

Ph.D. értekezés tézisei

Az anafázis promoting complex (APC/C) katalitikus modulja
Drosophila melanogasterben

Nagy Olga

Témavezető: Dr. Deák Péter
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
2012.

1. Bevezetés

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 enzim-kaszkádnak ubikvitin láncot kapcsol a szabályozó fehérjékhez, majd az így megjelölt fehérjéket felismeri, és lebontja a sejtek fehérjelebontó szerve, a proteasóma. A jelölési folyamat első lépése az ubikvitin aktiválódása, amelyet az E1 ubikvitin-aktiváló enzim végez. Ennek során 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 kötéssel formálva. Végül pedig megtörténik az aktivált ubikvitin célfehérjére juttatása. Ehhez a reakcióhoz egy harmadik enzim, az E3 ubikvitin-ligáz aktivitása szükséges. A jelölő folyamat kulcsfontosságú szereplője az E3 ubikvitin-protein ligáz, amely alkalmas felületet biztosít az ubikvitilációs reakció számára, és meghatározza ennek szubsztrát-specifitását is.

A sejtciklus mitózis és G1 szakaszainak szabályozását az APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) ubikvitin-protein ligáz komplex végzi. Az APC/C a szekurin lebontásával indukálja a leánykromatidák szétválását, és így a metafázis-anafázis átmentet, valamint a mitotikus ciklinek degradációjának szabályozásával lehetővé teszi a mitózisból való kilépést.

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.

2. Célkitűzések

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 feladatomban 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 *Drosophila* Apc11 funkcionális homológiájának igazolása sarjadzó élesztőben heterológ komplementációs kísérlettel.
4. Az Apc11-el kölcsönhatásba lépő más APC/C alegységek azonosítása élesztő kettős-hibrid és genetikai interakciós kísérletekkel.
5. Az APC/C alegységek és E2 enzimek közötti kölcsönhatás kimutatása élesztő hármas-hibrid és genetikai interakciós kísérletekkel.

3. Alkalmazott módszerek

1. Rekombináns DNS technikák
2. Szemikvantitatív, reverz transzkripció kapcsolt PCR (RT-PCR)
3. mRNS-ek 5' és 3'-végének meghatározása RACE reakcióval
4. Western blot analízis
5. Élesztő kettős- és hármas-hibrid
6. β -galaktozidáz aktivitás kimutatása
7. Heterológ komplementációs teszt
8. Deléciós mutánsok előállítás P elem remobilizációval
9. Neuroblaszt preparálása és citológiai jellemzése
10. Mitótikus gátlást kiváltó szerek alkalmazása *Drosophila* etetési tesztben

4. Eredmények

1. 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 apoptótikus 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^{I38}*) allélek azonosítása és jellemzése követte, melyek kísérletesen jól vizsgálható allélsort alkottak. A különböző erősségű allélek közös tulajdonsága a mitótikus génekre jellemző késői letális fenotípus volt. A P elem inszerciós allélek (*lmg⁰³⁴²⁴* 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.

2. Orceinnel festett lárvális neuroblaszt preparátumok citológiai vizsgálata szembetűnő mitótikus rendellenességeket tárt fel valamennyi állél esetében. A mitózisban lévő sejtek száma (mitótikus 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 mitótikus fenotípusjegyei a sejtosztódás prometa-, vagy metafázisos gátlására utaltak.
3. 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 mitótikus 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 nemzetségen belül, a *LmgB*-vel homológ szekvenciákat nem találtunk más rendszertani egységekben.

4. A *Drosophila* valamennyi egyedfejlődési stádiumában vizsgáltuk a *lmg* lokusz expresszióját. Kísérleti adataink szerint a dicisztronos mRNS a lokusz fő transzkripció 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.
5. Az APC/C jól ismert szubsztrátjai a mitótikus 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 mitótikus 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 mitótikus ciklinek lebontásában.
6. 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.

7. 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 az *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.
8. Ugyancsak az *Apc11/LmgA* és az *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 szerekekkel 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.

5. Összefoglalás

1. A *lemming* lokusz egy dicisztronos gént tartalmaz *Drosophila*-ban.
2. Ennek első ORF-je, a *lmgA* kódolja az APC/C ubikvitin ligáz Apc11 alegységét.
3. A *lmgA* 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.
4. Munkánk során azonosítottuk a humán Ube2S ubikvitin-konjugáló enzim *Drosophila* ortológját kódoló gént.
5. Kimutattuk, hogy a DmUbe2S APC/C-függő E2 aktivitása elhanyagolható ebben az organizmusban, azonban funkciója nélkülözhetetlen az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmus működéséhez.

6. Közlemények

Nagy O, Pal M, Udvardy A, Shirras C., Boros I., Shirras A., Deak P.
lemmingA encodes the Apc11 subunit of the APC/C in *Drosophila melanogaster* that forms a ternary complex with the E2-C type ubiquitin conjugating enzyme, Vihar and Morula/Apc2
CELL DIVISION 2012 MAR 14;7(1):9.
IF: 4.09

Lipinszki Z, Pal M, Nagy O, Deak P, Hunyadi-Gulyas E, Udvardy A
Overexpression of Dsk2/dUbqln results in severe developmental defects and lethality in *Drosophila melanogaster* that can be rescued by overexpression of the p54/Rpn10/S5a proteasomal subunit.
FEBS JOURNAL 278:(24) pp. 4833-4844. (2011)
IF: 3.129

Pal M, Nagy O, Menesi D, Udvardy A, Deak P
Structurally Related Tpr Subunits Contribute Differently to The Function of The Anaphase-promoting Complex in *Drosophila Melanogaster*.
JOURNAL OF CELL SCIENCE 120:(18) pp. 3238-3248. (2007)
IF: 6.383

Pal M, Varga K, Nagy O, Deak P
Characterization of the APC10/DOC1 subunit of the anaphase promoting complex in *Drosophila melanogaster*.
ACTA BIOLOGICA HUNGARICA 58:(Suppl.1.) pp. 51-64. (2007)
IF: 0.688