



UNIVERSITA' DI PISA
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea Specialistica in Scienze e Tecnologie Biomolecolari
Anno accademico 2007/2008

Tesi di Laurea Specialistica

Purificazione e caratterizzazione enzimatica dell'Anaphase Promoting Complex, un regolatore essenziale del ciclo cellulare

Candidato:

Claudia Guida

Relatori:

Prof.ssa Marcella Camici

Dott. Andrea Musacchio

“Il meglio che possiamo augurarci è di scoprire dietro il muro che abbiamo abbattuto altre muraglie più lontane di cui ignoriamo la consistenza e che richiederanno alla nostra intelligenza d’inventare nuovi congegni che dobbiamo costruire dal nulla.”

Magritte 1927

Indice

1 Introduzione	3
1.1 Ciclo cellulare, cicline e chinasi ciclina-dipendenti	3
1.2 La mitosi	5
1.3 <i>Checkpoints</i>	7
1.3.1 Lo <i>spindle assembly checkpoint</i>	7
1.4 Ubiquitinazione	9
1.5 L'Anaphase Promoting Complex	10
1.5.1 Composizione del complesso	10
1.5.2 Regolazione	12
1.5.3 APC/C e ciclo cellulare	12
1.5.4 Regolazione di APC ^{Cdc20} dallo <i>spindle assembly checkpoint</i>	14
1.6 Spegnimento del checkpoint	15
2 Materiali e metodi	19
2.1 Espressione e purificazione di proteine	19
2.1.1 Clonaggi	19
2.1.2 Espressione e purificazione di His-tag proteins	19
2.1.3 Espressione e purificazione di GST-proteins	20
2.1.4 Quantificazione proteica	20
2.2 Colture cellulari ed estratti proteici	21
2.3 Immunoprecipitazione dell'Anaphase Promoting Complex	21
2.4 Saggio di ubiquitinazione	21
2.5 <i>In vitro</i> transcription/translation	22
2.6 Anti APC7 e test funzionali	22
2.6.1 Overespressione di APC7 in cellule HeLa	22
2.6.2 Anti-APC7 in WB, IP ed IF	22
Anticorpi	24
3 Risultati e discussione	25
3.1 Produzione di ciclinaB1 e Ubch10, rispettivamente substrato ed E2 della reazione di ubiquitinazione APC-mediata	25
3.2 Immunoprecipitazione dell'Anaphase Promoting Complex, l'E3 della reazione di ubiquitinazione	29
3.3 Ricostituzione della reazione di ubiquitinazione APC-mediata <i>in vitro</i>	30
3.4 Stato di attivazione dell'APC/C e sua regolazione	35
3.5 Effetti di Cdc20 e Mad2 ^{L13Q} sull'attività ubiquitinante dell'Anaphase Promoting Complex .	39
3.6 Tentativo di eluizione dell'APC/C immunoprecipitato	44
3.7 Generazione di anticorpi anti-APC7, un'altra subunità dell'Anaphase Promoting Complex .	47
4 Conclusioni e prospettive	55
Bibliografia	57
Abbreviazioni e sigle presenti nel testo	60

1 Introduzione

1.1 Ciclo cellulare, cicline e chinasi ciclina-dipendenti

Il ciclo cellulare è una serie ordinata di eventi geneticamente controllati e interdipendenti, la cui finalità è la corretta proliferazione delle cellule eucariotiche. Si divide in quattro fasi principali, chiamate G1, S, G2, M. Durante la fase S viene replicato il DNA cromosomico, mentre durante la fase M, che comprende la mitosi e la citocinesi, avviene la vera e propria divisione cellulare. Per la maggior parte del tempo le cellule si trovano nella fase di crescita che intercorre fra due divisioni, detta interfase e che comprende quindi le fasi G1, S e G2. Le cellule di mammifero in coltura normalmente si dividono ogni 18-24 ore, anche se, negli organismi multicellulari il tempo di generazione può essere molto variabile. Infatti, a differenza delle fasi S ed M, la cui lunghezza tende ad essere simile nelle diverse cellule di mammifero, la durata della fase G1, che tipicamente è di 8-10 ore, può variare da minuti ad anni. E' proprio durante questa fase che la cellula prende la decisione di andare incontro ad un nuovo ciclo di divisione o uscire da esso, entrando in G0 e restando quiescente anche per lunghi periodi.

La progressione attraverso le varie fasi del ciclo cellulare è finemente regolata dalle chinasi ciclina-dipendenti o Cdk (*cyclin-dependent kinases*), serina/treonina chinasi la cui attività oscilla secondo un preciso ordine temporale durante gli eventi del ciclo, provocando cambiamenti nello stato di fosforilazione e quindi nello stato di attivazione, di proteine cruciali del ciclo cellulare. Le proteine Cdk che esercitano un controllo diretto nel ciclo di cellule animali, sono Cdk1 e Cdk2, che agiscono rispettivamente in fase M e in fase S, e Cdk4 e Cdk6 che sono importanti invece per entrare nel ciclo cellulare in risposta ad opportuni fattori extracellulari. La loro oscillazione, in verità, non dipende da variazioni della loro concentrazione, ma dall'associazione con specifiche proteine regolative di vario tipo, chiamate cicline. Queste, sintetizzate e degradate periodicamente, si accumulano in precise fasi del ciclo cellulare attivando così le Cdk verso specifici substrati.

In base alla loro espressione nel tempo e alla loro funzione nel ciclo cellulare, si distinguono quattro classi di cicline: cicline G1/S (ciclina E nei vertebrati), cicline S (ciclina A nei vertebrati), cicline M (ciclina B nei vertebrati), direttamente coinvolte nel controllo dei vari eventi del ciclo e le cicline G1 (ciclina D nei vertebrati) che invece regolano l'entrata in esso in risposta a fattori extracellulari.

Sebbene siano piuttosto diverse nella loro sequenza primaria, le cicline condividono una regione di circa 100 amminoacidi nota come *cyclin box*, responsabile del legame con le Cdk e quindi della loro attivazione. Non sono ancora note le basi molecolari che determinano la specificità dei complessi ciclina-Cdk per i substrati, ma è possibile che le cicline guidino l'attività catalitica delle Cdk, o legando direttamente determinati substrati, o portando le Cdk in compartimenti cellulari definiti

dove essi si accumulano. A supporto della prima ipotesi, è noto che la specificità delle cicline S dipende da una regione idrofobica (*hydrophobic patch*) sulla superficie delle cicline. Tale regione può legare una sequenza idrofobica complementare del substrato nota come *RXL motif*. L'interazione aumenta l'affinità della chinasi per il substrato (Brown N.R. et al., 1999). Questa stessa regione idrofobica interagirebbe poi anche con gli inibitori delle Cdk che impediscono il legame e la fosforilazione dei substrati in G1 o in risposta ad eventuali segnali inibitori provenienti dall'ambiente o da danni al DNA. Tuttavia alcune cicline contengono sequenze informative che le conducono, insieme alle loro Cdk, verso specifiche localizzazioni subcellulari (Miller et al., 2001) come ad esempio le cicline B nei vertebrati. Infatti il complesso ciclina B1-Cdk1 prima della mitosi è mantenuto nel citoplasma, ma in tarda profase, grazie ad una sequenza presente nella sua parte ammino-terminale, fuori dal sito di legame per la chinasi, viene rapidamente condotto nel nucleo dove fosforila le proteine della lamina nucleare, con conseguente rottura della membrana. Il complesso ciclina B2-Cdk1, invece, si associa con l'apparato del Golgi portando alla fosforilazione di quelle proteine che causano la frammentazione degli organelli durante la mitosi. Secondo un altro meccanismo ancora, la fosforilazione promossa dalla Cks1 (una piccola proteina che lega la porzione C-terminale delle Cdk lontano dal sito attivo), potrebbe aumentare l'affinità delle chinasi per il substrato, fornendo ad esse un sito di legame accessorio che riconosce proprio i residui fosforilati del substrato. In questo modo, dopo che il complesso ciclina-Cdk-Cks ha fosforilato un residuo, l'abilità della Cks di legare il fosfato aumenta l'affinità della chinasi per il substrato, facilitando così la fosforilazione di altri residui vicini; tutto ciò potrebbe essere particolarmente importante per le proteine con siti multipli di fosforilazione (Morgan D.O., 1997).

Il legame delle cicline è necessario ma non sufficiente per l'attivazione delle Cdk. Infatti, queste richiedono anche la fosforilazione di una treonina vicino al sito catalitico da parte di una seconda chinasi, la *CAK (Cdk-activating kinase)*. Come le altre chinasi, le Cdk hanno una struttura terziaria con un piccolo lobo ammino-terminale e uno più grande carbossi-terminale, tra i quali si inserisce l'ATP, ma due modificazioni peculiari rendono queste chinasi inattive in assenza delle cicline: un T-loop adiacente al sito attivo (dove T sta per treonina la cui fosforilazione potenzia l'attività catalitica) che blocca il legame col substrato (Russo A.A. et al., 1996), e catene amminoacidiche laterali disposte all'interno del sito attivo in modo tale che i fosfati dell'ATP non siano correttamente orientati per la reazione. E' proprio il legame con la ciclina che causa una riconfigurazione del sito attivo funzionale alla catalisi, provocando il cambio strutturale di due eliche altamente conservate e rendendo possibile anche la fosforilazione attivante sul residuo di treonina del T-loop da parte di una CAK. Oltre a questa fosforilazione, che non è regolata ed è sempre successiva al legame con la ciclina (il vero evento limitante la velocità nell'attivazione delle

Cdk), altre due fosforilazioni inibitorie controllano l'attività catalitica, interferendo probabilmente con l'orientamento dei fosfati. Una di esse avviene su un residuo di tirosina (Tyr15 nelle Cdk umane) e l'altra su un residuo di treonina adiacente (Thr14) entrambi localizzate all'interno del sito di legame per l'ATP. Della fosforilazione inibitoria sulla Tyr15 è responsabile l'enzima Wee1 (e nei vertebrati anche Myt1 che fosforila sia Thr14 che Tyr15), mentre la defosforilazione corrispondente, necessaria per l'attivazione del complesso ciclina-Cdk, richiede la fosfatasi Cdc25.

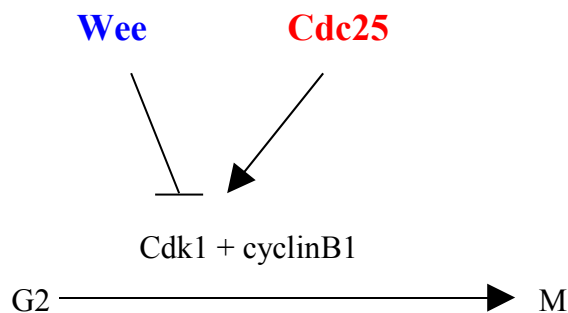


Figura 1.1 Modello di attivazione del complesso Cdk1-ciclina B1 ed entrata in mitosi

1.2 La mitosi

Cambiamenti nella fosforilazione di questi residui sono particolarmente importanti nell'attivazione dei complessi mitotici ciclina B-Cdk. Infatti, è proprio lo *switch* tra queste opposte attività enzimatiche a determinare la loro attivazione e quindi la rapida e irreversibile entrata in mitosi (Dunphy, W.G., 1994) (Figura 1.1). Come precedentemente sottolineato, infatti, l'attività delle Cdk è strutturalmente legata alla rimozione del fosfato inibitorio sulla Tyr15 che probabilmente ostacola l'ingresso dell'ATP nel sito catalitico; un ruolo chiave in questo processo potrebbe essere esercitato dal complesso ciclina A-Cdk2, attivo in G2, in grado di fosforilare e parzialmente attivare la fosfatasi Cdc25, così da rendere attivi i primi complessi ciclina B-Cdk1, che poi a loro volta, in un meccanismo a feedback positivo, attivano altre molecole di Cdc25 e contemporaneamente inibiscono Wee1. Infatti entrambi gli enzimi (Wee e Cdc25) sono regolati dai loro stessi substrati mitotici: ciclina B-Cdk1. Una volta attivata, Cdk1 è implicata nella fosforilazione delle condensine, delle laminine e delle proteine associate ai microtubuli, rispettivamente coinvolte nella condensazione dei cromosomi, nella rottura della membrana nucleare e nella formazione del fuso mitotico, eventi chiave della mitosi. L'attività delle chinasi è quindi mantenuta finché non entra in gioco un altro meccanismo regolatorio che la spegne, ossia la degradazione della ciclina B, che è determinante per l'uscita dalla mitosi. La defosforilazione dei target delle Cdks guida infatti gli

eventi finali della fase M, oltre che l'assemblaggio dei complessi prereplicativi alle origini di replicazione del DNA, che preparano la cellula per la successiva fase S.

E' possibile suddividere la mitosi in una serie di fasi che sono identificabili in base ad evidenti cambiamenti morfologici del DNA. In profase i cromosomi replicati e quindi bicromatidici, condensano. I centrosomi, duplicati in fase S, si separano e da ciascuno di essi cominciano a nucleare fasci di microtubuli che comporranno il fuso mitotico. In prometafase, invece, la membrana nucleare si rompe e i cromatidi fratelli, uniti solo a livello del centromero, cominciano ad attaccarsi ai microtubuli originati dai poli opposti della cellula. In metafase i cromosomi, avendo completato la loro congressione a livello della piastra metafasica (al centro del fuso mitotico) sono attaccati da robuste fibre di microtubuli (*K-fibers*) e "aspettano" il segnale per dividersi. Con l'anafase A, infatti, si ha la segregazione dei cromatidi fratelli che vengono spinti verso i poli opposti della cellula a cui segue, nell'anafase B, anche l'allontanamento reciproco dei centrosomi, che completa così la separazione. In telofase poi, i cromosomi decondensano e due nuove membrane nucleari avvolgono le due masse di cromatina. E' con la citocinesi, che, infine, si ha la vera e propria separazione fisica della cellula in due cellule figlie.

BOX1 | Strutture macromolecolari coinvolte nella mitosi.

Centromero: regione cromosomica caratterizzata da DNA altamente ripetuto e fortemente eterocromatica dove i cinetocori si assemblano e si attaccano ai microtubuli.

Centrosoma: struttura proteica che funge da centro organizzatore dei microtubuli (MTOC) nella maggior parte delle cellule animali. E' composto da due centrioli disposti ortogonalmente circondati da materiale pericentriolare con anelli di gamma-tubulina associati alla pericentrina.

Chinasi ciclina dipendenti: proteine chinasi la cui attività catalitica oscilla durante il ciclo cellulare in dipendenza dall'associazione con le cicline, subunità regolatorie positive del complesso.

Cinetocore: complesso proteico (60-100 proteine) localizzato al centromero dei cromosomi, a cui i microtubuli del fuso mitotico si attaccano. Si assemblano durante la mitosi e si disassemblano alla fine della mitosi.

Microtubuli: strutture citoscheletriche formate da dimeri di α -tubulina e β -tubulina, con una polarità intrinseca e un'instabilità dinamica data da continua depolimerizzazione e ripolimerizzazione.

Fuso mitotico: fascio di microtubuli che si forma all'inizio della mitosi ed è responsabile della corretta separazione dei cromatidi fratelli.

K fibers: fascio di microtubuli che lega il cinetocore di un cromatidio ad un centrosoma.

26S Proteasoma: Complesso multiproteico con attività proteasica, funzionale alla degradazione delle proteine marcate da catene di poliubiquitinate, inclusi i substrati dell'APC/C.

