

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Az APC komplex TPR alegységeinek genetikai analízise

Drosophila melanogasterben

PÁL MARGIT



Témavezető: Dr. Deák Péter

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóintézete
Biokémiai Intézet
Intracelluláris Fehérjelebontási Csoport

SZEGED

2007

Bevezetés

Az eukarióta élőlények sejtciklusának szabályozásában nagyon fontos szerepet játszik az ubiquitin-függő fehérjelebontási rendszer. Ebben a folyamatban először egy enzimkaszád rendszer poliubiquitin láncsal jelöli meg a lebontásra szánt fehérjét, majd egy nagy citoplazmatikus proteáz komplex, a 26S proteaszóma felismeri és lebontja a megjelölt fehérjét. Az enzim kaszkád első tagja az ubiquitin-aktiváló enzim (E1), amely ATP energiájának felhasználásával tioészter kötést létesít az aktív centrumában elhelyezkedő cisztein és az ubiquitin molekula C-terminális végén elhelyezkedő glicin között. A következő lépésben az aktivált ubiquitin átkerül az E1 enzimről az ubiquitin-konjugáló enzimre (E2), majd pedig az ubiquitin-protein ligáz (E3) közreműködésével a célfehérjére. A jelölő folyamat kulcsfontosságú szereplője az E3 ubiquitin-protein ligáz, amely felületet biztosít a folyamathoz és meghatározza a folyamat szubsztrát specificitását. A sejtciklus mitózis és G1 szakaszainak szabályozásában résztvevő E3 ubiquitin-protein ligáz az APC (Anaphase Promoting Complex). Az APC a szekurin lebontásával indukálja a kromoszóma szegregációt, és így a metafázis-anafázis átmenetet és a mitótikus ciklinek lebontásának szabályozásával lehetővé teszi a mitózisból való kilépést. Az APC egy igen nagyméretű, 1.5 MDa-os fehérje komplex, amely az élesztő esetén legalább 13 alegységből áll. Az élesztő alegységek ortológjait magasabb rendű eukariótákban is azonosították, ami azt mutatja, hogy az APC szerkezete és funkciója konzerválódott az evolúció folyamán. Annak ellenére, hogy ismerjük az APC alapvető szerepét és szabályozásának főbb elemeit, még számos kérdés megválaszolatlan mind felépítésével, mind pedig működésével kapcsolatosan. Pillanatnyilag még nincs megfelelő

magyarázat arra, hogy miért áll ilyen sok alegységből az APC, és hogy mi az egyes alegységek szerepe.

A gerincesek APC komplexében négy szerkezeti rokonságot mutató alegység található, amelyek mindegyike tartalmaz kilenc-tíz tandem elrendeződésű tetratriko peptid ismétlődést (TPR). A TPR-ek 34 aminosav hosszúságú motívumok, amelyekben nyolc, méret, hidrofóbicitás és térkitöltés tekintetében konzervált aminosav található. TPR motívumok különböző funkciójú fehérjékben fordulnak elő. Elképzelések szerint a TPR motívumok fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt, és így szerepük lehet nagystabilitású fehérje komplexek kialakításában. A sarjadzó élesztő TPR alegységeit a *Cdc27*, *Cdc16* és a *Cdc23* gének kódolják. Mindhárom gén esszenciális, hiányuk esetén a sejtek azonos mitotikus fenotípust mutatva pusztulnak el.

Célkitűzések

Munkánk célja az volt, hogy azonosítsuk és jellemezzük a sejtciklus szabályozásában fontos szerepet játszó APC komplex TPR alegységeit *Drosophila melanogasterben*. Eredményeinktől azt reméltük, hogy az egyes alegységek komplexen belüli funkciójának megismerésén túl közelebb kerülhetünk az APC egyedülállóan bonyolult felépítésének magyarázatához is. Munkatervemet a következő lépéseken keresztül valósítottam meg:

1. Az *Apc6*, *Apc7* és *Apc8* alegységeket kódoló gének azonosítása bioinformatikai módszerekkel.

2. *Apc6*-, *Apc7*- és *Apc8*-specifikus transzgénikus RNS interferencia vonalak előállítás.
3. Az RNS interferencia indukciója, és a kiváltott fenotípus genetikai, sejtbiológiai és citológiai jellemzése.
4. Az alegységek kölcsönhatásának vizsgálata affinitás kromatográfiás kísérletekben.

