzése.
2. Az Apc11 null mutáns előállítása P-elem remobilizációval, majd genetikai, citológiai és sejtbiológiai jellemzése.
3. Az Apc11 gén szerkezetének molekuláris biológiai vizsgálata
4. Az *Drosophila* Apc11 funkcionális homológiájának tesztelése sarjadzó élesztőben heterológ komplementációs kísérlettel.
5. Az Apc11-el kölcsönhatásba lépő más APC/C alegységek azonosítása élesztő kettős-hibrid és genetikai interakciós kísérletekkel.
6. Az APC/C alegységek és E2 enzimek közötti kölcsönhatás kimutatása élesztő hármas-hibrid és genetikai interakciós kísérletekkel.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Élesztő törzsek és módszerek

Az élesztő kettős-hibrid kísérletekhez a *S. cerevisiae* L40 (*MATa ade2 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ1 ura3::lexAop-lacZ LYS2::lexAop-HIS3*) törzset, az élesztő hármashibridhez a Tat7 (*MATa ura3-52 ade2 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ1 ura3::lexAop-lacZ LYS2::lexAop-HIS3*, Jacques Camonis nagylelkű ajándéka) törzset használtuk.

Az élesztő komplementációs teszthez a *S. cerevisiae* W303 (*MATa ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3, 112 his3-11,15 ura3*) és az APC11myc9 (*MATa APC11myc9-TPR1 ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3, 112 his3-11,15 ura3*, Wolfgang Zachariae bocsájtotta rendelkezésünkre) törzseket használtuk. Az élesztő táptalajokat, transzformálást és növesztés a *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual* (Rose, M. D., 1990) című kézikönyvben leírtak szerint végeztük.

2. Élesztő kettős-hibrid kísérletek

A nagyléptékű könyvtár transzformációhoz az Apc2/Mr fehérjét kódoló gént az LD24965 cDNS klón (BDGP, DGC Clone Arrays) felhasználásával, restrikciós emésztéssel klónoztuk megfelelő leolvasási keretben a LexA DNS kötő domént és triptofán szelekciós markert tartalmazó pBTM116 vektorba. Ezt a csali fehérjét kódoló konstrukciót L40 törzsbe jutattuk, a majd a csalit tartalmazó törzsbe transzformáltuk a pAct2 vektorba klónozott *Drosophila* embrionális cDNS könyvtárat, amely leucin szelekciós markert és GAL4 transzaktivációs domént hordoz. A transzformánsokat megfelelő minimál táptalajra szélesztettük, 3 napig 30 °C-on növesztettük, majd a Hisztidin+ és β-Galaktozidáz+ klónokból plazmidot izoláltunk és megszekvenáltuk. Az így kapott egyik jelölt a CG34440 gént kódoló cDNS klón volt.

A CG34440 cDNS szekvencia bioinformatikai módszerekkel történő vizsgálata során kiderült, hogy két nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) hordoz. Azért, hogy kiderítsük, melyik ORF-ről képződő fehérje lép kölcsönhatásba az Apc2/Mr-val, mindkét ORF-et kódoló szekvenciát egyenként, megfelelő leolvasási keretbe klónoztuk pGAD424 és pBTM116 vektorokba. Ezeket a konstruktokat együtt transzformáltuk L40

törzsbe az *apc2/mr*-pBTM116, valamint *apc2/mr*-pGAD424 konstrukttal, és vizsgáltuk a transzformánsok β -Galaktozidáz aktivitását. A *CG34440* gén 3' vége felőli ORF2 leolvasási keretről átíródó fehérjét csaliként használva, egy *Drosophila* embrió cDNS könyvtárat L40 élesztőbe transzformálva szűrtünk interakciós partner azonosítására.

3. Élesztő hármashibrid kísérletek

Az APC/C ubikvitin-ligáz és E2 ubikvitin-konjugáló enzimek kölcsönhatását élesztő hármashibrid rendszerben vizsgáltuk. Ehhez a *CG34440*-ORF1 fehérjét kódoló régiót tartalmazó pBTM116 konstrukciót használtuk, valamint az *apc2/mr* gént egy metioninnal szabályozható RS416 vektorba (Jacques Camonis nagylelkű ajándéka), EcoRI-XhoI helyre klónoztuk. A Vihar E2 enzim teljes kódoló régióját a *vihar* upper2 és a *vihar* lower primerekkel amplifikáltuk. A *vihar* második exonját, amely a Vihar UBC doménjét kódolja, a *vihar* upper1 és a *vihar* lower primerekkel sokszoroztuk fel.

A *CG8188* gént, amelyről képződő fehérje 67%-os hasonlóságot mutat a humán UBE2S E2 enzimmel, a *CG8188* upper+EcoRI és a *CG8188* lower+Sall primerekkel amplifikáltuk. A PCR termékeket EcoRI-Sall-el emésztettük, és megfelelő leolvasási keretben pGAD424 vektorba EcoRI-Sall helyre klónoztuk. Azért, hogy megvizsgáljuk, vajon a csonkított *CG8188* fehérje kölcsönhat-e az APC/C-vel, a *CG8188* N-terminális részét EcoRI-BglII emésztéssel kivágtuk, és klónoztuk pGAD424 vektorba EcoRI-BamHI helyre. A *CG8188* fehérje C-terminális felét kódoló szakaszt, amely hordozza a prediktált fehérje UBC domén aktív centrumát, BglII-Sall emésztéssel kivágva ligáltuk pGAD424 vektorba BamHI-Sall helyre. Az így módon elkészített konstrukciókat, különböző kombinációban Tat7 élesztőbe transzformáltuk. A His⁺ klónokat szelektáltuk, és elvégeztük rajtuk a β -galaktozidáz tesztet.

4. β -galaktozidáz aktivitás kimutatása

A szűrőpapíron elvégzett β -galaktozidáz módszernek a lényege, hogy egy folyékony nitrogénben történő fagyasztás-kiolvasztás ciklus az élesztősejtek lízisét eredményezi, de az enzimaktivitást nem befolyásolja. Szubsztrátként foszfát puffer

közegben 5-bromo-4-kloro-3-indolyl- β -D-galaktozidot (X-Gal) használtunk (Yeast Protocols Handbook Clontech Laboratories, Inc., USA). Ennek a módszernek az előnye, hogy nagyszámú kolónia egyidejű és gyors tesztelésére alkalmas, hátránya viszont, hogy nem kvantitatív. Ezért az élesztő hármashibrid kísérletekhez olyan nagyfokú érzékenységet mutató, és kvantitatívan értékelhető módszert használtunk, amivel lehetőség volt különbségeket kimutatni a β -galaktozidáz esetleges alapaktivitása mellett is.

A Pellet X-Gal (PXG) módszer vizuálisan teszi lehetővé, hogy az enzimaktivitás mértékét vizsgáljuk. Ennek lényege, hogy az élesztő kolóniákat szelektív folyadék táptalajban növesztjük mid-log fázisig ($OD_{600}=0,5-1$), majd egy abszorbancia egységnyi kultúrát centrifugálással kiülepítünk. A sejteket háromszor ismételt, folyékony nitrogénben történő fagyasztás-kiolvasztás ciklussal feltárjuk. A centrifugálás utáni üledéket vízben szuszpendáljuk, és 96 lyukú lemezre pipetázunk, majd hozzáadjuk az X-Gal szubsztrátot és agarózt tartalmazó reakció elegyet. A β -galaktozidáz aktivitása nyomon követhető a kék színreakció mértékének változásával, amely egy síkágyas szkennelvel dokumentálható.

A β -galaktozidáz aktivitás kvantifikálását a Beta-Glo[®] Assay System (Promega Corporation, USA) használatával is elvégeztük. Ebben a rendszerben egy két komponensből álló reagens biztosítja az élesztő sejtek feltárását és az enzimreakciót. Egy olyan kapcsolt enzimreakció játszódik le, amelyben a 6-O- β -galactopyranosyl-luciferin szubsztrátot a β -galaktozidáz elhasítja D-luciferinre és galaktózra. Ezután a D-luciferint a szentjánosbogár luciferáz fényreakció kíséretében katalizálja. A fényintenzitás arányos a jelenlévő β -galaktozidáz mennyiségével és luminométerrel meghatározható.

5. Élesztő komplementációs teszt

A CG34440 gén ORF1-et kódoló szakaszát a p426 alkohol-dehidrogenáz promotert és uracilt kódoló élesztő expressziós vektorba (Mumberg, 1999 Unk Ildikó nagylelkű ajándéka) klónoztuk, BamHI-SalI helyekre. Kontrollként az *apc3/mákos* gén teljes kódoló régióját kivágtuk az LD2661 cDNS (BDGP, DGC Clone Arrays) klónból és ligáltuk a p426 vektorba, az EcoRI-XhoI helyekre. A konstrukciókat és az üres p426 vektort egyenként transzformáltuk az *APC11-myc9* hőérzékeny mutánsba (Zachariae, 1998a). Az Ura+ klónokat minimál táptalajon szelektáltuk. Ezt követően, a transzformánsokból egyedi telepeket oltottunk le 3 ml YEPD (BIO 101, Inc., Canada) tápoldatba, és 30°C fokra

vízfürdőben növesztettük éjszakán át. Másnap reggel a kultúrákat $OD_{600}=0,1$ -re hígítottuk és hat kémcsőbe szétosztottuk, mindegyikbe 3-3 ml-t. Három kémcsövet 30°C fokos, hármat 37°C fokos vízfürdőben kevertetve inkubáltuk 10 órán át. Az élesztősejtek osztódását a kultúra optikai denzitásának óránkénti mérésével követtük nyomon. Ehhez az WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter készüléket használtuk. Kontrollként *W303* vad típusú törzset használtuk. Az adatok értékelését, és a növekedési görbék készítését Microsoft® Excel®-l el végeztük. A transzformánsok kolóniaformáló képességét szilárd YEPD táptalajon vizsgáltuk úgy, hogy a folyadék-kultúrájukból hígítási sort készítettünk. Az éjszakán át YEPD folyadék táptalajban, 30°C fokos vízfürdőben növesztett transzformánsokat másnap reggel $OD_{600}=0,1 - 0,00625$ -ig kihígítottuk, mindegyik hígításból 5-5 μl -t cseppentettünk egy-egy 10 cm-es Petri csészébe öntött YEPD táptalajra. Az egyik Petri csészét 30°C fokos, a másikat 37°C fokos inkubátorba helyeztük 1 napra.

6. Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek

A kísérletekben használt *Drosophila melanogaster* törzseket 25°C fokon tartottuk, és 25 mm átmérőjű üveg fiolákba öntött, 10 ml standard kukorica-élesztő táptalajon tartottuk. A keresztezéseket is ilyen táptalajon végeztük. A kolhicin és docetaxel etetéses kísérletekben, valamint a letálfázis meghatározáshoz ettől eltérő körülményeket alkalmaztunk, amit a megfelelő fejezetekben tárgyalok. Minden kísérletben a *w¹¹¹⁸* izogenizált törzset (Ryder, 2004) használtuk kontrollnak. A felhasznált törzseket a Bloomingtoni *Drosophila* Törzsközpontból (USA) szereztük be. A kísérletekben használt genetikai markerek leírása megtalálható a Flybase adatbázisban (<http://flybase.org>).

7. *lmg* és *Dmube2S* deléció mutánsok előállítása P elem remobilizációval

A *lmg^{J023}* és *lmg¹³⁸* deléció mutánsokat a *CG34440* gén 5' nem transzlálódó régiójában található P{PZ}03424 (Spradling, 1999) és P{EPgy2}EY11317 (Bellen, 2004) P elemek pontatlan kivágódásával állítottuk elő. A P elemeket hordozó törzseket a *Df(3L)C4/TM3,Sb,P(12-3)* transzpozázt termelő törzshöz kereszteztük. Ennek a keresztezésnek az utódai közül azoknak a hímeknek az ivarsejtjeiben játszódik le a P elem

ugrása, amelyek hordozzák a mobilizálható P elemet és a transzpozáz forrást is. Ezért ezeket „jump-starter” hímeknek is nevezik. A P elem kivágódására a P{PZ}03424 elem esetében a ry^+ , a P{EPgy2}EY11317 elem esetében a w^+ szemszín markerek elvesztéséből következettünk. Ezeket a P elem hiányos kromoszómákat *CyO*, *actGFP* kromoszómával balanszíroztuk.

Az *Dmube2S*^{61/2} deléciós mutánst a *CG8188* gén start kodonja előtt 87 bázispárra elhelyezkedő P{GawB}*CG8188*^{NP4039} elem (Brand és Perrimon, 1993) remobilizálásával állítottuk elő az előző bekezdésben leírtak szerint, kivéve, hogy a P elemet elvesztett kromoszómákat *FM6,w* kromoszómával balanszíroztuk.

PCR módszerrel megvizsgáltuk, hogy képződött-e delécia a *Img* és *Dmube2S* génekben a P elem hiányos kromoszómákon. Ehhez a jelölt állatokból gDNS-t izoláltunk a „30 légy” LiCl/KAc (E. J. Rhem, BDGP protokoll) és az „1 légy” (Gloor, 1993) módszer szerint. A *Img* deléciós jelölt állatokból izolált gDNS mintákon az ORF1 upper és ORF2 lower primerekkel, az *Dmube2S* jelöltekből izolált gDNS-en pedig a *CG8188* upper és *CG8188* lower primerekkel PCR reakciót végeztünk. A vadtypustól eltérő méretű PCR fragmenteket V-gene PCR Clean-up Kit-tel (V-gene Biotechnology Limited, China) kitisztítottuk és szekvenáltattuk.

8. Letálfázis meghatározás

A letális mutációkat *CyO*, *actGFP* vagy *TM6C*, *Tb*, *Sb* kromoszómákkal balanszíroztuk. A balanszer kromoszómákon található markerek segítségével lehetőségünk van a mutációra homozigóta és heterozigóta állatokat elkülöníteni. Ahhoz, hogy pontosan meghatározzuk, hogy az egyes mutációk az egyedfejlődés melyik stádiumában okozzák az állatok pusztulását, a homo- és heterozigóta lárvák fejlődését szinkronizált tenyészetekben követtük nyomon. Ehhez törzsenként 20-30 pár imágót petéztető kamrába helyeztünk. A kamra aljára aktív szénen tartalmazó táptalajt (2% bacto-agar, 0,8% D-glükóz, 0,1% aktív szén) raktunk Petri csészékben, amelyeket élesztővel gazdagon elláttunk. Az aktív széntől feketére festett táptalaj megkönnyíti a peték gyűjtését, az élesztő pedig megfelelő táplálékot biztosít az állatoknak. A kamrákat 25°C fokon tartottuk, a táptalajos Petri csészéket 12 óránként cseréltük, majd 48 óra elteltével, a lárvákat csipesszel begyűjtöttük. 50-50 lárvát standard táptalajt tartalmazó fiolába helyeztünk. Mindegyik genotípusból 400-

600 lárvának a metamorfózisát követettük nyomon. A letálfázist S. P. Bainbridge és M. Bownes (J Embryol Exp Morphol. 1981) által leírt morfológiai jegyek segítségével állapítottuk meg.

9. A *lmg* mutáns fenotípusának menekítése

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk vajon a *lmg* mutánsok fenotípusát a teljes *CG34440* gén, vagy csak a *CG34440-ORF1*, esetleg csak a *CG34440-ORF2* régió hiánya okozza, olyan transzgenikus állatokat állítottunk elő, amelyekben *lmg* mutáns háttéren termeltetni tudjuk a vad típusú *CG34440* gén, illetve a *CG34440-ORF1* és *CG34440-ORF2* régió géntermékét. Ehhez mindhárom kódoló régiót egyenként egy P elem alapú, pUAST *Drosophila* expressziós vektorba klónoztuk. A pUAST vektor öt darab, tandem elhelyezkedésű, élesztő eredetű UAS (upstream activating sequence) szekvenciát tartalmaz a multi-klónozó hely előtt. A transzgén átíródása csak abban az esetben történhet meg, ha jelen van az élesztő eredetű Gal-4 transzkripció faktor, amely dimerizálódva az UAS szekvenciához kötődik. A Gal-4 transzkripciójának iniciációját különböző szövet- és fejlődésszádium-specifikus, vagy általános promoterek szabályozhatják, így számos lehetőség kínálkozik a vizsgálni kívánt gén kifejeztetésére.

A teljes *CG34440* gént a *CG34440*-pACT2 cDNS klónból BamHI-BglII emésztéssel kivágtuk, és pUAST vektorba ligáltuk BglII helyre. Az inszert orientációját PstI emésztéssel határoztuk meg. A *CG34440-ORF1* kódoló régiót a *CG34440*-pACT2 cDNS klónból EcoRI-XhoI emésztéssel izoláltuk és pENTR1A vektorba EcoRI-XhoI helyre ligáltuk. Innét rekombináltuk pUAST vektorba a Gateway LR Clonease II Enzim Mix (Invitrogen Corporation, USA) segítségével a gyártó utasításait követve.

A *CG34440-ORF2*-pUAST konstrukt készítéséhez a *CG34440*-pACT2 cDNS klónt BamHI-BglII enzimekkel emésztettük, majd az így kapott cDNS fragmentet a pBluescript-SK vektor BamHI helyére ligáltuk. A fragment irányát PstI emésztéssel vizsgáltuk, a 3'-5' orientációt tartalmazó klónt kiválasztottuk és BseJI-SmaI-el emésztettük. Az emésztést agaróz gélen megfuttattuk, a *CG34440-ORF2*-pBluescript-SK fragmentet izoláltuk, és a fragment végeit T4 DNS ligázzal összekapcsoltuk. A *CG34440-ORF2*-pBluescript-SK konstruktból KpnI-XbaI emésztéssel kivágtuk a *CG34440-ORF2* fragmentet, és ligáltuk pUAST-be KpnI-XbaI helyre.

A klónozások során a fragmentek izolálását agaróz gélből Fermentas DNA Extraction Kit-tel végeztük, a ligáláshoz Fermentas T4 DNS ligázt használtunk. A konstrukciókat DH5 α kompetens sejtekbe transzformáltuk és felszaporítás után, a DNS-t alkalikus lízissel izoláltuk (Sambrook, 1989). Az injektáláshoz a konstrukciókat Qiagene Midiprep Kit-tel izoláltuk és DNS szekvencia meghatározással ellenőriztük.

A transzgenikus legyek előállítását standard *Drosophila* transzformációs technikával végeztük (Spradling, 1982). A pUAST konstrukciókat transzpozázt kódoló segítő plazmiddal együtt w^{1118} genotípusú, szinciciális blasztoderma stádiumú embriókba injektáltuk. A transzgenikus egyedeket piros szemszínük alapján azonosítottuk. Az egyes vonalakban, w/w ; *If/CyO*; *MKRS/TM6B,Tb,Hu* genotípusú állatokhoz történő keresztezéssel megállapítottuk a konstrukciók kromoszóma-lokalizációját, és homozigóta törzseket alapítottunk. A harmadik kromoszómába inszertálódott konstrukciót hordozó törzseket *lmg* mutánsokhoz kereszteztük. Az utódgeneráció w/w ; *lmg/CyO*, *actGFP*; *pUAST/ pUAST* genotípusú egyedeiből olyan törzseket alapítottunk, amelyek a rendelkezésünkre álló *lmg*⁰³⁴²⁴, *lmg*^{Ey11317}, *lmg*^{J023}, *lmg*¹³⁸ alléleket, valamint a *CG34440-pUAST*, *CG34440-ORF1-pUAST* és *CG34440-ORF2-pUAST* konstrukciókat minden kombinációban hordozták. Ezeket a vonalakat w/w ; *lmg/CyO*, *actGFP*; *da-GAL4/da-GAL4* genotípusú állatokhoz kereszteztük, és a w/w ; *lmg/lmg*; *pUAST/da-GAL4* genotípusú utódok fenotípusát vizsgáltuk. A *da-GAL4* egy olyan P elem alapú transzgén, amelyben a *Drosophila daughterless* gén promotere mögé illesztették az élesztő Gal-4 transzkripciósz faktort kódoló gént. A *daughterless* gén promotere lehetővé teszi, hogy a Gal4 transzkripciósz faktor folyamatosan és minden szövetben termelődjön, így a pUAST konstruktról a transzgén minden sejtben kifejeződik.

10. Szemikvantitatív, reverz transzkripció kapcsolt PCR (RT-PCR)

A *lemming*, *vihar* és *CG8188* gének expressziójának mértékét a különböző mintákból izolált RNS-ről átírt cDNS-t használva templátként, nem telítési körülmények között, 20 ciklussal végzett PCR reakcióval határoztuk meg. Telítési ciklusszám alatt a képződő PCR termék mennyisége arányos a reakcióba bemért templát mennyiségével. Ezzel a módszerrel tehát a PCR reakció termékéből következtethetünk a templátként használt minta RNS koncentrációjára.

Az RNS izolálását Tri Reagent extrakciós kittel (Sigma-Aldrich, USA) végeztük. Az RNS mintákat RQ1 RNáz-mentes DNázzal (Promega) kezeltük. A mintákból 1-1 µl-t 0,8%-os agaróz gélen futattuk, hogy ellenőrizzük az RNS épségét, ugyanis a nem degradálódott mintákban jól láthatóvá válik 2 kb-nál a 18S riboszómális RNS alkotta sáv. 5 µg totál RNS-ről M-MuLV reverz transzkriptázzal (Fermentas) és random hexamer primerekkel cDNS szintetizáltunk. Ezt templátként használva, 20 ciklusos polimeráz láncreakciót hajtottunk végre Dream Taq polimerázzal (Fermentas), standard reakciókörülmények között (2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 mM primer). A PCR reakciókba bemért templát mennyiségét a *Drosophila melanogaster* L17 riboszómális fehérjét kódoló CG3203 génre tervezett primerekkel (*rpL17A* upper és *rpL17A* lower) kalibráltuk. Az RT-PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel analizáltuk.

A *lemming* gén fejlődésszádium-specifikus expressziójának vizsgálatához totál RNS-t izoláltunk 50 mg *w*¹¹¹⁸ 0-12 órás embriókból, 10-10 L1, L2, korai L3, vándoroló L3, korai báb, késői báb, hím és nőstény állatokból. A következő primereket használtuk RT-PCR-hez:

ORF1: ORF1-RT upper és ORF1-RT lower

ORF2: ORF2 upper és ORF2 lower

ORF1+ORF2: ORF1+ORF2 upper és ORF1+ORF2 lower és 5

Ezeknek a primereknek a felhasználásával a *lemming* mutánsokban is megvizsgáltuk a *lmg* gén expressziójának változását. Ehhez a totál RNS izolálását 10-10 homozigóta *lmg* és *w*¹¹¹⁸ korai bábból végeztük.

A *CG8188* gén mutáns alléljeiben a génexpresszió változását RT-PCR-rel vizsgáltuk a *CG8188* upper és *CG8188* lower primerek használatával. A kísérlethez a totál RNS izolálást és reverz transzkripciót a *CG8188*^{NP4039}, *CG8188*^{NP3151}, *CG8188*^{61/2} és a kontroll *w*¹¹¹⁸ törzsekből 10-10 homozigóta adultat tartalmazó mintán végeztünk.

A *vihar* gén expressziójának vizsgálatához totál RNS-t izoláltunk 10-10 *vih*^{KG02013}, *vih*^{S110203}, *vihar*^{KK107720}; *da-GAL4* és *w*¹¹¹⁸ farát adult bábból, majd reverz transzkripciót végeztünk. Az RT-PCR reakciókat a *vihar* upper2 és a *vihar* lower2 primerekkel végeztük.

11. Citológiai analízis

A mitotikus kromoszóma-preparátumokat harmadik stádiumos vándorló lárvák

agyából készítettük. Az agyákat 0,7% NaCl oldatban boncoltuk ki, majd 45%-os ecetsavban fixáltuk 5 másodpercig. Ezután az ecetsavat eltávolítottuk, és az agyakra 45%-os ecetsavban oldott 5%-os orceint cseppentettünk és 5-7 percig festettük, majd 60%-os ecetsavval mostuk őket. A megfestett agyákat 60%-os ecetsavban oldott 5%-os orceinben történő préssel tárgylemezre preparáltuk. A kromoszómákat Olympus BX51 fáziskontraszt mikroszkóppal UPLFLN 100x O3Ph plan-apochromat objektívvel vizsgáltuk, és DP70 kamerával digitális felvételeket készítettünk.

A mitotikus indexet az egy látómezőben látható mitózisban lévő sejtek számával határoztuk meg. Az apoptotikus indexet az egy látómezőben lévő erősen festődő, lekerekedett, apoptotikus sejtek számával adtuk meg.