1.3 Checkpoints

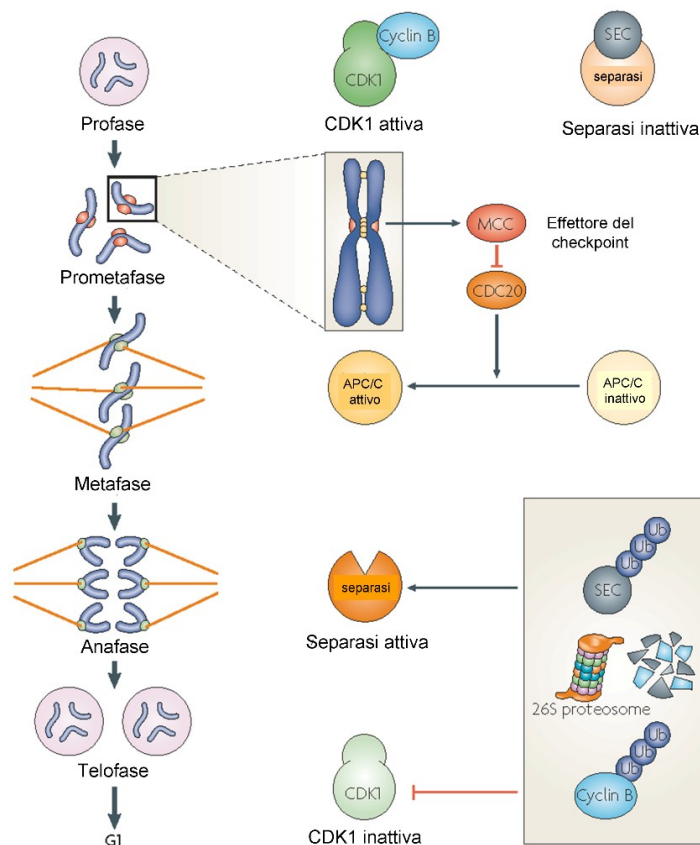
Il ciclo cellulare è un processo estremamente importante, in cui eventuali errori possono compromettere irreversibilmente la vitalità cellulare. Da qui l'esigenza di un sistema di regolazione che controlli efficacemente gli eventi del ciclo cellulare e la loro corretta progressione senza danni o alterazioni. Tre sono i maggiori punti di controllo (*checkpoints*) che rientrano in questo meccanismo: *checkpoint* di fase G1, detto anche “*restriction point*” o *Start* (in *Saccharomyces cerevisiae*) che, in tarda G1, determina l'entrata in un nuovo ciclo con il passaggio in fase S, o l'entrata in fase G0 in relazione alla disponibilità di fattori trofici e segnali proliferativi; G2/M *checkpoint* che controlla l'entrata in mitosi, bloccandola nell'eventualità che il DNA sia danneggiato o non completamente replicato; e lo *spindle assembly checkpoint* che governa la cosiddetta transizione metafase-anafase durante la mitosi. Componenti centrali di questi sistemi di controllo sono proprio le Cdk di cui viene regolato in modo irreversibile, robusto e coordinato lo stato di attivazione o inattivazione.

L'irreversibilità richiesta durante la transizione da uno stadio all'altro del ciclo è soddisfatta anche grazie alla degradazione di proteine regolatorie. L'ubiquitinazione e la conseguente proteolisi, unitamente alla fosforilazione, sono infatti i principali sistemi di controllo degli eventi mitotici, la cui ordinata progressione è garantita proprio da queste due modificazioni post-traduzionali. Se la fosforilazione è ideale per quei processi mitotici reversibili come l'assemblaggio del fuso mitotico (che richiede l'attività catalitica della Cdk1 all'inizio della mitosi, ma che deve poi essere disassemblato in tarda mitosi quando la sua attività finisce), la proteolisi è funzionale invece a quegli eventi che devono essere portati a compimento in modo irreversibile, come la separazione dei cromatidi fratelli o l'uscita dalla mitosi. Proprio il controllo e il timing di questi ultimi due eventi sono assicurati dallo *spindle assembly checkpoint*.

1.3.1 Lo *spindle assembly checkpoint*

Lo *spindle assembly checkpoint* (SAC) è un sofisticato meccanismo di controllo, conservato attraverso l'evoluzione, che agisce in prometafase e regola la transizione dalla metafase all'anafase. Esso ritarda la separazione dei cromatidi finché tutti i cromosomi sono attaccati ai microtubuli provenienti dai centrosomi situati ai poli opposti della cellula. L'attaccamento bipolare (o anfitelico) che si deve realizzare per ciascun cromatidio, il cui cinetocore deve attaccarsi ai microtubuli provenienti dal polo della cellula corrispondente, è, infatti, l'unico tipo di configurazione che garantisce poi un'uguale distribuzione del genoma tra le due cellule figlie, prevenendo così eventuali casi di aneuploidia spesso implicati nella tumorigenesi. Per impedire che

cellule con cromosomi non attaccati o impropriamente attaccati entrino in anafase, il SAC sincronizza la realizzazione di questo attaccamento bipolare con la degradazione di specifiche proteine, la ciclina B e la securina. Questi sono i principali substrati dell'*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C), un E3 ubiquitin ligase la cui attività è inibita finché il *checkpoint* non è soddisfatto. Quando ciò avviene la ciclina B viene ubiquitinata e marcata per la degradazione dal proteasoma 26S, provocando, di conseguenza, la riduzione dell'attività chinasi di Cdk1 e quindi l'uscita dalla mitosi. La securina, invece, è un inibitore della separasi, la proteasi che si attiva dopo la sua degradazione e che taglia la subunità Scc1 del complesso di coesine che tiene uniti i cromatidi fratelli a livello del centromero, causandone così la separazione. Lo *spindle assembly checkpoint*, stabilizzando la ciclina B e la securina, mantiene perciò lo stato mitotico e assicura che la coesione tra i cromatidi fratelli non venga persa prima del corretto attaccamento di tutti i cinetocori al fuso mitotico. (Varetti e Musacchio, 2008) (Figura 1.3)



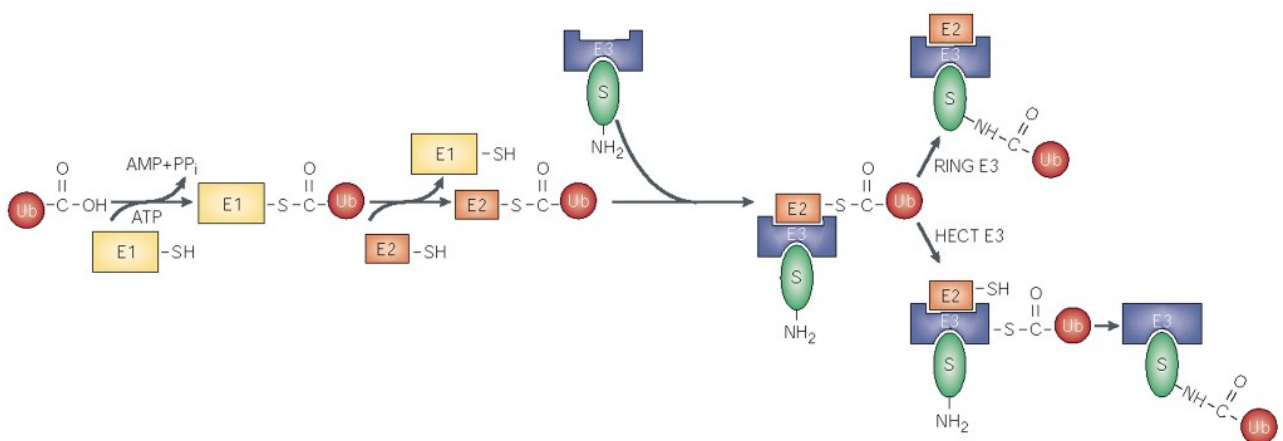
Musacchio & Salmon, 2007 *Nature review in Molecular Cell Biology*

Figura 1.3 Lo spindle assembly checkpoint

1.4 Ubiquitinazione

L'ubiquitinazione, ossia l'attaccamento di copie multiple di ubiquitina ad un residuo di lisina, marca le proteine per il riconoscimento e la degradazione da parte di un grande complesso di proteasi chiamato proteasoma, ed è un processo che si compone di tre passaggi (Figura 1.4). Innanzitutto si ha l'attivazione dell'ubiquitina da parte dell'*ubiquitin activating enzyme* (E1) che forma un legame tioestere tra il carbossiterminale dell'ubiquitina e il sulfidrilico di una cisteina nel suo sito attivo in una reazione ATP-dipendente. Segue poi il trasferimento dell'ubiquitina attivata su uno dei diversi *ubiquitin conjugating enzymes* (chiamati UBC o E2) mediante la formazione di un altro legame tioestere. Infine, l'E3 ubiquitin-ligase attacca l'ubiquitina sull'ε-amminogruppo di una lisina della proteina target. La ligasi può catalizzare il trasferimento di diverse molecole di ubiquitina o su Lys diverse del substrato, che vengono così monoubiquitinate, o su uno stesso residuo su cui forma catene di poliubiquitina (il proteasoma riconosce catene di almeno 4 ubiquitine).

Le E3 *ubiquitin ligases* si classificano in due gruppi che contengono domini proteici molto conservati. Le HECT (*E6-AP carboxy terminus*) *E3 ligases*, che formano un legame tioestere intermedio con l'ubiquitina, e le *RING-FINGER E3 ligases* che invece, essendo in grado di legare sia l'E2 che il substrato, catalizzano il trasferimento diretto dell'ubiquitina dall'uno all'altro.



Weissman, 2001 *Nature review in Molecular Cell Biology*

Figura 1.4 Pathway di ubiquitinazione

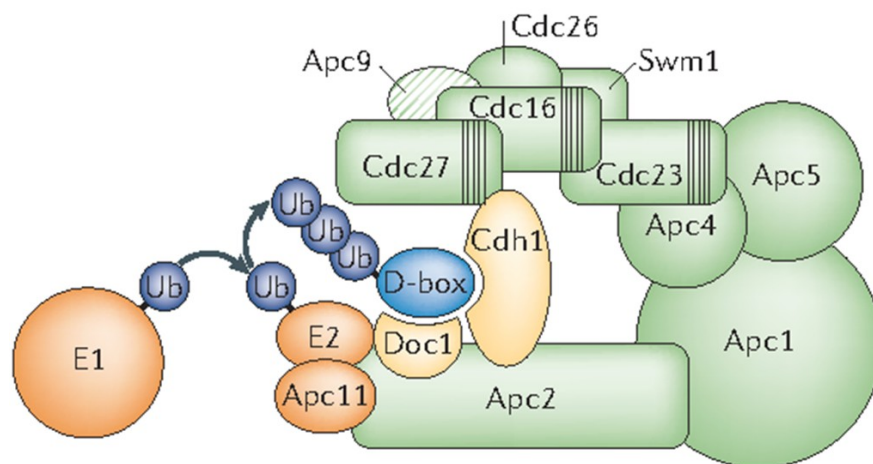
1.5 L'Anaphase Promoting Complex

1.5.1 Composizione del complesso

L'APC/C appartiene alle RING-E3 ligasi ed è un complesso di 1.5 MDa. L'APC/C umano è costituito da almeno 12 subunità. Le dimensioni di questo complesso multiproteico riflettono la sua complessità funzionale e la sua regolazione (Tabella 1.5). Secondo una visione emergente, si possono distinguere, comunque, alcuni subcomplessi: un complesso strutturale (APC1, APC4, APC5), un braccio catalitico (APC2, APC11, APC10 o Doc1) e un braccio con sequenze tatratriopeptidiche ripetute (Cdc23, Cdc16, Cdc27, Cdc26, Swm1) che mediano l'interazione proteina-proteina e il legame con gli attivatori (in particolare Cdc27 o APC3 sembra coinvolto in questo processo). A quest'ultimo subcomplesso appartiene anche APC7, l'unica subunità dell'APC/C dei vertebrati, non conservata in lievito. Il core catalitico dell'APC risiede nel dimero APC2-APC11 (Figura 1.5). Il primo, infatti, contiene un cullin domain in grado di legare il RING-finger domain dell'APC11 che, a sua volta, lega l'E2 e ha l'attività di ubiquitina ligasi. Le due subunità, in vitro, sono sufficienti a mediare l'ubiquitinazione anche se con minor processività e specificità dell'intero complesso (Tang et al., 2001). L'APC/C è in grado di riconoscere i vari substrati anche attraverso APC10 (o Doc1), una subunità del complesso che contribuisce al riconoscimento della *destruction box* (specifiche sequenze dei substrati note come D-box), aumentando l'affinità dell'APC/C per essi e la cui funzione sembra essere necessaria per un'efficiente proteolisi *in vivo* (Carroll et al., 2005, Passmore L. A. et al., 2003). Il processo di riconoscimento e legame del substrato richiede però anche i due coattivatori dell'enzima Cdc20 e Cdh1, che si associano all'APC/C in determinate fasi del ciclo cellulare e che reclutano i substrati mediante interazione diretta con specifici e conservati motivi proteici presenti in essi (vedi paragrafo successivo). Nel modello tridimensionale l'APC/C dei vertebrati è composto da due larghi domini, noti come "platform" e "arc lamp" molto flessibili l'uno rispetto all'altro e un cambio conformazionale nelle loro relative posizioni potrebbe essere determinato proprio dal legame con l'attivatore, come è stato evidenziato in seguito all'associazione di Cdh1 (Dube et al., 2005)

Tabella 1.5 Composizione dell'APC/C e suoi coattivatori.

<i>Vertebrati</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Budding yeast</i>	<i>Motivi strutturali</i>	<i>Funzioni</i>
Subunità				
APC1/TSG24	Shattered	Apc1	RPN1 e RPN2	-
APC2	Morula	Apc2	Cullin	Legame a APC11 e a DOC1
CDC27/APC3	Makos	Cdc27	TPR	Legame a CDH1
APC4	-	Apc4	Ripetizioni WD40	-
APC5	Ida	Apc5	TPR	-
CDC16/APC6	-	Cdc16	TPR	-
APC7	-	-	TPR	-
CDC23/APC8	-	Cdc23	TPR	-
DOC1/APC10	-	Doc1/Apc10	Dominio Doc	Riconoscimento del substrato, processività
APC11	Lemming	Apc11	RING-H2 finger	Reclutamento dell'E2, attività E3
CDC26	-	Cdc26	-	-
SWM1/APC13	-	Swm1/Apc13	-	-
-	-	Apc9	-	-
-	-	Mnd2	-	Inibizione Amal
Coattivatori				
CDC20/p55 ^{CDC}	Fizzy	Cdc20	C-box,ripetizioni WD40 e IR-tail	Riconoscimento del substrato
CDH1 A-D	Fizzy-related	Cdh1/Hct1	C-box,ripetizioni WD40 e IR-tail	Riconoscimento del substrato
-	Rap	-	C-box,ripetizioni WD40 e IR-tail	Riconoscimento del substrato
-	-	Amal	C-box,ripetizioni WD40 e IR-tail	Riconoscimento del substrato
-	Cortex	-	C-box,ripetizioni WD40 e IR-tail	Riconoscimento del substrato



