

A FEHÉRJELEBONTÁS SZEREPÉNEK TANULMÁNYOZÁSA A KROMOSZÓMA SZEGREGÁCIÓ ÉS A MITÓZIS SZABÁLYOZÁSÁBAN

Szakmai beszámoló

A kutatási téma tudományos háttere és elméleti indoklása

A sejtosztódások folyamán az örökítő anyag precíz duplikálódása és utódsejtekbe való szegregálódása biztosítja a genom stabilitását (1). Ezeket a folyamatokat az ubiquitin-függő protein degradációs rendszer szabályozza, aminek központi eleme az "anaphase promoting complex"-nek vagy APC-nek nevezett nagy, ubiquitin-protein ligáz komplex (2,3). Más enzimekkel együtt az APC katalizálja poli-ubiquitin láncok kialakulását mitotikus szabályozó fehérjéken. Az így megjelölt fehérjéket felismeri és lebontja a 26S proteoszóma. Az APC egy evolúciósan konzerválódott komplex, aminek strukturális és funkcionális homológjait kimutatták az élesztőktől, a magasabbrendű eukariótákon át, egészen az emberig (4).

Noha ismerjük az APC egyik fő funkcióját, és szabályozásának néhány elemét is, azonban számos fontos kérdés még megválaszolatlan a felépítésével, funkciójával és szabályozásával kapcsolatban. Nem értjük még, hogy miért áll az APC olyan sok alegységből, és nem ismerjük az egyes alegységek szerepét sem. Nem tudjuk, hogy mi a szerepe az APC-nek a poli-ubiquitin láncok kialakításában, van-e valódi enzimaktivitása, vagy csupán dokkoló állomásként szolgál a szubsztrát fehérjék és az ubiquitináló enzimek számára. Tisztázni kell még az APC szabályozásának és szubsztrát-specifitásának molekuláris részleteit is.

Munkánk célja az volt, hogy azonosítsuk az APC alegységeit kódoló géneket, valamint azok mutáns alléljait egy genetikailag jól kezelhető kísérleti rendszerben, a *Drosophila melanogaster*-ben.

A kutatási téma munkaterve

1. A *Drosophila* APC alegységeit kódoló gének azonosítása, cDNS-eik klónozása és expresszálása.
2. APC alegységekben mutáns vonalak izolálása P elemre épülő módszerekkel, és ezek jellemzése.
3. Az egyes APC alegységekkel kölcsönhatásban lévő gének azonosítása élesztő kettőshibrid és genetikai interakciós kísérletekben.
4. Protein degradáció követésére alkalmas kísérleti rendszer kifejlesztése.
5. A vad típusú és mutáns APC alegységek biokémiai analízise.

A kutatási téma résztvevői

Dr Deák Péter – témavezető, részt vett a kísérleti munkában, és a pályázattal kapcsolatos minden jellegű tevékenységben. Irányította a szakdolgozó hallgatók munkáját.

Dr Udvardy Andor – résztvevő, részt vett az in vitro ubiquitinációs assay-vel kapcsolatos munkában és a kísérleti adatok értékelésében.

Dr Boros Imre – résztvevő, részt vett az élesztő kettőshibrid rendszer felállításában, és a kísérleti adatok kiértékelésében.

Pál Margit – technikus, részt vett a munkatervben szereplő valamennyi kísérlet előkészítésében és megvalósításában, valamint a szakdolgozó hallgatók laboratóriumi betanításában.

Nagy Olga – egyetemi hallgató, aki 2004-2005 között szakdolgozóként az Apc7 alegységre specifikus transzgénikus RNS interferencia vonalakat izolált és jellemzett. 2005 szeptemberétől mint PhD hallgató folytatta munkáját.

Ménesi Dalma – egyetemi hallgató, aki 2004-2005 között szakdolgozóként az Apc6/Cdc16 alegységre specifikus transzgénikus RNS interferencia vonalakat izolált és jellemzett.

A kutatási téma megvalósítása és eredményei

1. A *Drosophila* APC alegységeit kódoló gének azonosítása, cDNS-eik klónozása és expresszálása.

Az APC alegységek azonosításában kihasználtuk a *Drosophila* genom-szekvencia adatbázis nyújtotta lehetőségeket. Az élesztő, valamint humán APC alegységek szekvenciáinak felhasználásával, az amerikai *Drosophila* genom projekt (BDGP) által rendelkezésre bocsájtott WU-BLAST adatbázis-kereső algoritmus TBLASTN programját használtuk (12 és 13). Ez a program aminósav szekvenciát hasonlít össze minden olvasási keretben folyamatosan átfordított nukleotid szekvenciához, majd pedig statisztikailag szignifikáns hasonlóságot keres a szekvenciák között.

A genomikus és az EST (expressed sequence tags) adatbázis szűrése után a sikerült azonosítani 10 *Drosophila* gént, és az ezeknek megfelelő cDNS klónokat (1. táblázat), amelyek nagymértékű homológiát mutattak az élesztő és humán szekvenciákkal. Az azonosított gének közül nyolc eddig még nem tanulmányozott, új génnek bizonyult. Az APC2 és APC5 homológokat kódoló génekről kiderült, hogy azonosak a már korábban genetikailag analizált *morula* (*mr*) és *imaginal discs arrested* (*ida*) lókuszokkal.

APC alegység	<i>Drosophila</i> gén	Citogenetikai pozíció	cDNS klón
APC1	CG9198	13D1-2	LD37115
APC2	<i>morula</i>	60A14	LD24965
APC3	CG8610	65E9-11	LD12661
APC4	CG32707	8C12	LD06225
APC5	<i>ida</i>	63F6	LP08426
APC6	CG6759	94E9	EP18439
APC7	CG14444	6C1	LD05103
APC8	CG2508	38C10	LD08958
APC10	CG11419	54B5	CK02399
APC11	CG18042	29D1-4	GH20177

1. táblázat APC alegységeket kódoló *Drosophila* gének és cDNS klónjaik

A cDNS klónok citogenetikai lokalizációját in situ hibridizációval is elvégeztük nyálmirigy óriáskromoszómákhoz. Ezekkel a citológiai adatokkal pontosítani lehetett

a genom annotációs adatokból megbecsült citológiai pozíciókat, és így hozzájárultunk a fizikai és citológiai térkép korrelációjának pontosításához.