Az elpusztult sejtek mennyiségét akridin-narancs festéssel is ellenőriztük. Ehhez harmadik stádiumos vándorló lárvák agyát és imágókorongjait PBS-ben kiboncoltuk, és 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ akridin-narancs (C.I. 46005 Molar Chemicals Ltd) oldatban festettük 5 percig sötétben. PBS-sel történő mosást követően tárgylemezre preparáltuk őket úgy, hogy a fedőlemez és a tárgylemez közé ragasztószalagból falat képeztünk, hogy megakadályozzuk a preparátumok összenyomódását. A preparátumok vizsgálatát Olympus BX51 fáziskontraszt mikroszkóppal 20 X Ph1 plan-apochromat objektívvel és Olympus FV 1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

12. Immunfestés

Harmadik stádiumos vándorló lárvák agyát PBS-ben kiboncoltuk, metanolban 20°C-on 20 percig fixáltuk, majd PBS-ben mostuk. Ezt követően az agyákat Triton X-100-al kiegészített PBS-ben inkubáltuk, amely átjárhatóvá teszi a sejthártyát az ellenanyagok számára. Ezt követően, az agyákat szobahőmérsékleten 40 percig BSA-val blokkoltuk, majd Ciklin B és α -tubulin elleni ellenanyagokkal inkubáltuk 4°C-on, éjszakán át. A Ciklin A és Ciklin B jelölésekhez, kétszázszorosára hígított Rb270 nyúl anti-Ciklin A és az Rb271 nyúl anti-Ciklin B antitesteket (Whitfield, 1990), az α -tubulin jelöléshez ötvenszeresére hígított patkány monoklonális YL1/2 anti- α -tubulin antitesteket (Kilmartin, 1982) használtunk. A preparátumokat PBS-sel történő mosást követően másodlagos ellenanyagokkal 2 órán át, sötétben inkubáltuk. Patkány elleni FITC konjugált (SIGMA), és egér elleni Rhodamin Red konjugált (Jackson Immuno Research Laboratories Inc)

másodlagos ellenanyagokat használtunk. A meg nem kötött másodlagos ellenanyagot PBS-sel történő mosással távolítottuk el, majd a DNS-t TOTO-3-mal (Molecular Probes) festettük meg. Ezután az agyakat egy csepp „Vectashield”-ben (Vector Laboratories) mikroszkóp tárgylemezre preparáltuk fel. A preparátumokat Olympus FV 1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az osztódó sejteket az α -tubulin elleni ellenanyaggal festett mitotikus orsók alapján azonosítottuk, és a TOTO-3-al festett DNS elhelyezkedése alapján állapítottuk meg, hogy a mitózis mely stádiumában vannak.

13. 5' és 3'-végi RACE vizsgálatok

A CG34440 génről *in vivo* képződő mRNS-ek méretének meghatározását RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA-Ends) kittel végeztük (Ambion, USA). Tri-Reagens-sel totál RNS izoláltunk 50 mg 0-12 órás embrióból és L3 stádiumú lárvákból. Az mRNS-ek 5' CAP struktúráját dohány savas pirofoszfátázzal eltávolítottuk, majd az így szabaddá vált 5' monofoszfát végekhez ligáltuk az RNS adapter molekulát, majd random dekamer primerrel reverz transzkripciót végeztünk. Az mRNS 5' végének pontos meghatározásához az adapter szekvenciájára specifikus 5' RACE OUTER és az ORF1-re (ORF1 lower: inner és ORF1-RT lower: outer), valamint az ORF2-re (ORF1+ORF2 lower: inner és ORF2 lower RACE: outer) specifikus primerekkel PCR reakciót végeztünk.

Az ORF1-ről képződő mRNS-ek 3' végének meghatározásához az mRNS-ek polyA-végére specifikus 3' RACE adapter segítségével szintetizáltuk a cDNS első szálát. Ezen a templáton az adapter szekvenciával komplementer 3' RACE inner, és gén-specifikus primerrel (ORF1-RT upper: outer és ORF1+ORF2 upper: inner) végeztünk PCR reakciót. A kapott PCR termékeket pTZ57R (Fermentas, Vilnius, Lithuania) vektorba klónoztuk és szekvenáltattuk.

14. Eritropoietin konstrukció és western blot

A *lemming* gén két leolvasási keretéről képződő fehérjét olyan konstrukció előállításával vizsgáltuk, amelyet S2 sejtekbe transzfektálva az ORF1-ről képződő LmgA

fehérje N-terminális végén haemagglutinin (HA), az ORF2-ről átíródó LmgB fehérje C-terminálisán FLAG epitópot hordoznak. Ehhez a *Drosophila* Gateway vektorrendszert (<http://www.ciwemb.edu/labs/murphy/Gateway%20vectors.html>) használtuk, amellyel lehetőség van egy megfelelő leolvasási keretben elkészített kiindulási klónból (Entry-clone) átrekombinálni a vizsgálni kívánt cDNS-t számos, különböző célokra alkalmas vektorokba.

Első lépésben az 5'-TCGAGATTACAAGGACGATGACAAGTAG-3' és az 5'-TCGACATTACAAGGACGACGATGACAAGTAG-3' oligonukleotidok felhasználásával FLAG epitópot inszertáltunk a pENTR1A vektorba EcoRV-XhoI helyre. Az így előállított konstrukciót szekvenálással ellenőriztük. A *lemming* gén teljes hosszúságú kódoló régióját a CG34440-pAct2 klónból BamHI-NruI emésztéssel kivágtuk, és a pENTR1A-FLAG konstrukcióba ligáltuk BamHI-NruI helyre, miután az NruI ragadós végeit Klenow polimerázzal (Fermentas, Vilnius, Lithuania) feltöltöttük. Az így FLAG epitóppal megjelölt *lemming* cDNS-t (Gateway LR clonase II Enzyme Mix-et használva, Invitrogen Corporation, USA) átrekombináltuk a pAHW célvektorba, amely HA epitópot kódoló szekvenciát tartalmaz a Gateway kazetta 5' végén. A rekombináns klónokat ampicillin rezisztenciájuk alapján szelektáltuk, és szekvenálással ellenőriztük transzfektálás előtt.

Schneider 2 (S2) sejtekbe 2,5 µg FLAG-CG34440-HA-pAHW plazmidot transzfektáltunk 15 µl Cellfectint (Invitrogen Corporation, USA) használva, majd a sejteket szérummentes S2 tápfolyadékban növesztettük (Sigma). A transzfektált sejtekből teljes fehérjekivonatot készítettünk (Sambrook, 1989), amit Western blottal analizáltunk 6000-szeresére hígított anti-FLAG (Sigma), és százszorosára hígított anti-HA (Udvardy Andor saját készítése) monoklonális ellenanyagok felhasználásával.

15. Kolhicin és Docetaxel etetési teszt

A *Dmube2S* hipomorf és null alléleknek, valamint a *Dmube2S*^{61/2}; *mad2*^{EY21687}/*TM6B*, *GFP* kettősmutánsnak vizsgáltuk a mitotikus gátlást kiváltó szerekkel szembeni érzékenységét. Kontrollként a *w*¹¹¹⁸ törzset, és a *vihar*^{KK107720} RNS interferencia alléljét használtuk. A RNS interferencia indukciójához a *vihar*^{KK107720} homozigóta állatokat az élesztő GAL4 transzkripciósz faktort kifejező *w/w*; *da-GAL4/da-GAL4* genotípusú állatokhoz kereszteztük. A kísérlethez 50-50 L1 stádiumú homozigóta, valamint *vihar* RNS

interferencia indukált lárvákat gyűjtöttünk, 5ml standard kukoricadara táptalajt tartalmazó fiolákba. Kolhicint vízben, docetaxelt 100%-os etanolban oldva törzsoldatot készítettünk, és vízben hígítottuk az etetéshez megfelelő koncentrációra. A lárvákat tartalmazó fiolákba 60-60 µl térfogatú, 0µM, 1µM, 5µM, 10µM, 15µM végkoncentrációjú kolhicin (Sigma-Aldrich, USA) és 0µM, 5µM, 10µM, 15µM, 20µM, 25µM docetaxel (Sigma-Aldrich, USA) oldatot mértünk. Az egyes koncentrációkat 6 párhuzamos fiolában teszteltük. Kontrollként 60 µl oldószert alkalmaztunk. A kezelt lárvák egyedfejlődését 25°C-on követtük, majd a kikelő imágókat megszámloltuk, és az adatokat MS Office Excel-el analizáltuk.

16. Felhasznált primerek

CG8188 upper+EcoRI: '5-GAATTCGCAGCAGGAAATTCAGAC-3'

CG8188 lower+Sall: 5'-GTCGACATGGAACTCCGCCTTATG-3'

CG8188 upper: 5'-AATCGAAGGCAGGCAAGAC-3'

CG8188 lower: 5'-GCTAGGATAGCCCATGAG-3'

ORF1 upper: 5'-CTCCCGCCAAGGATCGATATCTTT-3'

ORF1 lower: 5'-TCCGGGCAGGTGCTCTCG-3'

ORF2 upper: 5'-AATGATGGAGAACAGCAGCAACGAT-3'

ORF2 lower: 5'-TATGTTGGGGATGTTGGTGTGAATG-3'

ORF2 lower RACE: 5'-CTGGAAGCGCGACTGTGC-3'

ORF1-RT upper: 5'-GCAAAGCGGCGACAAAC-3'

ORF1-RT lower: 5'-CAGCTCTGGCGGCACAT-3'

ORF1+ORF2 upper: 5'-CCGCTGGTGTGGGGTGTATG-3'

ORF1+ORF2 lower: 5'-TTTGGCAGTGGCGGCAGAC-3'

rpL17A upper: 5'-GTGATGAACTGTGCCGACAA-3'

rpL17A lower, 5'-CCTTCATTTCGCCCTTGTTG-3'

vihar upper2: 5'-TGAATTCATGGCGCAGAATATCAGC-3'

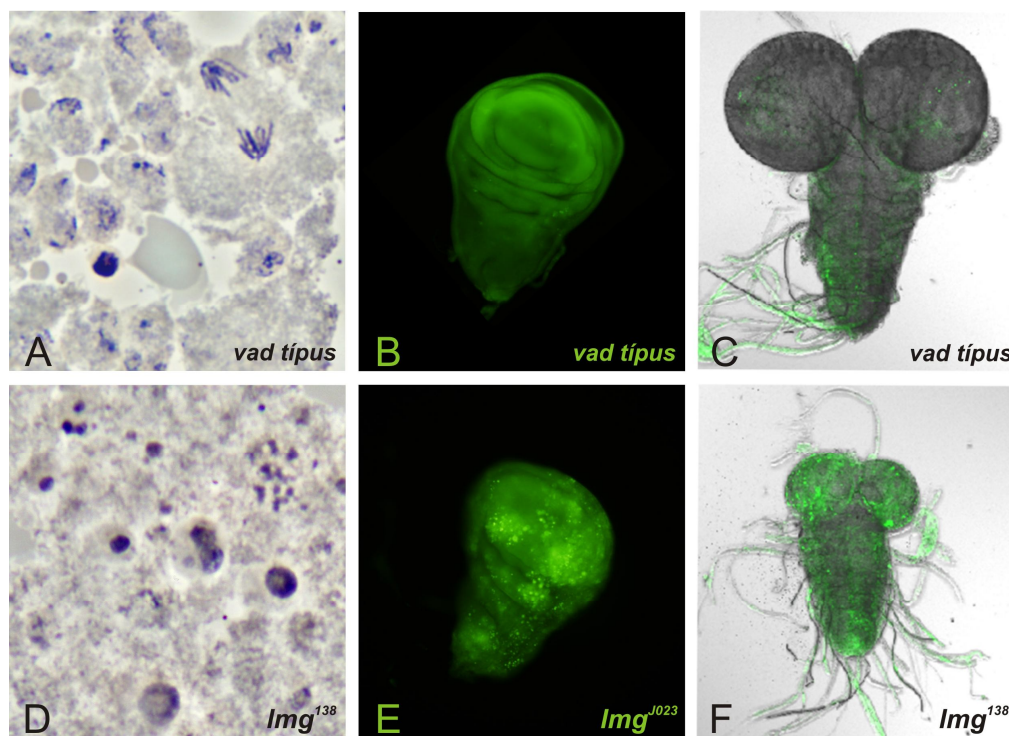
vihar lower: 5'-ATGTCGACGCCGCAATATGAGCAT-3'

vihar upper1: 5'-TGAATTCACACTCACCCACAGACTGC-3'

EREDMÉNYEK

1. A *lemming* funkciójának kiesése bábletalitást és megemelkedett apoptózist eredményez

Az *l(2)03424* mutáns törzset eredetileg a Berkeley Drosophila Genom Project egy P elem inszerciós gyűjteményben azonosította letális fenotípusa alapján (10. ábra: A P elem inszerciót háromszög jelöli.). Az *l(2)03424* homozigóták a bábból való kibújás előtt, a P15i farát adult stádiumban elpusztulnak (3. táblázat). Megfigyelhető, hogy a bábburokban rekedt állatoknak csökevényes szemük, szárnyuk és szőrzetük van, és potrohuk is rendellenesen fejlődött. A harmadik stádiumos lárvák imágókorongjait akridin narancssal megfestve, az apoptótikus sejtek számának jelentős megemelkedése tapasztalható (7. ábra). Mivel ezekből a lárvális szövetekből alakulnak ki később a felnőtt állat szervei, az igen intenzív apoptózis magyarázhatja a fent említett rendellenességek megjelenését.



7. ábra A *lmg* mutánsok agyában és imágókorongjaiban magas az apoptótikus sejtek száma. **A:** Vad típusú és **D:** *lmg¹³⁸* mutáns lárvák agyának orceinnel festett preparátumában megfigyelhető lekerekedett, apoptótikus sejtek. **B:** Vad típusú lárva és **E:** *lmg¹³⁸* mutáns lárva szárnydiszkuszának akridin narancssal festett preparátuma. **C:** Vad típusú és **F:** *lmg¹³⁸* mutáns harmadik stádiumos lárva agyának akridin narancssal festett preparátuma. A zöld pöttyök az akridin narancssal festődő apoptótikus sejteket jelölik.

A P elem inszerciót hordozó gént *lemmingnek* (*lmg*) nevezték el az öngyilkosságot elkövető lemmingek után, utalva ezzel az apoptotikus sejtek számának megemelkedésére a *lmg* mutánsokban. A *lmg* első mutáns alléljét *lmg*⁰³⁴²⁴-el jelölték. A *lmg*⁰³⁴²⁴ mutáns fenotípusa a P elem precíz kiugratása után megegyezett a vad típusú állatokéval, ami bizonyítja, hogy a *lemming* fenotípusát valóban a *l(2)03424* inszerció okozza.

A fent említett késői letalitás, és a megemelkedett apoptotikus sejtek száma jó egyezést mutat a sejtciklus-szabályozási gének, és az általunk korábban azonosított APC/C alegységek mutánsainak fenotípusával, ezért elvégeztük a *lmg*⁰³⁴²⁴ mutáns részletes funkcionális genetikai analízisét. Időközben a Berkeley Drosophila Genom Project azonosított egy, a *lmg*⁰³⁴²⁴-et nem komplementáló P{EPgy2}EY11317 inszerciót. Ezt a törzset beszereztük, és ugyancsak bevontuk kísérleteinkbe (10. ábra: A P elem inszerciókat háromszög jelöli).

2. A *lemming* mutációk természete

Klónoztuk a P elem inszerciókkal szomszédos genomikus szekvenciákat, és meghatároztuk, hogy az inszerciók a *lmg* gén 5'-végi nem transzlálódó régiójában helyezkednek el. Azt, hogy inszerciók befolyásolják-e a *lmg* gén kifejeződését, reverz transzkripcióhoz kapcsolt PCR (RT-PCR) módszerrel vizsgáltuk. Ehhez *lmg*⁰³⁴²⁴ és a *lmg*^{EY11317} mutánsokból totál RNS mintákat izoláltunk, és a *lmg* kódoló szekvenciájára tervezett primerekkel RT-PCR-t végeztünk. Kontrollként a mutánsoknak megfelelő stádiumban lévő vad típusú állatok mintáit használtuk. Az RT-PCR reakcióba bemért cDNS mennyiségét a riboszómális fehérjét kódoló *rpL17* gén transzkriptum mennyiségére kalibráltuk. Eredményeink szerint a *lmg*⁰³⁴²⁴ és *lmg*^{EY11317} mutánsokban csökkent a *lmg* gén expressziója a vad típusú állatokban tapasztaltakhoz képest, ezért ezek hipomorf alléleknek tekinthetők (8. ábra). A teljeskörű genetikai analízis megköveteli, hogy különböző erősségű allélokat vizsgáljunk, köztük null allélokat is. Ezért a P{PZ}03424 és a P{EPgy2}EY11317 elemek mobilizálásával *lemming* null mutánsokat állítottunk elő. A P elemek kivágódására a szemszín-markerek elvesztéséből következtettünk. Azokból az állatokból, amelyekben a P{PZ}03424 elem esetében a *rosy* (*ry*⁺), a P{EPgy2}EY11317 elem esetében a *white* (*w*⁺) szemszín-marker elveszett, törzseket alapítottunk és PCR reakcióval kerestünk deléciós kromoszómákat hordozó vonalakat. Mindkét P elem

esetében 350 deléció jelöltet vizsgáltunk.

A P{PZ}03424 elem esetében az egyik ilyen deléció jelölt a lmg^{J023} jelű vonal volt. A lmg^{J023} homozigóták az egyedfejlődés korai, P5(i) bábstádiumában pusztultak el, továbbá lárvális agyuk és imágókorongjaik orceinnel és akridin narancssal festett preparátumain az apoptotikus sejtek számának szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető (7. ábra).

A P{EPgy2}EY11317 elem mobilizálásával előállított lmg^{138} mutáns minden eddigi *lemming* allélnél erősebb fenotípust mutatott. A $lmg^{EY11317}$ homozigóták P4(ii) bábstádiumos letálfázisa a lmg^{138} homozigótákban egy korábbi, P4(i) stádiumra tolódott el. A lmg^{138} harmadik stádiumos lárvák agya sokkal kisebb volt (7. ábra C és F), mint a vad típusú állatoké, imágókorongjaik pedig elcsökevényesedtek. Az említett fenotípusjegyek alapján a lmg^{138} a legerősebb *lmg* allélnak tekinthető.

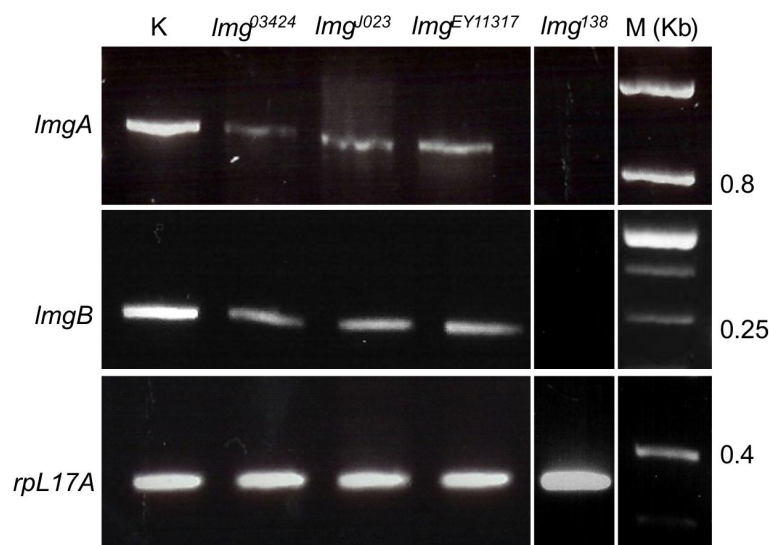
Genotípus	Letál fázis
w^{11118}	Életképes
lmg^{03424}	Farát adult P15(i)
lmg^{J023}	Korai báb P5(i)
$lmg^{EY11317}$	Előbáb P4(ii)
lmg^{138}	ElőbábP4(i)

3. táblázat A *lmg* mutánsok letálfázisa

A lmg^{J023} és lmg^{138} mutánsokban PCR reakcióval meghatároztuk a képződött deléciók méretét. A vad típusúnál kisebb méretű PCR fragmentek szekvenálásával pontosan meghatároztuk a képződött deléciók molekuláris töréspontjait. A P{PZ}03424 elem nem precíz kivágódásával létrehozott lmg^{J023} mutánsban 1543 bázispáros, míg a P{EPgy2}EY11317 elem remobilizálásával előállított lmg^{138} mutánsban 1120bp-os deléció képződött. Mindkét mutáns esetében a deléció az inszerciós pontnál kezdődik és *lmg* gén 5' vége felé terjed, kiejtve csaknem a teljes kódoló régiót (10. ábra).

Annak ellenére, hogy a lmg^{J023} mutánsban kimutattuk, hogy deléció képződött a *lmg* génben, RT-PCR-rel a gén gyenge expresszióját tudtuk detektálni (8. ábra). Ez egy többszörös mobilizációs eseménnyel magyarázható, melynek során a P elem nem precíz kivágódással magával vitte a szomszédos *lmg* szekvenciát, majd újra inszertálódva, egy más genomikus környezetbe juttatta azt, ahol képes kifejeződni. A P elem (vagy ennek egy része) egy újabb mobilizációs eseményt követően elveszett, ezért nem látható az elemre

jellemző szemszín-marker. A *Img*¹³⁸ mutánsokban nem mutatható ki *Img* génről képződő mRNS, így a *Img*¹³⁸ null allélnek tekinthető (8. ábra).



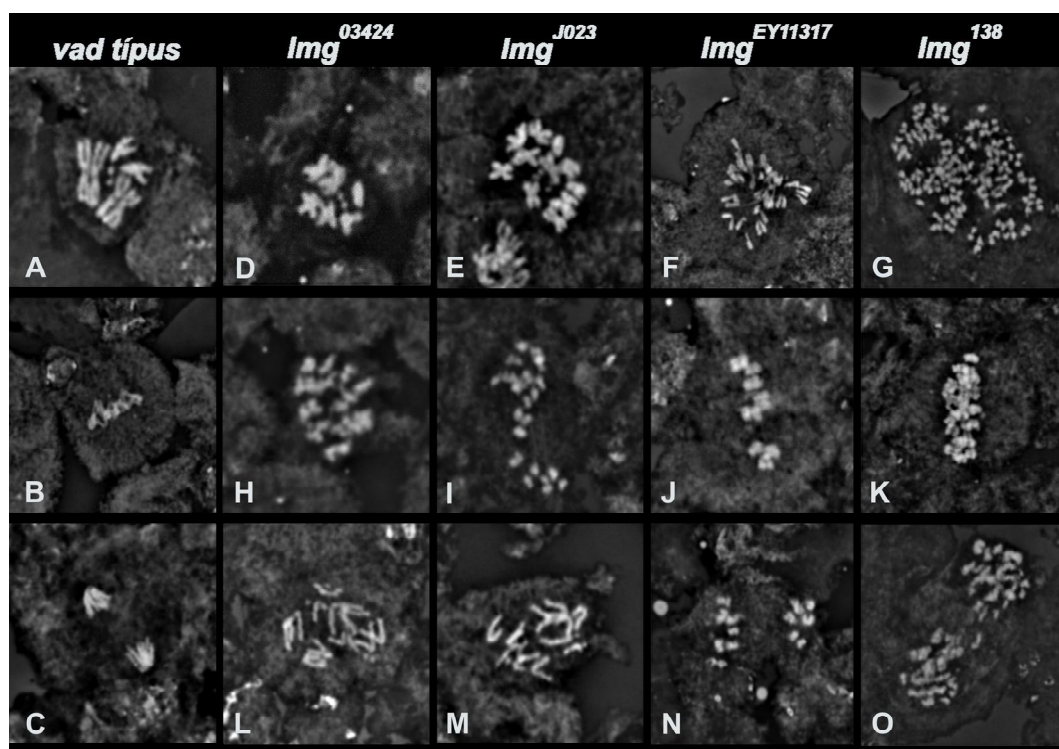
8. ábra A génexpresszió mértékének meghatározása RT-PCR-rel a *Img* mutánsokban. K: kontroll; M: molekulásúly marker. Felső két sor: A *Img* gén különböző ORF-jeire specifikus primerekkel kapott PCR termékek. Bemérési kontrollként a riboszómális fehérjét kódoló *rpL17A* génre specifikus primereket használtunk.