Peters, 2006 *Nature review in Molecular Cell Biology*

Figura 1.5 Modello di ubiquitinazione APC-mediata

1.5.2. Regolazione

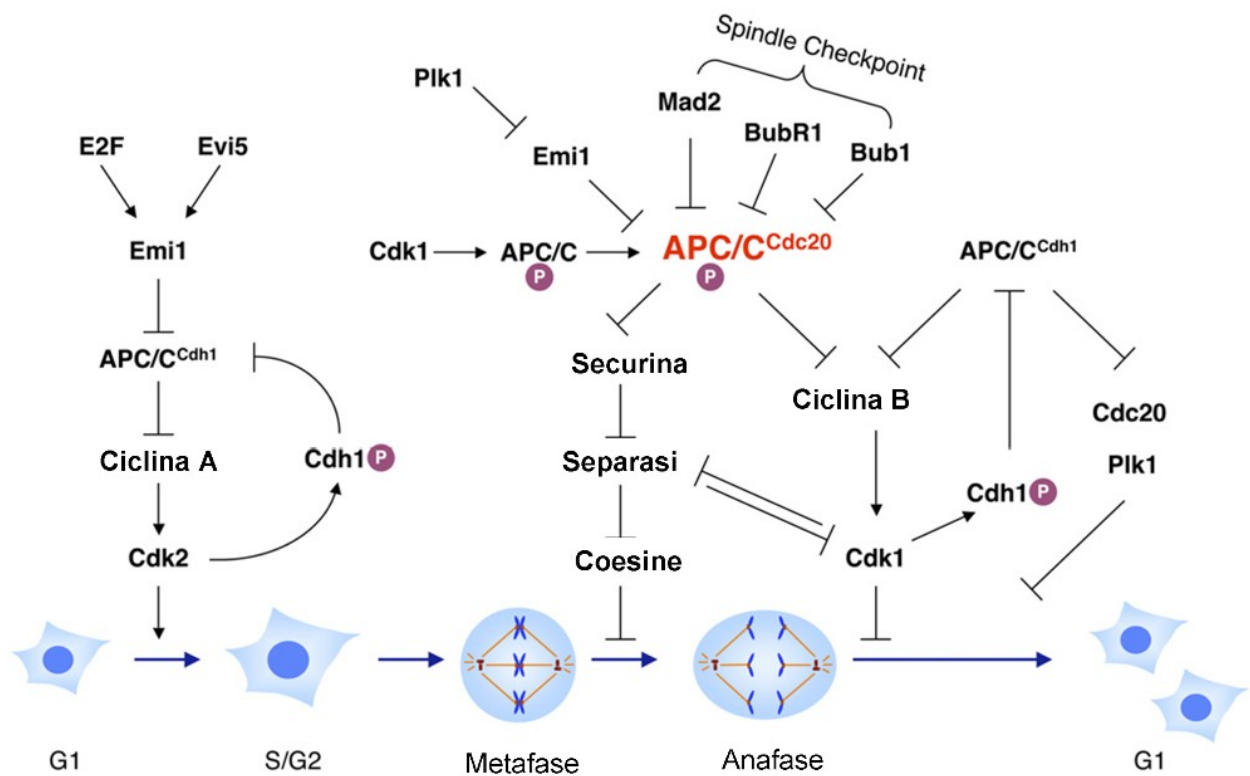
L'attività dell'APC/C è strettamente dipendente dagli attivatori Cdc20 e Cdh1, che sono conservati in tutti gli eucarioti e si associano al complesso in maniera ciclo cellulare-dipendente. Cdc20, infatti, è responsabile dell'attività dell'APC/C nella mitosi regolando il passaggio critico tra la metafase e l'anaphase (*metafase to anaphase transition*). Cdh1, invece mantiene l'attività dell'APC/C in tarda mitosi e in G1, in cui deve essere continuata la distruzione delle cicline S ed M fino al ciclo successivo. Entrambi sono caratterizzati dalla presenza di caratteristiche sequenze al loro interno: una C-box nella regione N-terminale (*consensus* DRF/YIPXR) e un motivo IR al C-terminale che mediano il legame con l'APC/C e ripetuti WD40 *domains* (sequenze di 40 amminoacidi con un triptofano e un aspartato in posizioni conservate) che invece interagiscono con le D-box (Kraft C. et al., 2005) o KEN box (Pfleger et al., 2000). La Destruction box (D box) ha una sequenza *consensus* minima RXXL che fu inizialmente scoperta nella porzione N-terminale delle cicline mitotiche e che è principalmente riconosciuta da APC/C^{Cdc20}, mentre la KEN-box, di solito con un *consensus* KENXXXE/D/N, è presente nello stesso Cdc20 ed è preferenzialmente, ma non esclusivamente riconosciuta da APC/C^{Cdh1}. E' da precisare, tuttavia, che il riconoscimento dei substrati, dipende, probabilmente, anche da altri motivi di degradazione e, come già detto sopra, coinvolge anche subunità dell'APC/C come APC10.

Cdc20 e Cdh1 legano sequenzialmente l'APC/C e conferiscono al complesso diversa specificità per i substrati. Il legame di Cdc20 all'APC/C richiede però la fosforilazione di alcune subunità del complesso da parte di chinasi mitotiche come Cdk1 e Plk1 (Fang et al., 1998, Kraft et al., 2003), mentre la fosforilazione di Cdh1, anch'essa Cdk-dipendente, previene il suo legame all'APC/C in G2 e durante la prima parte della mitosi (Zachariae et al., 1998). Così Cdc20 attiva l'APC/C in mitosi quando l'attività di Cdk1 è alta, mentre Cdh1 si associa all'APC/C in telofase e G1 quando questa si abbassa (in seguito alla degradazione della ciclina B) e alcune fosfatasi, come Cdc14 in lievito, rimuovono i fosfati da Cdh1.

1.5.3 APC/C e ciclo cellulare

Da un punto di vista regolatorio, durante il passaggio G1/S, il fattore di trascrizione E2F attiva la trascrizione di Emi1, un ulteriore regolatore dell'APC/C. Esso lega e inibisce Cdc20 e Cdh1 bloccando la loro interazione col substrato e mantiene inibito l'APC/C fino all'inizio della prometafase (Reimann et al., 2001). La conseguente stabilizzazione della ciclina A, porta quindi all'attivazione di Cdk2 che promuove l'entrata in fase S e contribuisce a fosforilare e inibire APC/C^{Cdh1}. All'inizio della mitosi Emi1 viene fosforilato da Polo-like kinase 1 (Plk1) e degradato

dall'altra ubiquitina ligasi del ciclo cellulare, SCF. Inoltre, il complesso ciclina B-Cdk1, che si è attivato, unitamente ad altre chinasi, fosforila l'APC/C e ne promuove il legame a Cdc20. Tuttavia, solo la soddisfazione del *checkpoint* e il conseguente disassemblaggio del complesso inibitorio del *Mitotic Checkpoint Complex* (MCC, vedi prossimo paragrafo) permette l'attivazione dell'APC/C^{Cdc20} e l'ubiquitinazione degradativa della securina e della ciclina B, con conseguente separazione dei cromatidi e riduzione dell'attività di Cdk1 (che tra l'altro, media anche la fosforilazione inibitoria sulla separasi, esercitando un controllo ridondante su di essa, oltre quello della securina). La defosforilazione di Cdh1, provoca in seguito l'attivazione di APC/C^{Cdh1} che in tarda anafase media la degradazione di vari substrati tra cui, lo stesso Cdc20. Infatti mentre in G1 APC/C^{Cdh1} resta attivo, APC/C^{Cdc20} viene inattivato dalla defosforilazione del *core* dell'enzima e dalla degradazione di Cdc20. (Figura 1.5.3)



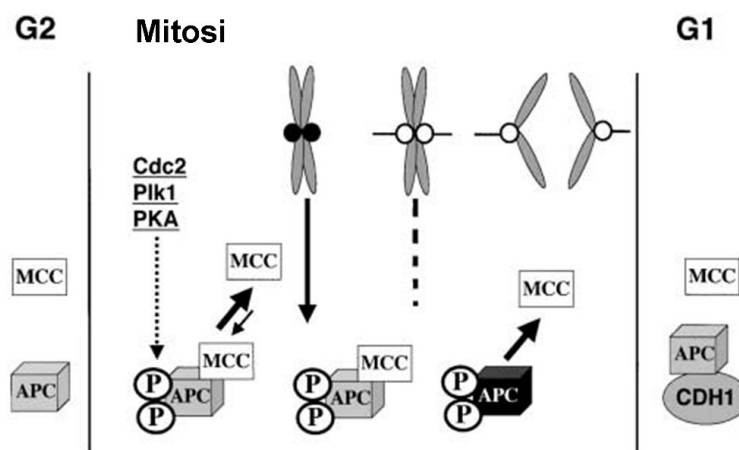
Yu, 2007 *Nature review in Molecular Cell Biology*

Figura 1.5.3 Funzione e regolazione dell'APC/C durante il ciclo cellulare

1.5.4 Regolazione di APC/C^{Cdc20} dallo *spindle assembly checkpoint*

Dato il ruolo fondamentale dell'APC/C^{Cdc20} nel determinare la segregazione cromosomica e il passaggio irreversibile in anafase, non sorprende che esso sia il target di regolazione chiave del SAC.

Studi genetici hanno identificato nei geni *MAD* (*mitotic arrest deficient*), Mad1, Mad2 e Mad3 (BubR1 nell'uomo) e nei geni *BUB* (*budding uninhibited by benzimidazole*) Bub1 e Bub3, e nella chinasi Mps1, i componenti chiave del SAC. Analisi biochimiche, poi hanno evidenziato come queste proteine siano implicate nell'inibizione dell'APC/C^{Cdc20} quando il *checkpoint* è attivato. Nello specifico, Mad2 e BubR1 sono in grado di legare e inibire Cdc20 *in vitro* (Fang et al., 1998, Tang et al., 2001) e possono creare un complesso con Bub3 e Cdc20, noto come MCC (Mitotic Checkpoint Complex) che è in grado di inibire efficacemente l'APC/C e probabilmente è il reale effettore del SAC (Sudakin et al., 2001) (Figura 1.5.4).

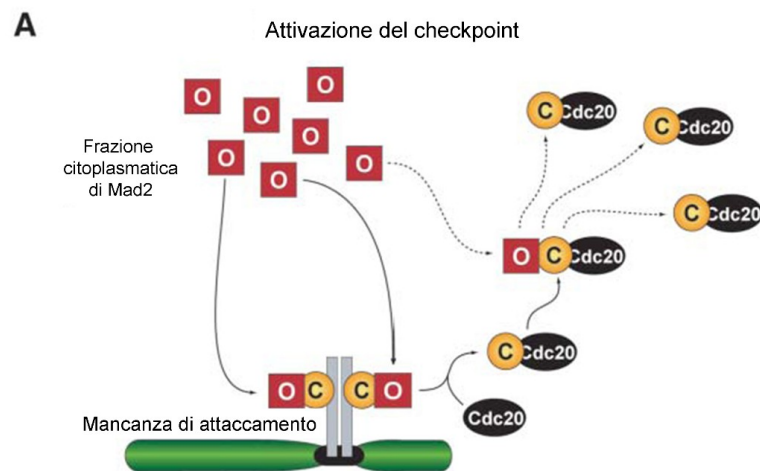


Sudakin et al., 2001 *Journal Cell Biology*

Figura 1.5.4 Modello di regolazione del Mitotic Checkpoint Complex.

Come il *Mitotic Checkpoint Complex* si formi ed eserciti l'inibizione sull'APC/C non è completamente chiaro, ma tutto ciò sembra favorito dall'aumento della concentrazione locale delle proteine del *checkpoint* ai cinetocori non attaccati, da cambiamenti conformazionali di Mad2 e da modificazioni post-traduzionali che facilitano il legame con Cdc20. In quest'ottica si pone il "*Mad2 template model*" (Figura 1.5.4.1), secondo cui Mad2 esiste in due diverse conformazioni, open-

Mad2 (O-Mad2), prevalentemente citosolico, e closed-Mad2 (C-Mad2), che è il conformero legato a Mad1 o a Cdc20. Mad1 è una proteina che resta stabilmente legata ai cinetocori non attaccati e C-Mad2, ad esso legata, è in grado di dimerizzare con una molecola di O-Mad2 favorendone il cambio conformazionale necessario per legare efficacemente Cdc20 nel citosol. Mad1 e Cdc20 hanno infatti lo stesso sito di binding per Mad2, cosicchè il complesso Mad2/Cdc20 nel citosol può svolgere la stessa azione di Mad1/Mad2 al cinetocore, cioè C-Mad2 può dimerizzare con un'altra molecola di O-Mad2 e favorire il legame ad un'altra Cdc20 e così via (De Antoni et al., 2005). Ne risulta così, un sistema di amplificazione del segnale, che potrebbe spiegare anche come un singolo cinetocore non attaccato sia sufficiente a sostenere l'attivazione del *checkpoint*. Tra le modificazioni che favoriscono l'assemblaggio del MCC, rientrano inoltre anche le fosforilazioni catalizzate da Bub1, MAPK e Cdk1 su Cdc20 e che facilitano il suo legame a Mad2.



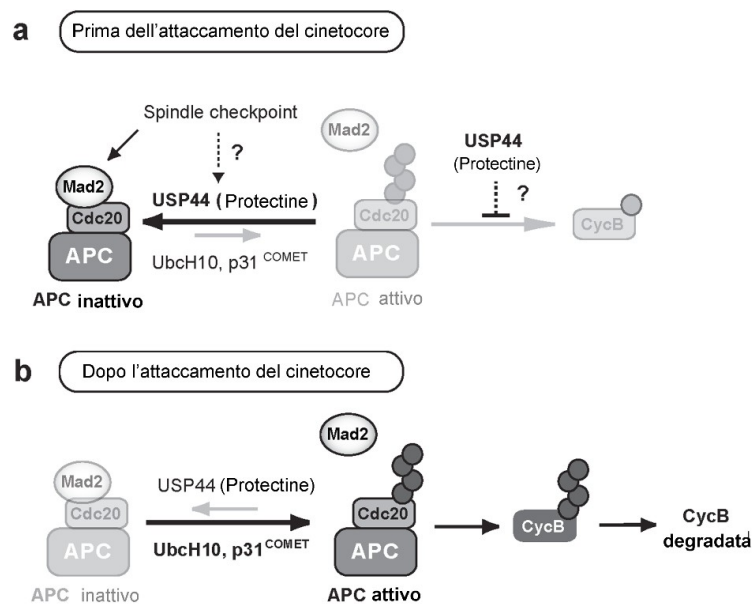
De Antoni et al., 2005 *Current Biology*

Figura 1.5.4.1 The Mad2 template model

1.6 Spegnimento del checkpoint

Sebbene non sia ancora chiaro come precisamente si realizzi lo spegnimento del SAC dopo l'attaccamento biorientato dei microtubuli ai cromosomi, diversi meccanismi sembrano essere implicati. Tra questi ci sono l'allontanamento delle proteine del *checkpoint* dal cinetocore in seguito all'attaccamento, un processo che sfrutta la motilità della dineina lungo i microtubuli e l'attivazione di p31 che compete per il legame a C-Mad2, prevenendo la dimerizzazione di C-Mad2 e O-Mad2 e l'amplificazione del segnale. A questi si aggiunge il disassemblaggio del MCC necessario per rimuovere l'inibizione sull'APC/C, il cui meccanismo non è però ancora chiaro. Particolarmente

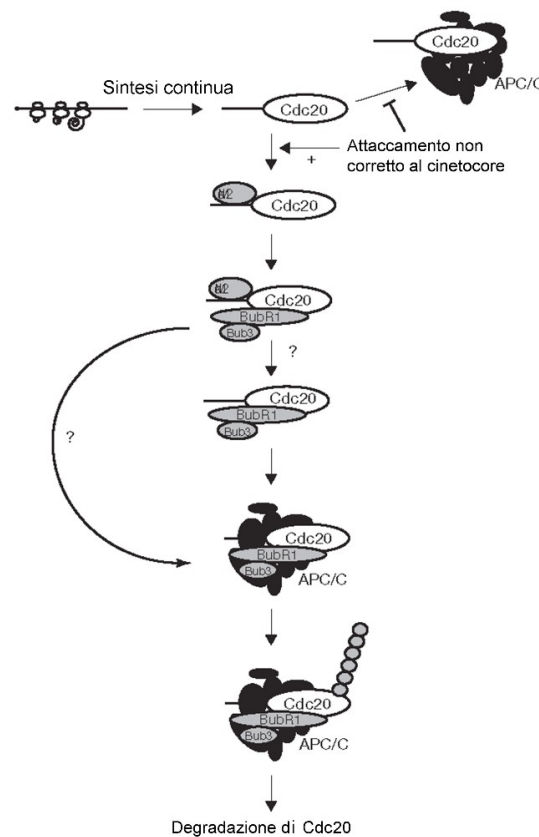
dibattuto, a riguardo, è il ruolo dell'autoubiquitinazione di Cdc20 all'interno del MCC e la sua funzione nel mantenimento del SAC. Due sono i recenti modelli che si contrappongono in questa valutazione. Secondo Kirschner e colleghi la funzione dell'ubiquitinazione di Cdc20 è di permettere la dissociazione da Mad2 e quindi inattivare il *checkpoint*. A supporto di questa ipotesi, l'overespressione di Ubch10, l'E2 implicata nella reazione di ubiquitinazione, impedisce l'arresto mitotico *in vivo*, mentre la sua aggiunta ad estratti mitotici, aumenta l'ubiquitinazione di Cdc20, distrugge l'interazione Mad2-Cdc20 e attiva l'APC/C *in vitro*, tutti effetti, questi, potenziati inoltre dall'aggiunta di p31 (Reddy et al., 2007). In linea con questi risultati, Stegmeier e colleghi hanno individuato una *Ubiquitin Specific Peptidase*, USP44 (detta anche protectina) responsabile della deubiquitinazione di Cdc20 e del mantenimento del legame Mad2-Cdc20 quando il *checkpoint* è attivo (Stegmeier et al., 2007). In questa visione, quando i cinetocori sono attaccati dai microtubuli e sono sotto tensione, le concentrazioni delle proteine del *checkpoint* e le loro attività decrescono, p31 lega Mad2 così da ridurre la velocità di formazione di Mad2/Cdc20 e contemporaneamente, con Ubch10, stimola l'autoubiquitinazione di Cdc20 e quindi il suo disassemblaggio da Mad2, con conseguente inattivazione del *checkpoint* (Figura 1.6.1).