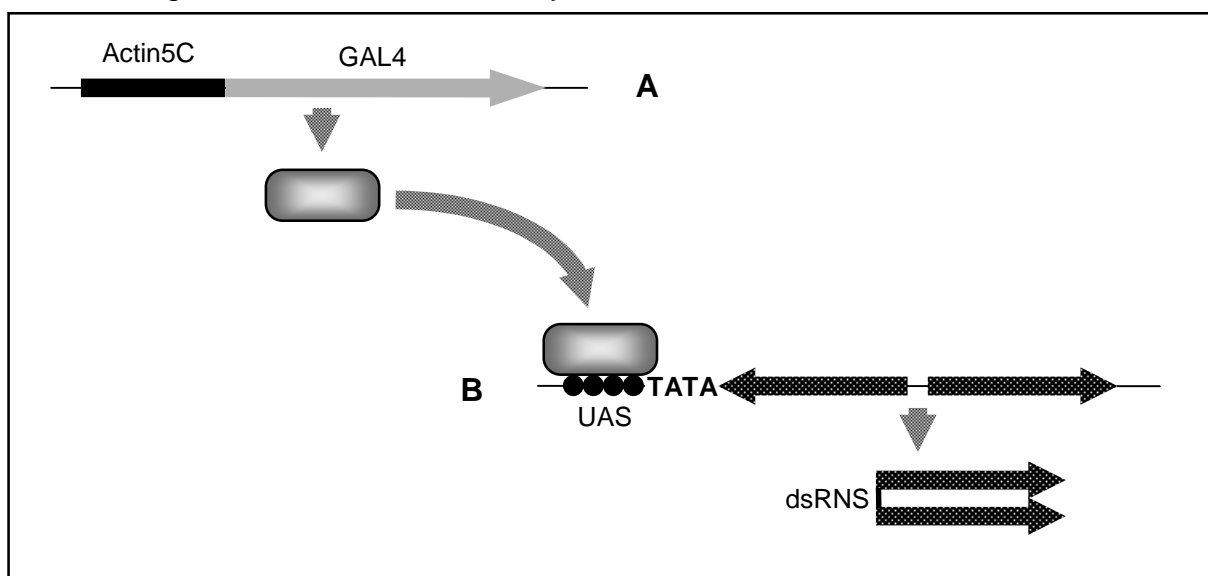
In silico génazonosítási eredményeink azt mutatják, hogy a *Drosophila* APC alegység-összetétele egyedi, amely kis mértékben eltér mind az élesztő, mind pedig a gerincesekre jellemző APC-től. Egyrészt, a gerincesekhez hasonlóan *Drosophilában* is megtalálható az APC7 alegység, viszont nem lehetett kimutatni az APC9 és APC12 alegységeket, amiket eddig csak az egysejtű élesztőkben sikerült azonosítani. Úgy tűnik, hogy a *Drosophila* APC egyedi jellemzője a Cdc26 alegység hiánya, ami pedig megtalálható mind élesztőkben, mind pedig gerincesekben is.

Valamennyi alegységnek megfelelő cDNS szekvenciákat pET-28 expressziós vektorba klónoztuk, amelyek alkalmasak N-terminálisan His-taggal ellátott polipeptidek expressziójára.

2. APC alegységekben mutáns vonalak izolálása P elemre épülő módszerekkel, és ezek jellemzése.

Mutánsok izolálására három igen hatékony kísérleti módszert alkalmaztunk, amelyek mindegyike a P elemek nyújtotta lehetőségeket használja ki. Első megközelítésként az általunk és mások által izolált P elem inszerciós mutánsgyűteményeket szűrtük meg (10). Olyan alegységek esetében, amelyek génjeiben nem találtunk P elem inszerciót, transzgenikus RNS interferencia és/vagy homológ rekombinációs technikákat alkalmaztunk.

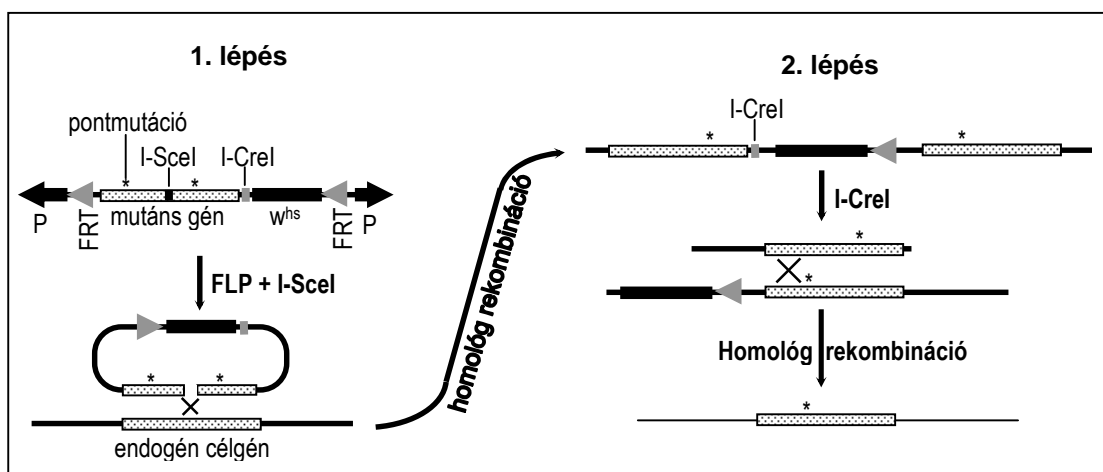
A transzgenikus RNS interferencia módszer lényege, hogy génspecifikus dupla szálú RNS (dsRNS) molekulák képződését indukáljuk az egyed sejtjeiben, amelyek az érintett gén expresszióját gátolják (9). Ehhez két transzgenikus vonalra van szükség minden kísérletben, amelyek keresztezésével indukálható az RNS



1. ábra A transzgenikus RNS interferencia kísérletek vázlatja. Az aktin 5C promotor biztosítja az élesztő GAL4 transzkripció faktor (A) egyenletes termelődését a transzgenikus egyedek minden sejtjében. A GAL4 faktor UAS szekvenciákhoz kötődve indukálja a vizsgált génnek megfelelő szekvencia expresszióját (B). A vizsgált génnek megfelelő szekvencia két kópiában, egymáshoz viszonyítva invertált orientációban van beklónoztva, így ezek komplementaritása miatt dsRNS képződik.

interferencia jelensége (1. ábra). Az egyik vonal hordozza a vizsgált génre specifikus dsRNS képződését biztosító konstrukciót (1. ábra, B), a másik pedig rendelkezik a dsRNS képződését indukáló konstrukcióval (1. ábra, A). A transzgenikus RNS interferencia vonalak nem valódi mutánsok, de a géncsendesítés eredményeként erős hipomorf, vagy null fenotípust mutatnak, továbbá a vonalak klasszikus genetikai mutánsokhoz hasonlóan keresztezhetők és genetikai interakciós kísérletekben is használhatók.

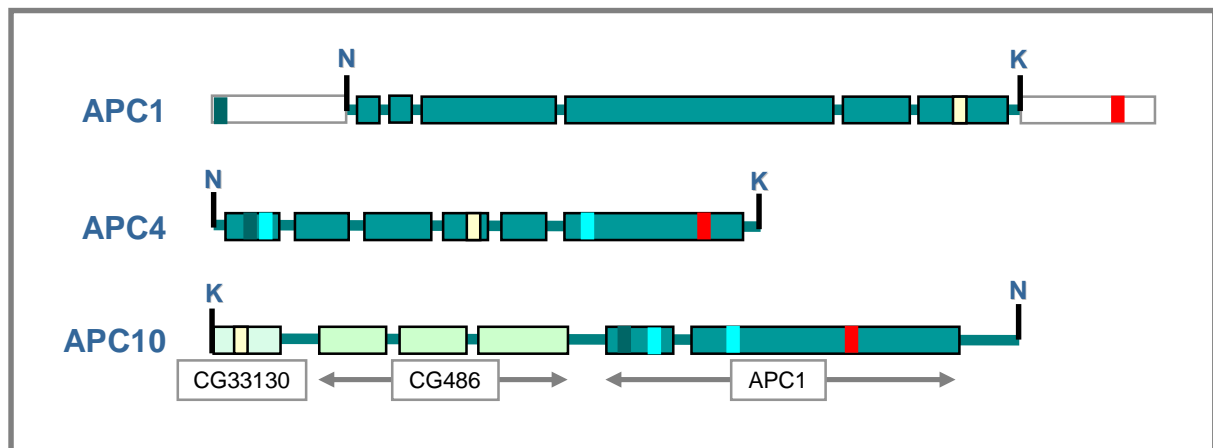
A homológ rekombinációs módszer lényege, hogy az állatok belső DNS javító és rekombinációs gépezetét kihasználva a vizsgált endogén gén egyik allélját kicseréljük egy másikra (8). Az első lépés vad típusú legyek transzformálása egy P elem alapú konstrukcióval, ami a P elem végeken belül tartalmaz két tandem FRT szekvenciát, továbbá a célgénnek megfelelő donor szekvenciát, ezen a szekvencián belül egy ritkán hasító helyspecifikus endonukleáz, az I-SceI felismerőhelyét, a donor szekvencián kívül egy másik ritkán hasító endonukleáz, az I-CreI felismerőhelyét, és a w^+ marker gént (2. ábra). A donor szekvencia tartalmazza azt a változást (pontmutáció, vagy deléció), amit a célgénben akarunk létrehozni. Egyszerű genetikai keresztezésekkel létrehozhatók olyan egyedek, amelyekben expresszálható az FLP helyspecifikus rekombináza, valamint a I-SceI endonukleáz. Az FLP plazmid formában kivágja a genomba random beépült transzgenikus konstrukciót (az FRT helyeken keresztül), amit aztán az I-SceI endonukleáz linearizál. A linearizált molekula homológ rekombinációt indukál a vele homológ genomikus lókuszbán, aminek eredményeként általában egy tandem duplikáció jön létre, ami tartalmazza a donor és recipiens (cél) szekvenciákat és a w^+ marker gént (2. ábra, 1. lépés). Ez az esemény könnyen követhető a w^+ marker gén szegregációjának követésével. Egy újabb keresztezést követően, a duplikációt hordozó egyedekben indukálható az I-CreI endonukleáz, aminek aktivitása ismét homológ rekombinációt indukál a két tandem szekvencia között. Ez az esemény is könnyen nyomonkövethető a w^+ marker elvesztésével (2. ábra, 2. lépés). Az így létrehozott, egy kópiát hordozó egyedek hordozzák a kívánt mutációt a vizsgált génben.