Alkalmazott módszerek

- Rekombináns DNS technikák
- Polimeráz láncreakció (PCR)
- Inverz PCR
- Szemikvantitatív reverz transzkripció kapcsolt PCR (RT-PCR)
- DNS szekvenálás
- P-elem remobilizáció
- P-elem transzformáció
- Gélszűrési kromatográfia
- Western blot analízis
- Neuroblaszt preparálás és citológiai jellemzés

Eredmények

Az élesztő TPR alegységek ortológjai *Drosophilában* is megtalálhatók. Ezek az alegységek az *Apc3* (más néven *Cdc27* vagy Mákos), az *Apc6* (más néven *Cdc16*) és *Apc8* (más néven *Cdc23*). Az *Apc3*

alegység mutánsainak vizsgálata alapján elmondható, hogy ez az alegység esszenciális az állatok fejlődése szempontjából, hiánya a mitotikus ciklinek felhalmozódását és metafázis-szerű gátlást eredményez. Dolgozatomban további három *Drosophila* APC TPR alegységének genetikai és biokémiai vizsgálatával foglalkozom. Kimutattuk ugyanis, hogy az élesztő TPR alegységek homológjai mellett a *Drosophila* genom kódol még egy TPR fehérjét, amely a gerincesek APC komplexének Apc7 alegységével mutat közeli rokonságot. Ezt a gént a *Drosophila* genom projekt (BDGP) a CG14444 azonosítóval látta el. A *Drosophila* Apc7 fehérje elsődleges szekvenciája, valamint a TPR motívumok számát, elhelyezkedését és eloszlását tekintve is konzerválnak látszik mind a növényi, mind pedig a humán homológokkal összehasonlítva. A *Drosophila* Apc7 fehérje TPR motívumai nagyobb mértékben hasonlítanak a humán Apc7 fehérje azonos pozícióban lévő TPR motívumához, mint egymáshoz, ami funkcionális hasonlóságra utal. Ez a hasonlóság megerősíti, hogy a CG14444 fehérje a *Drosophila* Apc7 homológjának felel meg, ezért az Apc7 gént a továbbiakban együtt vizsgáltuk a többi TPR alegységet kódoló génnel.

Az Apc6, Apc7 és Apc8 gének funkciójának vizsgálatához transzgénikus RNS interferencia vonalakat hoztunk létre. Az alegység-specifikus duplaszálú RNS-ek expressziója hatékonyan és specifikusan csökkenti az adott gén kifejeződését, és így az érintett génre specifikus funcióvesztéses fenokópia jön létre. Az Apc6 és Apc8 specifikus géncsendesítés nem befolyásolta szignifikánsan az embriók és korai lárvák fejlődését, azonban a későbbi fejlődési stádiumokban különböző báb letalitást eredményezett. Az Apc8^{RNSi} állatok az előbáb állapot P4(ii) stádiumában pusztultak el. Az Apc6^{RNSi} állatok némileg tovább fejlődtek és a „phanerocephalic” bábállapot P5(i) stádiumában pusztultak el. Az Apc8^{RNSi} hatása erősebbnek bizonyult olyan szempontból is, hogy több

harmadik stádiumos lárva pusztult el és nagyszámú melanotikus tumor is megfigyelhető volt bennük. Mind az *Apc6^{RNSi}*, mind pedig az *Apc8^{RNSi}* állatok előbb pusztultak el, mint az *Apc3* gén *mks^l* alléljára homozigóta állatok.

A harmadik stádiumos vándorló lárvák agyából készült preparátumokat vizsgálva megfigyelhető volt, hogy az *Apc6^{RNSi}* és *Apc8^{RNSi}* sejtekben a vad típusú, pálcika alakú kromoszómák helyett gyakran szinte ponszerűvé zsugorodott kromoszómák jelentek meg, amelyek vagy szétszóródva helyezkednek el, vagy szabályosan elrendeződtek a metafázis síkban. A túlkondenzálódott kromoszómák arra utalnak, hogy a sejtek a normálisnál hosszabb időt töltenek mitózisban, késlekednek, vagy megrekednek ebben a stádiumban, miközben kondenzációjuk tovább folytatódik. Ennek megfelelően több sejt volt mitózisban, ami a vad típushoz képest kétszer nagyobb mitotikus indexben (MI) mutatkozott meg. A sejtek többsége metafázis-szerű stádiumban volt, viszont az anafázisban és telofázisban lévő sejtek száma relatívan alacsony maradt. Ez megmutatik az *Apc6^{RNSi}* sejtek esetén kétszer, az *Apc8^{RNSi}* sejtek esetén háromszor magasabb metafázis-anafázis arányban, ugyanakkor azt is sugallja, hogy ezen alegységek funkciójának kiesése metafázis szerű késést vagy gátlást eredményez. Az *Apc6^{RNSi}* és *Apc8^{RNSi}* sejtek egy része poliploid volt, amelyek között leggyakrabban tetraploid, ritkában oktaploid vagy még magasabb ploiditású sejtek voltak, minden esetben túlkondenzálódott kromoszómákkal. Nem csak a metafázis, hanem az anafázis idején is megfigyelhetőek voltak rendellenességek például visszamaradó kromoszómák és kromoszóma hidak.