Stegmeier et al., 2007 *Nature*

Figura 1.6.1 Modello di regolazione dinamica dell'APC/C^{Cdc20} data dallo switch di deubiquitinazione-ubiquitinazione.

Nella visione contrastante, propugnata dai gruppi di Pines e Pagano, invece, Cdc20 sarebbe continuamente sintetizzato e degradato in mitosi e proprio la sua degradazione rappresenterebbe il meccanismo di controllo che assicura l'inattivazione di APC/C in risposta al SAC (Ge et al., 2009). Il modello proposto da Pines e colleghi, infatti, suggerisce che Cdc20 non entri in complesso stabile con Mad2, ma che quest'ultimo sia invece richiesto solo per permettere il legame di Cdc20 a BubR1. Una volta ottenuto ciò, Mad2 non è più necessario per sostenere il legame e lascia il complesso prima o dopo che esso sia presentato all'APC/C, il quale promuove quindi l'ubiquitinazione e la degradazione di Cdc20 per sostenere il SAC (Nilsson et al., 2008) (Figura 1.6.2)



Acquaviva et al., 2004 *Nature Cell Biology*

Figura 1.6.2 Modello di regolazione del MCC in cui Cdc20 è continuamente sintetizzato e degradato in mitosi

Obiettivo di questo lavoro è stato ricostituire *in vitro* l'ubiquitinazione mediata dall'APC/C, utilizzando la ciclina B1 come substrato, al fine di poterla usare come strumento utile per approfondire la regolazione e la modulazione dell'APC/C. In generale, avere a disposizione il

saggio di ubiquitinazione *in vitro* ha permesso di testare gli effetti di proteine del *checkpoint*, quali Cdc20 e Mad2 per poter poi, in una più ampia prospettiva, continuare ad indagare il ruolo di queste e di altre proteine, coinvolte nel SAC.

2 Materiali e metodi

2.1 Espressione e purificazione di proteine

2.1.1 Clonaggi

Il frammento di ciclina B1¹⁻⁸⁷ è stato clonato nel vettore di espressione batterica pETDuet (Novagen) usando i siti di clonaggio BamHI e EcoRI.

Il frammento di ciclina B1 a cui sono state aggiunte due Tyr o una Tyr e una Gly al C-terminale, contenente quindi i residui amminoacidici 1-89, è stato clonato nel vettore pGEX-6P-2rbs usando i siti di clonaggio BamHI e SallI. Lo stesso procedimento è stato utilizzato per il clonaggio del frammento di Cdc27¹⁴⁵⁻³⁴³.

La sequenza codificante APC7 *full length* è stata clonata in un vettore di espressione per cellule di mammifero, pcDNA 3.1-FLAG (Invitrogen) usando i siti di clonaggio EcoRI e XhoI.

2.1.2 Espressione e purificazione di His-tag proteins

Ciclina B1¹⁻⁸⁷ è stata espressa con un tag di sei istidine al N-terminale a 18°C per 16 ore in un ceppo di *E.Coli* BL21 dopo induzione con 0.5 mM di IPTG. Le cellule sono state lisate mediante sonicazione in lysis buffer (50 mM TrisHCl pH 8, 300 mM NaCl, 5% glicerolo, 5 mM imidazolo, EDTA free protease inhibitor cocktail e 2 mM β-mercaptoetanolo). Il lisato è stato quindi ultracentrifugato a 140.000xg per 45' e la porzione solubile (supernatante) è stata caricata su un Hitrap metal chelating column (GE Healthcare) precaricata con NiCl₂ e la proteina è stata eluita mediante un gradiente crescente di imidazolo (5 mM - 0,2 M). Le frazioni contenenti la ciclinaB1¹⁻⁸⁷ sono state raccolte, dializzate contro 1000 volumi di dialysis buffer (50 mM TrisHCl pH 6.8, 1 mM EDTA, 5% glicerolo e 1 mM DTT) e sottoposte a cromatografia a scambio cationico (Resource-S column) (GE Healthcare) da cui la proteina è stata eluita con un gradiente di NaCl.

His-Ubch10 è stata espressa a 37°C per 3 ore in *E.Coli* BL21 dopo induzione con 0.5 mM di IPTG. La lisi è stata effettuata secondo lo stesso procedimento della ciclinaB1¹⁻⁸⁷. La proteina è stata purificata mediante incubazione di 2 ore con la resina Ni-NTA agarose (Quiagen) ed è stata eluita con un gradiente di imidazolo (50 - 200 mM) in 50 mM TrisHCl pH 8, 300 mM NaCl, 5% Glicerolo. Le frazioni raccolte sono state dializzate contro 1000 volumi di DPBS (140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Entrambe le purificazioni sono state condotte a 4°C.

2.1.3 Espressione e purificazione di GST-proteins

Ubch10 è stata espressa con una GST tag all'N-terminale a 37°C per 3 ore in *E.Coli* BL21 dopo induzione con 0.5 mM di IPTG. Le cellule sono state lisate mediante sonicazione in lysis buffer (TBS 2x (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl), 5% glicerolo, EDTA free protease inhibitor cocktail, 1mM DTT, 0.5 mM EDTA). Il lisato ultracentrifugato a 140.000xg per 45' è stato incubato con Glutathion sepharose beads (GE Healthcare) per 2 ore a 4°C. Metà del campione proteico è stato sottoposto al taglio del tag con la proteasi Prescission (GE Healthcare) (il cui sito di taglio è compreso tra la GST e la proteina) e filtrato su colonna (Quiagen) in grado di trattenere solo le GST-beads. L'altra metà è stata eluita dalle Glutathion beads con 10 mM di GSH.

GST-ciclina B1¹⁻⁸⁹, sia con YY che con YG al C-terminale, è stata espressa a 18°C per 16 ore in *E.coli* BL21 dopo induzione con 0.5 mM IPTG ed è stata purificata ancora mediante il legame a Glutathion sepharose beads e taglio successivo con la Prescission. La proteina è stata in seguito separata mediante size exclusion chromatography Superdex-75 10/300 (GE Healthcare) in buffer composto da 20 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5% glicerolo, 1mM EDTA e 1 mM DTT.

GST-Cdc27¹⁴⁵⁻³⁴³ è stata espressa a 18°C per 16 ore in *E.Coli* BL21 dopo induzione con 0.5 mM di IPTG e purificata mediante Glutathion sepharose beads. La proteina sottoposta al taglio della GST con la proteasi Prescission, è stata purificata mediante una cromatografia a scambio anionico (Resource-Q column) (GE Healthcare) ed eluita con gradiente di NaCl. Le frazioni contenenti il frammento di Cdc27 sono state raccolte e caricate su una size exclusion chromatography Superdex-200 10/300 (GE Healthcare). La proteina è stata eluita in buffer composto da 20 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5% glicerolo, 1mM EDTA e 1 mM DTT.

GST-APC⁷³³⁶⁻⁵⁶⁵ è stata espressa a 18°C per 16 ore in *E.Coli* BL21 dopo induzione con 0.1 mM di IPTG e purificata con Glutathion sepharose beads. La proteina con la GST tag è stata eluita con 20 mM di GSH (in buffer di 50 mM TrisHCl pH 8, 150 mM NaCl e 0.5 mM EDTA ed è stata poi separata mediante size exclusion chromatography Superdex-75 16/600 (GE Healthcare). L'eluizione è stata effettuata in DPBS buffer (140 mM NaCl, 2.5 Mm KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Tutte le purificazioni sono state effettuate a 4°C.

2.1.4 Quantificazione proteica

Le proteine purificate sono state quantificate mediante lettura di assorbanza a 280 nm (spettrofotometro Beckman Coulter DU 730) oppure mediante scala comparativa di albumina di siero bovino (BSA) sottoposta ad SDS-PAGE e colorazione con Comassie Blue Brilliant.

2.2 Colture cellulari ed estratti proteici

Cellule HeLa sono state cresciute a 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Euroclone) contenente 10% di siero (Hyclone), 2 mM di L-glutamina, 10000 U/ml di penicillina e streptomina e raccolte, previa tripsinizzazione, mediante centrifugazione a 500xg 5' a 4°C.

Cellule mitotiche sono state ottenute con l'aggiunta di 330 nM di Nocodazolo (Sigma Aldrich) per 12 ore e sono state raccolte mediante shake-off. In alcuni casi, HeLa mitotiche sono state raccolte, lavate in DPBS e rilasciate per 2 ore in DMEM contenente 10 µM di MG132 (Calbiochem).

In tutti i casi, le cellule sono state lisate in ghiaccio in lysis buffer JS (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% glicerolo, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2mM Na₃VO₄, 2mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇ ed EDTA free protease inhibitor cocktail), sonicate e centrifugate a 16060xg 30' a 4°C. Il contenuto proteico del supernatante è stato poi quantificato tramite il metodo Bradford (reagente Bio-Rad Laboratories), misurando l'assorbanza a 595 nm e interpolando il valore registrato su una retta di taratura costruita con BSA.

2.3 Immunoprecipitazione dell'Anaphase Promoting Complex

1 mg di lisato proteico da cellule HeLa è stato incubato con 1.5 µg di mouse anti-Cdc27 (BD Biosciences) e tenuto in agitazione 2 ore a 4°C .30 µl di slurry protein G agarose beads (GE Healthcare) sono state poi aggiunte per altre 2 ore a 4°C. Le beads contenenti l'immunoprecipito sono state lavate tre volte con buffer A (50 mM TrisHCl pH 7.4, 10% glicerolo, 1 mM DTT e 1 ug/µl BSA) e il contenuto proteico è stato analizzato mediante SDS-PAGE e *Western blotting* anti-Cdc27 0.5 ug/ml.

2.4 Saggio di ubiquitinazione

20 µl di anti-Cdc27 beads (provenienti dall'immunoprecipitazione) sono stati aggiunti a 30-45 µl di miscela di reazione di ubiquitinazione contenente :100 nM E1 (Boston Biochemistry), 500 nM Ubch10 purificata, 250 µM ubiquitina (Sigma Aldrich), 1 µM ubiquitina aldeide (Sigma Aldrich), 40 mM TrisHCl pH 7.4, 10% glicerolo, 1 ug/µl BSA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP e 1 µM [¹²⁵I]- Ciclina B1¹⁻⁸⁹ o 1 µM CiclinaB1¹⁻⁸⁷. La reazione è stata condotta in agitazione continua a 1100rpm a 25°C è stata arrestata con l'aggiunta di Laemmli buffer (80 mM TrisHCl pH 6.8, 4% SDS, 25% glicerolo, blu di bromofenolo e 0.5 M di β-mercaptoetanol) ai tempi indicati.

In alcuni casi alla miscela di reazione è stato aggiunto il sistema di rigenerazione dell'ATP composto da 15 mM di creatina fosfato (Sigma Aldrich) e da 2 U di creatina fosfochinasi (Sigma Aldrich) diluita in UBAB buffer (25 mM TrisHCl pH 7.4, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂).

Ogni reazione è stata risolta mediante SDS-PAGE. La rilevazione delle forme di ciclinaB1 ubiquitinate è stata effettuata mediante *Western blotting* anti-ciclinaB1 (BD Biosciences) (per i saggi condotti usando CiclinaB1¹⁻⁸⁷) oppure mediante autoradiografia (con [¹²⁵I]- Ciclina B1¹⁻⁸⁹).

2.5 *In vitro* transcription/translation

Cdc20 *full length* è stata prodotta mediante il sistema di trascrizione e traduzione in vitro (TnT Quick Coupled Trascrizione Traduzione System, Promega) in lisati di reticolocita di coniglio a partire dal costrutto pcDNA-FLAG-Cdc20. La reazione è stata assemblata, secondo il protocollo del kit, in volume totale di 100 µl contenente 50 µl di lisato di reticolocita, 4 µl di buffer di reazione, 2 µl di RNA polimerasi, 2 µl di mix di amminoacidi, 2 µl di inibitori di Rnasi, 2 µg di pcDNA-flag-Cdc20 e acqua nuclease-free. La reazione è stata condotta a 30°C per 90'. La proteina è stata isolata, poi, mediante incubazione di 3 ore a 4°C con 40 µl di anti-FLAG agarose beads (Sigma Aldrich) ed è stata eluita con circa 150 µg di FLAG peptide (Sigma Aldrich) diluito in DPBS ed incubato con le beads per 16 ore. La produzione e la purificazione di Cdc20 sono state verificate mediante *Western blotting* con rabbit anti-Cdc20 (Santa Cruz Biotechnology).

2.6 Anti-APC7 e test funzionali

2.6.1 Overespressione di APC7 in cellule HeLa

Il costrutto pcDNA-FLAG-APC7 è stato trasfettato in cellule HeLa usando FuGENE Transfection Reagent (Roche). Per circa 5 milioni di cellule, 18 µl di FuGENE reagent sono stati incubati con OPTIMEM medium (serum-free modified Eagle's Minimum Essential Medium) (Invitrogen) per 5' a temperatura ambiente a cui sono stati aggiunti poi 6 µg di pcDNA-FLAG-APC7 incubati per altri 15' a temperatura ambiente. Il volume totale di 600 µl è stato quindi aggiunto goccia a goccia alle cellule in piastra per circa 24-48 ore.

2.6.2 Anti-APC7 in WB, IP ed IF

1 mg e 3 mg di GST-APC7³³⁶⁻⁵⁶⁵ sono stati rispettivamente utilizzati per generare due anticorpi policlonali in conigli e due anticorpi monoclonali murini. I processi di generazione e produzione sono stati seguiti dalle Polyclonal e Monoclonal facilities gestite dal consorzio Congentech

(Consortium for Genomic Technologies) dell'IFOM-IEO campus. La capacità dell'anticorpo di riconoscere l'immunogeno è stata valutata nelle diverse fasi del processo per *Western blotting* (WB), immunoprecipitazione (IP) e, nelle fasi finali, immunofluorescenza (IF).

La generazione di anticorpi policlonali è stata effettuata con più cicli di immunizzazione su due conigli. Per ognuno di essi sono stati testati lo *small*, il *large* e il *final bleeding* utilizzati in diverse e crescenti diluizioni in *Western blotting* ed immunoprecipitazione. Gli anticorpi purificati nella fase finale (si0645 ed si0651 rispettivamente 336 ug/μl e 360 ug/ul), sono stati testati in *Western blotting* in concentrazioni crescenti da 0.1 ug/μl a 0.7 ug/μl su 30 μg di lisato proteico di cellule HeLa che esprimevano l'APC7 a livello endogeno ed overespresso. Ciascuna coppia di lisati proteici è stata separata in SDS-PAGE, trasferita su membrana di nitrocellulosa (GE Healthcare) incubata con blocking solution (5% latte in TBST 0.05%) ed ibridata poi con ciascun anticorpo policlonale in una determinata concentrazione. La membrana è stata lavata 3 volte con TBST 0.5% per 10' ed è stata incubata con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi. Dopo altri 3 lavaggi, il riconoscimento dell'immunogeno è stato rilevato mediante Enhanced ChemiLuminescence (ECL) (GE Healthcare).

La capacità di immunoprecipitare l'APC/C è stata invece testata incubando per 2 ore rispettivamente 1 ug, 2 μg e 3 μg di ciascun anticorpo con 1 mg di lisato proteico di cellule HeLa, a cui sono stati aggiunti poi 30 μl di slurry protein G agarose beads (GE Healthcare) incubati per altre 2 ore a 4°C. Le beads contenenti l'immunoprecipitato sono state lavate 3 volte con buffer A ed il contenuto proteico è stato analizzato in SDS-PAGE e *Western blotting* con lo stesso anticorpo anti-APC7 (si0645) purificato e precedentemente testato in questa tecnica, utilizzato in concentrazione 0.2 ug/ul.