3. A *lemming* mutánsok mitotikus fenotípusának vizsgálata

A *Img* mutánsok mitotikusan osztódó szöveteiben az apoptotikus sejtek számának megemelkedése volt megfigyelhető, ami arra utalhat, hogy ezekben a sejtekben a mitózis során valamilyen hiba következik be. A mitotikus mutánsokról általánosságban elmondható, hogy letális fenotípusuk mellett, jellegzetes citológiai fenotípust is mutatnak, attól függően, hogy a sejtciklus melyik fázisában fejtik ki funkciójukat. Ennek kimutatására alkalmas módszer a vándorló, harmadik stádiumos lárvák agyából készített orceinnel festett preparátumok készítése, melyek fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálhatók.

A vad típusú sejtekben a mitotikus kromoszómák közül három pár (X, 2. és 3. kromoszómák) pálcika alakú, a 4. kromoszóma pedig pontszerű. A vad típusú preparátumokon látómezőnként csak néhány, általában 1-3 mitózisban lévő sejt látható. Ezzel szemben a *Img* mutánsok preparátumain sokkal nagyobb gyakorisággal láthatók mitózisban lévő sejtek, amelyek többségében túlkondenzálódott, pontszerűvé tömörödött

kromoszómákat láthatunk. A kromoszómák profázisban még normálisnak tűnnek, de a prometafázis, illetve a metafázis idejére a túlkondenzálódás egyértelműen láthatóvá válik (9. ábra D-K). A kromoszómák nagymértékű kondenzációja a mitózis lelassulásának vagy megállásának a következménye. Mivel ezek a sejtek jóval több időt töltenek metafázisban, ezért emelkedik meg a mitózisban lévő sejtek száma a szövetben. A mitotikus index (MI) a mitózisban lévő sejtek számát adja meg egy látómezőben, ami a *lmg* mutánsokban háromszor-négyszer nagyobb a vad típushoz képest (4. táblázat).



9. ábra A *lmg* allélek mitotikus fenotípusa orceinnel festett lárvális agypreparátumokban. **A:** vad típusú prometafázis; **B:** vad típusú metafázis; **C:** vad típusú anafázis; **D-K:** túlkondenzált kromoszómák és poliploid sejtek *lmg* mutánsokban; **L-M:** rendezetlen anafázis; **N:** túlkondenzálódott kromoszómák anafázisban; **O:** túlkondenzálódott kromoszómák anafázisban poliploid sejten.

A *lmg* hipomorf és null mutánsokban a legtöbb osztódó sejt prometafázis vagy metafázis-szerű állapotban volt, míg az anafázisban és telofázisban lévő sejtek száma viszonylag alacsony maradt. A *lmg*⁰⁴³²⁴, *lmg*^{J023} és *lmg*^{EY11317} mutánsokban több mint kétszeresére emelkedett a metafázis:anafázis (M:A) arány, míg a *lmg*¹³⁸ null mutánsban meghatározhatatlan volt ez az érték, mivel anafázisban lévő sejteket alig találtunk. Ez azt mutatja, hogy a *lmg* funkciójának hiánya metafázis-szerű gátlást okoz (4. táblázat). Azok a

sejtek, amelyek valahogyan kiszabadulnak a gátlás alól és anafázisba lépnek, a vad típustól eltérő morfológiai jegyeket mutatnak (9. ábra L és M). A kromoszómák ebben a stádiumban is gyakran túlkondenzáltak, és rendezetlenül helyezkednek el, a pólusok felé vándorlás során gyakran lemaradnak (9. ábra N és O).

A mutáns preparátumokban gyakran megfigyelhetők voltak poliploid sejtek (9. ábra G, K és O). Ilyen sejtek úgy alakulhatnak ki, hogy az anafázis végén nem játszódik le citokinézis, hanem a metafázisban gátolt sejtek dekondenzálják kromoszómáikat és visszatérnek interfázisba, majd DNS-ük újabb megkettőződését követően, poliploiddá válnak. A hipomorf *lmg* allélek esetében általában tetra, illetve oktaploid sejteket, a *lmg*¹³⁸ preparátumokban gyakran extrém ploidit mutató sejteket is megfigyeltünk (9. ábra G). Vad típusú preparátumokban poliploid sejteket nem találtunk.

Genotípus	Preparátum/ Látómező	Mitótikus index	M:A arány	Poliploid %	Apoptózis index
<i>w</i> ¹¹¹¹⁸	7/183	1.6±0.2	2.9±0.3	0	0.5±0.1
<i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴	6/135	4.1±0.8	4.5±0.7	19.6±5.6	1.4±0.3
<i>lmg</i> ^{J023}	7/167	4.4±0.9	6.3±0.1	29.1±7.4	1.2±0.2
<i>lmg</i> ^{EY11317}	6/170	5.8±0.7	6.2±0.4	26.6±3.1	1.5±0.4
<i>lmg</i> ¹³⁸	10/194	5.9±0.5	-	50.7±7.9	1.8±0.5

4. táblázat A *lmg* mutánsok mitótikus fenotípusának kvantitatív meghatározása.

Preparátum/Látómező: A vizsgált preparátumok és mikroszkóp látómezők száma. A mitótikus index megadja a mitózisban lévő sejtek számát egy-egy mikroszkóp látómezőben. A poliploid % megadja a több mint két kromoszóma garnitúrával rendelkező sejtek számát a mitótikus sejtek százalékában kifejezve. Az apoptotikus index megmutatja az apoptotikus sejtek számának átlagát egy mikroszkóp látómezőben.

Az orceinnel festett preparátumokon a mitótikus sejtek mellett nagyszámban megfigyelhetők voltak sötéten festődő, ún. piknotikus, lekerekedett sejtmagú sejtek (7. ábra D). Ezek a jelleg az apoptotikus sejtek tipikus jellemzői, amelyek számának megemelkedése a programozott sejthalál indukciójára utal. Vad típusú preparátumokban is láthatunk ilyen sejteket (7. ábra A), azonban a *lmg* mutánsokban három-négyszeresére nő ezek előfordulásának gyakorisága. Ezek az erősen festődő sejtek általában párosával, szorosan egymás mellett helyezkedtek el, ami arra utalhat, hogy az apoptózis azonnal indukálódott a mitózis befejezése után. Az apoptózisra jellemző jegyek alaposabb vizsgálata érdekében, egy apoptózisra specifikus festéssel, az akridin narancssal is megfestettük a harmadik stádiumos lárvák agyát és imágókorongjaikat. Az akridin narancs az elhalt sejtekbe gyorsabban hatol be, mint az élőkbe, és fluoreszcens mikroszkóppal jól

nyomon követhető. Azt tapasztaltuk, hogy az akridin narancs felhalmozódása valamennyi *lmg* mutánsban sokkal intenzívebb volt, mint a vad típusú szövetekben.

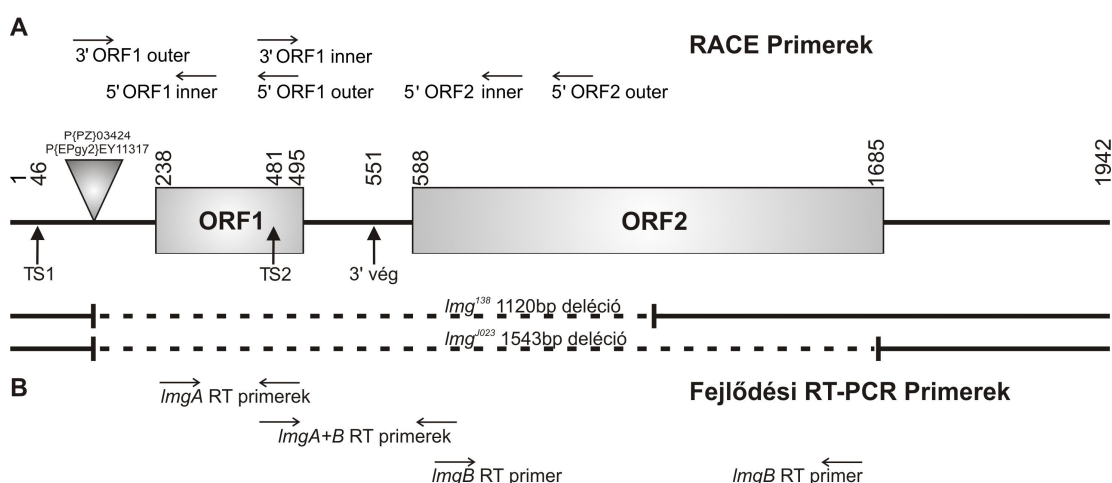
4. A *lemming* gén dicisztronos szerkezete evolúciósan konzerválódott a *Drosophilidae* családban

A *lmg*⁰³⁴²⁴ és a *lmg*^{EY11317} mutánsok P elem inszerciói a második kromoszóma bal karján, a 29D4-5 citológiai pozícióban helyezkednek el. Mindkét P elem inszerció remobilizálása során azt tapasztaltuk, hogy a mutáns fenotípus gyakran visszaállt vad típusúvá, ami arra utal, hogy valóban ezek az inszerciók felelősek a *lmg* gén funkciójának kieséséért, és a mutánsok fenotípusának kialakulásáért.

Klónoztuk a P{PZ}03424 elemmel szomszédos genomikus szekvenciákat, és meghatároztuk ezek nukleotid sorrendjét. A szekvencia analízisével megállapítottuk, hogy az inszerció a *lmg* gén 5'-végi nem transzlálódó régiójában helyezkedik el. A kapott szekvenciával homológia-keresést végeztünk BLAST algoritmus használatával. A Berkeley Drosophila Genom Projekt EST (Expressed Sequence Tag) adatbázisában számos olyan embrionális cDNS klónt találtunk, amely szekvencia-egyezést mutatott. Ezek közül az LD20119 azonosítóval ellátott klónnak teljes hosszában meghatározták a nukleotid szekvenciáját. Összehasonlítva a genomikus szekvenciával azt tapasztaltuk, hogy a *lmg* lokusz nem tartalmaz intront. Ez a transzkript kb. 2,0 kilobázis hosszúságú, két tandem elhelyezkedő nyitott leolvasási keretet (Open Reading Frame: ORF) tartalmaz, melyeket egy 92 bázispárból álló szakasz választ el egymástól (10. ábra A). A Flybase Drosophila adatbázisban további 423 cDNS klón érhető el, amelyek lefedik ezt a lokuszt. Ezek alapján a Berkeley Drosophila Genom Project a *lmg* génről két transzkript átíródását azonosította, egy kb. 2,0 és egy 2,9 kilobázis hosszúságút, mindkettő dicisztronos.

A Flybase adatbázisban található cDNS szekvenciák többszörös illesztésével 230 klón esetében azt kaptuk, hogy a transzkripció start pontja az 5' vég felőli ORF1 előtt 192 (±4) bázispárra helyezkedik el (Hoskins, 2011). A *lmg* gén transzkripció profiljának alaposabb megismerése érdekében, a képződő mRNS-ek 5' és 3' végét RACE reakcióval határoztuk meg. Ehhez embriókból és L3 stádiumú lárvákból totál RNS-t izoláltunk, majd ezeket a megadott protokoll szerint cDNS-sé írtuk át. Mindkét mintában az ORF1 inner primerrel kimutattuk, hogy a transzkript 5' vége az ORF1 start kodonja előtt 180 (±15) bázispárra kezdődik (10. ábra), amely hozzávetőlegesen megegyezik a Flybase-ben

található cDNS-ek vizsgálata során kapott értékkel. Azonban az ORF2-ről képződő mRNS-ek 5'-RACE vizsgálata embrionális RNS mintákon két különböző 5' végződést mutatott. Az egyik az ORF2 translációs start pontja előtt 107 bp-ra, a másik pedig az ORF1 előtt kezdődő mRNS 5' végére tehető. Ugyanezt az 5'-RACE kísérletet lárvális RNS mintákon elvégezve csak egy végződést tudtunk kimutatni, amely megegyezett az embrionális mintán kapott ORF1 előtt kezdődő mRNS 5' végével, amely azt mutatja, hogy ezek az mRNS-ek dicisztronosak.



10. ábra A *lmg* genomikus régió vázlatos bemutatása. **A:** A *lmg* lokusz molekuláris térképe a Flybase-ben közölt ~2,0 kb-os cDNS alapján. A *lmg* gén két ORF-jét téglalapok jelölik. A gén 5' nem translálódó régiójában található P{PZ}03424 és P{EPgy2}EY11317 P elem inszerciákat háromszög jelöli. A RACE kísérletekben használt primerek helyét nyilak, az azonosított transzkripció start helyeket TS1 és TS2 jelölik. A monocisztronos mRNS 3' végét nyíl mutatja. A *lmg*¹⁰²³ és *lmg*¹³⁸ mutánsokban a deléciók méretét tört vonal szimbolizálja. **B:** A fejlődési RT-PCR-ben használt primerek lokalizációja.

Annak eldöntésére, hogy vajon képződnek-e monocisztronos mRNS-ek a *lmg* génről, és hogy hol végződik a dicisztronos mRNS, 3'-RACE kísérletet is végeztünk. Az ORF1 szekvenciájára specifikus primerekkel kimutattunk egy mRNS-t, amelynek a 3' vége az intercisztronikus régióban, az ORF1 stop kodonja után 56 bázispárra végződik. Az ORF2-ről képződő mRNS-ek 3' végét RACE reakcióval nem sikerült kimutatni. Azonban egy élesztő kettős-hibrid kísérletben azonosítottunk egy cDNS klónt (kísérletet lásd később), amelynek szekvencia-meghatározásával az mRNS 3' vége az ORF2 stop kodonjától 1231 bázispárra végződik (10 ábra).

A Flybase-ben található cDNS szekvenciák analízisével, és a RACE kísérletekkel

kapott adatok alapján elmondható, hogy a *lmg* lokuszról egy dicisztronos mRNS képződik, amelyben az ORF1 és ORF2 a *lmgA* és *lmgB* cisztronoknak felelnek meg. Az azonosított monocisztronos mRNS-ek feltehetően a dicisztronos mRNS processzáásával keletkeznek, de nem zárható ki annak lehetősége sem, hogy valóban képződik a *lemming* génről monocisztronos mRNS is.

A *lemming* lokusz dicisztronos elrendeződésének okait tovább kutatva megvizsgáltuk, hogy vajon ez a szerkezet konzerválódott-e az evolúció során a különböző *Drosophila* fajokban. Bioinformatikai módszerekkel meghatároztuk a 12 *Drosophila* faj LmgA és LmgB fehérjéinek szekvenciáit. Ezeket a fehérjeszekvenciákat globális illesztéssel a *Drosophila melanogaster* LmgA, illetve LmgB fehérjéihez hasonlítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy a lokusz felépítése minden fajban hasonló, de különböző szakaszai eltérő konzerváltságot mutatnak (5. táblázat).

Fajok	LmgA (as%)	92 ICS (bp) %	LmgB (as%)	3'-UTR (bp%)
<i>D. simulans</i>	100	(92) 97	145 as, 90 143 as, 99	92
<i>D. sechellia</i>	100	(92) 100	98	96
<i>D. yakuba</i>	100	(83) 88	98	91
<i>D. erecta</i>	100	(83) 86	97	91
<i>D. ananassae</i>	98	(96) 53	84	67
<i>D. pseudoobscura</i>	98	(111) 41	77	58
<i>D. persimilis</i>	98	(111) 41	76	59
<i>D. willistoni</i>	97	(157) 28	69	47
<i>D. mojavensis</i>	97	(165) 33	67	47
<i>D. virilis</i>	96	(162) 31	66	47
<i>D. grimshawi</i>	97	(150) 36	67	46

5. táblázat A *lmg* lokusz bioinformatikai vizsgálata 12 *Drosophila* fajban

A *lemming* lokusz különböző régióinak aminosav (as%) és nukleinsav (bp%) szekvencia hasonlóságai a 11 *Drosophila* fajban a *Drosophila melanogaster* szekvenciájához. ICS: intercisztronikus régió, 3'-UTR: 3' nem transzlálódó régió.

A LmgA fehérje szekvenciája bizonyult a legnagyobb mértékben konzerváltnak, mivel még a legtávolabbi fajok esetében is legalább 96%-os azonosságot mutat, míg a LmgB esetében ez az érték csak 66%, bár ez utóbbi érték is relatíve magas konzerváltságot jelent. Az intercisztronikus régió (ICS) és a 3' nem transzlálódó régió (3' UTR) nukleotid

szekvenciáját hasonlítottuk a *Drosophila melanogaster* megfelelő régióihoz. Az intercisztronikus régió mérete fajonként eltérő, de a 3' nem transzlálódó régióval együtt mind a 12 *Drosophila* fajban konzerváltságot mutat (5. táblázat).

5. A *lmgA* a *Drosophila* APC/C Apc11 alegységét kódolja

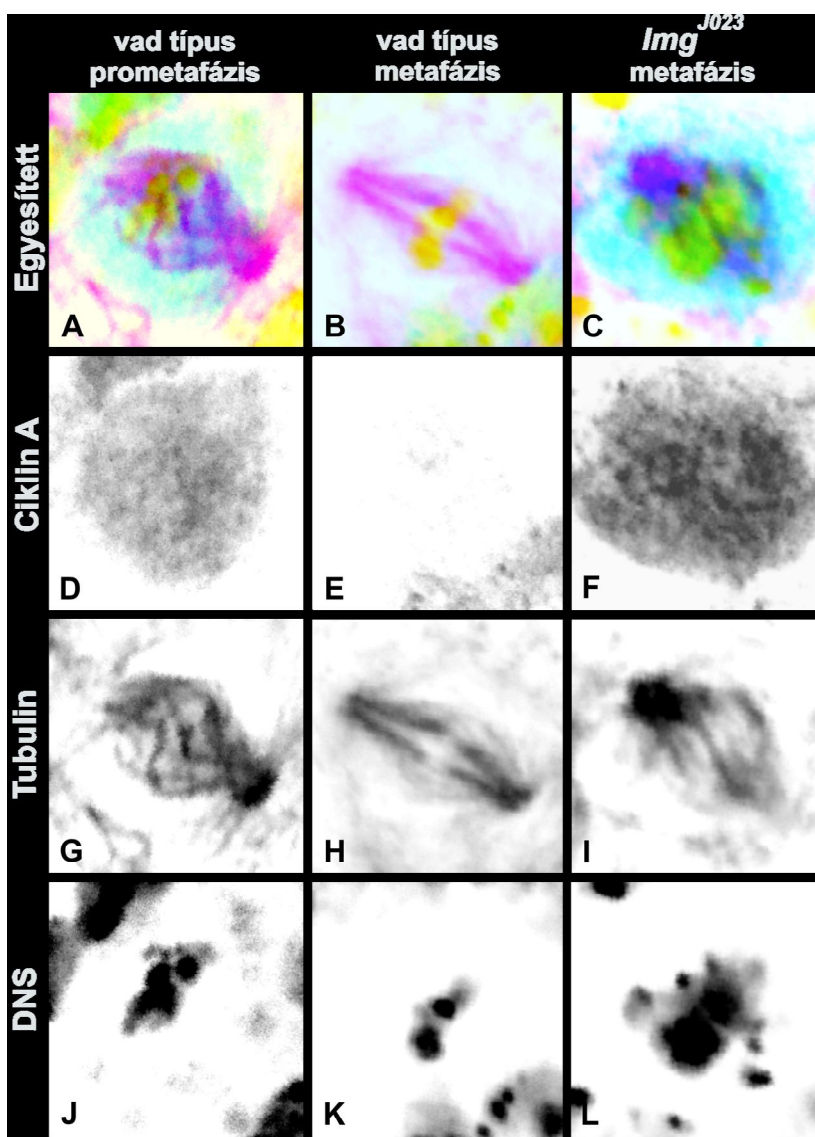
A *lmgA* kódoló szekvenciája 255 nukleotid hosszú, amely egy kis, mindössze 85 aminosavból álló RING finger domént tartalmazó polipeptidet kódol. A *LmgA* szekvenciájával homológ fehérjéket kerestünk a National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST adatbázis-kereső algoritmus használatával. Azt találtuk, hogy a fehérjeszekvenciája alapján a *LmgA* 78%-os azonosságot és 86%-os homológiát mutat a humán APC/C komplex Apc11 alegységével. Számos más faj, pl. egér, patkány, karmosbéka és zebraahal esetében is több mint 70% azonosságot mutatott az Apc11 fehérjével. A *LmgA* fehérje nagymértékű hasonlósága a humán és más fajok APC11 alegységhez, valamint a *lmg* mutánsok mitotikus fenotípusa együttesen azt mutatja, hogy a *lmg* gén *lmgA* cisztronja az *ecetmuslica* APC/C komplex APC11 alegységét kódolja.

A *lmgB* (Flybase-ben CG34441 jelöli) egy 365 aminosav hosszúságú feltételezett fehérjét kódol, amelyben nem tudtunk azonosítani funkcionális doméneket. Annak ellenére, hogy a *LmgB* fehérje szekvenciája konzerváltságot mutat a *Drosophilidae* családban, hasonló fehérjét más fajokban nem tudtunk azonosítani.

6. A mitotikus ciklinek felhalmozódnak a *lmg* mutánsokban

Az APC/C egyik fő funkciója a mitotikus ciklinek lebontásával a mitózisból történő kilépés szabályozása. Korábban már kimutattuk, hogy az Apc3/Mks, Apc6/Cdc16 és Apc10/Doc1 alegységek mutánsaiban felhalmozódnak a mitotikus ciklinek. Ezért szerettük volna megtudni, hogy vajon a *lmg* funkciójának hiánya érinti-e a mitotikus ciklinek degradációját. Ezt Ciklin A-ra és a Ciklin B-re specifikus poliklonális ellenanyag használatával, harmadik stádiumos lárvák agyának immunhisztokémiai festésével vizsgáltuk. A β -tubulinnal festett osztódási orsó alakjából, és TOTO-3-al festett DNS elhelyezkedéséből határoztuk meg, hogy a vizsgált sejtek a sejtciklus melyik fázisában

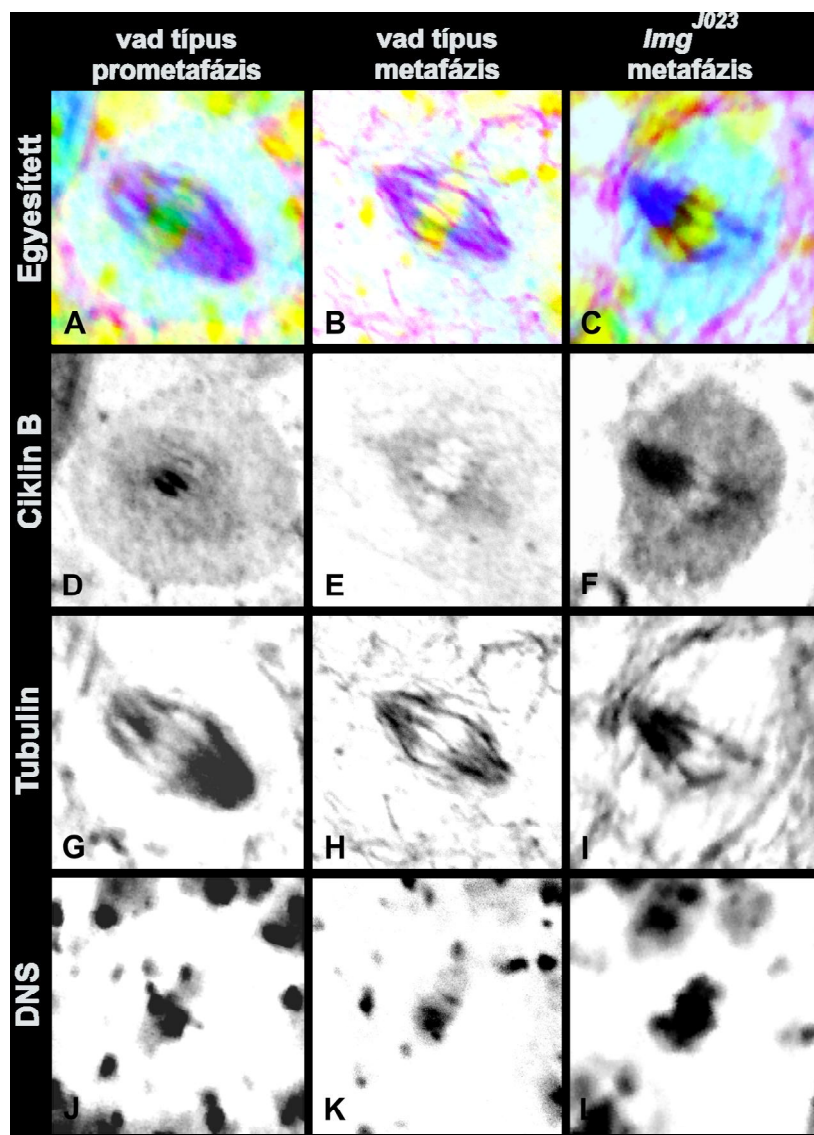
vannak.