Az APC egyik fő funkciója a mitotikus ciklinek kijelölése lebontásra. Az *Apc6^{RNSi}* és *Apc8^{RNSi}* mitotikus sejtek megemelkedett mennyiségű Ciklin B-t tartalmaztak, viszont meglepetésre, a Ciklin A

normális ütemben degradálódott. Igen érdekes, hogy az *Apc6^{RNSi}* és *Apc8^{RNSi}* sejtekben megfigyelhető tökéletes metafázisok magas aránya összefüggésben van ezeknek a sejteknek a Ciklin A degradációs képességével. Ez azt sugallja, hogy a Ciklin A degradációja szükséges a *Drosophila* esetén a kromoszómák középsíkba rendeződéséhez a metafázis során.

Az *Apc6* és *Apc8* gének funkcióvesztéses fenotípusától eltérően az *Apc7* gén funkciójának kiesése nem vezetett a fentebb említett abnormalitásokhoz. Az *Apc7^{RNSi}* állatok életképesek és fertilisek voltak, bár gyenge mitotikus fenotípus kromoszóma kondenzációs és szegregációs hibákkal detektálható volt sejteikben. Az *Apc7* gén nem esszenciális funkciójának bizonyítására előállítottuk a gén null mutáns allélját, a gén 3' végének közelében elhelyezkedő P elem pontatlan kivágódásával. A P elem kivágódása létrehozott egy akkora deléciót amely eltávolította az *Apc7* gén kétharmadát, beleértve a funkcionálisan fontos nyolc tandem TPR ismétlődést is. Az *Apc7* null mutáns fenotípusa azonosnak bizonyult az *Apc7^{RNSi}* vonalakéval. A mitotikus ciklinek lokalizációja és lebomlásának dinamikája is megkülönböztethetetlen volt a vad típustól. Mivel az *Apc7* alegység csökkent működésének vagy hiányának következtében kialakuló fenotípus igen nagymértékben eltért a többi alegység csökkent működése vagy hiánya által okozott fenotípustól szükségét éreztük, hogy bebizonyítsuk, hogy a homológia alapján azonosított *Apc7* fehérje *Drosophila* esetén is kapcsolódik az APC-hez. Ehhez különböző molekuláris nyomjelzőket hordozó *Apc7* és *Apc3*, vagy *Apc7* és *Apc8* fehérjéket expresszáltunk egyszerre S2 sejtekben, majd ezek extraktumait affinitáskromatográfiával tisztítottuk és western bloton analizáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy az *Apc7* legalább időlegesen asszociálódik a APC-vel. Az affinitáskromatográfiával kapott eredményt

megerősíti az a megfigyelésünk, hogy az Apc7 gén szinergisztikus genetikai interakciót mutat az Apc8 alegységgel. Mindezen adatok együttesen azt sugallják, hogy az Apc7 nem állandó komponense az APC-nek, nem tartozik az APC magját alkotó alegységek közé, hanem csak ideiglenesen kapcsolódik a komplexhez, mint a Fizzy vagy a Fizzy-related szabályozó fehérjék.

A TPR mutánsok egymástól eltérő fenotípusa nem igazán egyeztethető össze az APC szerkezetét leíró azon modellel, amely szerint az APC vázát a TPR alegységek alkotják. Egy ilyen központi vázszerkezettől azt várnánk, hogy összeomlik, vagy instabillá válik és így működésképtelen APC-t eredményez, ha szerkezeti elemeit egyesével, vagy kettesével eltávolítjuk. Mi nem ezt tapasztaltuk az RNSi vonalaink analízise során. Az agy és az imágókorongok az egyes és kettős TPR^{RNSi} állapotokban is kifejlődtek. Tény, hogy az agy és az imágó korongok is csökevényesek voltak, azonban pusztán létük igazol bizonyos szintű mitotikus aktivitást, és legalább minimális szintű APC működést. E megfigyelések alapján a mi adataink jobban támogatják azt az alternatív modellt, amely szerint az APC szerkezeti alapját a legnagyobb alegység, az Apc1/Shtd képezi. E modell szerint az Apc1/Shtd központi alegységhez különböző, a többi alegység által alkotott alkomplexek kapcsolódnak. Mindezeket figyelembe véve a mi elképzelésünk szerint a TPR alegységek egy funkcionális alkomplexet képezve az Apc1 alegységhez kapcsolódnak és valószínűleg aktivátorok és szubsztrátok megkötésében játszanak szerepet.