La generazione di anticorpi monoclonali è stata realizzata in quattro fasi principali: immunizzazione di 8 topi (5 cicli ad intervalli di due settimane), fusione di cellule spleniche da un topo selezionato con una linea cellulare di mieloma per creare ibridomi, subclonaggio della linea cellulare capace di produrre anticorpi selezionata dagli ibridomi e purificazione finale dell'anticorpo. La capacità degli anticorpi di riconoscere e purificare l'immunogeno è stata valutata nelle diverse fasi del processo in *Western blotting* ed immunoprecipitazione. Negli step finali, dai due ibridomi selezionati (BR21 e BZ79) sono stati ottenuti quattro subcloni, i cui supernatanti, contenenti gli anticorpi secreti, sono stati testati in WB, IP ed IF. Ciascun supernatante è stato diluito 2, 5 e 10 volte ed utilizzato, in ciascuna diluizione, per l'immunoblotting su 30 μg di lisato proteico di cellule HeLa che esprimevano l'APC7 a livello endogeno ed overespresso. L'immunoprecipitazione dell' APC/C è stata invece valutata incubando 500 μl di ogni supernatante con 30 μl di slurry protein G agarose

beads per 2 ore a 4°. Le beads, precipitate mediante centrifugazione di 3' a 400xg, sono state incubate poi con 1 mg di lisato proteico da cellule HeLa per altre 2 ore a 4°C. La verifica è stata effettuata ancora mediante *Western blotting* sia con 0.2 ug/μl dell'anticorpo anti-APC7 policlonale rabbit (si0645) che con 0.5 ug/μl dell'anti-Cdc27 monoclonale mouse (BD Biosciences).

Tutti gli anticorpi, nelle fasi finali della loro produzione, sono stati testati anche in immunofluorescenza su cellule HeLa sincronizzate con un doppio blocco in timidina (2 mM) (Sigma Aldrich) per 15 ore, rilasciate per 7.5 ore in terreno fresco e trattate poi con 10 μM di MG132 per 90'. Le cellule cresciute su vetrini pretrattati con D-polyilisina, sono state fissate in formaldeide (1% in DPBS) per 10', permeabilizzate con TritonX100 (0.1% in DPBS) per 10', incubate con *blocking solution* (3% BSA in DPBS) per un'ora ed incubate, poi, con gli anticorpi primari (i supernatanti dei subcloni diluiti 2 volte e l'anticorpo anti-centromero diluito 50 volte) per 90'. Dopo 3 lavaggi da 10' in DPBS, i vetrini sono stati quindi incubati con gli anticorpi secondari legati ai fluorofori. I vetrini, lavati di nuovo in DPBS sono stati poi incubati per 3' con DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole). L'IF è stata condotta a temperatura ambiente e le immagini sono state acquisite con microscopio confocale (Leica TCS SP2 confocal microscope) ad ingrandimento 63x.

Anticorpi

Anticorpi usati in *Western blotting*:

Mouse anti-Cdc27 (BD Biosciences WB1:500), mouse anti-cyclinB1 (BD Biosciences WB 1:1500), mouse anti-Bub3 (BD Biosciences WB 1:1000), mouse anti-BubR1 (BD Biosciences WB 1.1000), rabbit anti-Cdc20 (Santa Cruz Biotechnology WB 1:500), rabbit anti-Mad2 (Bethyl Laboratories WB 1:2000), anti-mouse e anti-rabbit IgG usati come anticorpi secondari. (Bio-Rad WB 1:10000)

Anticorpi usati in immunofluorescenza:

Rabbit anti-gamma tubulina (Sigma Aldrich IF 1:1000), human Anti-Centromeric Antibody (Antibodies Incorporated IF 1:50), anti-mouse e anti-rabbit IgG usati come anticorpi secondari coniugati a FITC o Cy5 o Cy3. (Jackson Laboratories, Inc. IF 1:150)

3 Risultati e discussione

3.1 Produzione di ciclinaB1 e Ubch10, rispettivamente substrato ed E2 della reazione di ubiquitinazione APC-mediata

Per ricostituire la reazione di ubiquitinazione APC-mediata *in vitro*, si è resa necessaria dapprima la produzione di alcuni reagenti fondamentali, quali il substrato della reazione, ciclina B1, e uno degli *ubiquitin activating enzymes* che *in vivo* interagiscono con l'APC/C, Ubch10.

Della ciclina B1 è stato espresso il frammento compreso tra i residui amminoacidici 1-87 (peso molecolare = 9.3 kDa), uno dei frammenti più usati in letteratura per il medesimo scopo e contenente la D-box necessaria all'ubiquitinazione e alla proteolisi. La sequenza è stata clonata in un vettore di espressione batterica pETDuet e la proteina, con un tag di sei istidine all'N –terminale è stata espressa in un ceppo di *E. Coli* BL21 a 18°C per 16 ore dopo un'induzione effettuata con 0.5 mM di IPTG. La sua purificazione è stata realizzata dapprima con un'Hi-trap chelating HP (Figura 3.1.1), cromatografia per affinità basata sull'interazione tra il Nichel e la coda di istidine (His-tag), a cui è seguita una dialisi contro 1000 volumi di *dialysis buffer* (50 mM TrisHCl pH 6.8, 1mM EDTA, 5% glicerolo e 1 mM DTT). Il successivo passaggio cromatografico è stato una cromatografia a scambio ionico (pI di ciclina B1¹⁻⁸⁷:10.75) e la cui proteina è stata eluita con 980 mM di NaCl.

La sequenza amminoacidica del frammento purificato non comprendeva né triptofani, né fenilalanine, né cisteine, amminoacidi capaci di assorbire a una lunghezza d'onda di 280 nm, perciò è stato necessario analizzare tutte le frazioni dei passaggi cromatografici, mediante SDS-PAGE e successiva colorazione con Comassie Brilliant Blue. Inoltre, per lo stesso motivo, la quantificazione della proteina purificata, è stata possibile solo mediante un confronto con una scala di quantità note di albumina di siero bovino (BSA) (Figura 3.1.2). La resa della purificazione è stata di circa 15 mg di proteina per litro di coltura batterica iniziale.

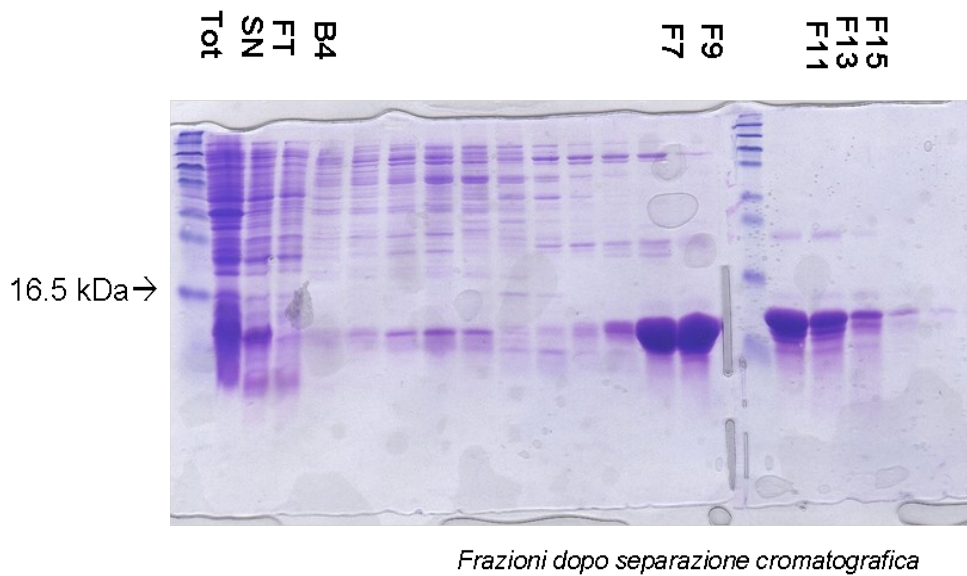


Figura 3.1.1 Passaggi di purificazioni iniziali della ciclina B1¹⁻⁸⁷

Il frammento di ciclina B1¹⁻⁸⁷ viene purificato da lisato batterico mediante sonicazione, ultracentrifugazione, e Hitrap Chelating HP. (Tot = 10 µl di lisato batterico dopo sonicazione, SN=10 µl di supernatante contenente la componente proteica separata con l' ultracentrifugazione, FT = flowthrough = 10 µl del materiale che non si è legato alla colonna cromatografica, B4...F15 = frazioni raccolte durante l'eluizione dall'Hitrap Chelating HP)

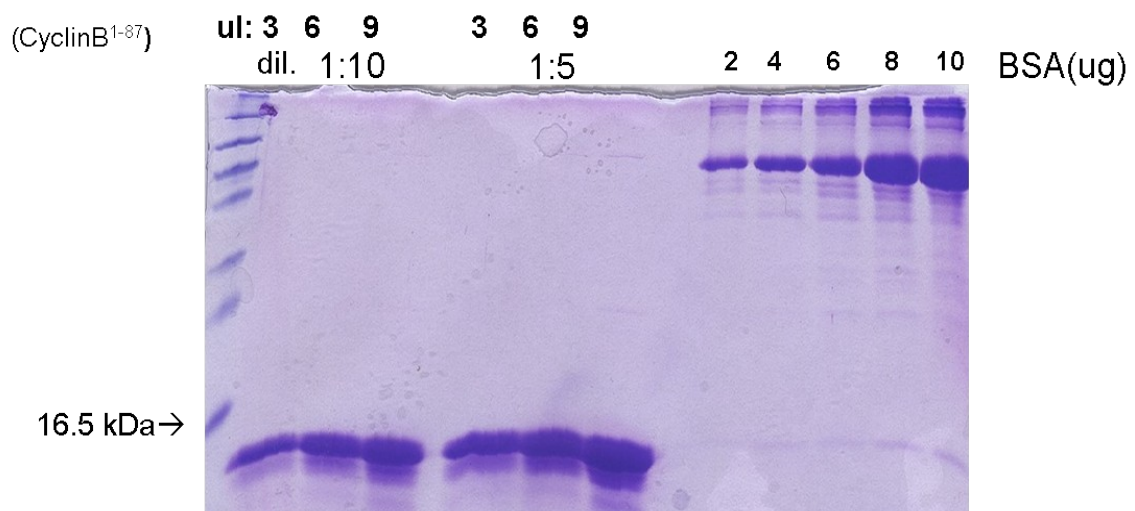


Figura 3.1.2 Quantificazione della ciclina B1¹⁻⁸⁷

3, 6, 9 µl di due diluizioni diverse della proteina purificata sono paragonati con 2, 4, 6, 8, 10 µg di BSA.

L'intera sequenza codificante per Ubch10 è stata espressa a partire da due diversi costrutti già disponibili: pGEX-6P-2rbs-Ubch10 e pETDuet-Ubch10. Entrambi sono stati espressi in *E. coli* a 37°C per 3 ore dopo l'induzione con 0.5 mM di IPTG, mentre la loro purificazione è stata differenziata in relazione ai diversi *tag* di affinità associati alla proteina. Nel primo costrutto, Ubch10 (peso molecolare = 19.6 kDa) è stata espressa con una Glutathione-S-Transferasi (peso molecolare = 25 kDa) all'N-terminale, ed è stata perciò purificata sfruttando il legame del *tag* ad una resina di glutathione-sefarosio (*glutathion sepharose beads*) (Figura 3.1.3). Metà del campione proteico è stato sottoposto a taglio proteolitico della proteasi Prescission per eliminare la GST-tag da Ubch10; quest'ultima è stata quindi eluita mediante il passaggio su una colonna in grado di trattenere solo la resina a cui è legata la GST (Figura 3.1.4). L'altra metà invece non è stata sottoposta al taglio del tag ed è stata eluita dalla resina di glutathione-sefarosio direttamente con 10 mM di glutathione ridotto (GSH). Le rese calcolate mediante misura di assorbanza a 280 nm, sono state di 13 mg/litro per Ubch10 e 6 mg/litro per GST-Ubch10.

Il secondo costrutto di Ubch10 con 6 His all'N terminale è stato purificato, invece, mediante incubazione con Ni-NTA agarose, sfruttando l'interazione tra la resina e la coda di istidine. L'eluizione successiva è stata effettuata incubando la resina con concentrazioni crescenti di imidazolo (50-200 mM) (Figura 3.1.5). La resa finale della proteina eluita è stata di 3.3 mg per litro di coltura .

Delle tre proteine prodotte e purificate -Ubch10, GST-Ubch10 e His-Ubch10- soltanto la prima è stata utilizzata come E2 nella reazione di ubiquitinazione.

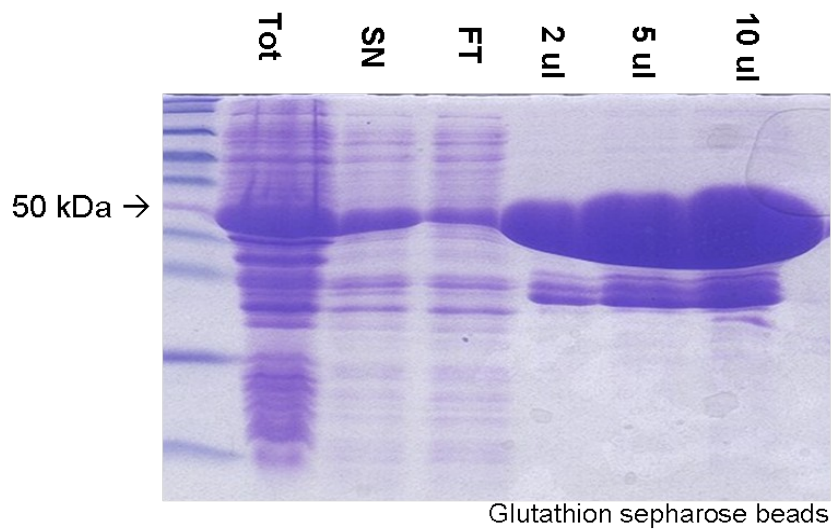


Figura 3.1.3 Passaggi di purificazione iniziali di GST-Ubch10

GST-Ubch10 (peso molecolare: 47 kDa) viene purificata da lisato batterico sottoposto a sonicazione, ultracentrifugazione ed ad incubazione con glutathion sepharose beads (Tot = 10 μ l di lisato batterico dopo sonicazione, SN = 10 μ l di supernatante contenente la componente proteica separata con l' ultracentrifugazione, FT = flowthrough = 10 μ l di quello che non si è legato alle glutathion sepharose beads, 2, 5, 10 μ l = volumi di glutathion sepharose beads dopo incubazione con GST-Ubch10).

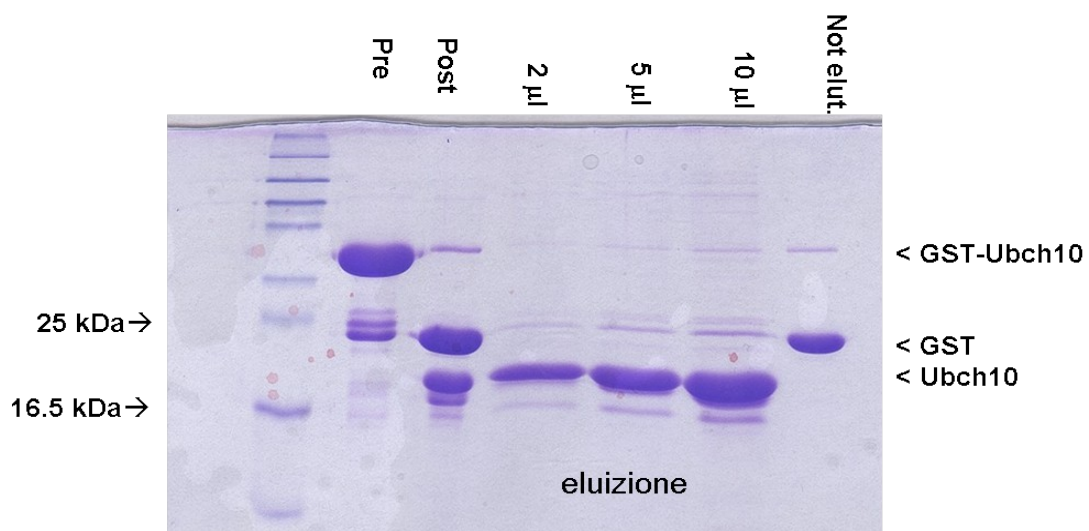


Figura 3.1.4 Eluizione di Ubch10 dopo l'eliminazione del tag.

La proteasi Precission è utilizzata per tagliare la GST tag così da permettere ad Ubch10 di essere eluita dalle GST-Glutathion sepharose beads (Pre=10 μ l di campione proteico prima dell'incubazione con la Precission, Post = 10 μ l di campione proteico dopo l'incubazione con la Precission, 2, 5, 10 μ l = volumi di Ubch10 dopo l'eluizione, Not elut.= 10 μ l del materiale che non viene eluito dalla colonna).