11. ábra Ciklin A nem bomlik le a *lmg* mutánsokban.

Az egyesített képeken zöld szín jelöli a Tubulint, kék a DNS-t és piros a Ciklin A-t. A monokróm képek külön-külön mutatják a Ciklin A, Tubulin és a DNS festést. A vad típusú sejtekben a Ciklin A kimutatható prometáfázisban (A és D), azonban a metafázis során lebomlik (B és E). A *lmg*^{J023} mutáns sejtekben a Ciklin A felhalmozódását az erőteljes festődés mutatja (C és F).

Vad típusú sejtekben profázisban és korai prometáfázisban a Ciklin A mennyisége még detektálható, de metafázisban már nem (11. ábra A és D). A Ciklin A lebomlását a Ciklin B degradációja követi, szintje nagyon gyorsan lecsökken a kromoszómák szegregációját megelőzően (12. ábra B és E). Ezzel szemben a *lmg* mutánsokban, mindkét ellenanyaggal, jelentős különbségeket figyeltünk meg a metafázis-szerű stádiumban lévő sejtekben, a vad típushoz képest.



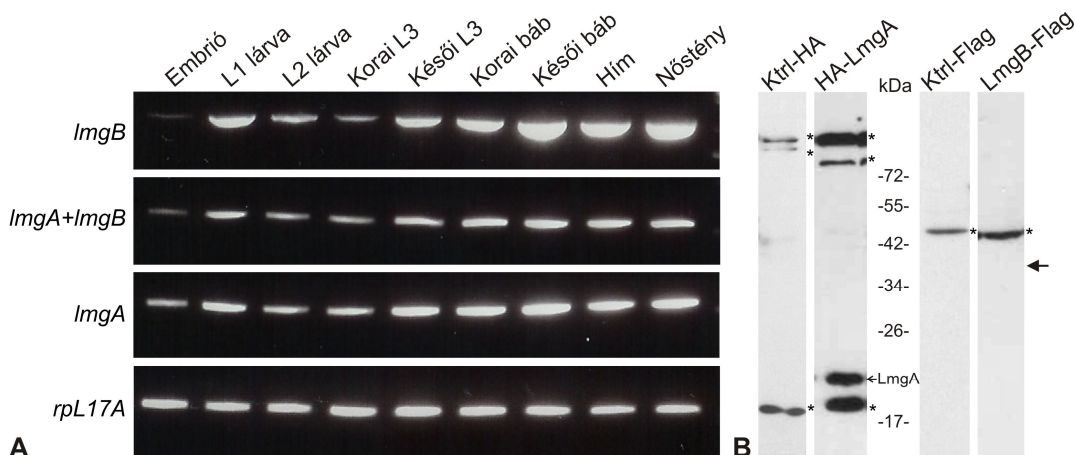
12. ábra Ciklin B felhalmozódik a *Img* mutánsokban.

Az egyesített képeken zöld szín jelöli a Tubulint, kék a DNS-t és piros a Ciklin B-t. A monokróm képek külön-külön mutatják a Ciklin B, Tubulin és a DNS festést. A vad típusú sejtekben a Ciklin B szintje magas prometáfázisban (A és D), majd a metafázis során fokozatosan lebomlik (B és E). A *Img*^{J023} mutáns sejtekben az intenzív festődés azt mutatja, hogy nem bomlik a Ciklin B a metafázis alatt (C és F).

A kontroll preparátumokon, a háttérfestődésénél intenzívebb festődést a Ciklin A-ra a vizsgált sejteknek (n=29) csak a 14%-ában, a Ciklin B esetében (n=24) 17%-ában tapasztaltunk. Ezzel szemben a vizsgált *Img*^{J023} sejteknek több mint 80%-ában mind a Ciklin A (n=17), mind pedig a Ciklin B (n=20) felhalmozódása megfigyelhető volt a mitotikus orsó körül (11 és 12 ábra C és F). Ezek a sejtek ugyanakkor igen intenzív DNS festődést is mutattak. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a Lmg fehérje szükséges a Ciklin A és Ciklin B lebontásához.

7. A *lmgA* és *lmgB* expressziójának vizsgálata az egyedfejlődés során

A dicisztronos génszerkezet gyakran duplikációk eredményeként jön létre, és általában a két cisztronnak hasonló funkciója van (Ben-Shahar, 2007). A *lmgA* és *lmgB* esetében azonban sem nukleotid szekvenciájuk, sem a képződő fehérjék nem mutatnak hasonlóságot. Mindazonáltal a mono- és dicisztronos mRNS-ek létezése felveti azt a lehetőséget, hogy a két cisztron expressziója eltérő. Ennek vizsgálatára, totál RNS-t izoláltunk vad típusú embriókból, L1, L2, korai L3, vándorló L3 lárva, korai báb, késői báb, hím és nőstény állatokból. Ezekben a mintákon RT-PCR-el vizsgáltuk a mono- és dicisztronos mRNS-ek képződését, olyan primerek felhasználásával, amelyek csak a *lmgA*-ra, csak a *lmgB*-re, illetve az intercisztronikus *lmgAB* régióra illeszkednek (10. ábra B).



13. ábra A *lmg* gén expressziós mintázata.

A: *lmg* specifikus transzkriptek meghatározása szemi-quantitatív RT-PCR-rel különböző fejlődési stádiumból izolált totál RNS mintákban. Bemérési kontrollként az *rpL17A* transzkripció szintjét használtuk. **B:** Western blot a HA- és Flag-jelölt dicisztronos *lmg* konstrukttal transzfektált S2 sejtekből izolált totál sejtextraktumon. Kontrollként (Ktrl) nem transzfektált sejteket használtunk. Az első oszlop a HA-LmgA immunoblotja anti-HA ellenanyaggal. A HA-LmgA fehérje immunoreaktív bandje ~20 kDa-nál. A második oszlop a LmgB-Flag immunoblotja Flag ellenanyaggal. Nagymértékű mintafelvitel követően sem kimutatható a LmgB-Flag. Nyíl jelöli a LmgB prediktált molekula tömegét. A csillaggal jelöltek az anti-HA és anti-Flag által nonspecifikusan felismert polipeptidek.

A kapott PCR termékek mintázata mind a három kísérletben nagyon hasonló volt. Embrióban nagyon alacsony expressziót tapasztaltunk, ami megemelkedett az L1 stádiumú lárvákban. Az L2 és korai L3 lárva stádiumban lecsökkent a génexpresszió, majd újra erősödött a vándorló L3 lárvákat és korai bábokat tartalmazó mintákban. A késői bábokból izolált mintákban tapasztaltuk a legerősebb expressziót, amelynek magas szintje a hímekben és nőstényekben is megmaradt (13. ábra A). Ezek az eredmények azt sugallják,

hogy a *lemming* gén terméke egy dicisztronos mRNS. Ha képződik róla monocisztronos *lmgA*, illetve *lmgB* mRNS is, ezeknek az expressziós mintázata nem mutat detektálható különbséget a dicisztronos mRNS-től.

8. LmgB fehérje expressziójának vizsgálta

A transzláció általában az első cisztron AUG start kodonjánál kezdődik, egy dicisztronos mRNS esetében pedig a második cisztron átíródása ún. belső riboszóma kötőhelyeken kezdődik (Blumenthal, 2011). A *lmg* gén szekvenciájának *in silico* analízisével nem találtunk ilyen belső riboszóma-kötőhelyeknek (Internal Ribosome Entry Site = IRES) megfelelő motívumokat. Azért, hogy megvizsgáljuk vajon mindkét cisztronról képződik-e fehérje, a teljes hosszúságú *lmg* cDNS-t egy olyan Gateway klónozó vektorba illesztettük, amelynek segítségével a *lmgA* 5' végére egy hemagglutinin (HA) nyomjelzőt tettünk megfelelő leolvasási keretben, a *lmgB* 3' végét pedig FLAG epitópot kódoló szekvenciával láttuk el. Ezt a konstrukciót Schneider 2 (S2) sejtekbe transzfektáltuk, majd a transzformánsok felszaporítása után teljes fehérjekivonatot készítettünk, és Western blott analízist végeztünk anti-HA és anti-FLAG monoklonális ellenanyagokkal (13. ábra). Kontrollként nem transzfektált sejteket használtunk. Az anti-HA ellenanyaggal sikerült kimutatnunk a hemagglutininnel jelölt LmgA fehérje termelődését. A HA-LmgA ~20 kDa-os mérettartományban futott, a várt 9,9 kDa helyett (13. ábra B). A HA-LmgA eltérése a prediktált molekulatömegtől azzal magyarázható, hogy a fehérje esetleges posztiszintetikus módosításai, valamint a hemagglutinin epitóp szekvencia megváltoztatták a LmgA molekulatömegét.

A prediktált 37,7 kDa molekulatömegű LmgB fehérje képződését azonban nem tudtuk detektálni a várt mérettartományban, csak egy anti-FLAG ellenanyag által felismert, más mérettartományban futó specifikus fehérjesáv jelent meg.

Annak ellenére, hogy a dicisztronos mRNS képződése kimutatható az egyedfejlődés során, és S2 sejtekben is sikerült kifejeztetni, a LmgB fehérje termelődését nem sikerült kimutatnunk. Ennek ellenére elképzelhető, hogy a LmgB termelődik ugyan, de mennyisége kimutathatóság alatti. Végül az sem zárható ki, hogy a LmgB elektroforetikus mobilitása kisebb, mint ahogy várnánk, és így esetleg együtt fut az anti-FLAG ellenanyag által nem specifikusan felismert fehérjesávval.

9. A *lemming* mutáns fenotípus menekítése

Annak eldöntésére, hogy vajon a *lmg* funkció kialakításában mindkét ORF-nek van-e szerepe, olyan transzgenikus *Drosophila* vonalakat hoztunk létre, amelyekben az élesztő Gal4 transzkripció faktor segítségével termeltetni tudtuk transzgenikus állatokban a dicisztronos (*lmgAB*) cDNS-t, illetve csak a *lmgA*, vagy csak a *lmgB* ORF-eknek megfelelő szekvenciákat. Vizsgáltuk, hogy ezeknek a transzgének a kifejeződése képes-e menekíteni a különböző *lmg* mutánsok letális és mitótikus fenotípusait (6. táblázat).

Genotípus	Letál fázis	Preparátum/ Látómező	Mitótikus index	M:A arány	Poliploid %	Apoptózis index
<i>w¹¹¹⁸</i>	Életképes	7/183	1.6±0.2	2.9±0.3	0	0.5±0.1
<i>lmg¹³⁸</i>	Előbáb (P4i)	10/194	5.9±0.5	-	50.7±7.9	1.8±0.5
<i>lmg¹³⁸;lmgA-pUAST/daGAL4</i>	Életképes	6/180	1.5±0.2	3±0.6	0	0.5±0.1
<i>lmg¹³⁸;lmgA+B-pUAST/daGAL4</i>	Életképes	4/100	1.4±0.2	3.1±0.3	0	0.6±0.2
<i>lmg¹³⁸;lmgB-pUAST/daGAL4</i>	Előbáb (P4i)	5/100	4.9±0.9	-	43.7±6.2	1.7±0.2

6. táblázat A *lmg¹³⁸* mutáns letális és mitótikus fenotípusának menekítése.

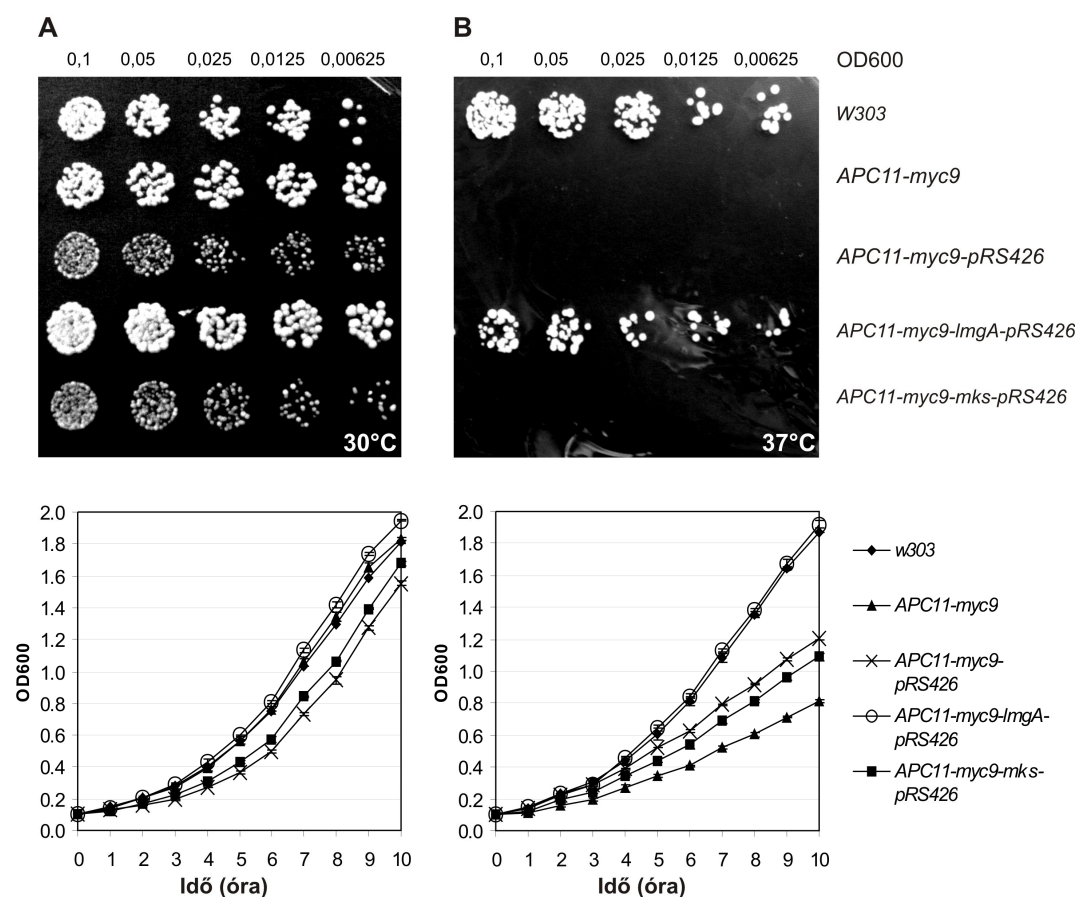
Preparátum/Látómező: A vizsgált preparátumok és mikroszkóp látómezők száma. A mitótikus index a mitózisban lévő sejtek átlagos számát fejezi ki egy-egy mikroszkóp látómezőben. A poliploid % megadja a diploid kromoszóma-garnitúránál nagyobb kromoszómaszámmal rendelkező sejtek számát adja meg a mitótikus sejtek százalékában kifejezve. Az apoptótikus index az apoptótikus sejtek számának átlagát mutatja egy mikroszkóp látómezőben.

Ha a *lmgAB* és *lmgA* konstrukciókat az állat minden sejtjében kifejeztettük, azok képesek voltak a *lmg* mutánsok letális és a mitótikus fenotípusát is menekíteni. A harmadik stádiumos lárvák agya és imágókorongjai a vad típusú állatokéval megegyező méretű és morfológiájúak voltak, belőlük életképes és fertilis imágók fejlődtek. Ezzel szemben a *lmgB* expressziójával nem tudtuk menekíteni a *lmg* mutánsok fenotípusát, még számos független *lmgB* vonal bevonásával sem, noha a *lmgB* mRNS képződését előzetesen RT-PCR-rel ellenőriztük.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy *lmg* mutánsok fejlődési és mitótikus fenotípusának kialakításáért kizárólag a *lmgA* funkciójának hiánya felelős. Eredményeink alapján a *lmgB* funkcióvesztése nem befolyásolja az életképességet.

10. LmgA funkciójának vizsgálata heterológ komplementációs kísérlettel

Mivel a prediktált LmgA fehérje nagyfokú homológiát mutat mind a humán, mind az élesztő APC/C Apc11 alegységével, kíváncsiak voltunk, hogy képes-e átvenni a sarjadzó élesztő Apc11 alegységének szerepét, Apc11 hiányos élesztősejtekben kifejeztetve. Ehhez egy élesztő transzformálásra alkalmas, pRS426 vektorba klónoztuk a *lmgA* kódoló régióját, amelynek kifejeződését egy konstitutívan aktív alkohol-dehidrogenáz promoter szabályozza. Ezt a konstrukciót az *APC11-myc9* mutáns élesztősejtekbe juttattuk, majd követtük a transzformánsok életképességét permisszív és restriktív hőmérsékleteken (14. ábra).



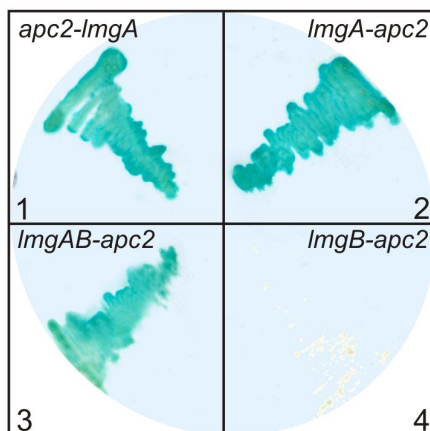
14. ábra A *lmgA* menekíti a sarjadzó élesztő *APC11-myc9* null mutáns hőmérséklet érzékeny fenotípusát. **A:** W303 kontroll, *APC11-myc9* mutáns és transzformált *APC11-myc9* mutáns sejtek normális növekedést mutatnak 30°C-on YEPD táptalajon (A: felső panel) és folyadék kultúrában (A: alsó panel). 37°C-on csak a kontroll, és a *lmgA*-pRS426 expressziós konstrukttal transzformált *APC11-myc9* mutáns sejtek voltak képesek növekedni YEPD szilárd (B: felső panel) és folyadék táptalajban (B: alsó panel).

Az *APC11-myc9* élesztősejtek normális növekedést mutatnak 30°C-on, azonban

37°C-on képtelenek az osztódásra, és rövid időn belül elpusztulnak. A kontrollként használt W303 vad típusú élesztő magasabb hőmérsékleten is képes osztódni. Amikor a pRS416-*lmgA* konstrukciót az *APC11-myc9* sejtekbe jutattuk, azt tapasztaltuk, hogy az élesztősejtek visszanyerték növekedési képességüket restriktív hőmérsékleten is. Ha az *APC11-myc9* sejtekbe csak az üres vektort, vagy egy másik *Drosophila* APC/C alegységet, az *Apc3/Mákost* kifejező pRS426-*mks* konstrukciót transzformáltuk, akkor nem tudtuk menekíteni az *APC11-myc9* élesztő mutáns hőérzékeny fenotípusát. Ezek alapján elmondható, hogy a *LmgA* fehérje képes funkcionálisan helyettesíteni az élesztő APC11 alegységet, és az *Apc11* funkciója evolúciósan konzerválódott.

11. *LmgA* kölcsönhatásának vizsgálata az *Apc2* alegységgel

Élesztőben és humán sejtekben kimutatták, hogy az *Apc11* és *Apc2* alegységek kölcsönhatnak egymással, és az APC/C katalitikus alkomplexét alkotják, ezért megvizsgáltuk, hogy *Drosophila*-ban is hasonlóan viselkednek-e (Tang 2001, Tronton 2006). Ehhez a fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására alkalmas élesztő kettős-hibrid módszert használtuk. Ezt a kísérletet eredetileg az *Apc2/Mr*-vel kölcsönható fehérjék azonosítására terveztük, ezért az *Apc2/Mr* alegységet kódoló szekvenciát klónoztuk pBTM116 plazmidba. Ezt az *apc2/mr-pBTM116* „csali” konstrukciót használtuk egy *Drosophila* pAct2 embrionális cDNS könyvtár szűrésére. Kifogtunk egy cDNS klónt, ami erős interakciót mutatott. Ezt a klónt kitisztítottuk és szekvenáltattuk. A kapott szekvencia analízisével kimutattuk, hogy két tandem elhelyezkedésű ORF-et kódol, amelyek megfelelnek a *lmg* génről átíródó dicisztronos mRNS szekvenciájának. Azért, hogy azonosítsuk a *lmg* cDNS-nek azt a régióját, amely szükséges az *Apc2*-vel való kölcsönhatáshoz, a cDNS *lmgA* és *lmgB*-nek megfelelő tethető szakaszait egyenként klónoztuk pGAD424 vektorba. Ezeket a konstrukciókat az *apc2/mr-pBTM116*-al együtt transzformáltuk L40 élesztőbe, és a transzformánsokon elvégeztük az interakció kimutatására szolgáló β -galaktozidáz tesztet (15. ábra). Amint a 15. ábrán látható, csak a *LmgA* mutatott interakciót az *Apc2*-vel. Evvel azonos eredményt kaptunk akkor is, ha a fehérjék előtt megcseréltük az aktivációs és DNS kötő doméneket.



15. ábra Élesztő kettős-hibrid kísérletben a LmgA kölcsönhat az APC2/Mr-val. *S. cerevisiae* L40 sejteket transzformáltunk *apc2*-pGAD424 és *lmgA*-pBTM116 (1), *apc2*-pBTM116 és *lmgA*-pGAD424 (2), *apc2*-pBTM116 és *lmgAB*-pACT2 (3), valamint *apc2*-pBTM116 és *lmgB*-pGAD424 (4) konstrukciókkal. Az interakciót a kék színreakciót mutató élesztő kolóniák jelezzik

Az előbbi kísérletekkel párhuzamosan, élesztő kettős-hibrid szűrést végeztünk a feltételezett LmgB fehérje kölcsönható partnereinek azonosítására is. A *lmgB*-pBTM116 konstruktot „csaliként” használva azonban nem tudtunk kölcsönható fehérjét azonosítani a *Drosophila* embrionális cDNS könyvtár szűrése során.

12. Az APC/C-vel kölcsönható E2 enzimek azonosítása

In vitro kísérletekben kimutatták, hogy a humán Apc11 és Apc2 alegységek kölcsönhatnak az Ubc4/5 és E2-C típusú ubikvitin-konjugáló enzimekkel (Gmachl, 2000; Tang, 2001). Ecetmuslicában eddig egy E2-C típusú enzim genetikai analízise történt meg, amely az UbcH10 homológja, és Viharnak nevezték el (Máthé, 2004). A *vihar* (*vih*) mutánsokban a mitózisban lévő sejtek metafázis-szerű stádiumban vesztegelnek, és Ciklin B felhalmozódik bennük. Ezen túlmenően, humán sejtekben kimutatták, hogy az UbcH10 az Ube2S-el együttműködve alakítja ki a poliubikvitin láncokat (Wu, 2009; Williamson, 2009). Ezért megvizsgáltuk, hogy szekvencia homológia alapján azonosítható-e Ube2S homológ *Drosophila*-ban.

A humán Ube2S szekvenciájával BLAST keresést végeztünk és azt találtuk, hogy a *CG8188* azonosítóval ellátott génről képződő hipotetikus fehérje több mint 60%-os azonosságot mutatott a humán Ube2S E2 enzimmel (16. ábra). E nagyfokú hasonlóság alapján a *CG8188* gént a humán Ube2S-t kódoló gén *Drosophila* ortológjának tekintjük és

a *DmUbe2S* elnevezést adtuk neki.