Összefoglalás

Kísérleti adataink alapján a következő megállapításokat tehetjük:

- Azonosítottuk és transzgénikus RNS interferencia vonalak analízisén keresztül jellemeztük a *Drosophila* APC TPR alegységeit.
- Kimutattuk, hogy az *Apc6* és *Apc8* alegységek funkcióvesztése letális fenotípust eredményez, ami együtt jár metafázis gátlással, apoptózis indukcióval és Ciklin B felhalmozódással.
- Kimutattuk, hogy a humán *Apc7* alegység homológja megtalálható *Drosophilában* is.
- A *Drosophila Apc7* gén szinergisztikus genetikai kölcsönhatást mutat az *Apc6* és *Apc8* génekkel.
- A *Drosophila Apc7* fehérje együtt tisztul az *Apc3* és *Apc8* alegységekkel.
- A *Drosophila Apc7* fehérje nem létfontosságú komponense az APC-nek.
- Kimutattuk, hogy az *Apc8* alegység legalább két példányban van jelen az APC komplexben.

Közlemények

1. Pal M, Nagy O, Menesi D, Udvardy A and Deak P.
Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase promoting complex in *Drosophila melanogaster*.
J Cell Sci. 2007.120, 3238-48 IF: 6.543
2. Pal M, Varga K, Nagy O, Deak P.
Characterisation of the APC10/DOC1 subunit of the anaphase promoting complex in *Drosophila melanogaster*.
Acta biologica Hungarica. 2007; 58 (Suppl.) 51-64 IF:0.636
3. Ryder, E., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Drummond, J., Webster, J., Johnson, G., Morley, T., Chan, Y. S., Blows, F., Coulson, D. et al.
The DrosDel Deletion Collection: A *Drosophila* Genomewide Chromosomal Deficiency Resource.
Genetics. 2007 Sept; 177, 615-29. IF: 4.289
4. Szabo A, Pal M, Deak P, Kiss P, Ujfaludi Z, Pankotai T, Lipinszki Z, Udvardy A.
Molecular characterization of the Rpt1/p48B ATPase subunit of the *Drosophila melanogaster* 26S proteasome.
Mol Genet Genomics. 2007 Jul;278(1):17-29 IF: 2.632
5. Kiss P, Szabo A, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradzsky KF, Lipinszki Z, Pal M, Udvardy A.
Zn²⁺-induced reversible dissociation of subunit Rpn10/p54 of the *Drosophila* 26 S proteasome.
Biochem J. 2005 Oct 15;391(Pt 2):301-10. IF: 4.22
6. Dequier E, Souid S, Pal M, Maroy P, Lepesant JA, Yanicostas C.
Top-DER- and Dpp-dependent requirements for the *Drosophila* fos/kayak gene in follicular epithelium morphogenesis.
Mech Dev. 2001 Aug;106(1-2):47-60 IF: 3.462
7. Burmester T, Mink M, Pal M, Laszloffy Zs, Lepesant J, Maroy P.
Genetic and molecular analysis in the 70CD region of the third chromosome of *Drosophila melanogaster*.
Gene. 2000 Apr 4;246(1-2):157-67. IF: 2.461

8. Salzberg A, Prokopenko SN, He Y, Tsai P, Pal M, Maroy P, Glover DM, Deak P, Bellen HJ.

P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: mutations affecting embryonic PNS development.

Genetics. 1997 Dec;147(4):1723-41.

IF: 4.687

9. Deak P, Omar MM, Saunders RD, Pal M, Komonyi O, Szidonya J, Maroy P, Zhang Y, Ashburner M, Benos P, Savakis C, Siden-Kiamos I, Louis C, Bolshakov VN, Kafatos FC, Madueno E, Modolell J, Glover DM.

P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F.

Genetics. 1997 Dec;147(4):1697-722.

IF: 4.687

Közlemények száma: 9

Összes impact factor: 33.617

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott igazolom, hogy Pál Margit doktori értekezésében és annak téziseiben ismertetett tudományos eredmények valóságosak, és azok a Jelölt munkája során születtek.

Pál Margit szerepe, mint első szerző, alapvető volt a „Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase promoting complex in *Drosophila melanogaster*” (*J Cell Sci.* 120, 3238-48) és a „Characterisation of the APC10/DOC1 subunit of the anaphase promoting complex in *Drosophila melanogaster*” (*Acta Biologica Hungarica.* 58, 51-64) című publikációk létrehozásában. Támogatom azt, hogy Pál Margit ezeket a publikációkat PhD fokozat megszerzéséhez felhasználja.

Szeged, 2007. október 19.

.....
Dr. Deák Péter
tudományos főmunkatárs
témavezető