2. ábra Irányított mutagenézis homológ rekombináció felhasználásával. A *Drosophila* sejtek nem tartalmaznak I-SceI és I-CreI meganukleázokat, azonban az élesztőből származó rekombinázzal, a flipázzal (FLP) együtt kiválóan működnek transzgenikus állatokban kifejezve. A "*" az irányított mutációk helyét jelöli.

Az ismertett módszerekkel sikerült valamennyi alegységet kódoló génre mutánsokat, és/vagy transzgénikus RNS interferencia vonalakat izolálni, és jellemezni. Eredményeink a következők:

Apc1/shtd Ebben a génben homológ rekombinációs technikával sikerült egy null allélt előállítani. Ezt úgy értük el, hogy a donor szekvenciából kiejtettük a gén 5'- és 3'-végi kódoló szekvenciáit (3. ábra). Ez a mutáns recesszív báb letális, és erős mitotikus fenotípust mutat, amely magas mitotikus index, túlkondenzálódott kromoszómák, metafázis-szerű blokk, anafázisban megfigyelhető kromoszóma szegregációs rendellenességek és poliploid (általában tetraploid) sejtek megjelenésében nyilvánul meg. A génexpresszió hiányát RT-PCR-rel igazoltuk. Időközben Barbara Thomas (National Cancer Institute, Bethesda, USA) izolált egy EMS indukált gyenge hipomorf mutációt, amit *shattered* (*shtd*)-nek nevezett el. Megállapította, hogy a mutáció az APC1 homológot kódoló gént érinti, és elküldte nekünk a törzset, amit az általunk izolált alléllal együtt jellemeztünk. Az APC legfontosabb szubsztátjai közé tartoznak a Ciklin A és Ciklin B mitotikus ciklinek, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy mi történik ezekkel a mutáns sejtekben. Ciklin-specifikus ellenanyagok felhasználásával, mitotikusan aktív szöveteken immunhisztokémiai festéseket végeztünk, majd a preparátumokat Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal analizáltuk. Az Apc1/shtd mutánsokban mindkét ciklin szintje magas maradt a mitózisban lelassult, vagy gátolt sejtekben.



3. ábra Homológ rekombinációs konstrukciók sematikus ábrázolása. NotI-KpnI végű fragmenteket klónoztuk be pTV2 *Drosophila* transzformációs vektorba. Az *Apc1* konstrukció 5080 bp hosszú, és nem tartalmazza a gén első és utolsó exonjait. Az *Apc4* konstrukció 2948 bp hosszú, és két frameshift mutációt (kék csík) hordoz a gén első és utolsó exonjaiban. Az *Apc10* konstrukció 4627 bp hosszú, és két frameshift mutációt hordoz. Ezen kívül két szomszédos gén (CG33130 és CG4866) szekvenciáját is hordozza, amik azonban elvesznek a homológ rekombináció során. Jelmagyarázat: sárga csík=I-SceI meganukleáz felismerő szekvencia; sötétzöld csík=transzlációs start; piros csík=stop kódon; K=KpnI hely; N=NotI hely; zöld téglalap=exon szekvenciák; zöld vonal=intron illetve nem kódoló szekvenciák.

Apc2/mr Az alegységet kódoló *morula* (*mr*) gén mutáns alléljai már léteztek munkánk kezdetekor. Ezeket beszereztük, és fenotípusukat összevetettük az általunk izolált mutánsok fenotípusával. Mitotikus fenotípusuk hasonló az APC1 mutánsokhoz, azonban a poliploid sejtek gyakorisága jóval alacsonyabb a *mr*

homozigótákban. A mutánsokat genetikai interakciós kísérletekben használtuk, és sikerült interakciót kimutatni az APC2 és APC11 alegységek között.

Apc3/mks Az első mutáns allélt, *mákos*-t (*mks*¹) még Cambridge-i tanulmányutam során izoláltam (10). Jellemzését részben jelen pályázat időtartama alatt végeztük, David Gloverrel (Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, UK) kollaborálva (11). Az amerikai Drosophila Genom Project (BDGP) P elem inszerciós gyűjteményében egy további inszerciós allélt is azonosítottunk, aminek a *mks*² jelölést adtuk. A *mks* mutációkról kimutattuk, hogy az APC komplex APC3 alegységét kódoló gént érintik, annak hipomorf alléljai. A *mks*¹ allél báb és farát-adult letális, míg a *mks*² allél semiletális. Sikerült kimutatnunk genetikai interakciót az APC3/*mks* gén, valamint a *polo* és *twins* mitotikus szabályozó gének között. Említésre méltó, hogy az APC3 - *twins* interakciós kísérleteink fényt derítettek a sejtciklust szabályozó rendszer egyik adaptációs folyamatának mechanizmusára. Ezeket az eredményeinket már 2003-as beszámolóban jelentettem, és közleményben is megjelent már.

Apc4 Erre a génre is homológ rekombinációs technikával hoztunk létre egy null mutáns allélt. Ebben az esetben két frameshift mutációt szándékoztunk létrehozni a kódoló régió elején, valamint a kódoló szekvencián belül (3. ábra). A konstrukciók ellenőrzése során kiderült, hogy az 5'-végi frameshift mutáció létrehozása közben egy 30 nukleotid hosszú deléció jött létre, ami érintette a start kódot is. Mivel ez a nem tervezett módosulás összhangban volt terveinkkel, ezt a konstrukciót használtuk fel donorként. A létrehozott mutáns törzs a deléció mellett hordozza a belső mutációt is. Az APC4 mutáció is letalitást okoz, a homo- és hemizigóták báb stádiumban pusztulnak el.