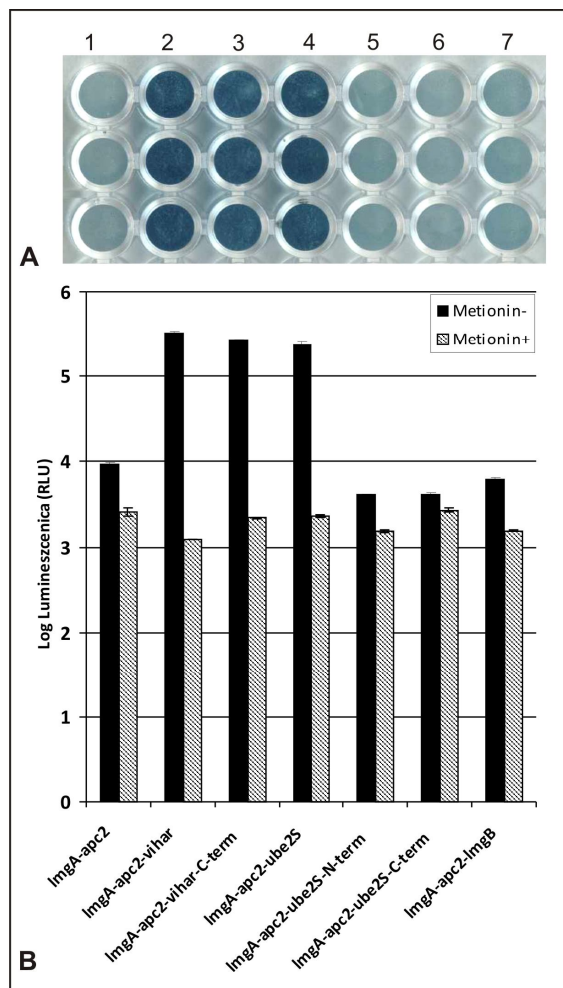
<i>DmCG8188</i>	(1)	MSSQYSNVENLSPQTIRQVMRELQEMETTPPEGIKVLINESDVTDIQA	(48)
<i>HsUbe2S</i>	(1)	MN--SNVENLPPHIIRLVYKEVTTLTADPPDGIKVPNEEDLTDLQV	(45)
		*.*****.*: ** * :*: : : **:*****: **.*:*.:	
<i>DmCG8188</i>	(49)	LIDGPAGTPYAAGIFRVKLTLNKDFPLTPPKAYFLTKIFHPNVAANGE	(96)
<i>HsUbe2S</i>	(46)	TIEGPEGTPYAGGLFRMKLLLGKDFPASPPKGYFLTKIFHPNVGANGE	(93)
		: *****.*:*.:** *.****** :*:*.******.***	
<i>DmCG8188</i>	(97)	ICVNTLKKDWKPDLGIKHILLTIKCLLIIVNPESALNEEAGKMLLERY	(144)
<i>HsUbe2S</i>	(94)	ICVNVLKRWTAEIGIRHVLLTIKCLLIHPNPESALNEEAGRLLLENY	(141)
		****.*:*.:.:****.*:***** *****.*:*.:	
<i>DmCG8188</i>	(145)	DDYSQRARMTEIHAQP-----AKCG-----VGAVGDAK	(173)
<i>HsUbe2S</i>	(142)	EEYAARARLLTEIHGGAGGPSGRAEAGRALASGTEASSTDPGAPGGPG	(190)
		::*: ***:*****. *:* * ** *	
<i>DmCG8188</i>	(174)	DDGGPSTKKHAG-LDKKLQDKKKEKLLKEKKRMLKRL	(209)
<i>HsUbe2S</i>	(142)	GAEGPMAKKHAGERDKKLAAKKK---TDKKRALRRL	(222)
		. ** :***** ***** ** :*:*** *:*	

16. ábra A *CG8188* génről képződő hipotetikus fehérje több mint 60%-os azonosságot mutatott a humán Ube2S E2 enzimmel. A *-gal jelölt aminosavak azonosak, a „:” jelölt aminosavak konzerváltak, és a „.” jelöltek hasonlóak.

Mivel eddig még nem állt rendelkezésünkre információ arról, hogy a Vihar hogyan lép kölcsönhatásba, illetve hogy kötődik-e az APC/C-hez, ezért a feltételezett *DmUbe2S*-el együtt vizsgáltuk fizikai interakcióját élesztő kettős-hibrid rendszerben. A *DmUbe2S* és *vihar* szekvenciáját klónoztuk pBTM116 és pGAD424 élesztő kettős-hibrid analízisre alkalmas vektorokba, és együtt transzformáltuk a LmgA és Apc2 fehérjéket kódoló konstruktokkal L40 élesztő sejtekbe. Annak ellenére, hogy az összes lehetséges kombinációban vizsgáltuk kölcsönhatásukat, nem tudtunk interakciót kimutatni. Az egyik lehetséges magyarázat erre az lehet, hogy az Apc2 és Apc11 alegységek együtt szükségesek az E2 enzimek kötődéséhez egy háromkomponensű interakciós komplexet alkotva. Ezen elképzelésünk igazolására élesztő hármashibrid rendszerben vizsgáltuk tovább az APC/C alegységek és az E2 enzimek kölcsönhatását.

Az *apc2/mr* szekvenciáját egy metioninnal szabályozható expressziós vektorba, a pRS416-ba klónoztuk. A *vihar* teljes kódoló szekvenciáját, valamint az N-terminális túlnyúló szekvenciát nem tartalmazó *vihar-C-terminális* konstrukciókat készítettünk pGAD424 vektorba. Ezt követően a *DmUbe2S* gén teljes, valamint az N-terminális és C-terminális szekvenciáját klónoztuk pBTM116 vektorba. Végül az élesztő kettős-hibrid

kísérletben használt *lmgA*-pBTM116, az *apc2*-pRS416, valamint a különböző *vihar* és *DmUbe2S* konstruktokat együtt transzformáltuk TAT7 élesztő sejtekbe.



17. ábra Élesztő hármashibrid kísérletben *LmgA* és *APC2/Mr* együtt mutat kölcsönhatást a *Vihar*, vagy *DmUbe2S* E2 enzimekkel.

S. cerevisiae Tat7 sejteket transzformáltunk *lmgA*-pBTM116, *apc2*-pRS416 és pGAD424 (A1); *lmgA*-pBTM116, *apc2*-pRS416 és *vihar*-pGAD424 (A2); *lmgA*-pBTM116, *apc2*-pRS416 és *vihar*-C-term-pGAD424 (A3); *lmgA*-pBTM116, *apc2*-pRS416 és *Dmube2S*-pGAD424 (A4); *lmgA*-pBTM116, *apc2*-pRS416 és *Dmube2S*-N-term-pGAD424 (A5); *lmgA*-pBTM116, *apc2*-pRS416 és *Dmube2S*-C-term-pGAD424 (A6); *lmgA*-pBTM116, *apc2*-pRS416 és *lmgB*-pGAD42 (A7) konstruktokkal és Pellet X-Gal módszerrel vizsgáltuk kölcsönhatásukat (A). A három sor párhuzamos kísérleteket jelöl.

B: β -galaktozidáz aktivitás mérése *Beta-Glo*® módszerrel minimál folyadék kultúrában 1 mM metionin jelenlétében és metionin nélkül. A kék színreakció (A: 2-4. oszlop) és a megemelkedett lumineszcencia (B: 2-4. oszlop) a *lmgA*-*Apc2*-*vihar*, a *lmgA*-*Apc2*-*viharC-term* és a *lmgA*-*Apc2*-*Dmube2S* kölcsönhatását jelzi.

A transzformánsokon elvégeztük a szemi-quantitatív β -galaktozidáz tesztet, és azt tapasztaltuk, hogy a negatív kontrollként használt *lmgA*-pBTM116, *apc2*-pRS416 és az üres pGAD424 vektort tartalmazó transzformánsok minimál táptalajon is képesek voltak

lassú növekedésre, és a β -galaktozidáz teszttel is ki tudtunk mutatni egy alacsony szintű riportergén aktivitást. Azonban, ha a transzformánsok a *lmgA* és *apc2* mellett a *vihar-teljes*, a *vihar-C-terminális* vagy a *Dmube2S-teljes* konstruktokat hordozták, a riportergén sokkal intenzívebb aktivitását tapasztaltuk, ami kölcsönhatásra utalt. Azért, hogy erről meggyőződünk, a β -galaktozidáz aktivitás kvantitatív meghatározásra alkalmas Pellet X-Gal és Beta-Glo[®] módszerekkel is vizsgáltuk a transzformánsokat. Amint azt a 17. ábra szemlélteti, ezekkel a módszerekkel egyértelműen ki tudtuk mutatni, hogy az Apc2 és Apc11 együtt szükségesek a Vihar, illetve a DmUbe2S kölcsönhatásához. Ezt az is bizonyítja, hogyha az Apc2 alegységet kivontuk a rendszerből úgy, hogy *apc2*-pRS416 konstrukt expresszióját metioninnal gátoltuk, akkor a riportergén aktivitása lecsökkent a kontrollban kapott alapértékre (17. ábra).

13. Genetikai kölcsönhatás vizsgálata az *apc2/mr*, az *apc11/lmg* és *vihar* gének között

Az Apc2 és Apc11 alegységek fizikai interakciójának vizsgálatát egymással és az E2 enzimekkel genetikai interakciós vizsgálatokkal is kiegészítettük. Gének, illetve géntermékek közötti funkcionális kapcsolat tanulmányozására elfogadott módszer a kettősmutánsok előállítása, és a közöttük lévő genetikai kölcsönhatás vizsgálata. Kísérleteinkhez a gének hipomorf alléljeit választottuk, hogy a kettősmutánsok fenotípusának esetleges változását könnyebben azonosítani tudjuk (7. táblázat).

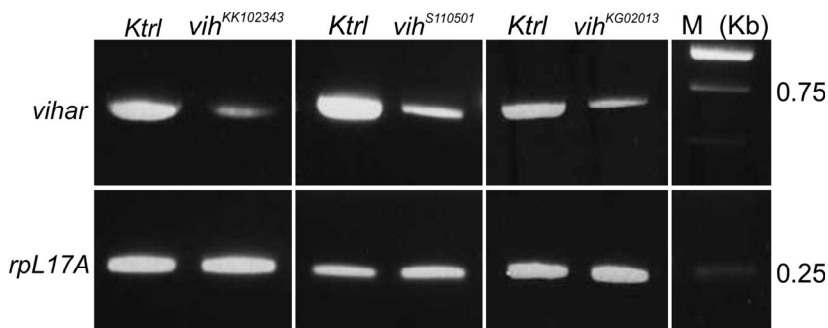
Genotípus	Letálfázis	Preparátum/ látómező	Mitótikus index	M:A arány	Poliploid %	Apoptózis index
<i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴	Farát adult P15(i)	6/135	4.1±0.8	4.5±0.7	19.6±5.6	1.4±0.3
<i>mr</i> ²	Szemiletelis, nőstény steril	6/174	1,4±0,1	3,3±0,4	0	1,2±0,3
<i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴ , <i>mr</i> ²	Előbáb P4(ii)	6/106	4,5±0,7	4,4±0,3	31,8±3,9	1,3±0,4
<i>vihar</i> ^{S110501}	Farát adult P15(i)	7/196	2,1±0,3	3,7±0,6	4,2±0,4	0,9±0,3
<i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴ , <i>vihar</i> ^{S110501}	Buborékos előbáb P3	6/116	6,1±0,6	3,9±0,7	44,3±8,4	1,8±0,3
<i>mr</i> ² ; <i>vihar</i> ^{S110501}	Korai L3 lárv	-	-	-	-	-
<i>mr</i> ² ; <i>vihar</i> ^{KG02013}	Korai L3 lárv	-	-	-	-	-

7. táblázat A *lmg*⁰³⁴²⁴, a *mr*² és a *vihar* mutánsok letális és mitótikus fenotípusának kvantitatív meghatározása.

Preparátum/Látómező: A vizsgált preparátumok és mikroszkóp látómezők száma. A mitótikus index megadja a mitózisban lévő sejtek számát egy-egy mikroszkóp látómezőben. A poliploid % megadja a több mint két kromoszóma garnitúrával rendelkező sejtek számát a mitótikus sejtek százalékában kifejezve. Az apoptótikus index megmutatja az apoptótikus sejtek számának átlagát egy mikroszkóp látómezőben.

Az *Apc2* esetében a *mr*² szemiletális és nősténysteril alléljét használtuk, és rekombinációval kettősmutánst állítottunk elő a *lmg*⁰³⁴²⁴ alléllal. A kettősmutánsokat tesztelő keresztezéssel ellenőriztük. A *lmg*⁰³⁴²⁴, *mr*² homozigóták az egyszeres mutánsokhoz képest korábbi, P4(ii) báb stádiumban pusztultak el. Mitotikus fenotípusukat megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy szignifikánsan megemelkedett a poliploid sejtek száma (7. táblázat).

A *Vihar* esetében a *vih*^{S110501} és *vih*^{KG02013} P elem inszerciós alléleket használtuk, melyek RT-PCR vizsgálatok alapján hipomorfoknak bizonyultak (18. ábra). A *lmg*⁰³⁴²⁴ és *vih* egyes mutánsok az egyedfejlődés farát adult P15(i) bábstádiumában pusztulnak el (7. táblázat). Ezzel szemben a *lmg*⁰³⁴²⁴; *vih*^{S110501}/*vih*^{KG02013} kettősmutánsok a buborékos előbáb, vagy P3 stádiumban pusztulnak el, és erősebb mitotikus fenotípust mutattak. Jelentősen megemelkedett a mitózisban lévő (magas MI), valamint poliploid sejtek száma. A *mr*²; *vih*^{S110501}/*vih*^{KG02013} kettősmutánsoknál az előzőeknél drasztikusabb fenotípus-változást tapasztaltunk. A homozigóta állatok korai L3 stádiumban pusztultak el. Mivel ezeknek az állatoknak nagyon kicsi az agya, ezért mitotikus preparátumokat nem tudtunk készíteni, és mitotikus fenotípusukat nem tudtuk meghatározni.



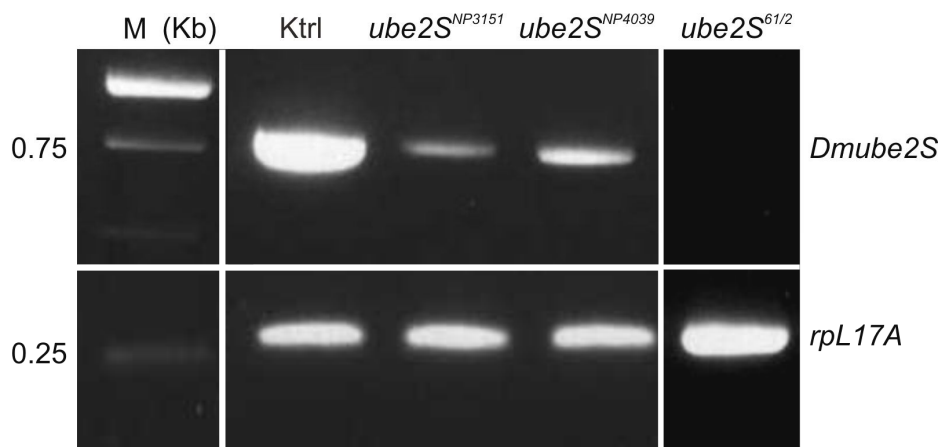
18. ábra A génexpresszió mértékének meghatározása RT-PCR-rel a *vihar* mutánsokban.

Ktrl: kontroll; M: molekulásúly marker. Felső sorban a *vihar* génre specifikus primerekkel kapott PCR termékek láthatóak. Az alsó sor a bemérési kontrollként használt riboszómális fehérjét kódoló *rpL17A* génre specifikus primerekkel kapott PCR termékeket mutatja.

A *DmUbe2S* gén két P elem inszerciós alléljét, a *DmUbe2S*^{NP4039} és a *DmUbe2S*^{NP3151} szereztük be törzsközpontokból. Mindkét allél esetében a homozigóták életképesnek és fertilisnek bizonyultak (8. táblázat). A *DmUbe2S* gén expresszióját RT-PCR-rel ellenőriztük, és mindkét törzsben jelentős csökkenést tapasztaltunk a vad típushoz képest (19. ábra). Az APC/C alegységek és a *DmUbe2S* kettősmutásai nem mutattak fenotípus-változást az egyes mutánsok kiindulási fenotípusához képest (8. táblázat).

14. *DmUbe2S* null mutáns előállítása

Humán és *Drosophila* sejtekben kimutatták, hogy a K11-kapcsolt poliubikvitin láncok iniciációját az UbcH10/Vihar, míg a lánc hosszabbítását az Ube2S E2 enzim végzi (Williamson, 2009). Amennyiben az Ube2S-nek ilyen létfontosságú feladata van, hiánya szembetűnő lehet a sejtre és az organizmusra nézve. Ennek ellenére, a *DmUbe2S* gén P elem inszerciós alléljai életképesnek bizonyultak (8. táblázat). Azt feltételeztük, hogy a vizsgált allélek hipomorf jellegéből adódóan, a képződő kevés géntermék is elegendő a gén funkciójának ellátásához, ezért elhatároztuk, hogy null mutánst állítunk elő. A gén 5' vége előtt 85 bázispárra elhelyezkedő P{GawB}CG8188^{NP4039} elem remobilizálásával 400 olyan vonalat hoztunk létre, amelyekben a P elem ugrása következtében a *white* (*w+*) szemszín markert elvesztették. Ezeket a fehér szemű állatokat törzsbe állítottuk. A közöttük megbújó deléciós mutánsokat PCR reakcióval azonosítottuk, és szekvenálással meghatároztuk a deléciók pontos méretét. A *DmUbe2S*^{50/1} jelöltben 910 bázispáros deléció képződött, amely eltávolította a gén csaknem kétharmadát, beleértve az UBC domént kódoló régiót. A *DmUbe2S*^{61/2}-ben 1409 bázispáros deléció képződött, amely eltávolította a gén teljes kódoló régióját, tehát a *DmUbe2S*^{61/2} null allélnek tekinthető (19. ábra).



19. ábra A génexpresszió mértékének vizsgálata RT-PCR-rel az *DmUbe2S* mutánsokban. Ktrl: kontroll; M: molekulásúly marker. Felső sorban a *DmUbe2S* génre specifikus primerekkel kapott PCR termékek láthatóak a vad típusban (Ktrl) és a *DmUbe2S* mutánsokban. Bemérési kontrollként a *rpL17A* transzkripció szintet használtuk (alsó sor).

Mindkét *DmUbe2S* deléciós mutánsnak vizsgáltuk az életképességét és mitotikus fenotípusát is. A *DmUbe2S*^{50/1} és a *DmUbe2S*^{61/2} homozigóta állatok életképeseknek és

fertiliseknek bizonyultak. A harmadik stádiumos lárvák agyának és imágókorongjainak fejlődésében és morfológiájában nem tapasztaltunk eltérést a kontrollhoz képest. Mitótikus fenotípusukat megvizsgálva nem volt szignifikáns eltérés a vad típusú állatok fenotípusától (8. táblázat). A további kísérletekhez a *DmUbe2S*^{61/2} mutánst használtuk. Kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a *DmUbe2S* E2 enzimnek – a humán *Ube2S* enzimmel ellentétben – nincs, vagy elhanyagolható szerepe lehet az APC/C-függő poliubikvitin láncok létrehozásában normál körülmények között.

15. A *DmUbe2S*^{61/2} genetikai kölcsönhatást mutat a *morula*, *lemming* és *vihar* génekkel

A *DmUbe2S* és *vihar* valamint a *morula* és *lemming* gének közötti kölcsönhatást genetikai interakciós kísérletekben is vizsgáltuk. A *DmUbe2S*^{61/2} allél felhasználásával *DmUbe2S*^{61/2}; *mr*² és *Dmube2S*^{61/2}; *lmg*⁰³⁴²⁴, valamint *DmUbe2S*^{61/2}; *vihar*^{S110501}/*vihar*^{KG02013} kettősmutánsokat állítottunk elő, és vizsgáltuk fenotípusukat. Először megvizsgáltuk, hogy a kiindulási egyes mutánsokhoz képest eltolódik-e a kettősmutánsok letálfázisa. Ehhez minden vonalból 500-500 L2 stádiumú lárvát gyűjtöttünk és követtük egyedfejlődésüket (8. táblázat).

Genotípus	Letálfázis
<i>DmUbe2S</i> ^{61/2}	Életképes
<i>DmUbe2S</i> ^{NP3151}	Életképes
<i>DmUbe2S</i> ^{NP4039}	Életképes
<i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴	Farát adult P15(i)
<i>DmUbe2S</i> ^{NP3151} ; <i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴	Farát adult P15(i)
<i>DmUbe2S</i> ^{NP4039} ; <i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴	Farát adult P15(i)
<i>vihar</i> ^{S110501} / <i>vihar</i> ^{KG02013}	90% életképes, farát adult P15(i)
<i>DmUbe2S</i> ^{61/2} ; <i>vihar</i> ^{S110501} / <i>vihar</i> ^{KG02013}	Farát adult P15(i)
<i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴	Farát adult P15(i) (500 lárvából 57,6±4,2%)
<i>DmUbe2S</i> ^{61/2} ; <i>lmg</i> ⁰³⁴²⁴	Farát adult P15(i) (500 lárvából 33,4±4,1%)
<i>mr</i> ²	30% életképes, nőtény steril, farát adult P15(i),
<i>DmUbe2S</i> ^{61/2} ; <i>mr</i> ²	Farát adult P15(i)

8. táblázat A *DmUbe2S*, a *DmUbe2S*; *lmg*, a *DmUbe2S*; *mr*², valamint *DmUbe2S*; *vihar* mutánsok letálfázisának kvantitatív meghatározása.

A *mr*² homozigóták 30%-a életképes, a nőtények sterilek. A *DmUbe2S*^{61/2}; *mr*² homozigóták 100%-a elpusztult a kikelés előtti farát adult P15(i) stádiumban. Mitótikus

fenotípusukat megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a mr^2 mutáns mitotikus indexéhez és metafázis:anafázis arányához képest a $DmUbe2S^{61/2}$; mr^2 kettős mutánsokban kissé megemelkedik a mitózisban és metafázisban lévő sejtek száma (9. táblázat). A mr^2 mutánsokból készített preparátumokon poliploid sejteket egyáltalán nem találtunk, ezzel szemben a $DmUbe2S^{61/2}$; mr^2 homozigóták mitózisban lévő sejtjeinek $2,4 \pm 2,2\%$ -a poliploidnak bizonyult (9. táblázat).

A lmg^{03424} homozigóták $57,6 \pm 4,2\%$ -a farátadult P15(i) bábstádiumban pusztul el, míg a $DmUbe2S^{61/2}$; lmg^{03424} homozigótáknak csak $33,4 \pm 4,1\%$ -a jut el eddig a stádiumig (8. táblázat). Azonban lmg^{03424} erős mitotikus fenotípusához viszonyítva a $DmUbe2S^{61/2}$; lmg^{03424} kettősmutánsokban nem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget (9. táblázat).

Genotípus	Preparátum/ Látómező	Mitotikus index	M:A arány	Poliploid %	Apoptózis index	Túlkondenzált kromoszóma%
w^{1118}	5/150	$1,5 \pm 0,1$	$3 \pm 0,3$	0	$0,5 \pm 0,1$	0
$Dmube2S^{61/2}$	5/150	$1,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$	0	$0,7 \pm 0,2$	0
mr^2	6/174	$1,4 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,4$	0	$1,1 \pm 0,3$	0
mr^2 ; $DmUbe2S^{61/2}$	8/234	$2,1 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,8$	$2,4 \pm 2,2$	$1,6 \pm 0,4$	0
lmg^{03424}	6/135	$4,1 \pm 0,8$	$4,5 \pm 0,7$	$19,6 \pm 5,6$	$1,4 \pm 0,3$	$40,4 \pm 2,9$
$DmUbe2S^{61/2}$; lmg^{03424}	5/150	$4,9 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,3$	$17,9 \pm 7$	$0,9 \pm 0,3$	$37,1 \pm 4,1$
$vihar^{S110501}/vihar^{KG02013}$	10/271	$2,6 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,8$	$7,6 \pm 2,9$	$1 \pm 0,3$	$17,5 \pm 0,9$
$DmUbe2S^{61/2}$; $vihar^{S110501}/vihar^{KG02013}$	6/119	$8,5 \pm 0,9$	$6,6 \pm 2,4$	$6,6 \pm 2,4$	$1,6 \pm 0,4$	$77,1 \pm 7,3$

9. táblázat Az $DmUbe2S^{61/2}$, a $vihar$, és a mr^2 mutánsok, valamint a mr^2 ; $DmUbe2S^{61/2}$, a $DmUbe2S^{61/2}$; lmg^{03424} és a $DmUbe2S^{61/2}$; $vihar$ kettősmutánsok mitotikus fenotípusának kvantitatív meghatározása.

Preparátum/Látómező: A vizsgált preparátumok és mikroszkóp látómezők száma. A mitotikus index megadja a mitózisban lévő sejtek számát egy-egy mikroszkóp látómezőben. A poliploid % megadja a több mint két kromoszóma garnitúrával rendelkező sejtek számát a mitotikus sejtek százalékában kifejezve. Az apoptotikus index megmutatja az apoptotikus sejtek számának átlagát egy mikroszkóp látómezőben. A túlkondenzált kromoszóma % megadja túlkondenzált kromoszómákat tartalmazó sejtek számát a mitotikus sejtek százalékában kifejezve.