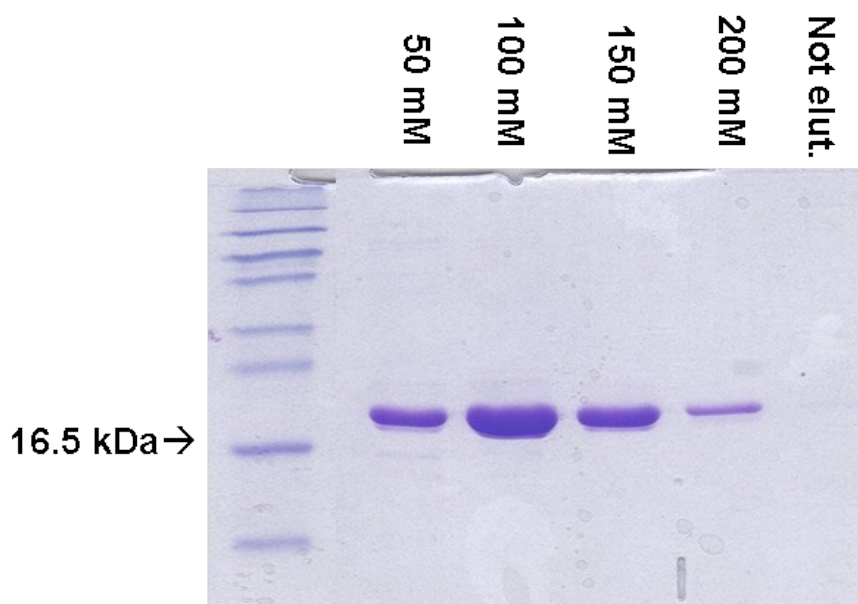


Figura 3.1.5 Eluizione di His-Ubch10 con imidazolo

His-Ubch10 è stata eluita da Ni-NTA-agarose mediante incubazione con soluzioni tampone a concentrazioni crescenti (50-200 mM) di imidazolo. 5 μ l di ogni campione proteico eluito con una data concentrazione di imidazolo sono stati caricati su gel, insieme a 5 μ l di ciò che è rimasto attaccato alla resina trattenuta in colonna (not elut).

3.2 Immunoprecipitazione dell'Anaphase Promoting Complex, l'E3 della reazione di ubiquitinazione

Al momento non è nota una procedura per l'espressione e la purificazione di una forma ricombinante dell'APC/C. Il complesso è stato quindi immunoprecipitato da cellule HeLa interfasiche o mitotiche. In quest'ultimo caso l'arresto e l'isolamento delle sole cellule in mitosi sono stati ottenuti aggiungendo alle cellule 330 nM di Nocodazolo per circa 12 ore .

Il Nocodazolo è una droga che previene la polimerizzazione dei microtubuli e conseguentemente l'attaccamento di questi ai cromosomi. Questa condizione attiva il SAC, che arresta le cellule in mitosi. L'immunoprecipitazione, sia da cellule asincrone che mitotiche, è stata realizzata incubando gli estratti proteici cellulari con un anticorpo diretto contro una subunità dell'enzima, Cdc27 (o APC3) e poi con una resina di agarosio ricoperta di proteina G (*protein G beads*). L'efficienza dell'IP è stata quindi verificata per *Western blotting*. Per ogni lisato cellulare utilizzato sono stati caricati 50 μ g di lisato proteico totale, 50 μ g di componente proteica non precipitata e 10 μ l di anti-Cdc27 beads. Come si può vedere in Figura 3.2.1, la forma di Cdc27 immunoprecipitata da cellule trattate con Nocodazolo, mostra una mobilità elettroforetica minore rispetto a quella proveniente da cellule asincrone. Questa differenza è in accordo con ciò che è noto in letteratura riguardo alla

fosforilazione a cui va incontro l'APC/C in mitosi, fosforilazione funzionale all'interazione con il suo attivatore Cdc20. In questa modificazione post-traduzionale, tra le altre, sembra coinvolta proprio la subunità Cdc27 (Kraft et al., 2003) contro la quale è diretto l'anticorpo.

L'immunoprecipitazione è stata analizzata anche mediante colorazione argentica (*silver staining*) nel tentativo di visualizzare con maggiore sensibilità le bande relative alle varie subunità del complesso e capire il grado di legame aspecifico da parte di contaminanti alla resina di anticorpo anti-Cdc27. Tuttavia, la scarsa qualità della colorazione e la mancanza di nitidezza delle bande, non hanno permesso di raggiungere tali obiettivi.

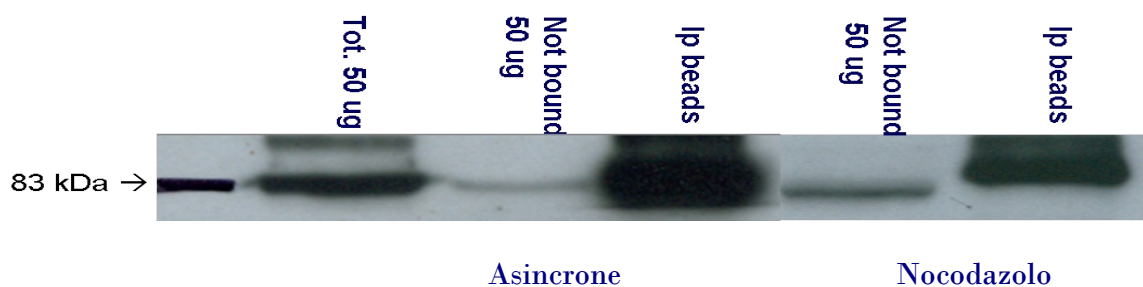


Figura 3.2.1 Immunoprecipitazione e *Western blotting* anti-Cdc27.

APC/C è immunoprecipitato da HeLa asincrone o bloccate in Nocodazolo usando anti-Cdc27 e protein G beads.

(Tot = 50 µg di lisato proteico totale, not bound= 50 µg di lisato proteico dopo incubazione con anti-Cdc27, ip beads =10 µl di anti-Cdc27 beads precipitate)

3.3 Ricostituzione della reazione di ubiquitinazione APC-mediata *in vitro*.

Dopo aver ottenuto il substrato, l'E2 e l'E3 necessari per il processo di ubiquitinazione, si è passati a definire il protocollo da seguire per assemblare la reazione. L'analisi comparativa di molti dei protocolli presenti in letteratura utilizzati per il medesimo scopo, è servita a delineare, almeno in linea generale, i rapporti tra le concentrazioni dei componenti essenziali del processo: E1, E2, ubiquitina e substrato. I primi tentativi sono stati effettuati perciò assemblando una reazione di 30/40 µl contenente 100 nM di E1, 500 nM di E2, 250 µM di ubiquitina, 1 µM di ubiquitina aldeide, 15 µM BSA, 2 mM di ATP e 1 µM di Ciclina B1¹⁻⁸⁷, e ad essa sono stati aggiunti 20 µl di resina anti-Cdc27 (ottenuti con l'immunoprecipitazione). La reazione, condotta a 25°C per circa un'ora (temperatura e tempi anch'essi avvalorati dai dati letterari), è stata arrestata dall'aggiunta di SDS presente nel buffer di caricamento ed è stata risolta per SDS-PAGE e successivo *Western blotting* anti-ciclina B1. L'anticorpo commerciale anti-ciclina B1 utilizzato, generato contro i primi

21 amminoacidi della ciclina, era in grado di riconoscere il frammento usato come substrato della reazione; tuttavia, analizzando la Figura 3.3.1, non risultano visibili nell'immunoblotting forme di ciclina poliubiquitinate ad alto peso molecolare e non si distinguono variazioni tra la reazione completa e quelle di controllo mancanti ognuna di una componente essenziale del processo. Infatti, al di là di alcune bande aspecifiche riconosciute dall'anticorpo, si distinguono soltanto una banda di alta mobilità elettroforetica, attribuibile al substrato che non ha reagito, e le due bande di circa 25 e 50 kDa, identificabili rispettivamente come le catene leggere e pesanti dell'anti-Cdc27 usato per l'immunoprecipitazione che vengono riconosciute dall'anti-ciclinaB1.

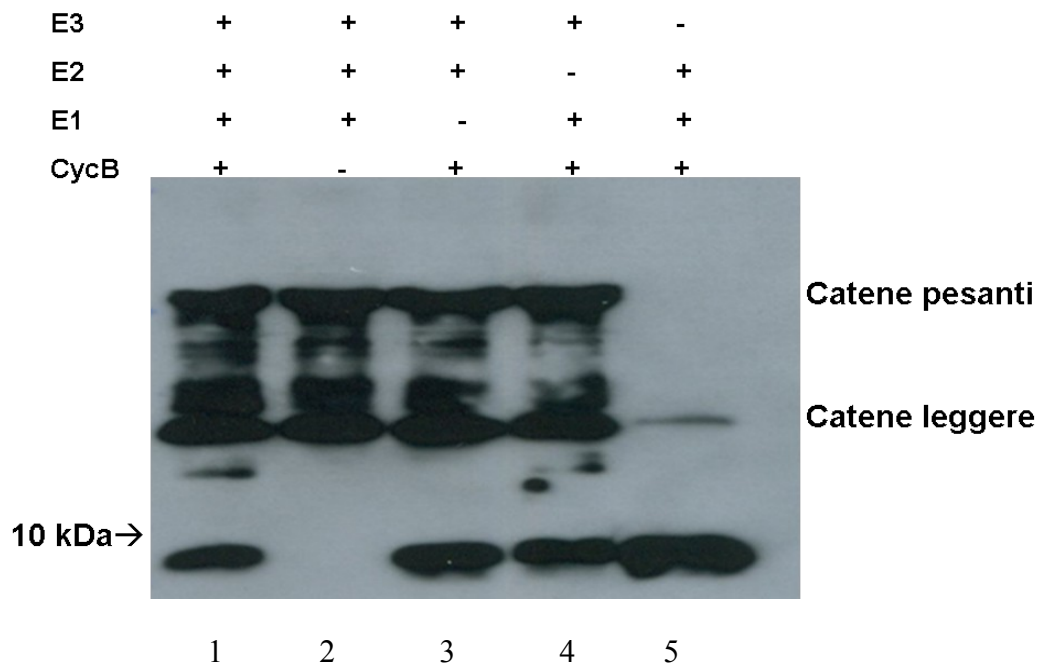


Fig 3.3.1 Saggio di ubiquitinazione e *Western blotting* anti-CiclinB1

La reazione di ubiquitinazione completa e le reazioni di controllo mancanti rispettivamente di ciclinaB1¹⁻⁸⁷, E1, E2 e E3 (lanes 2-4) sono sottoposte a SDS-PAGE e *Western blotting* anti-ciclinaB1.

Il processo è stato ripetuto più volte, ma con gli stessi risultati; ci si è chiesti perciò se il problema fosse relativo alla poca sensibilità del sistema di detezione utilizzato, considerando anche, che nella

quasi totalità dei protocolli analizzati, presenti in letteratura, il substrato utilizzato era marcato con un isotopo radioattivo e la reazione veniva evidenziata mediante autoradiografia.

Si è scelto, pertanto di adeguarsi all'uso di una ciclina B1 radioattiva, marcata con [¹²⁵I], che garantisca un sistema di rilevazione sensibile e altamente specifico. La iodinazione della ciclina B1, però, richiedeva la presenza di una tirosina o di una fenilalanina o di una cisteina all'interno della sequenza (per uno qualsiasi dei tipi di reagenti di iodinazione che si scegliesse di adoperare), amminoacidi che però non erano presenti negli 87 residui del frammento di ciclina B1 clonato ed espresso come descritto sopra. Per aggiungere quindi al C-terminale una coppia di tirosine o una tirosina e una glicina si è proceduto alla mutagenesi del frammento e al suo clonaggio nel vettore di espressione batterico pGEX-6P-2rbs. Entrambi i costrutti pGEX-6P-2rbs-ciclinaB1^{1-89YY} e pGEX-6P-2rbs-ciclinaB1^{1-89YG} sono stati espressi, come il frammento di ciclinaB1¹⁻⁸⁷, in *E. Coli* a 18°C per 16 ore e sono stati purificati sfruttando l'interazione tra la GST tag e la resina di glutatione sefarosio. Dopo il taglio del tag e l'eluizione dalla resina, le proteine sono state sottoposte a *size exclusion chromatography* e sono state quantificate mediante scala comparativa di BSA, con una resa di 1.8 mg/litro per ciclinaB1^{1-89YY} e 1.4 mg/litro per ciclinaB1^{1-89YG}. La iodinazione, è stata effettuata dalla Biotrend Chemikalien GMBK (Colonia, Germania), utilizzando 500 µg di ciclina B1¹⁻⁸⁹ con YG al C-terminale, che sono stati iodinati con Chloramin-T, purificati in HPLC.

Nei primi saggi di ubiquitinazione composti con il substrato radioattivo, l'APC/C è stato immunoprecipitato con anti-Cdc27 da cellule HeLa arrestate in Nocodazolo per 12 ore e rilasciate in mezzo fresco con 10 µM di MG132 (inibitore del proteasoma) per due ore. Il rilascio dal Nocodazolo, consente la ripresa della polimerizzazione dei microtubuli e l'attaccamento bipolare dei cromosomi con conseguente uscita dalla mitosi; l'inibizione del proteasoma, evitando la proteolisi della securina e della ciclina B1 ubiquitinate, non permette, invece, l'uscita dalla mitosi. L'APC/C immunoprecipitato da queste cellule dovrebbe essere quindi pienamente attivo.

I 20 µl di *slurry* anti-Cdc27-beads utilizzati nella reazione, erano stati precedentemente analizzati mediante *Western blotting* quantitativo comparando volumi crescenti di resina anti-Cdc27 con quantità crescenti (ng) di un'altra subunità del complesso disponibile in forma ricombinante, APC7. L'*immunoblotting* è stato quindi effettuato con un anti-APC7 policlonale generato durante il periodo di tesi (vedi paragrafo 3.7). Il confronto tra l'intensità delle bande ha permesso così di constatare che 20 µl di *slurry* beads equivalevano a circa 40 ng di APC/C.

Nella reazione di ubiquitinazione, assemblata con lo stesso mix di reagenti descritto sopra, è stato aggiunto questa volta anche il sistema di rigenerazione dell'ATP, presente in alcuni protocolli usati in letteratura (Rape et al., 2006, Jin et al., 2008) e composto da 15 mM di creatina fosfato, 20 mM

di ATP e 2 U di creatina fosfochinasi. La reazione completa e le reazioni di controllo sono state sottoposte, come prima, a separazione elettroforetica e seguente autoradiografia. Tuttavia, anche in questo caso non si evidenziavano forme di ciclina B1 ad alto peso molecolare date dalla formazione di catene di poliubiquitina. Ciò che è evidente, invece è la banda a basso peso molecolare di ciclina B1¹⁻⁸⁹ che non ha reagito (Figura 3.3.2 pannello 1)

Quando, invece, la reazione è stata ripetuta eliminando il sistema di rigenerazione dell'ATP e abbassando la concentrazione dell'ATP a 2 mM, è risultata evidente la formazione di catene di poliubiquitina ad alto peso molecolare. (Figura 3.3.2 pannello 2)

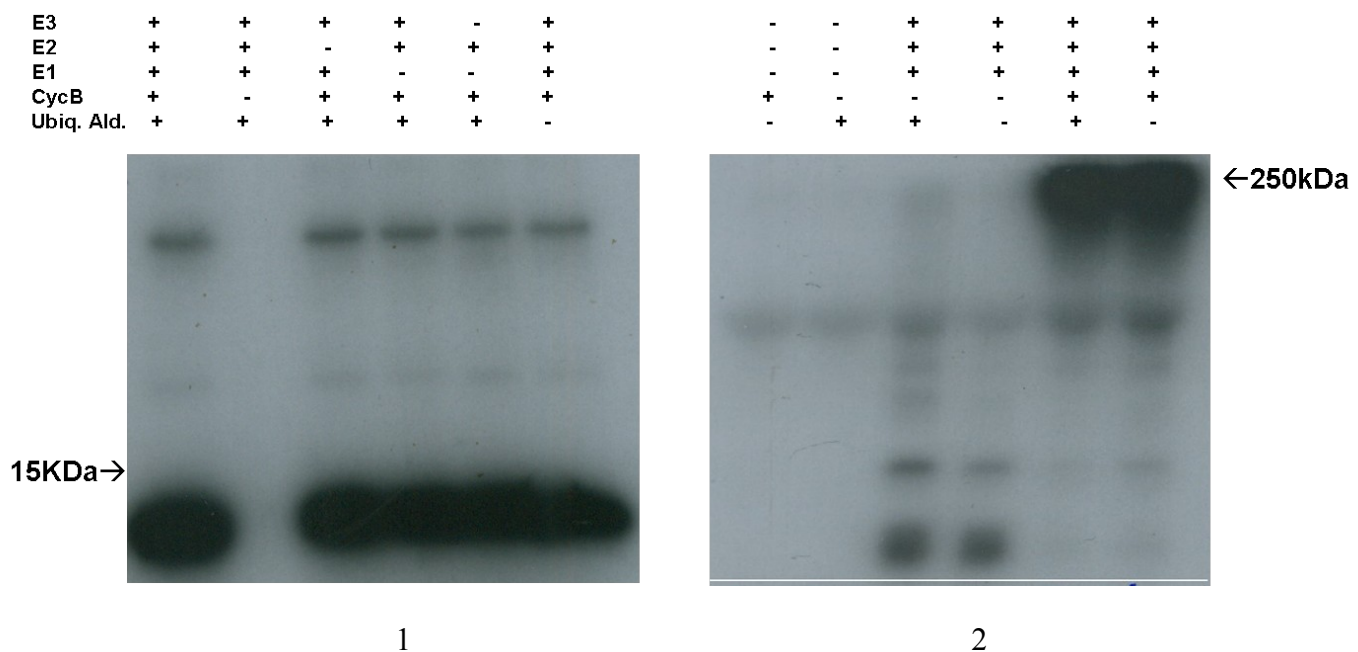


Figura 3.3.2 Saggi di ubiquitinazione ed autoradiografia.