Apc5/ida Ezt az alegységet az *ida* gén kódolja, mutáns alléljait mások izolálták (14). Ezeket elkértük, hogy genetikai interakciós kísérleteket végezhesünk. Sajnos az *ida* mutációkat hordozó kromoszómák további háttérmutációkat is hordoznak, ezért ezektől rekombinációs kísérletekben meg kell szabadulni, mielőtt használhatóak lesznek céljainkra. Ezek a kísérletek folyamatban vannak.

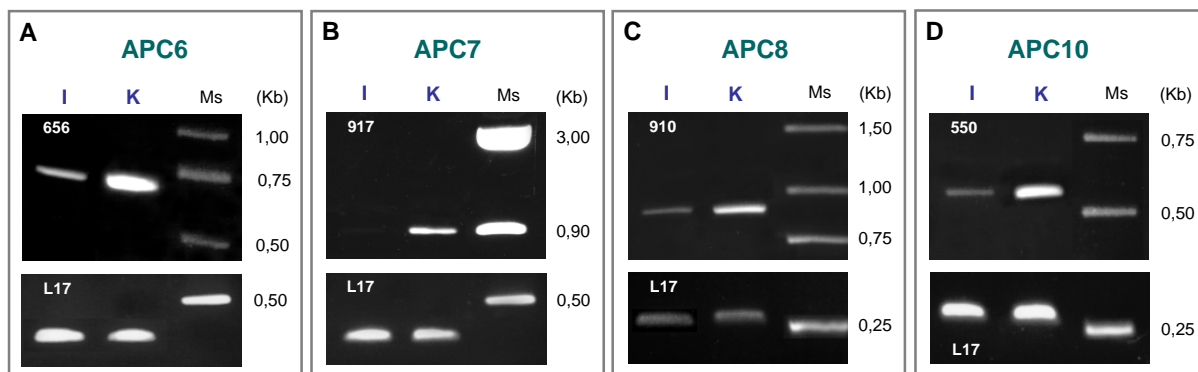
Apc6/Cdc16 Ebben az esetben a transzgénikus RNS interferencia módszer bizonyult eredményesnek. Összesen 9 független, APC6 specifikus RNS interferencia konstrukciót hordozó vonalat sikerült előállítani, melyek közül hat vonal mutat jellegzetes mitotikus fenotípust olyan egyedekben, amelyekben konstitutívan expresszálódik az APC6 génre specifikus duplaszálú RNS. Az RNS interferencia egyedek késői báb stádiumban pusztulnak el, emelkedett mitotikus indexet és metafázis-szerű gátlást mutatnak túlkondenzálódott kromoszómákkal. RT-PCR kísérletekben kimutattuk, hogy az RNS interferencia vonalak erős hipomorfok, azaz a génexpresszió a vad típushoz képest mintegy 10-15 %-ra csökkent. Ezekben az állatokban megnövekedett az apoptózis gyakorisága is. Ezt a munkát – szakdolgozati témaként - Nagy Olga V. éves biológus hallgató végezte. Immunhisztokémiai festéssel kimutattuk, hogy csak az egyik fő APC szubsztrát, a Ciklin B szintje marad magas a mitotikusan megrekedt sejtekben. A Ciklin A szabályosan, a mitózis elején lebomlik, ezért ennek az alegységnek csak a Ciklin B lebontásában lehet szerepe.

Apc7 Az Apc7 esetében is a transzgénikus RNS interferencia technikát alkalmaztuk a génfunkció kiütésére. Összesen öt transzgénikus vonalat sikerült

izolálni. Meglepetésünkre, ezek mindegyike életképes és fertilis maradt az RNS interferencia indukálása után is. RT-PCR kísérletekben kimutattuk, hogy az *Apc7* gén expressziója több mint 90 %-al csökkent az RNS interferencia indukciója után a vad típushoz képest. Ezek az állatok, noha életképesek voltak, jellegzetes mitótikus fenotípust mutattak: a sejtosztódás anafázisának időtartama mérhetően megnőtt a metafázishoz viszonyítva, és gyakori kromoszóma szegregálódási rendellenességek is megfigyelhetők voltak. Ez az első APC alegység, amely funkciója nem eszenciális az organizmus számára. Ez a munka Ménesi Dalma V. éves biológus hallgató szakdolgozati témája volt. A Ciklin A és B fehérjék a vad típushoz hasonló eloszlást mutattak a mitózis különböző stádiumaiban.

Apc8/Cdc23 E gén esetében is kizárólag a transzgénikus RNS interferencia technika állt rendelkezésünkre. Ebben az esetben 21 független transzgénikus vonalat sikerült azonosítanunk. Ezek közül 4 vonalban gátoltuk az *Apc8* gén expresszióját, és minden esetben korai báb letalitást, és jellegzetes mitótikus fenotípust kaptunk, ami megemelkedett mitótikus indexben, túlkondenzálódott kromoszómák megjelenésében, és metafázis-szerű gátlásban nyilvánult meg. RT-PCR kísérletekben kimutattuk, hogy ezekben a vonalakban is, az *Apc6/Cdc16* génhez hasonló, 85-90%-al csökkent a génexpresszió, viszont mind a letális, mind pedig a mitótikus fenotípus sokkal kifejezettebb az *Apc8/Cdc23* gén esetében. Ennek a génnek a funkció-kiesése is apoptózist indukál. Immunhisztokémiai festéssel csak Ciklin B-t tudtunk kimutatni a mitótikusan megrekedt sejtekben. Ciklin A-t csak prometáfázisban detektáltunk, később még a megrekedt sejtekben sem volt kimutatható. Ez az eredmény azt jelzi, hogy az *Apc6/Cdc16* alegységhez hasonlóan, ennek az alegységnek is csak a ciklin B lebontásában van szerepe.

Apc10 Az *Apc10* gén esetében párhuzamosan végeztük a homológ rekombinációs és az RNS interferencia kísérleteket. Mindkettő működött. A gén kis mérete (1.1 kb) nem elégséges hatékony homológ rekombinációhoz, ezért egy ennél lényegesen nagyobb, 4627 bp hosszú genomikus szekvenciát használtunk kísérleteinkben donor szekvenciaként. Ez a szekvencia három génre is kiterjed, ezek azonban nem zavarják a kísérlet eredményességét. Az I-SceI hasítóhelyet a szekvencia 5'-végéhez közel, egy szomszédos génbe (CG33130) illesztettük be, majd pedig egy frameshift mutációt hoztunk létre az *Apc10* második exonjában, az evolúciós konzerváltságot mutató DOC1 domén előtt (3. ábra). Összesen hat, a konstrukciót a 3. kromoszómán hordozó homozigóta életképes transzgénikus vonalat állítottunk elő. A homológ rekombinációs keresztezések után egy bábletális mutánst izoláltunk, amelyről kimutattuk, hogy hordozza az általunk létrehozott frameshift mutációt. Az RNS interferencia kísérletekhez a gén 2. exonját magába foglaló 443 bp hosszú cDNS fragmentet klónoztuk a pWIZ vektorba. A transzformálást követően 17 független, homozigóta életképes transzgénikus vonalat kaptunk, melyek közül ötöt vizsgáltunk tovább. dsRNS indukció minden esetben bábletalitást eredményezett, ami együtt járt az *Apc10* expresszió drasztikus (~90%-os) csökkenésével. Mind a homológ rekombinációval előállított allél, mind pedig az RNS interferencia vonalak mitótikus fenotípusára jellemző a magas mitótikus index, túlkondenzálódott kromoszómák, anafázisban visszamaradó kromoszómák és kromoszóma hidak, valamint erősen poliploid sejtek megjelenése.