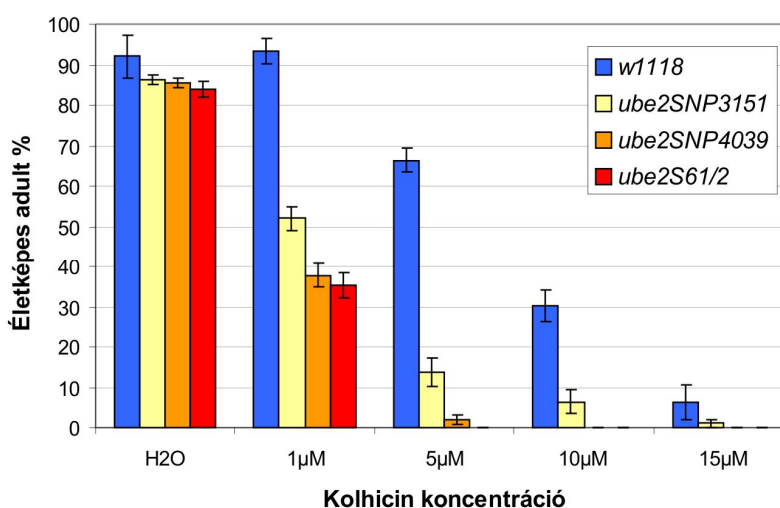
A $vihar^{S110501}/vihar^{KG02013}$ transz-heterozigóták 90%-a életképes, azonban a kikelést követően azonnal vagy 1-2 napon belül elpusztulnak (8. táblázat). Ezzel szemben a $DmUbe2S^{61/2}$; $vihar^{S110501}/vihar^{KG02013}$ kettősmutánsok farát adult P15(i) bábstádiumban pusztultak el. Mitotikus fenotípusukban drasztikus változást tapasztaltunk a $vihar$ transzheterozigótákhoz képest (9. táblázat). A kettősmutánsokban több mint háromszorosra emelkedett a mitózisban lévő sejtek száma, valamint több mint kétszeresére a metafázis:anafázis arány. A $vihar$ mitózisban lévő sejtjeinek $17,5 \pm 0,9\%$ túlkondenzált kromoszómát tartalmaz, a $DmUbe2S^{61/2}$; ez az érték a $vihar$ kettősmutánsokban $77,1 \pm 7,3\%$ -ra emelkedett (9. táblázat).

16. A *DmUbe2S* mutánsok érzékenyek mitózist gátló szerekkel szemben

Noha a *DmUbe2S* funkció kiesése *Drosophilában* nem bizonyult kritikusnak az APC/C-függő ubikvitilációs folyamatban, az előzőekben ismertetett genetikai interakciós kísérleteink és irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy esetleg az APC/C működését meghatározó orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban lehet szerepe. Ennek tesztelésére *DmUbe2S* mutánsok kolhicin és docetaxel mitotikus gátlószerekkel szembeni érzékenységét vizsgáltuk. Ezek a szerek a mikrotubulusok normális működését gátolva, aktiválják az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmust.

A mitotikus gátlást kiváltó szerekkel történő kezelést úgy végeztük, hogy a szereket különböző koncentrációkban ráértük az L1 lárvákat tartalmazó táptalajra, így a szer közvetlenül érintkezett az állatok testfalával, és bekerült az emésztőrendszerükbe. Két szer, a docetaxel és kolhicin bizonyult megfelelőnek a kísérletekhez, ugyanis ezek oldószere, és a szerek hatása alacsony koncentrációban nem bizonyult toxikusnak a vad típusú állatokra nézve.

A kolhicinből vízben oldva törzsoldatot készítettünk, és 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M végkoncentrációban alkalmaztuk. Az oldatokat 50-50 vad típusú és *DmUbe2S* homozigóta L1 lárvát tartalmazó fiola táptalajára mértük, és követtük az állatok egyedfejlődését.

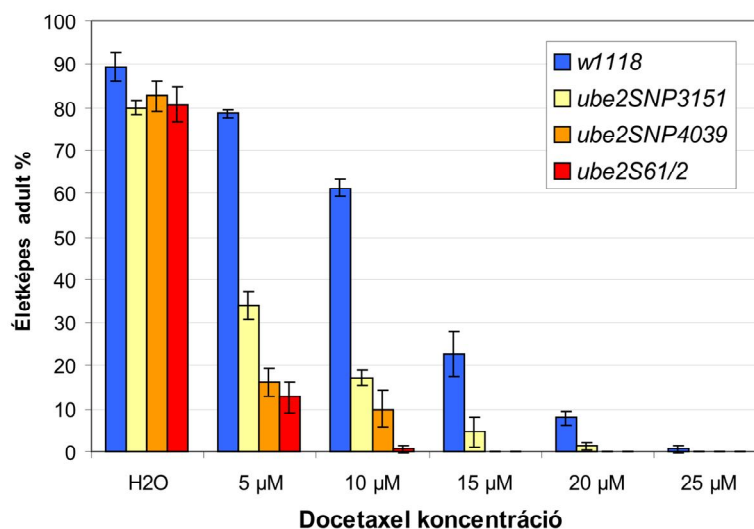


20. ábra. A *DmUbe2S* mutánsok érzékenysége kolhicinnel szemben. Az oszlopok különböző végkoncentrációban alkalmazott kolhicin hatását mutatják az életképességre. Az életképes adult % megadja a kezelt állatokból kifejlődött imágók arányát.

A vad típusú állatokra 1 μ M kolhicin még nem bizonyult toxikusnak, az állatok több

mint 90%-a életképes, fertilis imágóvá fejlődött (20. ábra). Ezzel szemben a *DmUbe2S* hipomorf és null mutánsai kevesebb, mint 50%-ban éltek túl a kezelést. 5 μ M-os koncentrációban a vad típusú állatok 70%-a túlél, azonban a *DmUbe2S* mutánsoknál ez az érték 15% alá csökken, sőt a *DmUbe2S*^{61/2} null mutánsra 100%-ban letálisnak bizonyult. A 10 és 15 μ M koncentrációjú kolhicin hatására a vad típusú állatok még 30%-a, illetve 8%-a életképesnek bizonyult, de az *DmUbe2S* esetében csak a *DmUbe2S*^{NP4039} hipomorf mutánsok éltek túl, jóval kevesebb számban, mint a vad típusúak (20. ábra).

A docetaxelből alkoholban oldva készítettünk törzsoldatot, majd ezt vízben hígítva 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M végkoncentrációban alkalmaztuk. A docetaxel kezelés hatására a *DmUbe2S* a kolhicin kezeléshez hasonló érzékenységet mutatott (21. ábra). A vad típusú állatok az 5 μ M docetaxel kezelést 80%-ban túléltek, míg az *DmUbe2S* mutánsoknak csak 10-30%-a. 15 μ M koncentrációnál a vad típusú állatok 25%-a életképes imágóvá fejlődött, azonban a *DmUbe2S*^{NP4039} és *DmUbe2S*^{61/2} mutánsokra 100%-ban letálisnak bizonyult (21. ábra).

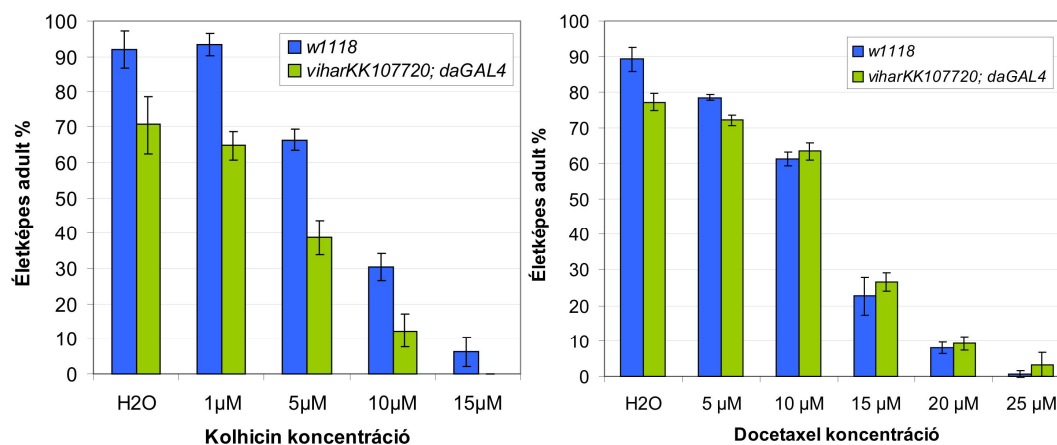


21. ábra A *DmUbe2S* mutánsok érzékenységet mutatnak docetaxellel szemben.

Az oszlopok különböző végkoncentrációban alkalmazott docetaxel hatását mutatják az életképességre. Az életképes adult % megadja a kezelt állatokból kifejlődött imágók arányát.

Annak igazolására, hogy a mitótikus szerekek szembeni érzékenység csak a *DmUbe2S*-re jellemző, a *vihar* mutánt is kezeltük kolhicinnel és docetaxellel. Ehhez a *vihar*^{KK107720} RNS interferencia vonalat használtuk, amelyben a duplaszálú RNS-ek

képződését egy általános, minden sejttípusban kifejeződő daGAL4 driverrel indukáltuk. Noha a *vihar* RNS interferencia indukált állatoknak csak kb. 70%-a életképes, de mind kolhicin, mind pedig docetaxel kezelésekben a vad típushoz hasonló érzékenységet mutattak (22. ábra).



22. ábra A *vihar*^{KK107720} indukált RNS interferencia vonal a vad típushoz hasonló érzékenységet mutat a mitotikus gátlást kiváltó kolhicinnel és docetaxellel szemben.

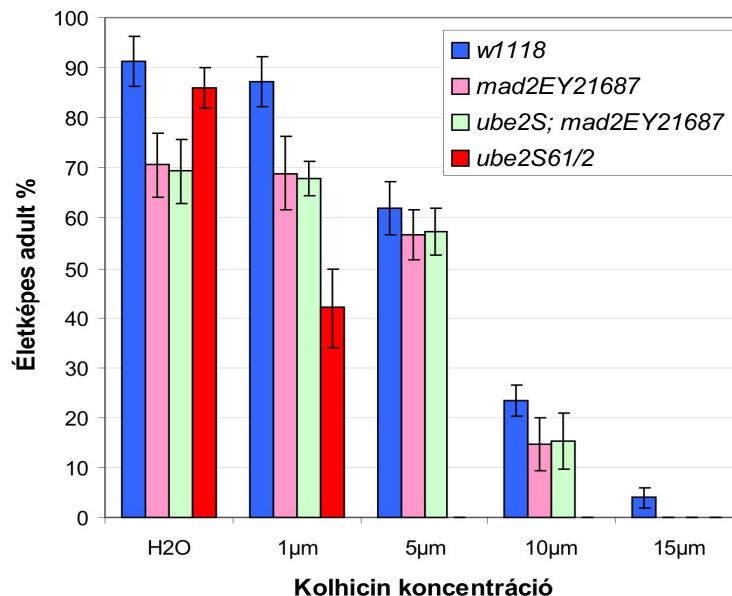
Az oszlopok különböző végkoncentrációban alkalmazott kolhicin és docetaxel hatását mutatják az életképességre. Az életképes adult % megadja a kezelt állatokból kifejlődött imágók arányát.

A fenti kísérleti eredmények bizonyítják, hogy a *DmUbe2S* mutánsok nagyfokú érzékenységet mutatnak az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmust aktiváló kolhicin és docetaxel mitotikus gátlószerekkel szemben. Ez a tény egyben alátámasztja feltételezésünket, hogy a *DmUbe2S* génnek az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban lehet szerepe *Drosophilában*. Ebben a tekintetben hasonló a *Drosophila* és humán *DmUbe2S* fehérjék funkciója (Garnett, 2009).

17. A *mad2* hiánya menekíti az *DmUbe2S* kolhicin érzékenységét

Humán sejtvonalakon végzett kísérletek azt mutatják, hogy ha az *Ube2S* mellett az orsó-összeszerelési ellenőrzési pontban szerepet játszó *BubR1*-et is inaktiválták, akkor a mitotikus gátlást kiváltó szerek kimosását követően megszűnt a korábban az *Ube2S* hiányában tapasztalt mitotikus gátlás (Garnett, 2009). Ez az eredmény alátámasztja a humán *Ube2S* szerepét az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban.

Megvizsgáltuk, hogy mi történik a *DmUbe2S* mutánsainkban kolhicin kezelés hatására, ha az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmus inaktivált állapotban van. Ehhez a *mad2* szemileltális alléljével, a *mad2*^{EY216871}-el és a *DmUbe2S*^{61/2}-el kettősmutánt állítottunk elő. A *DmUbe2S*^{61/2}; *mad2*^{EY216871} homozigóta lárvákat a korábban ismertetett kísérletekben, és az ezekben használt végkoncentrációkban kolhicinnel kezeltük (23. ábra).



23. ábra A *mad2* menekíti *DmUbe2S* kolhicinnel szembeni érzékenységét. Az oszlopok különböző végkoncentrációban alkalmazott kolhicin hatását mutatják az életképességre. Az életképes adult % megadja a kezelt állatokból kifejlődött imágók arányát %-ban kifejezve.

Azt tapasztaltuk, hogy mind a *mad2*^{EY216871}, mind pedig a *DmUbe2S*^{61/2}; *mad2*^{EY216871} kettős homozigóták a vad típusú állatokhoz hasonló érzékenységi fenotípust mutattak. Még a legnagyobb, 15µM végkoncentrációban alkalmazott kolhicin hatására is voltak életképes imágóvá fejlődött állatok (23. ábra). Kontrollként a *DmUbe2S*^{61/2} mutánt használtuk, amely a korábbi kísérletekben kapott eredményekhez hasonlóan, csak a legkisebb koncentrációban alkalmazott kolhicint élték túl. Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a Mad2 hiánya képes volt menekíteni a *DmUbe2S* mitotikus gátlást kiváltó szerekkel szembeni érzékenységét. Ez az eredmény ugyancsak azt támasztja alá, hogy a *DmUbe2S* génnek az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban van szerepe *Drosophilában*.

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az APC/C a Cullin-RING-finger típusú ubikvitin-ligázok családjába tartozó multi-alegységes komplex. Különböző szabályozó fehérjék ubikvitinációjával kulcsfontosságú szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában. Az APC/C-t legalább 13 alegység építi fel, azonban pontos alegység-összetétele még nem ismert. Az APC/C szerkezeti modellje szerint az alegységek strukturális és funkcionális alkomplexekbe rendeződnek (Thronton, 2006). A szerkezeti vázat alkotó alegységekhez szabályozó molekulák és szubsztrát fehérjék kapcsolódnak, a Cullin-szerű Apc2 és a RING finger domént tartalmazó Apc11 alegységek pedig a katalitikus alkomplexét alkotják (Vodermaier, 2003; Passmore, 2005). Az Apc11-ről sarjadtó élesztőben és humán sejtekben kimutatták, hogy E1 és E2 enzimek jelenlétében képes nem specifikusan célfehérjék ubikvitilálására, ezért az APC/C minimális ubikvitin-ligáz moduljának tekintik (Tang, 2001).

Dolgozatomban egy többsejtű modellorganizmusban, a *Drosophila melanogaster*-ben vizsgáltam az Apc11 alegység funkcióját, és kölcsönhatását E2 ubikvitin-konjugáló enzimekkel. Kimutattuk, hogy az Apc11-et a dicisztronos szerkezetű *lemming* gén kódolja, melynek 5' vége felőli ORF-je, a *lmgA* egy olyan fehérjét kódol, amely tartalmaz egy RING finger domént, és szekvenciája több mint 80%-os azonosságot mutat a humán APC/C Apc11 alegységével. A *lmgA* mutációi az állatok pusztulását okozzák az egyedfejlődés báb stádiumában, ami azt mutatja, hogy hasonlóan más fajok, valamint a *Drosophila* többi APC/C alegységeihez, a *LmgA* nélkülözhetetlen az egyedfejlődés során. Mivel az Apc11 az APC/C katalitikus alkomplexét alkotja, a *lmg* mutációi az APC/C funkciójának kieséséhez és a sejtciklus hibáihoz vezetnek.

A *lmg* mutánsok mitotikus fenotípusa azt sugallja, hogy a *LmgA* az APC/C komplex alegysége. A *lmg* lárvális agypreparátumok mitotikus sejtjeiben megfigyelt metafázis-szerű gátlás, kromoszóma túlkondenzáció és poliploidia, valamint az apoptotikus sejtek számának megemelkedése nagyon hasonló a már korábban jellemzett *apc3/mks*, *apc6/cdc16^{RNSi}*, és az *apc8/cdc23^{RNSi}* *Drosophila* APC/C alegységek mutánsainak fenotípusához (Deák, 2003; Pál, 2007a).

Azt, hogy a *LmgA* valóban az APC/C komplex tagja, tovább erősíti az immunfestési kísérleteink eredménye, mellyel kimutattuk, hogy a *LmgA* hiányában a metafázis gátlásban lévő sejtekben az APC/C legfontosabb szubsztrátjainak, a Ciklin A-nak

és Ciklin B-nek a lebontása zavart szenved. Más *Drosophila* APC/C alegységek esetében azt tapasztaltuk, hogy míg az Apc6/Cdc16 és Apc8/Cdc23 alegységek hiánya csak a Ciklin B lebontását érinti, addig az Apc3/Mks esetében mindkét mitotikus ciklin felhalmozódik (Pál, 2007a; Deák, 2003). A mitotikus ciklinek szerepet játszanak a kromoszómák kondenzációjában és mozgásában. Humán és *Drosophila* sejtekben túltermelt Ciklin A esetében kimutatták, hogy gátolta a kromoszómáknak a sejt egyenlítői síkjába rendeződését, a Ciklin B felhalmozódása következtében pedig a kromoszómák oszcilláló, pólusirányú mozgását figyelték meg (Elzen és Pines, 2001; Parry és O'Farrell, 2001). *Xenopus* sejtextraktumokban kimutatták, hogy a Ciklin B stabilizálódása kromoszóma túlkondenzációhoz vezet, amelyben Ciklin B/Cdc2-függő protein-kináz kaszkád által foszforilált H1 hiszton játszik szerepet (Kishimoto, 1998). A mitotikus ciklinek hibás degradációja magyarázhatja a *lmg* mutánsokban megfigyelt túlkondenzálódott és szétszórtan elhelyezkedő kromoszómák gyakori előfordulását a mitotikus sejtekben.

A LmgA hiányában jelentősen megemelkedett az apoptotikus sejtek száma a harmadik stádiumos lárvák agyszövetében és imágókorongjaiban. Ma még nem ismert, hogy az APC/C funkciójának hiánya milyen mechanizmussal vezet apoptózishoz. Elképzelhető, hogy a *lmg* mutánsokban a mitózisban rekedt sejtek gyorsan és közvetlenül apoptózisba kezdenek anélkül, hogy visszatérnék interfázisba. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a mitózis és az apoptózis folyamatának közös komponensei vannak (King, 1995). Egyes feltételezések szerint az apoptózis egy alapértelmezett útvonal, amelynek kivédésében a Survivin fehérje játszik szerepet a mitózis során. A Survivin a mitózis elején a mitotikus orsó mikrotubulusaihoz kötődik, és ha ez a kölcsönhatás valamilyen zavart szenved, az a Kaszpáz-3 aktivációjához és apoptózishoz vezet (Ambrosini, 1997; Li, 1998).

Ha a mitotikusan osztódó sejteket különböző mikrotubulusok működését gátló szerekkel kezelték, mint pl. paclitaxel, a sejtek megrekedtek metafázisban, majd közvetlenül és gyorsan apoptózisba léptek (Woods, 1995). Ezeknek a szereknek a hatására aktiválódik az orsó-összeszerelődési ellenőrzési pont, amely gátolja az APC/C funkcióját, ezért lehetséges, hogy az APC/C aktivitásának hiánya felelős az apoptózis kialakulásáért (Sorger, 1997; Cohen-Fix, 1997; Zacharie és Nasmyth, 1999). Ezt támasztják alá saját eredményeink is, hisz valamennyi eddig vizsgált létfontosságú APC/C alegység funkciójának kiesése megnövekedett apoptózist eredményezett.

Jurkat sejtekben kimutatták, hogy a Fas-indukált apoptózis során aktiválódnak a

Cdk-k, mert egy kaszpáz-3-szerű proteáz hasítja a Wee1 kinázt és az Apc3/Cdc27 alegységet, inaktíválva ezzel az APC/C-t (Zhou, 1998). Számos irodalmi adat van arra vonatkozóan, hogy a Cdk-k aktivitása megemelkedik az apoptózis során, ami azt sugallja, hogy ezek az enzimek az apoptotikus útvonal komponensei (Shi, 1994; Meikrantz, 1996; Yao, 1996). Ezért lehetséges, hogy az APC/C funkciójának hiányában a mitotikus ciklinek megemelkedett mennyisége, és Cdk aktivitásának elhúzódása vezet apoptózishoz. Azonban a mitotikus ciklinek mennyiségének emelkedése önmagában nem elegendő az apoptózis beindulásához a Survivin fehérje védelmező funkciója miatt (Ambrosini, 1997; Li, 1998). A védelmező funkciók hiányában, az anafázis során megemelkedett Cdk aktivitásra a sejtek apoptózis indukciójával válaszolhatnak. Ha az APC/C-nek is hasonló, védelmező szerepe van, és ha ebben valamilyen hiba csúszik, akkor a Survivin és az APC/C funkciójának egyidejű kiesése, és a megemelkedett Cdk aktivitás vezethet apoptózishoz.

A *lmg* lárvális agypreparátumokban megfigyelt poliploid sejtek feltehetően olyan sejtek, amelyek elkerülték az apoptózist, újra megkettőzték kromoszómaikat mielőtt mégegyszer mitózisba léptek, de a citokinézis nem történt meg. Néhány sejt képes ezt a folyamatot többször is megismételni, amire a preparátumukon megfigyelt extrém poliploid sejtek jelenléte utal. Ezek alapján elképzelhető, hogy a mitózisnak van egy olyan kitüntetett szakasza, amely különösen érzékeny a *LmgA* funkciójának hiányára, és így az APC/C működésének kiesésére, ami nagy gyakorisággal, apoptózis indukciójához vezet.

A *lmg* génről átíródó mRNS-ek vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy két tandem elhelyezkedésű, eltérő leolvasási keretben lévő ORF-et kódol. A gén 5' vége felőli *lmgA* cisztron a *Drosophila* APC/C Apc11 alegységét kódolja, a 3' vég felőli *lmgB* cisztronról képződő feltételezett fehérje funkciója ismeretlen. Sem szekvencia, sem pedig funkcionális hasonlóságot nem találtunk a *lmgA* és *lmgB* cisztron között, annak ellenére, hogy a két cisztron közötti kapcsolat számos dicisztronos génre jellemző (Ben-Shahar, 2007). Mindkét ORF szekvenciája és elrendeződése evolúciósan konzerválódott a *Drosophilidae* családban, amely kiterjed a két cisztron közötti, és 3' nem transzlálódó régiókra is. Ennek ellenére mi azt tapasztaltuk, hogy a *lmgB* feltételezett terméke nem létfontosságú, nem tudtunk benne azonosítani ismert fehérje motívumokat, továbbá nem találtunk kölcsönható partnert sem egy *Drosophila* embrionális cDNS könyvtár nagy léptékű szűrése során. Ezen túlmenően, *Drosophila* S2 sejtekben sem volt kimutatható a *LmgB* fehérje termelődése a dicisztronos mRNS-ről. A *lmgA* cisztron az AUG start kodonja mellett további három azonos leolvasási keretben lévő AUG kodont is tartalmaz. A *Drosophila* *stoned* és *snapi*n

dicisztronos gének esetében kimutatták, hogy a dicisztronos mRNS-ben található AUG kodonok csillapították a második cisztron transzlációját (Wall, 2005). Mindent összevetve, eddigi vizsgálataink nem nyújtanak felvilágosítást a *lmgA* és *lmgB* dicisztronos elrendeződésének okára, valamint a *lmgB* funkciójára sem.

A LmgA funkcióját egy heterológ komplementációs kísérlettel vizsgáltuk úgy, hogy a *Drosophila* Apc11-et kódoló *lmgA*-t kifejeztettük hasadó élesztő *Apc11-myc9* mutánsban. A LmgA képes volt menekíteni az *Apc11-myc9* mutáns hőérzékeny fenotípusát, amit a transzgenikus élesztősejtek vad típushoz hasonló növekedése bizonyított restriktív hőmérsékleten. Ez az eredmény azt támasztja alá, hogy a LmgA az Apc11 alegység *Drosophila* ortológja.