Le reazioni complete e i relativi controlli sono sottoposti a SDS-PAGE e autoradiografia. Nel pannello 1 le reazioni sono effettuate con sistema di rigenerazione e 20 mM di ATP, nel pannello 2 le reazioni sono assemblate senza sistema di rigenerazione e con 2 mM di ATP.

Questi risultati, unitamente all'osservazione che, nelle reazioni con alte concentrazioni di ATP, l'aggiunta dell' SDS *loading buffer* provocava un cambiamento di colore (presumibilmente dovuto al viraggio del blu di bromo fenolo) hanno fatto supporre che la reazione potesse essere inibita da una variazione incontrollata del pH, dovuta alla alta concentrazione dell'ATP. Per indagare questa

possibilità ed escludere anche che l'inibizione fosse dovuta, invece, alla presenza di contaminanti nei componenti del sistema di rigenerazione, sono state assemblate reazioni di ubiquitinazione con diverse combinazioni di questi elementi e diverse concentrazioni di ATP. L'autoradiografia e lo schema delle reazioni associato (Figura 3.3.3) rivelano che ad una concentrazione di 20 mM di ATP, indipendentemente dall'aggiunta del sistema di rigenerazione, la reazione viene inibita (lanes 3, 6, 8, 9, 11). Inoltre, l'aumento di concentrazione del TrisHCl a 100 mM, non è in grado di tamponare questa inibizione (lane 3). Si può sottolineare tuttavia, che la formazione di catene di poliubiquitina, può prescindere dalla presenza di ATP, creatina fosfato e creatina fosfochinasi (lane 4) probabilmente perché il tempo di reazione (30 minuti) non è troppo lungo da richiedere un supplemento di ATP, che, si ricorda, esser necessario per l'attività dell'ubiquitin activating enzyme, E1.

ATP (mM)	2	0.5	20	-	-	20	-	20	20	-	20
Creatine phosp.(15mM)	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Creatine pKinase(2U)	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
TrisHCl pH 7.4 (40 mM)	+	+	100mM	+	+	+	+	+	+	+	+

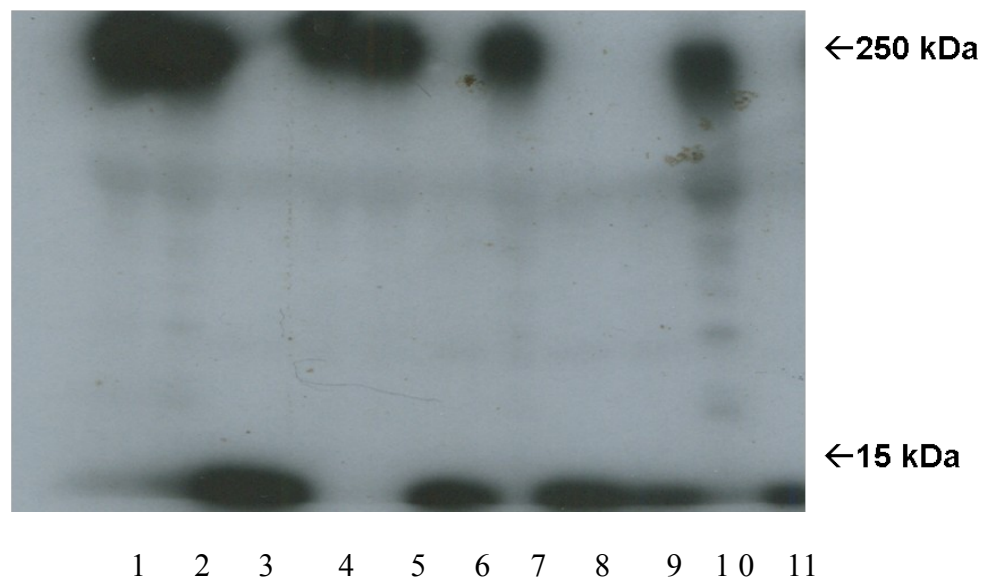


Figura 3.3.3 20 mM di ATP inibiscono la reazione di ubiquitinazione.

Le reazioni di ubiquitinazione sono assemblate con diverse combinazioni di creatina fosfato, creatina fosfochinasi e ATP. L'ATP è aggiunto in diverse concentrazioni 0.5, 2 o 20 mM. In un unico caso la concentrazione del buffer TrisHCl è di 100 mM anziché 40 mM. Le reazioni sono state analizzate per SDS-PAGE e successiva autoradiografia.

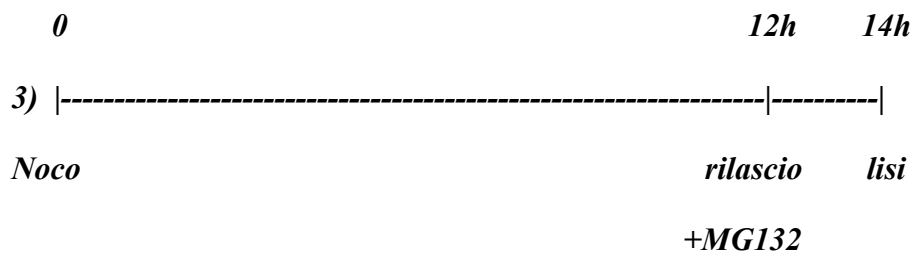
3.4 Stato di attivazione dell'APC/C e sua regolazione.

Dopo aver definito le condizioni efficaci per l'ubiquitinazione, si è passati a verificare lo stato di attivazione dell'APC/C e la sua dipendenza dal ciclo cellulare.

L'APC/C è stato immunoprecipitato, anche in questo caso, con un anticorpo anti-Cdc27 da cellule HeLa asincrone, bloccate in Nocodazolo e poi rilasciate in MG132 (schema 3.4.1). In queste tre condizioni, le cellule sono rispettivamente in interfase, in mitosi con un SAC non soddisfatto (si potrebbe dire "ON") e in mitosi ma con un SAC soddisfatto (e quindi "OFF") (vedi pagina 31). L'immunoprecipitazione e la miscela di reazione sono state realizzate secondo i protocolli già descritti ma in questo caso la reazione è stata bloccata e analizzata dopo 10, 20 e 30 minuti, considerando l'aggiunta del substrato come tempo 0. È stata analizzata cioè la tempistica di ubiquitinazione con l'APC/C immunoprecipitato da cellule in tre diverse condizioni. Le due autoradiografie presenti in Figura 3.4.2 sono relative alle stesse miscele di reazione a vari tempi, assemblate però in volumi diversi. Nel primo caso (pannello 1), per ogni condizione è stata preparata una miscela di reazione di 45 μ l (aggiunta poi ai 20 μ l di anti-Cdc27 beads immunoprecipitati dalle cellule) e a 10, 20 e 30 minuti sono stati prelevati 15 μ l da sottoporre ad SDS-PAGE.

Nel secondo caso (pannello 2) sono state assemblate, invece, per ogni condizione cellulare tre diverse miscele da 30 μ l ciascuna, che sono state poi bloccate con l'aggiunta del Laemmli buffer a distanza di 10 minuti l'una dall'altra. Sebbene l'autoradiografia del secondo pannello sia più intuitiva, entrambi i pannelli mostrano che solo nel caso in cui l'APC/C viene immunoprecipitato da cellule mitotiche rilasciate in MG132, la reazione di ubiquitinazione avviene e si completa (ultime tre *lanes*). Lo stato di attivazione o inattivazione del complesso può essere misurato sia in termini di catene di poliubiquitina formate sulla ciclina B1¹⁻⁸⁹ (freccia rossa), sia in termini di ciclina B1¹⁻⁸⁹ che non viene coinvolta nella reazione (freccia blu). Come si può notare nella Fig. 3.4.2, l'APC/C immunoprecipitato da cellule interfasiche (prime tre *lanes*) ha sempre una bassissima attività, mentre quello proveniente da cellule trattate in Nocodazolo, è debolmente attivo ma ha una capacità ubiquitinante leggermente superiore quando la reazione è condotta per 30 minuti. L'APC/C proveniente da cellule rilasciate riesce invece in 30 minuti a poli-ubiquitinare tutta la ciclina B1 presente nella miscela (confronta bande inferiori e superiori).

1) *Asincrone*



Schema 3.4.1 L'APC/C è immunoprecipitato da cellule HeLa asincrone e mitotiche trattate con Nocodazolo per 12 ore e, nell'ultimo caso, rilasciate in mezzo fresco con MG132 per 2 ore.

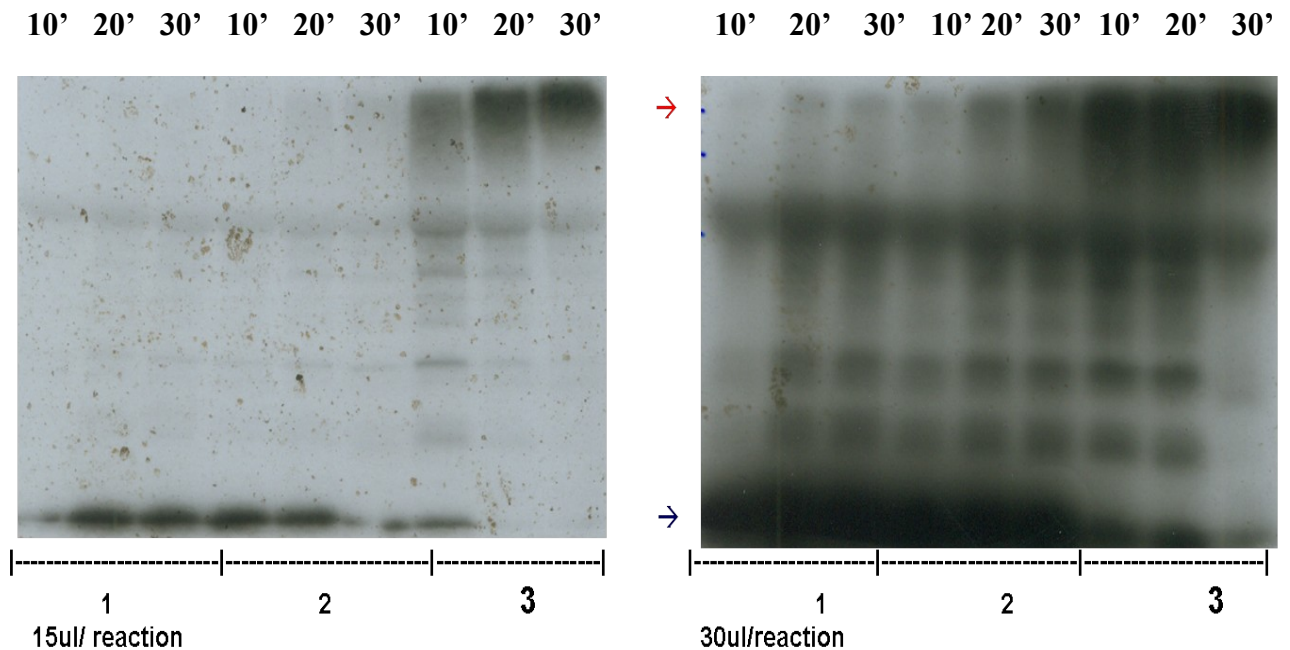


Fig 3.4.2 Stato di attivazione dell'APC/C immunoprecipitato da cellule HeLa in diverse condizioni

L'APC/C immunoprecipitato da cellule asincrone (1), cellule bloccate in Nocodazolo (2) e bloccate in Nocodazolo e poi rilasciate in MG132 (3) è utilizzato nelle reazioni di ubiquitinazione di 15 e 30 µl condotte per 10, 20 e 30 minuti.

La variazione nello stato di attivazione dell'APC/C trova la sua spiegazione più probabile nel funzionamento e nella regolazione del MCC, composto da BubR1, Bub3, Mad2 e Cdc20, identificato per la prima volta da Sudakin et al. nel 2001 come effettore del SAC nell'inibire l'APC/C (vedi introduzione). I dati preliminari su cui Sudakin e colleghi basarono la caratterizzazione del complesso inibitorio, erano il ruolo, precedentemente dimostrato, di Mad2 nell'inibire l'APC/C *in vitro* interagendo con Cdc20 (Fang et al., 1998) e l'evidenza che in cellule mitotiche l'APC/C è associato con la chinasi mitotica BubR1 (Chan et al., 1999). Il complesso composto da BubR1 (Mad3 in lievito), Bub3, Mad2 e Cdc20, già identificato in lievito (Hardwick et al., 2000), fu così purificato da HeLa mitotiche e si dimostrò 3000 volte più efficace di Mad2 ricombinante nell'inibire l'APC/C. Inoltre, secondo il modello di Sudakin e colleghi, il MCC è presente per tutto il ciclo cellulare, ma è in grado di legare e inibire solo l'APC/C mitotico, che probabilmente, in mitosi, è in una forma modificata che lo rende suscettibile all'inibizione. Infatti, l'APC/C viene attivato in mitosi da modificazioni post-traduzionali come la fosforilazione, che è necessaria per l'associazione a Cdc20 e proprio la forma enzimatica fosforilata potrebbe essere riconosciuta e legata dal MCC. Contro l'ipotesi che il MCC esista per tutto il ciclo cellulare, si staglia invece l'idea che esso si formi solo in concomitanza dell'attivazione del SAC di cui è l'effettore. In ogni caso, quando i cinetocori non sono attaccati bipolarmente ai microtubuli, il "wait anaphase signal" proveniente da essi è dato probabilmente da Mad2 o da una cascata di chinasi, aumenta o prolunga l'interazione del MCC con l'APC/C, inibendo la sua attività enzimatica fino al soddisfacimento del *checkpoint*. Quando ciò avviene e tutti i cromosomi sono attaccati bipolarmente, il segnale viene meno, il MCC si dissocia (secondo un meccanismo non ancora noto) e l'APC diventa attivo, permettendo così l'uscita dalla mitosi. Sebbene non sia chiaro il meccanismo di inibizione esercitato dal MCC, è probabile che il complesso funga da pseudo substrato e blocchi l'accesso dei reali substrati sull'APC/C, come sembra suggerire la presenza di una KEN box (sequenza di riconoscimento dei substrati) nella sequenza di BubR1, uno dei componenti del MCC.