4. ábra A génexpresszió meghatározása az RNS interferencia törzsekben RT-PCR-rel. A vizsgálatokhoz totál RNS-t izoláltunk indukált és nem indukált (kontrol) bábokból. Az RT-PCR reakciókat logaritmusos fázisban állítottuk le, és azonos térfogatokat analizáltunk. Templát bemérési kontrollként L17 riboszómális fehérje szekvenciákat (L17 Rp) használtunk. Az alkalmazott primerek által felamplifikált fragmentek mérete szerepel a gélfotókon. Az L17 fragment mérete 276 bp. I=indukált; K=nem indukált kontrol.

2004-ben az Exelixis Biotechnológiai cégtől (San Francisco, USA) vásároltunk egy P elem inszerciós törzset, amelyben az inszerciót az *Apc10* közelébe térképezték. Megállapítottuk, hogy az inszerció a gén 5'-végi promóter régióját érinti, és gátolja expresszióját. RT-PCR kísérletekben nem detektálható *Apc10*-specifikus transzkript, ezért ez a mutáció null allélnak tekinthető. Ennek a mutánsnak mind a letális, mind pedig a mitótikus fenotípusa nagyon hasonló az általunk izolált homológ rekombinációs allél, valamint az RNS interferencia vonalak fenotípusához. Mindhárom típusú mutánsban magas a ciklin A és B szintje az anafázisban megrekedt sejtekben.

Apc11/Img A gén első két P elem inszerciós allélját Allan Shirras (Lancaster, UK) izolálta, és az érintett génnek a *lemming* (*Img*) jelölést adta (15). Miután kiderült, hogy *Img* az APC11 alegységet kódolja, a mutánsokat elküldte nekünk további jellemzésre. Sajnos mindkét törzs (*Img*³⁴²⁴ és *Img*^{J023}) hordoz háttérmutációkat is, amik megnehezítik felhasználásukat. Időközben az amerikai Drosophila Genom Project (BDGP) P elem inszerciós gyűjteményében azonosítottunk egy új P elem inszerciós allélt, amely mentes háttérmutációktól (*Img*³). Munkánkhöz a *Img*³ és a háttérmutációktól megtisztított *Img*³⁴²⁴ mutánsokat használtuk. A *Img*³⁴²⁴ mutáció egy hipomorf allél, aminek szemiletális, míg a *Img*³ null allélnak késő báb letális fenotípusa van. Mindkettő erős mitótikus fenotípussal rendelkezik, amelyre nagyon magas mitótikus index, túlkondenzálódott kromoszómák, és poliploid sejtek nagy gyakorisága jellemző. Mindkét mitótikus ciklin koncentrációja magas ezeknek a mutánsoknak a mitózisban megrekedt sejteiben.

3. Az egyes APC alegységekkel kölcsönhatásban lévő gének azonosítása élesztő kettőshibrid és genetikai interakciós kísérletekben.

Az élesztő kettős hibrid rendszer széleskörűen alkalmazott módszer az egymással kölcsönható fehérjék azonosítására (16), ezért alkalmas módszernek

látszott az APC pontos alegység-összetételének meghatározására, és az APC-vel kölcsönható molekulák azonosítására. Ezt a kísérleti rendszert kétféleképpen állítottuk be.

Egyrészt az általunk vizsgált alegységeknek megfelelő szekvenciákat összekapcsoltuk mind a LexA bakteriális transzkripció faktor DNS-kötő (DB) doménjével, mind pedig az élesztő GAL4 transzkripció faktor aktivációs doménjével (AD). Ezekben a kísérletekben különböző DB-AD kombinációkat juttattunk élesztő sejtekbe, és funkcionális transzkripció aktivátor képződéséből következtettünk az alegységek közötti interakcióra. A kísérletek eredményességét korlátozta az a tény, hogy az *Apc3/mks*, *Apc8/Cdc23* és az *Apc10* alegységek önmagukban is hatékony aktivátornak bizonyultak mind a DB mind pedig az AD doménhez kapcsolva. Ennek ellenére nagyon erős interakciót sikerült kimutatnunk az *Apc2/mr* és *Apc11/lmg* alegységek között. Ezt az interakciót genetikai interakciós kísérletekben is sikerült megerősítenünk. Ez az eredményünk összhangban van az élesztő és humán APC biokémiai vizsgálatát ismertető legfrissebb közleményekkel, amelyek azt sugallják, hogy ez a két alegység egy katalitikus szubkomplexet alkot az APC-n belül. Több alegység között tapasztaltunk bizonytalan (nagy variabilitást mutató, és gyenge jelt adó) kölcsönhatást. Ezekből, és az időközben megjelenő szerkezetvizsgálati közlemények adataiból arra következtettünk, hogy egy-egy kölcsönhatás kialakításában kettőnél több alegység vehet részt. Ezt a feltételezésünket hármás- és négyes-hibrid kísérletekben fogjuk ellenőrizni, amelyek elvégzését a jelen pályázat anyagi lehetőségei nem tették lehetővé.

Egy másik kísérletsorozatban egyes APC alegység-LexA DB fúziós klónokat csaliként felhasználva olyan cDNS könyvtárat szűrtünk meg, amely minden képviselője aktivációs domént kódoló DNS darabbal van összekapcsolva (CLONTECH matchmaker cDNS könyvtár). Ezekben a kísérletekben a vizsgált APC fehérjével kölcsönható polipeptidet kódoló gének felismerhetők és azonosíthatók. Evvel a módszerrel sikerült azonosítanunk az *Apc2/mr* alegységgel interakciót mutató két fehérjét kódoló gént, az *Apc11/lmg*-et és a *lesswright (lwr, CG3018)*-t. Az *Apc11/lmg*-el kapott eredmény az első kísérlet eredményének, a genetikai interakciós eredményeinknek, és az irodalmi adatok ismeretében nem meglepő. A *lwr* gén egy SUMO konjugáló (E2) enzimet kódol, amely részt vesz az ubiquitinhez hasonló SUMO polipeptid fehérjékhez történő kapcsolásában, a sumoilálásban. A sumoilálásban, az ubiquitináláshoz hasonlóan aktíváló (E1), konjugáló (E2) és ligáz (E3) enzimek vesznek részt. A ubiquitinálással ellentétben azonban, a sumoilálás nem eredményez fehérjedegradációt, hanem módosítja a fehérjék lokalizációját, aktivitását, vagy a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. Mivel rendelkezünk *lwr* mutánsokkal, az *lwr - Apc2/mr* interakciót genetikai interakciós kísérletben is sikerült kimutatnunk. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy mind az *lwr*, mind pedig a sumoilálásban részt vevő gének mutációi az APC mutánsokhoz hasonló mitotikus fenotípust mutatnak. Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy a sumoilálásnak szerepe lehet az APC-függő fehérjedegradáció szabályozásában.

Az APC sokalegységes összetétele alapján elképzelhető, hogy az egyes alegységek kiesése, vagy módosulása befolyásolhatja más alegységek funkcióját, illetve ezek szabályos beépülését a komplexbe. Ennek tanulmányozására genetikai interakciós kísérleteket végeztünk az alegységek között. Szinergisztikus genetikai

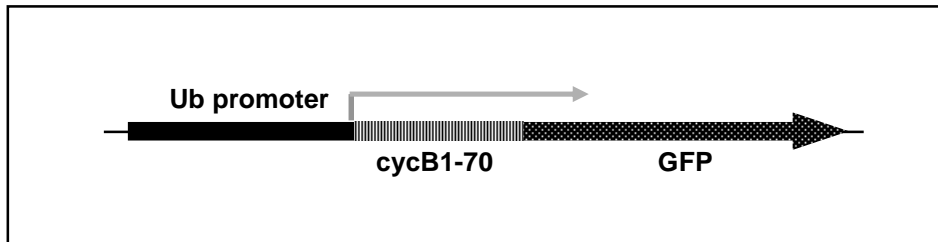
interakció figyelhető meg az APC négy, TPR (tetratricopeptide-repeat) doméneket tartalmazó alegysége, az Apc3/mks, Apc6/Cdc16, Apc7 és Apc8/Cdc23 között. TPR doméneket tartalmazó fehérjék általában nagy fehérje-komplexekben találhatók (5 és 6), és fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában van szerepük (bővebben lásd az 5. pontot).