Az APC/C aktivitásához E2 enzimek működése is szükséges. *In vitro* kimutatták, hogy az Ubc4/5 és az E2-C típusú E2 enzimek kötődnek az APC/C-hez, vagy az Apc2, vagy az Apc11 alegységhez (Gmachl, 2000; Yu, 1996; Tang, 2001; Summers, 2008; Vodermaier, 2003). Hasadó élesztőben és ecetmuslicában végzett genetikai vizsgálatok alapján azonban úgy tűnik, hogy inkább az E2-C típusú E2 enzimek működnek együtt az APC/C-vel. Hasadó élesztőben az UbcP4/Ubc11 esszenciálisnak bizonyult. Hiányában a sejtciklus metafázis stádiumban megrekedt, nem történt meg a leánykromatidák szétválása, és felhalmozódott a Cdc13 mitotikus ciklin. Az UbcP4/Ubc11 túltermelése pedig képes volt menekíteni a *cut9/apc6* mutáns hőérzékeny fenotípusát (Osaka, 1997). *Drosophilában* az E2 enzimet kódoló *vihar* gén mutánsai az *ubcP4/ubc11* mutánsokhoz hasonló fenotípust mutattak. A Vihar hiányában a sejtek metafázis-szerű állapotban megrekedtek, és nem történt meg a Ciklin B lebontása, továbbá a Vihar funkciója szükségesnek bizonyult az APC/C működéséhez (Máthé, 2004).

Az eddigi vizsgálatokból úgy tűnt, hogy vagy az Apc2 vagy az Apc11 köti az E2 enzimeket (Tang, 2001; Summers, 2008; Gmachl, 2000; Chang, 2004). Eredményeink alapján *Drosophilában* ettől eltérő kölcsönhatás valósul meg, amelynek lényege, hogy mindkét alegység együttes jelenléte szükséges az E2 enzimek kötődéséhez. Élesztő kettős- és hármas-hibrid módszerekkel fizikai interakciót mutattunk ki a LmgA és az Apc2/Mr között, és ennek a két APC/C alegységnek kölcsönhatása szükséges a Vihar és a DmUbe2S E2 enzimek kötődéséhez. Ezt a fizikai kölcsönhatást genetikai interakciós kísérletekkel is megerősítettük. A *lmgA* szinergisztikus genetikai kölcsönhatást mutatott az *apc2/mr* alegységgel, és az E2 enzimet kódoló *vihar*ral. Ez a gének funkcionális kapcsolatára utal, és arra, hogy a LmgA valóban az APC/C komplex része. Élesztőben és humán sejtekben

ezek a fehérjék az APC/C katalitikus modulját alkotják, ebben a munkánkban az Apc2 és az Apc11 alegység fizikai kapcsolatát *Drosophilában* is igazoltuk.

Az E2-C típusú enzimek abban különböznek az Ubc4/5 típusú enzimektől, hogy N-terminális részükön egy kiterjedt, erősen konzervált aminosav-szekvenciát tartalmaznak. Ennek szerepéről még keveset tudunk. Az Ubc12 E2 esetében leírták, hogy az N-terminális része szükséges a NEDD8 E1 enzimmel történő optimális kölcsönhatáshoz (Huang, 2004). Humán sejt kivonatokból *in vitro* kimutatták, hogy az APC/C-vel elsősorban az E2-C típusú UbcH10 működik együtt, az Ubc4/5 típusú UbcH5 pedig csak akkor vett részt az APC/C funkciójában, ha az ubikvitin nagy feleslegben volt jelen. Az UbcH10 konzervált N-terminális végének mutációjával megállapították, hogy az APC/C számos kritikus funkcióját szabályozza, fokozza az aktivitását, az ubikvitináció hatékonyságát és szelektivitását. Ez alapján felállítottak egy modellt, mely szerint, az UbcH10 katalitikus magja kapcsolódik az Apc2 és Apc11 által alkotott alkomplexhez, ezután az N-terminális vége az Apc2-höz kötődik, létrehozva egy reakciófelszínt a szubsztátok optimális bekötődéséhez. E modell szerint az Apc2 és az UbcH10 N-terminális vége egy olyan „csatornát” hoz létre, amelyen keresztül képes együttműködni a D-box receptorral, és biztosítja a szubsztátok megfelelő elhelyezkedését (Summers, 2008). Az élesztő hármas-hibrid kísérleteinkben kapott adataink alapján, *Drosophilában* az E2-C típusú E2 enzimek APC/C-vel való kölcsönhatáshoz az Apc2 és Apc11 alegységek együttesen szükségesek. Ehhez az interakcióhoz elégséges volt a Vihar fehérje C-terminális vége, azonban a DmUbe2S esetében a teljes hosszúságú polipeptidre szükség volt.

A lizin 48 (K48) oldallánccal kapcsolódó poliubikvitin láncok kötődése a célfehérjékhez degradációs jelként szolgál, amelyeket felismer és lebont a 26S proteaszóma (Pickart, 2004). Nemrégiben kimutatták, hogy egy másik kötéstípus is, a lizin 11 (K11) oldallánccal kapcsolódó poliubikvitinek, valamint K63, K48 és K11 kötések keverve tartalmazó rövid ubikvitin láncok is degradációs jelként szolgálnak (Jin, 2008; Kirkpatrick, 2006).

Humán és *Drosophila* sejtekben *in vitro* kimutatták, hogy a K11-kapcsolt poliubikvitin lánc kialakításához két E2 enzim is szükséges. A lánc iniciációját az UbcH10 vagy az UbcH5, míg a lánc hosszabbítását az Ube2S végzi (Wu, 2010; Williamson, 2009). Ha az Ube2S expresszióját RNS interferenciával csendesítették *Drosophila* S2 sejtekben, akkor a sejtek hosszabb időt töltöttek metafázisban, és nem történt meg a Ciklin B lebontása. Ezeknek az irodalmi adatoknak ellentmondanak a HeLa sejtekben és a *Xenopus*

sejtkivonatokban kapott kísérleti eredmények. HeLa sejtekben az Ube2S nem bizonyult létfontosságúnak a mitózis folyamán (Garnett, 2009). Azonban ha mitotikus gátlást kiváltó szerekkel kezelték a sejteket, az Ube2S hiányában a sejtek megrekedtek metafázisban, valamint nem történt meg az APC/C legfontosabb szubsztrátjainak ubikvitinációja (Garnett, 2009). *Xenopus* sejtkivonatokban azt találták, hogy az Ube2S hiánya nem befolyásolta a Ciklin B lebontását. Az Ube2S jelenléte akkor vált fontossá, amikor csökkent a Ciklin B szabad lizin oldalláncainak száma (Dimova, 2012). *Drosophila* S2 sejtekben a *DmUbe2S* hiányában a sejtek a metafázis stádiumában hosszabb időt töltenek a vadtypusnál, a mitotikus index gyenge emelkedést és a Ciklin B felhalmozódását is tapasztalták (Williamson, 2009). A *DmUbe2S* hipomorf allélek, és az általunk előállított null mutánsok életképeseknek és fertiliseknek bizonyultak, mitotikus fenotípust nem mutattak. Ezek alapján, a *DmUbe2S* nem létfontosságú normális körülmények között az intakt organizmus számára. Ebből arra lehet következtetni, hogy *Drosophilában* normális körülmények között nem jelentős, vagy nincs szükség a *DmUbe2S* lánchosszabbító funkciójára. Úgy tűnik, hogy a poliubikvitin lánc létrehozását egyedül a Vihar E2 enzim végzi. A *DmUbe2S* csak olyan körülmények között vált nélkülözhetetlenné, amikor mitotikus gátlást okoztunk úgy, hogy az állatokat a mikrotubulusok stabilizációját kiváltó szerekkel kezeltük. A mitotikus gátlást kiváltó szerekkel szembeni fokozott érzékenység csak a *DmUbe2S*-re jellemző, és azzal magyarázható, hogy *DmUbe2S* hiányában a sejtek nem tudnak kiszabadulni az orsó-összeszerelési ellenőrzési pont által okozott gátlás alól, ami végül az állatok pusztulásához vezet. Ez a fenotípus nagyon hasonló az Ube2S hiányos humán sejtekben tapasztaltakhoz, amikor mikrotubulusok depolimerizációját gátló taxolokkal kezelték őket. Ube2S hiányában, a szerek kimosását követően, a sejteknek sokkal több időre volt szükségük, hogy kiszabaduljanak a gátlás alól (Garnett, 2009). Továbbá azt is megfigyelték, hogy ezekben a sejtekben nem történt meg a Ciklin B lebontása. Garnett és munkatársai azt feltételezik, hogy az Ube2S inaktíválja az orsó-összeszerelési ellenőrzési pontot. Megfigyelték, hogy ha az *ube2S*-t és az orsó-összeszerelési ellenőrzési pontban szerepet játszó *bubR1*-et egyszerre inaktiválták, akkor megszűnt az *ube2S* mitotikus gátlást kiváltó szerekre való érzékenysége: a szerek kimosását követően, a sejtek kiszabadultak a gátlás alól. Hasonló jelenséget tapasztaltunk *Drosophilában* is, amikor *Dmube2S*^{61/2}; *mad2*^{EY216871} kettősmutánsokat kezeltünk kolhicinnel. Ezekben a kettősmutánsokban a *DmUbe2S* mellett hiányzik az orsó-összeszerelési ellenőrzési pontban résztvevő Mad2 fehérje is. Ismert, hogy ha a

mikrotubulosok nem megfelelően kapcsolódtak a kinetokórhoz, a Mad2 kötődik a Cdc20-hoz, és így inaktiválja az APC/C-t, gátolja a szekurin és a M ciklinek lebontását (Musacchio, 2007). Mad2 hiányában inaktiválódik az orsó-összeszerelési ellenőrzési pont, amely képes menekíteni a Dmube2S mitotikus gátlást okozó szerekkel szembeni érzékenységét. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a humán sejtekhez hasonlóan Drosophilában sem létfontosságú az Ube2S, funkciójának kiesése nem okoz mitotikus fenotípust. Úgy gondoljuk, hogy Drosophilában a DmUbe2S szerepe akkor válik esszenciálissá, ha a sejteket valamilyen mitotikus stressz éri.

A DmUbe2S és APC/C kölcsönhatását biokémiai adatok mellett genetikai kölcsönhatásuk is bizonyítja Drosophilában. A *Dmube2S* és a *lmg*, valamint az *Apc2*-t kódoló *mr* kettősmutánsok fenotípusát vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a kettősmutánsok korábbi stádiumokban pusztulnak el, mint a *mr*² és *lmg*⁰³⁴²⁴ mutánsokra jellemző letálfázis. A *Dmube2S*^{61/2}; *mr*² kettősmutánsok lárvális agypreparátumaiban azt is megfigyeltük, hogy megemelkedett a metafázisban megrekedt sejtek és a poliploid sejtek száma a *mr*² mutánshoz képest. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DmUbe2S Drosophilában is szorosan együttműködik az APC/C-vel. Ha az APC/C-vel kölcsönható mindkét E2 enzimet kiejtettük, az végzetes következményekkel járt. A *Dmube2S*; *vihar* kettősmutánsok a *vihar* homozigótákhoz képest erősebb mitotikus fenotípust mutattak, és a két E2 hiánya korábbi letalitást eredményezett. Eredményeink alapján a DmUbe2S és a Vihar E2 enzimek együttműködnek az APC/C-vel Drosophilában, de valószínűleg nem együtt vesznek részt a célfehérjék ubiquitilálásában. A DmUbe2S enzimnek szerepe lehet az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban, talán annak inaktiválásában, de ennek pontos meghatározásához még további vizsgálatok szükségesek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Deák Péternek, hogy lehetőséget adott, hogy kutatócsoportjában elsajátítsam a genetikai és molekuláris biológiai technikákat és ismereteket! Hálás vagyok, hogy tanácsaival precíz és önálló kutatómunkára tanított! Köszönöm állandó támogatását, és a dolgozatom megíráshoz nélkülözhetetlen segítségét és türelmét!

Hálás vagyok Dr. Pál Margitnak, hogy rendkívüli türelemmel megtanított a genetika és molekuláris biológia gyakorlati alkalmazására! Köszönöm a kísérletekben nyújtott segítségét és barátságát!

Köszönöm Dr. Udvardy Andornak a kísérletekben nyújtott minden segítségét és állandó jó tanácsait! Köszönöm Udvardy Katalinnak az S2 sejtekkel végzett kísérletekben nyújtott segítségét!

Szeretném megköszönni Kovács Leventének a bioinformatikai kísérletekben, a mikroszkópos felvételek készítésében nyújtott segítségét, és feltétel nélküli barátságát!

Köszönöm a családomnak a támogatásukat és biztatásukat!

ÖSSZEFOGLALÓ

A sejtosztódások során a kromoszómák szétválását, valamint a mitózisból való kilépést egy ubikvitin-függő fehérjelebontó mechanizmus szabályozza. Ez a folyamat két lépésből, egy jelölő és egy lebontó lépésből áll. Az első, jelölési lépésben egy enzimaszkád ubikvitin láncot kapcsol a célfehérjékhez, majd az így megjelölt fehérjéket felismeri, és lebontja a sejtek fehérjelebontó szerve, a proteaszóma. A jelölő folyamat főszereplője egy ubikvitin-ligáz komplex, az APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome), amely alkalmas felületet biztosít az ubikvitilációs reakció számára, és meghatározza ennek szubsztrát-specifitását is.

Az APC/C egy nagyméretű, mintegy 1.5 MDa-os fehérjekomplex, amelynek eddig 12-13 alegységét azonosították különböző fajokban. Az egyes alegységek homológjai általában nagymértékű szekvencia és topológiai hasonlóságot mutatnak, ami evolúciós konzerváltságot bizonyít. Annak ellenére, hogy ismerjük az APC/C alapvető szerepét és szabályozásának főbb elemeit, még számos kérdés megválaszolatlan mind felépítésével, mind pedig működésével kapcsolatosan. Csoportunkban az APC/C alegységeit kódoló gének P elem inszerciós mutánsait, és alegység-specifikus transzgenikus RNS-interferencia vonalakat vizsgálunk *Drosophila* modell organizmuson. Ezek részletes fenotípus analízisével igyekszünk megismerni az alegységek funkcióját, valamint új ismereteket szerezni az APC/C felépítéséről és működéséről is. Ebbe az átfogó projektbe illeszkedik a dolgozatomban ismertetett munka, amelyben az *Apc11* alegységet kódoló *lemming* (*lmg*) gént azonosítottuk és jellemeztük genetikai, citológiai és molekuláris biológiai módszerekkel.

Munkánk a *l(2)03424* P elem inszerciós mutáns azonosításával kezdődött, amely farát adult letális fenotípust, valamint szem-, szárny- és sörtefejlődési rendellenességeket mutatott. Imágókorongjainak akridin narancs festésével az apoptotikus sejtek számának jelentős megemelkedését tapasztaltuk, ezért az inszerció által érintett gént *lemmingnek* neveztük el. Ezt további, az eredeti alléllal nem komplementáló, hipomorf (*lmg*^{EY11317} és *lmg*^{J023}) és null (*lmg*¹³⁸) allélek azonosítása és jellemzése követte, melyek kísérletesen jól vizsgálható allélsort alkottak. A különböző erősségű allélek közös tulajdonsága a mitotikus génekre jellemző késői letális fenotípus volt. A P elem inszerciós allélek (*lmg*⁰³⁴²⁴ és *lmg*^{EY11317}) esetében a P elem remobilizációja gyakran eredményezte a mutáns

fenotípusjegyek reverzióját vad típusúvá, ami arra utalt, hogy ezek az inszerciók közvetlenül felelősek a mutáns fenotípus kialakulásáért.

Orceinnel festett lárvális neuroblaszt preparátumok citológiai vizsgálata szembetűnő mitotikus rendellenességeket tárt fel valamennyi allél esetében. A mitózisban lévő sejtek száma (mitotikus index) sokkal magasabb volt, mint a vad típusban, és ezeknek a sejteknek a többsége prometa- és metafázisban volt. A prometa- és metafázisos sejtek kromoszómái erősen túlkondenzálódtak, és a ritka anafázisban lévő sejtek kromoszómái is rendellenesen viselkedtek. Ugyancsak magas volt a poliploid sejtek száma, amelyek pedig gyakorlatilag nem figyelhetők meg vad típusú preparátumokon, és ezek kromoszómái is túlkondenzálódtak voltak. Összességében, a *lmg* mutánsok felsorolt mitotikus fenotípusjegyei a sejtosztódás prometa-, vagy metafázisos gátlására utaltak.

A *lmg* gén klónozását a P elem inszerciókkal szomszédos DNS szekvenciák plazmid-menekítésével végeztük. Ezt követően a plazmid-menekítési fragmentek szekvencia analízisével, majd pedig a genomikus és cDNS szekvenciák összevetésével határoztuk meg a *lmg* lokusz felépítését. Ezekből kiderült, hogy a *lmg* gén nem tartalmaz intronokat, és egy 2 kb méretű mRNS-t kódol, amely két nyitott leolvasási keretet, vagy ORF-t (Open Reading Frame) tartalmaz, azaz dicisztronos. Az 5'-végi ORF1-et *lmgA*-nak, a 3'-végi ORF2-t pedig *lmgB*-nek neveztük el. A *lmgA* egy rövid, 85 aminosavból álló polipeptidet kódol, amely több mint 80%-os szekvencia-azonosságot mutat a humán Apc11-el, és tartalmaz egy tökéletesen konzerválódott RING finger domént, amely valamennyi ismert Apc11 alegységben megtalálható. A *lmgA* ORF egyedüli expressziója képes volt menekíteni a *lmg*¹³⁸ null mutánsok letális, morfológiai és mitotikus fenotípusát. A *lmgB* ORF egy 365 aminosavból álló feltételezett fehérjét kódol, amelyben nem ismerhetők fel konzervált domének. Noha ez a szekvencia jelentős konzerváltságot mutat a *Drosophilidae* családon belül, a *LmgB*-vel homológ szekvenciákat nem találtunk más rendszertani egységekben.

A *Drosophila* valamennyi egyedfejlődési stádiumában vizsgáltuk a *lmg* lokusz expresszióját. Kísérleti adataink szerint a dicisztronos mRNS a lokusz fő transzkripciós terméke, bár nem zárható ki, hogy emellett monocisztronos mRNS-ek is képződnek. Ez utóbbiak képződése esetén arányuk és expressziós mintázatuk nem térhet el észrevehetően a dicisztronos mRNS-től. Ezen túlmenően, nem tudtuk kimutatni a *lmgB* ORF hatékony transzlációját *Drosophila* S2 sejtekben olyan körülmények között, amelyekben a *lmgA* ORF transzkripciója és a *LmgA* fehérje képződése detektálható volt.

Az APC/C jól ismert szubsztrátjai a mitotikus ciklinek, melyek a metafázis-anafázis átmenet előtt, vagy ennek során bomlanak le, és így megteremtődik a feltétel a mitózisból való kilépésre. A létfontosságú APC/C alegységek funkciójának kiesése együtt jár a mitotikus ciklinek stabilizációjával és sejten belüli felhalmozódásával. Neuroblaszt preparátumok immunhisztokémiai festésével kimutattuk, hogy a *lmg* mutánsok mitózisban megrekedt sejtjeiben ugyancsak felhalmozódik mind a Ciklin A, mind pedig a Ciklin B. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a Lmg fehérjének szerepe van a mitotikus ciklinek lebontásában.

A humán Apc11 alegységgel mutatott jelentős szekvencia-hasonlóság, valamint az említett fenotípusjegyek alapján valószínűsíthető, hogy a *lmgA* ORF ennek az alegységnek egy evolúciósan konzervált *Drosophila* változatát kódolja. Ezt igazolta a heterológ komplementációs kísérletünk, amelyben a *lmgA* ORF képes volt menekíteni a sarjadzó élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) Apc11 mutáns sejtjeinek hőérzékeny letális fenotípusát. A LmgA fehérje tehát funkcionális ortológja az Apc11 alegységnek.

Élesztő és humán APC/C vizsgálatokból ismert, hogy az Apc11 alegység az Apc2 alegységhez kapcsolódik, és együtt alkotják a teljes komplex katalitikus alkomplexét. Az eddigi irodalmi adatok azt sugallták, hogy az E2 ubikvitin-konjugáló enzimek vagy az Apc2, vagy pedig az Apc11 alegységhez kapcsolódtak. Élesztő kettős-hibrid kísérletekben kimutattuk a *Drosophila* LmgA/Apc11 alegység kapcsolódását az Apc2/Mr alegységhez. Azonban meglepetésünkre, hasonló kísérletekkel nem sikerült kimutatnunk a Vihar E2 enzim kölcsönhatását sem a Apc11/LmgA, sem pedig a Apc2/Mr alegységgel. Kölcsönhatást csak olyan körülmények között tudtunk kimutatni, ha mindhárom fehérje jelen volt a sejtekben. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a Vihar E2 enzim kapcsolódásához a Apc11/LmgA és az Apc2/Mr alegységek együttesen alakítanak ki felületet, tehát egy háromkomponensű komplex képződik.

Ugyancsak a Apc11/LmgA és a Apc2/Mr alegységek együttesen kialakított felületéhez kapcsolódik a *CG8188* gén terméke is, amely több mint 60%-os azonosságot mutat a humán Ube2S ubikvitin-konjugáló enzimmel, így elképzelhető, hogy a két E2 enzim ugyanazon kötőhelyért versenyez. Humán sejtekben kimutatták, hogy K11-kapcsolt poliubikvitin láncok kialakításához két E2 enzim is szükséges. Az UbcH10 vagy az UbcH5 végzi a lánc iniciálását, az Ube2S pedig a lánc hosszabbítását. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a *Dmube2S* gén hipomorf és null alléljei is életképesek és nem mutatnak mitotikus fenotípust. Kísérleti eredményeink tehát arra utalnak, hogy

Drosophilában normál körülmények között elhanyagolható, vagy nincs szükség a DmUbe2S E2 aktivitására. Noha a DmUbe2S mutánsok nem mutattak mitotikus rendellenességeket, azonban mitotikus gátlást okozó szerekkel történő kezelésre fokozott érzékenységgel reagáltak. Ez a fenotípus menekíthető volt, ha Mad2 hiányában inaktiváltuk az orsó-összeszerelési ellenőrzési pontot. Ezek a fenotípusjegyek jó egyezést mutatnak a humán sejtekben kapott eredményekkel, ahol feltételezik, hogy az Ube2S – E2 ubikvitin-konjugáló aktivitása mellett – részt vesz orsó-összeszerelési ellenőrzési pont inaktiválásában is.

Eredményeimet összefoglalva elmondható, hogy a *lemming* lokusz egy dicisztronos gént tartalmaz Drosophilában. Ennek első ORF-je, a *ImgA* kódolja az APC/C ubikvitin ligáz Apc11 alegységét. A *ImgA* genetikai interakciója az *apc2/mr*, *vihar* és *DmUbe2S* génekkel, valamint termékeik – Apc11-Apc2-Vihar/Dmube2S – fizikai kölcsönhatása arra utal, hogy az általuk alkotott háromkomponensű komplex ugyanazt a katalitikus modulját reprezentálja a Drosophila APC/C-nek, amit az élesztő és emlős sejtekben azonosítottak biokémiai módszerekkel. Munkánk során azonosítottuk a humán Ube2S ubikvitin-konjugáló enzim Drosophila ortológját kódoló gént is, és kimutattuk, hogy a DmUbe2S APC/C-függő E2 aktivitása elhanyagolható ebben az organizmusban, azonban funkciója nélkülözhetetlen az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmus működéséhez.

SUMMARY

Crucial cell cycle events, such as chromosome separation and exit from mitosis are regulated by the ubiquitin-dependent protein degradation system. This process consists of two distinct steps. First, target proteins are marked with polyubiquitin chains by an enzyme cascade, and then the marked proteins are recognized and degraded by the 26S proteasome. An ubiquitin ligase, the anaphase promoting complex/cyclosome or APC/C plays a key role in this process. The APC/C provides the platform for the ubiquitylation reaction and determines substrate specificity as well.

The APC/C is a large, 1.5 MDa protein complex, that contains at least 12 or 13 subunits. The sequence and topology of these subunits appear to be evolutionary conserved. Though we know the general function and its basic regulatory mechanism, there are still many unanswered questions about the structure and role of the APC/C. In our group, we characterized P element insertion mutants coding for different APC/C subunits, and transgenic RNAi lines specifically silencing different APC/C subunits of the model organism, *Drosophila melanogaster*. We undertook detailed analyses of their phenotypes to understand the role of these APC/C subunits, and to gain further information about the structure and function of the APC/C. In my Ph.D thesis I describe the identification and genetic, cytological and molecular biological characterization of the *lemming* gene that codes for the Apc11 subunit.