4. Protein degradáció követésére alkalmas kísérleti rendszer kifejlesztése.

Az általunk előállított mutánsok lehetővé teszik az APC funkciójának és szabályozásának részletes analizisét. A sejtciklus szabályozásában betöltött szerepét az APC a különböző szubsztrát molekulák ubiquitinálásán keresztül fejt ki. Ennek követésére egy in vitro APC-függő ubiquitinációs assay kidolgozását is terveztük. Ennek lényege, hogy *Drosophila* embrió kivonat kromatográfiás frakcióit inkubáljuk ubiquitin, rekombináns mitotikus ciklin (ciklinA vagy ciklinB), ubiquitin aktiváló (E1) és konjugáló (E2) enzimek, valamint ATP és ATP-regeneráló rendszer jelenlétében (28), majd ciklin elleni specifikus ellenanyag felhasználásával, immunoblot technikával, követjük a ciklin molekula multi-ubiquitinálását.

Munkánkban az emlős sejtekre kidolgozott protokollt vettük alapul, ezt, és ennek változatait alkalmaztuk *Drosophila* embrió extraktumokon. Sajnos erőfeszítéseink nem jártak eredménnyel, mivel nem sikerült ubiquitinált szubsztrátot kimutatnunk. Elképzelhető, hogy az extraktum egy lényeges komponense elbomlik a preparálás során, vagy a rekombináns fehérjék egyike termelődik, de inaktív formában. Ezeknek a lehetőségeknek a tesztelése igen költség- és időigényes, ezért a projektnek ezt a részét egy évi próbálkozás után leállítottuk, és egy alternatív módszer kidolgozására tértünk át. Lényegesnek tartom megjegyezni, hogy *Drosophilában* működő in vitro ubiquitinációs assay-t eddig más laboroknak sem sikerült előállítani.

Az általunk kidolgozott új módszerrel közvetve, a fehérjedegradáció nyomonkövetésével következtetünk az ubiquitináció hatékonyságára. Lényege, hogy egy nem interferáló degradációs szubsztrátot hozunk létre a sejtekben, amely koncentráció-függő, követhető és mérhető jelet bocsájt ki. A detektált intenzitásváltozásból így tehát következtethetünk a protein degradációs mechanizmus hatékonyságára. Olyan transzgénikus állatokat hoztunk létre, amelyek folyamatosan, de viszonylag alacsony koncentrációban expresszálnak egy Ciklin B-GFP fúziós fehérjét. A fúziós fehérje N-terminális 70 aminosav hosszú doménje a Ciklin B szekvenciájával azonos, így hordozza az ubiquitinációhoz elengedhetetlen destruktív (D-box) szekvenciát. C-terminális doménje a teljes GFP szekvenciával azonos, amit egy stop és poli-A szignál szekvencia követ. A fúziós terméket kódoló szekvencia expresszióját az ubiquitin gén promotere biztosítja (5. ábra). A fúziós fehérjét expresszáló állatok nem különböznek a vad típusú állatoktól sem életképességben, sem pedig fertilitásban, ami azt jelenti, hogy a fúziós termék nem interferál a sejt- és egyedfejlődési folyamatokkal. Az előállított transzgénikus vonalak a nagy kromoszómákon (X, 2. és 3.) hordozzák, és detektálható mértékben expresszálják a Ciklin B-GFP transzgént.



5. ábra A Ciklin B-GFP fúziós transzgen felépítése. A ciklin és GFP szekvenciák azonos leolvasási frémekben kapcsolódnak egymáshoz. Ub=ubiquitin.

A proteindegradáció követésére alkalmas rendszert kidolgoztuk tehát, azonban használatát az APC mutánsok jellemzésében még nem kezdhettük el a pályázat időtartama alatt, mivel alkalmas mérőműszerek (konfokális mikroszkóp és mikrofluorométer) nem álltak a rendelkezésünkre.

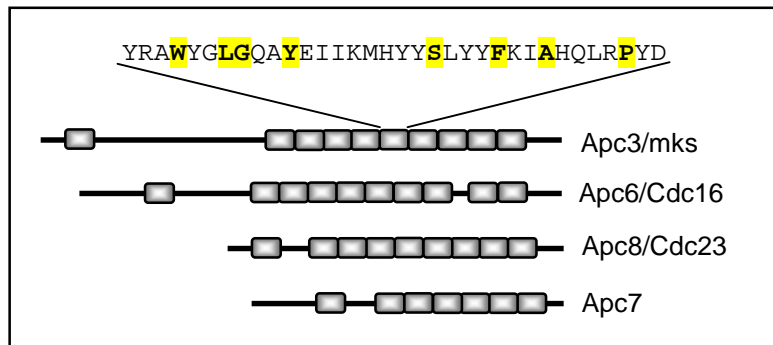
5. A vad típusú és mutáns APC alegységek felépítése és biokémiai analízise.

Az APC2, APC4, APC7 és APC10 alegységeknek megfelelő szekvenciákat klónoztuk és expresszáltattuk bakteriális pET expressziós rendszerben. Sajnos az expresszált fehérjék minden esetben oldhatatlannak bizonyultak, és a zárványtestekben (inclusion body) halmozódtak fel. Az APC2, APC3 és APC7 alegységeket sikerült tisztítanunk, ezekkel a mintákkal nyulakat immunizáltunk poliklonális ellenanyag nyerése céljából. Sajnos valamennyi próbálkozásunk, továbbá egy ellenanyag termelésre szakosodott labor (PTE, Anatómiai Tanszék) próbálása is sikertelen volt: a kinyert szérumok nem, vagy csak nagyon gyengén ismerték fel a *Drosophila* sejt-extraktumban lévő natív APC alegységet. Ennek egyéb más mellett az lehet az oka, hogy a bakteriális expresszió folyamán a képződő fehérje nem a natív fehérjére jellemző térszerkezetet veszi fel. Ez különösen jellemző olyan polipeptidekre, amelyek az APC-hez hasonló nagy komplexek kialakításában vesznek részt.

Ilyen, vagy hasonló nehézségekkel más laborok is szembetalálhatták magukat, mert mindezideig nem ismert egyetlen mono- vagy poliklonális ellenanyag *Drosophila* APC alegység ellen. Egy lehetséges, de igen kockázatos és drága megoldást jelent alegység-specifikus szintetikus oligopeptidek felhasználása ellenanyag termelésre. Ezt, valamint további alegységek tisztítását és immunizálást azonban a pályázat biztosította anyagi lehetőségünk már nem tette lehetővé.

A rendelkezésünkre álló bioinformatikai eszközök és protein-szerkezet vizsgálati adatok felhasználásával a fehérjék lényeges biokémiai tulajdonságait ismerhetjük meg (12 és 13). A funkció szempontjából az egyik legfontosabb információ a fehérjék domén összetétele, ezért ennek analízisét valamennyi APC alegységre elvégeztük. Ennek lényege, hogy az alegységek aminosav szekvenciáit időről-időre összevetettük a nemzetközi protein-domén adatbázisokban (Swiss-Prot Prosite database, NCBI Conserved Domain Database) található szekvenciákkal. *In silico* analízisünkéből megállapítható, hogy az APC alegységek viszonylag szegények konzervált domének tekintetében. Az Apc1/shtd, Apc4 os Apc5/ida alegységekben nem azonosítható ilyen domén, az Apc2/mr alegység tartalmaz egy cullin, az Apc10

Doc1, az Apc11/lmg pedig egy Ring-finger domént. A cullin, Doc1 és Ring-finger doméneket tartalmazó fehérjék megtalálhatók az APC-től eltérő ubiquitin ligáz (E3) komplexekben is, jelezve, hogy ezeknek szerepe van a ligázok katalitikus aktivitásának kialakításában. Az említett alegységektől eltérően, az Apc3/mks, Apc6/Cdc16, Apc7 és Apc8/Cdc23 alegységek a TPR fehérjék családjába tartoznak (6). Ezekre jellemző, hogy tandem ismétlődésekben tartalmaznak egy degenerált, 34 aminosavból álló szekvenciát. Szekvenca analízisünkből kiderült, hogy a *Drosophila* Apc3/mks és Apc6/Cdc16 alegységek tíz, az Apc8/Cdc23 alegység kilenc, az Apc7 alegység pedig hét TPR ismétlődést hordoznak (6. ábra).



6. ábra A *Drosophila* TPR alegységek felépítése. A téglalapok egy-egy 34 aminosavból álló TPR ismétlődést jelöl. Az ábra felső részén az Apc3/mks ötödik TPR motívumának szekvenciája látható a konszenzus aminosavak kiemelésével.

A TPR ismétlődések szekvenca szinten bem mutatnak nagy konzerváltságot, még egy fajon belül sem, amit jól szemléltet a *Drosophila* Apc8/Cdc23 fehérjében található kilenc motívum összehasonlítása (7/A ábra).

TPR-1	GYGIYLYGVV	LKALN	LNQA	AEQMLVQ	AIRLVP	PML	APC8																	
TPR-2	IYLIAQ	MA	LVYHN	KRDVDK	AIELYQ	ALLES		PYR																
TPR-3	LDNVD	TYSN	LVFK	EMKTE	MAQLA	HKA		VSINK	YR															
TPR-4	PETCC	VIG	NYYS	SIRCD	HQVA	ISYF		QRA	LKLN	PKY														
TPR-5	LAAW	TLMG	HEF	MELK	NTNAA	IQSY		RKA	VEVN	KRD														
TPR-6	YRAWY	GLGQ	AYE	IIKMH	YYS	SLYY		FKIA	HQLR	PYD														
TPR-7	SRML	VALG	ETYE	KLDK	CEN	AVK		YWK	AIDV	GDIE														
TPR-8	GIAMY	KL	LANL	HEKL	GDHET	AVHC		YIM	YCED	ERAA														
TPR-9	YQGF	ITL	LAN	Y	EKK	GEYER		A	AYY	AYK	CLD	SEDRK												
		Y	IA	H		F	L																	
		---	W	---	L	G	---	Y	---	A	---	Y	---	A	---	P	---	konszenzus						
			L	M	S	L				S	L	C		K										
At	YRAWY	GLGQ	AYE	MMG	MP	FYAL	H	Y	FRKS	I	FFL	P	N	D					B TPR6					
Sp	YRAWY	GLGQ	TYE	VLD	MH	FYAL	Y	F	QRA	A	TAL	R	P	Y	D									
An	YRAWY	GLGQ	AYE	VLD	M	S	FYAL	F	Y	QRA	A	A	L	R	P	Y	D							
Dm	YRAWY	GLGQ	AYE	IIKMH	Y	S	L	Y	F	KIA	H	Q	L	R	P	Y	D							
Xl	YRAWY	GLGQ	TYE	I	L	K	M	P	FY	C	L	Y	Y	R	R	A	H	Q		L	R	P	N	D
Hs	YRAWY	GLGQ	TYE	I	L	K	M	P	FY	C	L	Y	Y	R	R	A	H	Q		L	R	P	N	D

7. ábra Az Apc8 alegység TPR ismétlődéseinek összehasonlítása. Az A rész a *Drosophila* Apc8 kilenc TPR szekvenciáját mutatja, míg a B rész hat faj Apc8 alegységének hatodik TPR ismétlődését hasonlítja össze. Középen a TPR konszenzus látható. At *Arabidopsis*, Sp hasadó élesztő, An *Aspergillus*, Dm *Drosophila*, Xl *Xenopus*, Hs ember.

A konszenzus szekvencia mindössze nyolc aminosavból áll, de közöttük sincs invariáns pozíció. A szekvencián belül azonban kis és nagy, valamint poláros és apoláros aminosavak szabályos váltakozása jelzi, hogy a TPR motívumok szerkezete konzerválódott. Ez nyilvánvalóvá vált, amikor különböző fajokban azonosított TPR fehérjék azonos pozícióban lévő szekvenciáit hasonlítottuk össze (7/B ábra). Ezeken belül a szekvencia hasonlóság sokkal kifejezettebb, ami funkcionális konzerváltságot jelez.

Az utóbbi években sikerült néhány TPR fehérje kristályszerkezetét meghatározni (7 és 19). Kiderült, hogy minden TPR ismétlődés két azonos hosszúságú α -hélixet tartalmaz (8/A ábra), amelyek antiparallel (helix-turn-helix) konformációt vesznek fel (8/B ábra). Az egymás melletti ismétlődések elfordulnak egymástól, ezért tandem sorozatuk egy jobbmenetes szuperhélixet alkot.



8. ábra A TPR ismétlődés másodlagos és harmadlagos szerkezete. (A) A humán PEX5 (peroxisomal targeting signal receptor) és a *Drosophila* PP5 (protein foszfatáz-5) és a *Drosophila* Apc8 alegység egy-egy TPR motívumának szekvenciája. A hengerek az α -hélixeket reprezentálja. (B) A *Drosophila* PP5 enzim TPR ismétlődésének helix-turn-helix konfigurációja.

A *Drosophila* APC alegységek TPR ismétlődései nagyon hasonlók a szerkezetvizsgálatokban használt PEX5 és PP5 fehérjék TPR ismétlődéseihöz (8. ábra), ezért feltételezzük, hogy az általunk tanulmányozott négy alegység térbeli szerkezete modellezhető a már megismert TPR fehérjék térszerkezeti adataival. Ezek, és az általunk izolált mutánsok fenotípusai, valamint az interakciós eredményeink alapján feltételezzük, hogy a TPR alegységek egy vázszerkezetet (scaffold) képeznek, és ehhez kötődnek az APC további alegységei, aktivátorai, valamint szubsztrát fehérjéi is. Evvel az elképzeléssel magyarázhatók a hasonló felépítésű TPR alegységek eltérő mutáns fenotípusai is: egy TPR alegység kiesése más-más funkciót érinthet attól függően, hogy egy további alegység, aktivátor, vagy szubsztrát kötődését érinti.

Külön említést érdemel az Apc7 alegység többitől eltérő, nem esszenciális funkciója. Tisztítási és sűrűség-grádiens centrifugálási kísérletek kimutatták, hogy az APC monomer és dimer formában is létezik, és a dimer forma hatékonyabb E3 ligáz aktivitással rendelkezik, mint a monomer (17 és 18). Elképzelhetőnek tartjuk, hogy az Apc7 alegység a dimerek kialakulásában játszik szerepet, mert ez összhangban lenne megismert tulajdonságaival.