Our work was started with the identification of the *l(2)03424* P element insertion mutant, which showed pharate adult lethality and had reduced eyes, wings and bristle defects. Imaginal discs stained with acridine orange showed elevated level of apoptosis, therefore we renamed the affected gene as *lemming*. In addition to this, we have isolated and characterized non-complementing hypomorph (*Img^{EY11317}* and *Img^{J023}*) and null (*Img¹³⁸*) alleles that together form an allelic series. The common feature of the different alleles is their late lethality. Remobilization of the P element in the insertion lines (*Img^{EY11317}* and *Img^{J023}*) frequently caused reversion of the mutant phenotype to wild type, suggesting that these insertions were indeed directly responsible for the mutant phenotype.

Cytological analysis of orcein stained larval neuroblast preparations revealed obvious mitotic abnormalities in all mutant alleles. The proportions of cells in mitosis were much higher (mitotic index) in mutant preparations than in wild types, and most of these

cells were in prometa- or metaphase-like stage. Cells in prometaphase or metaphase had highly condensed chromosomes, and cell in anaphase were rare but most of them had abnormal chromosomes. In addition to this, polyploid cells were frequently observed in mutant preparations, though such cells could never be seen in wild type preparations. Most of the polyploid cells had overcondensed chromosomes. All of the mitotic phenotypes listed above suggest that in *lmg* mutants the cell cycle is delayed or arrested in prometa- or metaphase-like stage.

The *lmg* gene was cloned by plasmid rescue of the genomic DNA flanking the P element insertions. This was followed by sequence analyses of plasmid rescue fragments, and comparative analyses of genomic and cDNA sequences were used to determine the structure of the *lmg* locus. It turned out that the *lmg* gene is intronless and codes for a ~2 kb mRNA which contains two open reading frames (ORF), thus it is dicistronic. The 5' ORF was designated as *lmgA*, and the 3' ORF as *lmgB*. The *lmgA* encodes a small, putative polypeptide of 85 amino acids (~ 10 kDa), which shows more than 80% sequence similarity with the APC11 subunit of the human APC/C, and contains a RING finger motif characteristic to known APC11 subunits. The expression of *lmgA* alone was sufficient to fully rescue the lethal, morphological and mitotic phenotypes of *lmg*¹³⁸ null mutant. The *lmgB* ORF codes for a putative polypeptide of 365 amino acids, with apparently no known functional domains. Although the LmgB protein sequence is conserved in Drosophilidae, homologous sequences could not be found in other species.

We have analyzed the expression pattern of *lmg* locus in different developmental stages of *Drosophila*. According to our results, the dicistronic message could be the main product of *lmg* transcription, however it could not be excluded that monocistronic mRNAs might be produced. If monocistronic messages were present, their ratio and expression profile, did not differ significantly from that of the dicistronic message. Beyond that, we could not detect efficient translation of LmgB in S2 cells in such circumstances where the transcription of the *lmgA* and the presence of LmgA could be detected.

The well-known substrates of the APC/C, the mitotic cyclins are degraded before or during the metaphase-anaphase transition, thereby permitting mitotic exit. Loss of the essential APC/C subunits causes stabilization and accumulation of the mitotic cyclins within cells. Our immunostaining experiments in *lmg* mutant neuroblasts showed that cells arrested in mitosis accumulate both Cyclin A and Cyclin B. These results show that the Lmg protein has a role in of mitotic cyclin degradation.

The high sequence similarity to the human Apc11, and the phenotypes mentioned

above suggest that the *lmgA* codes for this evolutionary conserved subunit in *Drosophila*. This is further supported by our heterologous complementation experiments, in which *lmgA* was able to complement the thermosensitive lethal phenotype of budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Apc11-deficient cells. Accordingly, the LmgA protein in fruit flies is the functional orthologue of the Apc11 subunit.

It is known that in yeast and human cells the Apc2 subunit binds to Apc11, and they together form the catalytic sub-complex of the APC/C. Likewise, some data suggest the E2 ubiquitin-conjugating enzymes interact with either the Apc2 or the Apc11 subunits. We have demonstrated in yeast two-hybrid experiments, that the *Drosophila* LmgA/Apc11 subunit interacted with the Apc2/Mr subunit. Surprisingly, in similar experiments we could not detect any interaction between the Vihar E2 enzyme and either LmgA/Apc11 or Apc2/Mr subunits. However, we could observe interaction if all three proteins were present in the cells. This result suggests that LmgA/Apc11 and the Apc2/Mr together form a platform for Vihar binding, so they constitute a ternary complex.

We have also demonstrated that similarly to Vihar, the LmgA/Apc11 and Apc2/Mr subunits form together a binding site for the product of the *CG8188* gene; therefore it is possible that this protein and Vihar compete for the same binding site. This protein shows more than 60% similarity to the human Ube2S E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and considered to be the homologous enzyme in *Drosophila* (DmUbe2S). It was shown recently that the lysine K11-linked ubiquitin chains are assembled by two E2 enzymes in human cells. Ube2S elongates ubiquitin chains after the substrates become pre-ubiquitinated by UbCH10 or UbCH5-type E2 enzymes. We found out that hypomorph and null alleles of the *DmUbe2S* gene are viable, and do not show any mitotic phenotypes, suggesting that the DmUbe2S enzyme either has no E2 activity or it is negligible during normal development. However, the *DmUbe2S* mutants showed hypersensitivity to chemicals activating the spindle-assembly checkpoint, such as colchicine or docetaxel and this phenotype could be rescued in *mad2* mutants with inactivated spindle-assembly checkpoint. This feature of the *DmUbe2S* mutants is similar to the behavior of human cells lacking Ube2S function and supports the idea that Ube2S is important for silencing the spindle-assembly checkpoint.

Taken all my results together, one can conclude that the *lemming* locus codes for a dicistronic gene in *Drosophila*. It's first ORF, the *lmgA* codes for the Apc11 subunit of the APC/C ubiquitin-ligase. The genetic interactions of *lmgA* with the *apc2/mr*, *vihar* and *Dmube2S* genes and the physical interaction of their gene products – LmgA-Apc2-Vihar/Dmube2S – suggest that this ternary complex represents the same catalytic sub-complex

of the APC/C, as the one identified by biochemical means in yeast and mammalian cells. We have identified the *Drosophila* orthologue of the gene coding for the human Ube2S ubiquitin-conjugating enzyme. It was shown that the APC/C-dependent E2 activity of DmUbe2S is dispensable in this organism, but its role appears to be critical for the normal functioning of the spindle-assembly checkpoint.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med* 3, 917–921.
2. Ayad, N.G., Rankin, S., Murakami, M., Jebanathirajah, J., Gygi, S., and Kirschner, M.W. (2003). Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* 113, 101–113.
3. Bainbridge, S.P., and Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 66, 57–80.
4. Barford, D. (2011). Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). *Q. Rev. Biophys.* 44, 153–190.
5. Barr, F.A., Silljé, H.H.W., and Nigg, E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 429–440.
6. Bastians, H., Topper, L.M., Gorbsky, G.L., and Ruderman, J.V. (1999). Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins. *Mol. Biol. Cell* 10, 3927–3941.
7. Bellen, H.J., Levis, R.W., Liao, G., He, Y., Carlson, J.W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P.R., Schulze, K.L., Rubin, G.M., et al. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* 167, 761–781.
8. Ben-Shahar, Y., Nannapaneni, K., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., and Welsh, M.J. (2007). Eukaryotic operon-like transcription of functionally related genes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 222–227.
9. Bentley, A.M., Williams, B.C., Goldberg, M.L., and Andres, A.J. (2002). Phenotypic characterization of *Drosophila* *ida* mutants: defining the role of APC5 in cell cycle progression. *J. Cell. Sci.* 115, 949–961.
10. Blatch, G.L., and Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21, 932–939.
11. Blumenthal, T. (2004). Operons in eukaryotes. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3, 199–211.
12. Borden, K.L., and Freemont, P.S. (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 395–401.
13. Borgne, A., and Meijer, L. (1996). Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J. Biol. Chem.* 271, 27847–27854.
14. Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
15. Capron, A., Serralbo, O., Fülöp, K., Frugier, F., Parmentier, Y., Dong, A., Lecureuil, A., Guerche, P., Kondorosi, E., Scheres, B., et al. (2003). The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell* 15, 2370–2382.
16. Carroll, C.W., and Morgan, D.O. (2002). The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 880–887.
17. Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbé, J.-C., and Lorca, T. (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 24, 314–325.
18. Chang, T.-S., Jeong, W., Lee, D.-Y., Cho, C.-S., and Rhee, S.G. (2004). The RING-H2-finger protein APC11 as a target of hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 521–530.
19. Cohen-Fix, O., and Koshland, D. (1997). The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 14361–14366.
20. Cooper, K.F., Mallory, M.J., Egeland, D.B., Jarnik, M., and Strich, R. (2000). Ama1p is a meiosis-specific regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14548–14553.

21. Deak, P., Donaldson, M., and Glover, D.M. (2003). Mutations in *mákos*, a *Drosophila* gene encoding the Cdc27 subunit of the anaphase promoting complex, enhance centrosomal defects in polo and are suppressed by mutations in *twins/aar*, which encodes a regulatory subunit of PP2A. *J. Cell. Sci.* **116**, 4147–4158.
22. Dimova, N.V., Hathaway, N.A., Lee, B.-H., Kirkpatrick, D.S., Berkowitz, M.L., Gygi, S.P., Finley, D., and King, R.W. (2012). APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1. *Nat. Cell Biol.* **14**, 168–176.
23. Dube, P., Herzog, F., Gieffers, C., Sander, B., Riedel, D., Müller, S.A., Engel, A., Peters, J.-M., and Stark, H. (2005). Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. *Mol. Cell* **20**, 867–879.
24. den Elzen, N., and Pines, J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J. Cell Biol.* **153**, 121–136.
25. Di Fiore, B., and Pines, J. (2008). Defining the role of Emi1 in the DNA replication-segregation cycle. *Chromosoma* **117**, 333–338.
26. Foe, I., and Toczyski, D. (2011). Structural biology: a new look for the APC. *Nature* **470**, 182–183.
27. Fujita, M., Yamada, C., Goto, H., Yokoyama, N., Kuzushima, K., Inagaki, M., and Tsurumi, T. (1999). Cell cycle regulation of human CDC6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**, 25927–25932.
28. Furuta, T., Tuck, S., Kirchner, J., Koch, B., Auty, R., Kitagawa, R., Rose, A.M., and Greenstein, D. (2000). EMB-30: an APC4 homologue required for metaphase-to-anaphase transitions during meiosis and mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1401–1419.
29. Garnett, M.J., Mansfeld, J., Godwin, C., Matsusaka, T., Wu, J., Russell, P., Pines, J., and Venkitaraman, A.R. (2009). UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1363–1369.
30. Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J.M., and Hunt, T. (2001). Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* **153**, 137–148.
31. Gieffers, C., Dube, P., Harris, J.R., Stark, H., and Peters, J.M. (2001). Three-dimensional structure of the anaphase-promoting complex. *Mol. Cell* **7**, 907–913.
32. Gloor, G.B., Preston, C.R., Johnson-Schlitz, D.M., Nassif, N.A., Phillis, R.W., Benz, W.K., Robertson, H.M., and Engels, W.R. (1993). Type I repressors of P element mobility. *Genetics* **135**, 81–95.
33. Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132–138.
34. Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Peters, J.M. (2000). The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8973–8978.
35. Grossberger, R., Gieffers, C., Zachariae, W., Podtelejnikov, A.V., Schleiffer, A., Nasmyth, K., Mann, M., and Peters, J.M. (1999). Characterization of the DOC1/APC10 subunit of the yeast and the human anaphase-promoting complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 14500–14507.
36. Haldeman, M.T., Xia, G., Kasperek, E.M., and Pickart, C.M. (1997). Structure and function of ubiquitin conjugating enzyme E2-25K: the tail is a core-dependent activity element. *Biochemistry* **36**, 10526–10537.
37. Harper, J.W. (2001). Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Curr. Biol.* **11**, R431–435.
38. Harper, J.W. (2002). A phosphorylation-driven ubiquitination switch for cell-cycle control. *Trends Cell Biol.* **12**, 104–107.
39. Hartwell, L.H. (1991). Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics* **129**, 975–980.
40. Hayes, M.J., Kimata, Y., Wattam, S.L., Lindon, C., Mao, G., Yamano, H., and Fry, A.M. (2006).

- Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nat. Cell Biol.* 8, 607–614.
41. Hershko, A., Ganoth, D., Sudakin, V., Dahan, A., Cohen, L.H., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Eytan, E. (1994). Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2. *J. Biol. Chem.* 269, 4940–4946.
 42. Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258, 8206–8214.
 43. Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30, 405–439.
 44. Hopfner, K.-P. (2003). Chromosome cohesion: closing time. *Curr. Biol.* 13, R866–R868.
 45. Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: “one size” doesn’t fit all. *Trends Biochem. Sci.* 30, 183–187.
 46. Hoskins, R.A., Landolin, J.M., Brown, J.B., Sandler, J.E., Takahashi, H., Lassmann, T., Yu, C., Booth, B.W., Zhang, D., Wan, K.H., et al. (2011). Genome-wide analysis of promoter architecture in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 21, 182–192.
 47. Huang, D.T., Miller, D.W., Mathew, R., Cassell, R., Holton, J.M., Roussel, M.F., and Schulman, B.A. (2004). A unique E1-E2 interaction required for optimal conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 927–935.
 48. Huang, J., and Raff, J.W. (2002). The dynamic localisation of the *Drosophila* APC/C: evidence for the existence of multiple complexes that perform distinct functions and are differentially localised. *J. Cell. Sci.* 115, 2847–2856.
 49. Hwang, L.H., and Murray, A.W. (1997). A novel yeast screen for mitotic arrest mutants identifies DOC1, a new gene involved in cyclin proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 8, 1877–1887.
 50. Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., and Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* 81, 269–278.
 51. Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr. Biol.* 9, 227–236.
 52. Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., and Rape, M. (2008). Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* 133, 653–665.
 53. Kashevsky, H., Wallace, J.A., Reed, B.H., Lai, C., Hayashi-Hagihara, A., and Orr-Weaver, T.L. (2002). The anaphase promoting complex/cyclosome is required during development for modified cell cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11217–11222.
 54. Kilmartin, J.V., Wright, B., and Milstein, C. (1982). Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. *J. Cell Biol.* 93, 576–582.
 55. King, K.L., and Cidlowski, J.A. (1995). Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J. Cell. Biochem.* 58, 175–180.
 56. King, R.W., Glotzer, M., and Kirschner, M.W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol. Biol. Cell* 7, 1343–1357.
 57. King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M.W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81, 279–288.
 58. Kirkpatrick, D.S., Hathaway, N.A., Hanna, J., Elsasser, S., Rush, J., Finley, D., King, R.W., and Gygi, S.P. (2006). Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat. Cell Biol.* 8, 700–710.
 59. Kishimoto, T. (1998). Cell cycle arrest and release in starfish oocytes and eggs. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 549–557.
 60. Kominami, K., Seth-Smith, H., and Toda, T. (1998). Apc10 and Ste9/Srw1, two regulators of the APC-cyclosome, as well as the CDK inhibitor Rum1 are required for G1 cell-cycle arrest in fission

- yeast. *Embo J.* 17, 5388–5399.
61. Kramer, E.R., Gieffers, C., Hölzl, G., Hengstschläger, M., and Peters, J.M. (1998). Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr. Biol.* 8, 1207–1210.
 62. Kramer, E.R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Peters, J.M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol. Biol. Cell* 11, 1555–1569.
 63. Kurasawa, Y., and Todokoro, K. (1999). Identification of human APC10/Doc1 as a subunit of anaphase promoting complex. *Oncogene* 18, 5131–5137.
 64. Lamb, J.R., Michaud, W.A., Sikorski, R.S., and Hieter, P.A. (1994). Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *Embo J.* 13, 4321–4328.
 65. van Leuken, R., Clijsters, L., and Wolthuis, R. (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim. Biophys. Acta* 1786, 49–59.
 66. Leversson, J.D., Joazeiro, C.A., Page, A.M., Huang, H. k, Hieter, P., and Hunter, T. (2000). The APC11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. *Mol. Biol. Cell* 11, 2315–2325.
 67. Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580–584.
 68. Máthé, E., Kraft, C., Giet, R., Deák, P., Peters, J.-M., and Glover, D.M. (2004). The E2-C vihar is required for the correct spatiotemporal proteolysis of cyclin B and itself undergoes cyclical degradation. *Curr. Biol* 14, 1723–1733.
 69. Matyskiela, M.E., and Morgan, D.O. (2009). Analysis of activator-binding sites on the APC/C supports a cooperative substrate-binding mechanism. *Mol. Cell* 34, 68–80.
 70. Matyskiela, M.E., Rodrigo-Brenni, M.C., and Morgan, D.O. (2009). Mechanisms of ubiquitin transfer by the anaphase-promoting complex. *J. Biol* 8, 92.
 71. Meikrantz, W., and Schlegel, R. (1996). Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem* 271, 10205–10209.
 72. Melixetian, M., and Helin, K. (2004). Geminin: a major DNA replication safeguard in higher eukaryotes. *Cell Cycle* 3, 1002–1004.
 73. Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E.A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 29–36.
 74. Mocciaro, A., and Rape, M. (2012). Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. *J. Cell. Sci.* 125, 255–263.
 75. Möckli, N., and Auerbach, D. (2004). Quantitative beta-galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. *BioTechniques* 36, 872–876.
 76. Moore, R., and Boyd, L. (2004). Analysis of RING finger genes required for embryogenesis in *C. elegans*. *Genesis* 38, 1–12.
 77. Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261–291.
 78. Mumberg, D., Müller, R., and Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119–122.
 79. Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 379–393.
 80. Ohi, M.D., Feoktistova, A., Ren, L., Yip, C., Cheng, Y., Chen, J.-S., Yoon, H.-J., Wall, J.S., Huang, Z., Penczek, P.A., et al. (2007). Structural organization of the anaphase-promoting complex bound to the mitotic activator Slp1. *Mol. Cell* 28, 871–885.
 81. Osaka, F., Seino, H., Seno, T., and Yamao, F. (1997). A ubiquitin-conjugating enzyme in fission yeast that is essential for the onset of anaphase in mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3388–3397.
 82. Page, A.M., Aneliunas, V., Lamb, J.R., and Hieter, P. (2005). In vivo characterization of the nonessential budding yeast anaphase-promoting complex/cyclosome components Swm1p, Mnd2p

- and Apc9p. *Genetics* 170, 1045–1062.
83. Pál, M., Nagy, O., Ménesi, D., Udvardy, A., and Deák, P. (2007a). Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Sci.* 120, 3238–3248.
 84. Pál, M., Varga, K., Nagy, O., and Deák, P. (2007b). Characterization of the Apc10/Doc1 subunit of the anaphase promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *Acta. Biol. Hung* 58 Suppl, 51–64.
 85. Parry, D.H., and O’Farrell, P.H. (2001). The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr. Biol.* 11, 671–683.
 86. Passmore, L.A., and Barford, D. (2005). Coactivator functions in a stoichiometric complex with anaphase-promoting complex/cyclosome to mediate substrate recognition. *EMBO Rep.* 6, 873–878.
 87. Passmore, L.A., McCormack, E.A., Au, S.W.N., Paul, A., Willison, K.R., Harper, J.W., and Barford, D. (2003). Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *Embo J.* 22, 786–796.
 88. Patton, E.E., Willems, A.R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K.L., and Tyers, M. (1998). Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev.* 12, 692–705.
 89. Pelzer, C., Kassner, I., Matentzoglou, K., Singh, R.K., Wollscheid, H.-P., Scheffner, M., Schmidtke, G., and Groettrup, M. (2007). UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 282, 23010–23014.
 90. Peters, J.M. (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 759–768.
 91. Pfleger, C.M., Lee, E., and Kirschner, M.W. (2001). Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 15, 2396–2407.
 92. Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 55–72.
 93. Rape, M., and Kirschner, M.W. (2004). Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 432, 588–595.
 94. Reed, S.I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 855–864.
 95. Rodrigo-Brenni, M.C., and Morgan, D.O. (2007). Sequential E2s drive polyubiquitin chain assembly on APC targets. *Cell* 130, 127–139.
 96. Rose, M.D., Fred Winston, and Philip Hieter (1990). *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
 97. Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G., et al. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 797–813.
 98. Sambrook, J., and Gething, M.J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342, 224–225.
 99. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (CSHL Press).
 100. Seino, H., Kishi, T., Nishitani, H., and Yamao, F. (2003). Two ubiquitin-conjugating enzymes, UbcP1/Ubc4 and UbcP4/Ubc11, have distinct functions for ubiquitination of mitotic cyclin. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3497–3505.
 101. Shi, L., Nishioka, W.K., Th’ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., and Greenberg, A.H. (1994). Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143–1145.
 102. Song, L., and Rape, M. (2008). Reverse the curse--the role of deubiquitination in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 156–163.
 103. Sorger, P.K., Dobles, M., Tournebize, R., and Hyman, A.A. (1997). Coupling cell division and cell

- death to microtubule dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 807–814.
104. Spradling, A.C., and Rubin, G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341–347.
 105. Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S., and Rubin, G.M. (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* 153, 135–177.
 106. Steen, J.A.J., Steen, H., Georgi, A., Parker, K., Springer, M., Kirchner, M., Hamprecht, F., and Kirschner, M.W. (2008). Different phosphorylation states of the anaphase promoting complex in response to antimetabolic drugs: a quantitative proteomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6069–6074.
 107. Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* 6, 185–197.
 108. Summers, M.K., Pan, B., Mukhyala, K., and Jackson, P.K. (2008). The unique N terminus of the UbcH10 E2 enzyme controls the threshold for APC activation and enhances checkpoint regulation of the APC. *Mol. Cell* 31, 544–556.
 109. Tanaka-Matakatsu, M., Thomas, B.J., and Du, W. (2007). Mutation of the Apc1 homologue shattered disrupts normal eye development by disrupting G1 cell cycle arrest and progression through mitosis. *Dev. Biol.* 309, 222–235.
 110. Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Ozkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J., and Yu, H. (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* 12, 3839–3851.
 111. Thornton, B.R., Ng, T.M., Matyskiela, M.E., Carroll, C.W., Morgan, D.O., and Toczyski, D.P. (2006). An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 20, 449–460.
 112. Townsley, F.M., Aristarkhov, A., Beck, S., Hershko, A., and Ruderman, J.V. (1997). Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2362–2367.
 113. Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37–42.
 114. Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278, 460–463.
 115. Vodermaier, H.C., Gieffers, C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.-M. (2003). TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr. Biol.* 13, 1459–1468.
 116. Wall, A.A., Phillips, A.M., and Kelly, L.E. (2005). Effective translation of the second cistron in two *Drosophila* dicistronic transcripts is determined by the absence of in-frame AUG codons in the first cistron. *J. Biol. Chem.* 280, 27670–27678.
 117. Whitfield, W.G., Gonzalez, C., Maldonado-Codina, G., and Glover, D.M. (1990). The A- and B-type cyclins of *Drosophila* are accumulated and destroyed in temporally distinct events that define separable phases of the G2-M transition. *Embo J.* 9, 2563–2572.
 118. Williamson, A., Wickliffe, K.E., Mellone, B.G., Song, L., Karpen, G.H., and Rape, M. (2009). Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18213–18218.
 119. Woods, C.M., Zhu, J., McQueney, P.A., Bollag, D., and Lazarides, E. (1995). Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol. Med* 1, 506–526.
 120. Wu, T., Merbl, Y., Huo, Y., Gallop, J.L., Tzur, A., and Kirschner, M.W. (2010). UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the anaphase-promoting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 1355–1360.
 121. Yamada, H., Kumada, K., and Yanagida, M. (1997). Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast. *J. Cell. Sci.*

110 (*Pt 15*), 1793–1804.

122. Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H., and Hunt, T. (2004). Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* 13, 137–147.
123. Yanagida, M. (2000). Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* 5, 1–8.
124. Yao, S.L., McKenna, K.A., Sharkis, S.J., and Bedi, A. (1996). Requirement of p34cdc2 kinase for apoptosis mediated by the Fas/APO-1 receptor and interleukin 1beta-converting enzyme-related proteases. *Cancer Res* 56, 4551–4555.
125. Yeong, F.M. (2004). Anaphase-promoting complex in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2215–2225.
126. Yu, H., King, R.W., Peters, J.M., and Kirschner, M.W. (1996). Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr. Biol.* 6, 455–466.
127. Zachariae, W., and Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 13, 2039–2058.
128. Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W. (1998a). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282, 1721–1724.
129. Zachariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P.D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M.J., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998b). Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* 279, 1216–1219.
130. Zhou, B.B., Li, H., Yuan, J., and Kirschner, M.W. (1998). Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 6785–6790.