A kutatási téma teljesítése során felmerült nehézségek

A munkaterv teljesítése közben több nehézséggel is szembe kellett néznünk. A pályázat elnyerése után a munka elkezdését késleltette az a körülmény, hogy a témavezető egy több éves külföldi tanulmányútról tért vissza, és intézeti átszervezési és beszerzési nehézségek miatt sem saját labor, sem pedig lényeges, a munka szempontjából alapvető eszközök nem álltak rendelkezésére. Ezek miatt a folyamatos molekuláris munka csak az első év végén, míg nagyobb volumenű genetikai munka csak a második évben indulhatott be.

Lehetőségeinket lényegesen korlátozta az a tény, hogy a megítélt támogatás dologi kiadási keretét kétszer is csökkentették kb. 10-10 %-al, és a futamidő alatt került bevezetésre az ÁFA-fizetési kötelezettség is. Egy eszköz és vegyszer tartalékkal nem rendelkező új labor lévén, a megváltozott anyagi lehetőségeink korlátozták a kutatási téma teljesítését különösen a pályázat második felében.

A kutatási eredmények közzététele

Kutatási eredményeinket eddig három hazai (VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XII. és XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok) és egy nemzetközi konferencián (19th European Drosophila Research Conference) mutattuk be.

Két diplomadolgozat készült a kutatási témában. Nagy Olga V. éves biológus hallgató „Az APC ubiquitin ligáz Cdc16 alegységét kódoló gén genetikai analízise ecetmuslicában” címmel írta és védte meg szakdolgozatát. Ménesi Dalma V. éves biológus hallgató „Az APC7 gén vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben” című szakdolgozatot készített.

A témával kapcsolatos közleményünk eddig egy jelent meg nemzetközi, magas impakt faktorú folyóiratban. Az Apc3/mks alegységgel kapcsolatosan közleményünk a Journal of Cell Science-ben (IF 7.25) jelent meg a „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.” címmel. Ez a munka jelentette a kiinduló pontját a pályázati témának, azonban a mutáns izolálását és jellemzésének jelentős részét még külföldi tanulmányutam alatt végeztem.

A kutatási téma jelentős eredményeinek közzélése még folyamatban van. Jelenleg két kéziratunk van közel „beküldési” állapotban. Az egyikben a TPR alegységekkel kapcsolatos eredményeinket írtuk le. A másikban az Apc11/lmg jellemzését, és az Apc11/lmg – Apc2/mr interakciót ismertettük. A későbbiekben közölni szeretnénk az Apc10, Apc1/shtd és az Apc4 alegységek funkcionális analízisével kapcsolatos eredményeinket is. A publikációk elfogadásáról tájékoztatni fogom az OTKA Irodát.

A fentiek miatt kérem, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést szükség esetén az OTKA Bizottság módosítsa a megjelent közlemények figyelembevételével.

Összefoglalás és legfontosabb eredmények

Az eukarióta sejtciklus szabályozásában alapvető szerepet játszó APC komplex genetikai és molekuláris biológiai analizisét végeztük el elsőként egy soksejtű eukarióta modell organizmusban.

Azonosítottuk a *Drosophila* APC komplexet alkotó tíz alegységet kódoló géneket. Ezek közül, P transzpozibilis elemre épülő technikákkal, nyolc gén mutáns alléljait és/vagy transzgenikus RNS interferencia vonalait sikerült előállítani és jellemezni.

Egy kivételével valamennyi alegység funkciója nélkülözhetetlennek bizonyult az állatok egyedfejlődése szempontjából, és kiesésük jellegzetes mitotikus fenotípusok kialakulását eredményezte. Az egyes mutánsok esetében egymáshoz hasonló, de jelentősen eltérő fenotípus-jegyeket is kimutattunk. Ezekből arra következtettünk, hogy a különböző alegységeknek eltérő szerepe van a komplex funkciójának kialakításában.

Genetikai és fizikai interakciókat is kimutattunk az egyes alegységek között, amelyek jó egyezést mutatnak azokkal a fiziko-kémiai adatokkal, amelyeket mások az APC komplex szerkezetének vizsgálata során időközben meghatároztak.

Genetikai interakciós kísérletekben kimutattuk, hogy a két protein modifikációs rendszer, az ubiquitinálás és a sumoilálás funkcionálisan összefügg egymással.

Kimutattuk, hogy a csak soksejtű eukariótákban található APC7 alegység egy hét TPR motívumot hordozó fehérje, amelynek funkciója, egyedülként, nem eszenciális a teljes komplex funkciója szempontjából.

Kidolgoztunk egy kísérleti rendszert a proteindegradáció *in vivo* és *in vitro* követésére.

Hivatkozások

1. Nasmyth K., (1999) Separating sister chromatids. *Trends Biochem Sci.* 1999 (3): 98-104.
2. Townsley F.M. and Ruderman J.V., (1998). Proteolytic ratchets that control progression through mitosis. *Trends in Cell Biology* 8: 238-244.
3. Peters J.M. (1998). SCF and APC: The Yin and Yang of cell cycle-regulated proteolysis. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 759-768.
4. Peters J-M., (1999) Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Experimental Cell Research* 248: 339-349
5. Lamb J.R., Tugendreich S. and Hieter P., (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends in Biochemical Sciences* 20: 257-259.
6. Lamb J.R., Michaud W.A., Sikorski R.S. and Hieter P., (1994) Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO Journal* 13: 4321-4328.
7. Das A.K., Cohen P.W. and Barford D., (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: Implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO Journal* 17: 1192-1199.

8. Rong Y.S. and K.G. Golic, (2000) Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* 288: 2013-2018.
9. Lee YS, Carthew RW. (2003) Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods*, 30(4):322-9.
10. Deak P., M.M. Omar, R.D.C. Saunders, M. Pal, O. Komonyi, J. Szidonya, P. Maroy, Y. Zhang, M. Ashburner, P. Benos, C. Savakis, I. Siden-Kiamos, C. Louis, V.N. Bolshakov, F.C. Kafatos, E. Madueno, J. Modolell and D.M. Glover, (1997) 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* 147: 1697-1722.
11. Deák P., M Donaldson and D. M. Glover, (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* encoding a regulatory sub-unit of PP2A. *Journal of Cell Science*, 116: 4147-4158.
12. Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10.
13. Altschul, S.F. (1993) A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances. *Journal of Molecular Evolution* 36: 290-300.
14. Bentley A.M., Williams B.C., Goldberg M.L. and A. J. Andres. (2001) Mutations in *ida* cause aneuploidy and defects in late cell cycle events. 42nd Annual *Drosophila* Research Conference, abstract: 145A.
15. Taylor and Shirras, (1997) The lemming gene of *Drosophila*. *Abstr. Gen. Soc./BSDDB*, 1997: 70.
16. Chien, C.T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991) The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 9578-9582.
17. Passmore LA, Booth CR, Venien-Bryan C, Ludtke SJ, Fioretto C, Johnson LN, Chiu W, Barford D. (2005) Structural analysis of the anaphase-promoting complex reveals multiple active sites and insights into polyubiquitylation. *Molecular Cell*, 20(6):855-66.
18. Gieffers C, Dube P, Harris JR, Stark H, Peters JM. (2001) Three-dimensional structure of the anaphase-promoting complex. *Molecular Cell*, 7(4):907-13.
19. Vodermaier HC, Gieffers C, Maurer-Stroh S, Eisenhaber F, Peters JM. (2003) TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Current Biology* 2003, 13(17):1459-68.

Szeged, 2006. február 27.

Dr. Deák Péter
Témavezető
MTA SZBK Biokémiai Intézet