Alla luce di quanto detto, si è cercata la correlazione tra lo stato di attivazione dell'APC/C, verificato con i saggi di ubiquitinazione in Fig. 3.4.2 e il legame del MCC ad esso. Il legame di BubR1, Bub3, Mad2 e Cdc20 all'APC è stato testato immunoprecipitando l'enzima con anti-Cdc27 da cellule HeLa trattate secondo lo schema 3.4.1 e verificando poi sulla resina anti-Cdc27 la presenza dei componenti del MCC mediante *immunoblotting* dei relativi anticorpi (Figura 3.4.3). Come atteso, nessuno dei componenti del MCC, nemmeno l'attivatore Cdc20, è legato all'APC/C proveniente da HeLa interfasiche, mentre per l'APC/C purificato dalle cellule mitotiche in due diversi stati di attivazione del *checkpoint*, si possono evidenziare differenze nelle quantità relative di BubR1, Bub3, Mad2 e Cdc20 legati. In particolare, la quantità di BubR1 e Mad2 legati all'APC/C

proveniente da HeLa mitotiche rilasciate in MG132 (*checkpoint* "OFF") è molto più ridotta di quella legata all'APC/C proveniente da HeLa mitotiche arrestate con Nocodazolo (*checkpoint* "ON"). La differenza può essere notata sia comparando tra loro l'intensità delle bande relative all'immunoprecipitato nelle due condizioni, sia comparando queste bande con quelle relative ai "not bound" corrispondenti. Per "not bound" si intende tutta la componente proteica che non è stata immunoprecipitata con l'anti-Cdc27 e che quindi non è legata all'APC/C. Come è deducibile dalla Figura 3.4.3, tutte le bande presenti nel "not bound" relativo alle cellule rilasciate in MG132, hanno un'intensità paragonabile a quella delle bande del totale (dove per totale si intende tutta la componente proteica prima dell'incubazione con l'anti-Cdc27), a voler sottolineare che la maggior parte delle proteine del MCC non sono legate all'enzima precipitato. Notevoli differenze tra le bande del totale e del "not bound" si vedono invece nell'immunoprecipitazione da cellule trattate in Nocodazolo, a sostegno del fatto che i componenti del MCC mostrano una maggiore affinità all'APC/C proveniente da cellule con questo trattamento.

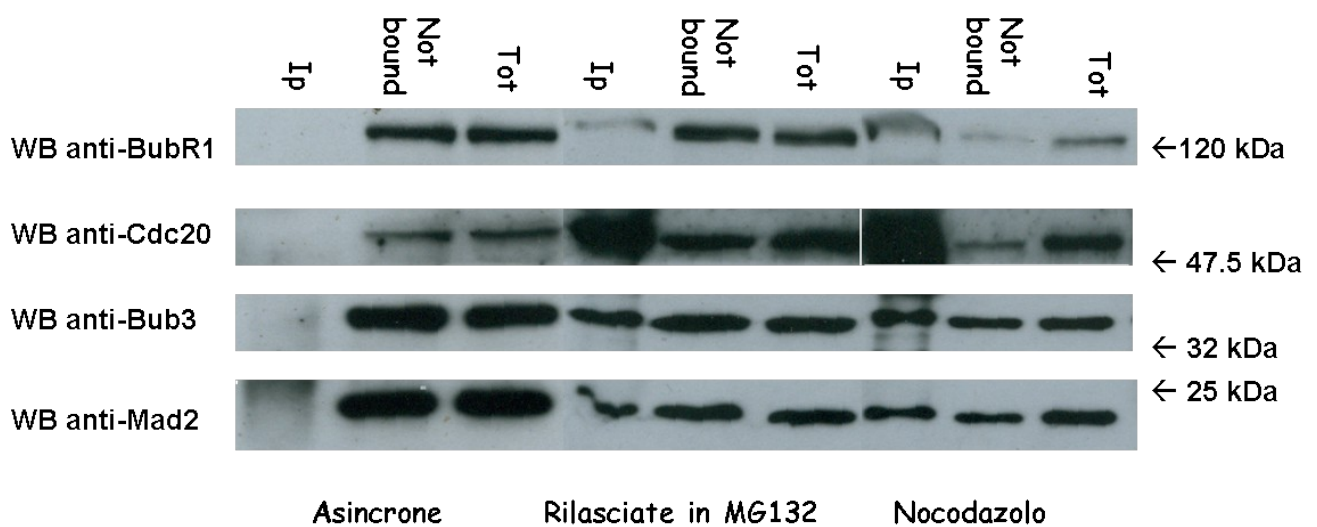
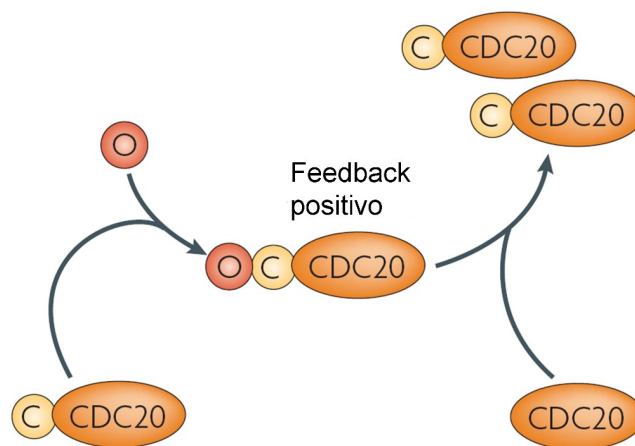


Figura 3.4.3 Stato di legame del MCC all'Anaphase Promoting Complex

L'APC/C è immunoprecipitato da cellule HeLa asincrone (1), bloccate in Nocodazolo (2), bloccate in Nocodazolo e poi rilasciate in MG132 (3). Il legame delle componenti del MCC all'enzima viene verificato per ogni condizione mediante *Western blotting* anti-BubR1, anti-Cdc20, anti-Bub3 e anti-Mad2 su 50 µg di componente proteica totale, 50 µg di componente proteica non legata dall'anti-Cdc27 e 10 µl di slurry anti-Cdc27 beads.

Come è già stato sottolineato, l'attività dell'APC/C in mitosi richiede l'associazione del coattivatore Cdc20. Questo coattivatore è il target di controllo che garantisce l'inibizione dell'APC/C finché il SAC non è soddisfatto. Cdc20, infatti, viene legato da C-Mad2 (nella conformazione chiusa) in quel meccanismo di amplificazione del segnale generato dai cinetocori non attaccati noto come "Mad2 template model" (vedi paragrafo 1.5.4 dell'introduzione e Fig 3.4.4) e quando è sequestrato poi all'interno del MCC non risulta funzionale all'attivazione dell'APC/C fino a che il *checkpoint* non è soddisfatto e il MCC è disassemblato.



Musacchio & Salmon, *Nature Review in Molecular Cell Biology*

Fig 3.4.4 Interazione tra closed Mad2 e CDC20 e amplificazione del segnale

C-Mad2 legato a Cdc20 è in grado di dimerizzare con una molecola di O-Mad2, provocandone una modificazione conformazionale funzionale per il legame con un'altra molecola di Cdc20. Il complesso neoformato C-Mad2/Cdc20 a sua volta può ripetere il processo, amplificandolo.

3.5 Effetti di Cdc20 e Mad2^{L13Q} sull'attività ubiquitinante dell'Anaphase Promoting Complex

Al fine di verificare la sua azione attivatoria sull'enzima, Cdc20 (peso molecolare 55 kDa) è stato ottenuto mediante "*in vitro translation*" ed è stato aggiunto alla reazione di ubiquitinazione. Cdc20 è una proteina insolubile che in vivo richiede l'azione di una chaperonina per il suo ripiegamento (*folding*), ed è perciò piuttosto difficile purificarla in una forma che sia attiva e funzionale come attivatore. L'unico sistema che si è rivelato efficace in questo senso è stato il sistema di trascrizione e traduzione in vitro in lisato di reticolocita a partire dal costrutto pcDNA-FLAG-Cdc20. La reazione è stata effettuata a 30°C per circa 90 minuti in un volume finale di 100 µl ed è stata incubata poi con 45 µl di anti-FLAG *agarose* per circa 2 ore, al fine di sfruttare l'interazione tra il

FLAG tag e la resina per immunoprecipitare Cdc20. Quest'ultima è stata eluita, poi, con il FLAG peptide incubato ad alta concentrazione con la resina per 16 ore. Il volume di eluizione è stato quindi ridotto di circa 10 volte e ripartito tra le reazioni di ubiquitinazione. Tutti i passaggi relativi all'isolamento di Cdc20 sono stati verificati mediante *Western blotting* anti-Cdc20 (Fig 3.5.1), sottoponendo alla stessa corsa elettroforetica anche quantità note di Cdc20 ricombinante (non funzionante come coattivatore, perché probabilmente non foldata), già disponibile in laboratorio da prendere come riferimento per la quantificazione della proteina. Confrontando l'intensità delle bande di Cdc20 ricombinante con quelle relative a volumi crescenti di Cdc20 eluito dall'anti-FLAG agarose, si è valutato che ad un microlitro di Cdc20 eluito corrispondono circa 18 ng di proteina. (circa 327 nM).



Figura 3.5.1 Cdc20: in vitro translation, eluizione e quantificazione

Cdc20 è dapprima trascritto e tradotto in vitro a partire da pcDNA-FLAG-Cdc20 e poi immunoprecipitato con anti-FLAG agarose ed eluito da esso con FLAG peptide. La scala di Cdc20 ricombinante è utilizzata per la quantificazione della proteina eluita, valutata in 18 ng/ μ l (IVT = 10 μ l di reazione, not bound = 10 μ l di componente proteica della reazione che non si è legate alla resina, beads = 10 μ l di anti-FLAG agarose beads, 1, 2, 3 μ l = volumi crescenti di Cdc20 eluito e concentrato, 5, 10, 20, 30 ng = quantità di Cdc20 ricombinante)

L'effetto di Cdc20 sull'APC/C immunoprecipitato da cellule HeLa trattate secondo lo 3.4.1, è stato verificato aggiungendo circa 3 μ l della proteina in vitro translata ed eluita (corrispondenti a circa 60 ng) alla reazione di ubiquitinazione. L'APC/C è stato immunoprecipitato ancora con un anticorpo anti-Cdc27 e 20 μ l di slurry anti-Cdc27 beads sono stati incubati con Cdc20 aggiunto alla miscela di ubiquitinazione contenente tutti gli elementi necessari, meno la [¹²⁵I]ciclina B¹⁻⁸⁹. L'incubazione

con Cdc20 è stata effettuata in continua agitazione per un ora a 25°C e la reazione di ubiquitinazione è stata avviata subito dopo con l'aggiunta del substrato.

Parallelamente è stato analizzato anche l'effetto inibitorio di Mad2 sull'attività dell'APC/C isolato da cellule HeLa nelle tre condizioni già descritte (schema 3.4.1). È stato impiegato il mutante Mad2^{L13Q} che possiede la leucina 13 modificata, modificazione che conferisce alla proteina la capacità di assumere preferenzialmente la conformazione chiusa e legare quindi Cdc20 con maggiore velocità (Mapelli et al., 2007 Cell).

100 μM di Mad2^{L13Q} sono stati incubati, come Cdc20, nella miscela di reazione con 20 μl di anti-Cdc27 beads per un'ora a 25°C e la reazione di ubiquitinazione è stata avviata subito dopo con l'aggiunta della [¹²⁵I] ciclina B¹⁻⁸⁹.

Come è visibile dallo schema di reazione annesso alle tre autoradiografie, 4 tipi di reazione sono state assemblate con la resina anti-Cdc27 proveniente da ognuna delle tre condizioni cellulari: una reazione completa (di controllo) senza fattori aggiuntivi, una reazione a cui sono stati aggiunti circa 60 ng di Cdc20, una a cui è stato aggiunto 100 μM di Mad2^{L13Q} e l'ultima in cui sono state aggiunte entrambe le proteine. Ciascuna reazione è stata bloccata a 10, 20, 30 minuti ed è stata poi verificata per autoradiografia.

Nel caso in cui l'APC/C è stato immunoprecipitato da cellule HeLa asincrone, come atteso in base al risultato in Figura 3.4.2, la reazione di controllo mostra una debolissima attività enzimatica che viene però leggermente stimolata dall'aggiunta di Cdc20 (confronta le due reazioni a 20 e 30 minuti). Questa attività, per quanto debole, viene comunque inibita dall'incubazione con Mad2^{L13Q}, e ancor più dall'incubazione con Cdc20 e Mad2^{L13Q} (Figura 3.5.2)

La ciclina B1¹⁻⁸⁹ che non è stata coinvolta nella reazione, in questo caso non risulta visibile al fondo del gel, perché la corsa elettroforetica è stata bloccata dopo la sua uscita dal gel.

Analizzando le reazioni relative all'APC/C immunoprecipitato da HeLa bloccate in Nocodazolo per 12 ore, si nota invece, che la debole attività enzimatica della reazione di controllo, viene potenziata dall'aggiunta di Cdc20, soprattutto quando la reazione è condotta per 30 minuti (nota l'aumento di intensità della banda più alta). Inoltre, come nel caso precedente, l'aggiunta di Mad2^{L13Q}, determina un effetto inibitorio sia quando aggiunto da solo, sia in concomitanza con Cdc20 (Figura 3.5.3).

Quando l'APC/C è immunoprecipitato da cellule HeLa bloccate in Nocodazolo e rilasciate in MG132, la sua attività è già elevata (come visibile in Figura 3.4.2), ma viene comunque aumentata dall'aggiunta di Cdc20. Infatti, dopo l'incubazione con Cdc20 la reazione risulta completa già dopo 10 minuti, mentre nel controllo ciò si realizza in 30 minuti (vedere l'intensità delle bande superiori

nelle reazioni a 30 minuti nelle Figure 3.4.2 e 3.5.4). L'aggiunta di Mad2^{L13Q} rivela anche in questo caso un effetto inibitorio seppur parziale, poco più intenso di quello ottenuto con l'incubazione contemporanea di Cdc20 e Mad2^{L13Q} (Figura 3.5.4).

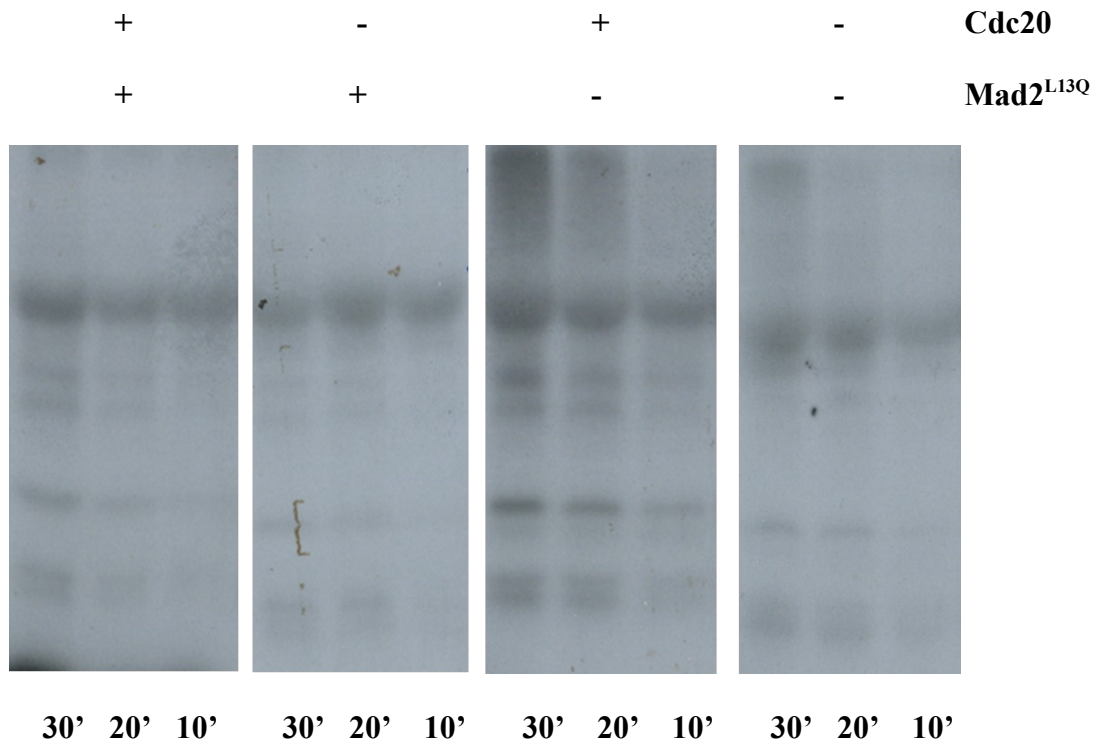


Figura 3.5.2 Effetto di Cdc20 e Mad2^{L13Q} sull'attività dell'APC in HeLa ASINCRONE

Mad2^{L13Q} e Cdc20 sono stati aggiunti nella reazione di ubiquitinazione secondo le combinazioni schematizzate ed incubati con l'APC/C immunoprecipitato da cellule HeLa asincrone. Ogni tipo di reazione è stata effettuata per 10, 20 e 30 minuti e verificata per SDS-PAGE ed autoradiografia.

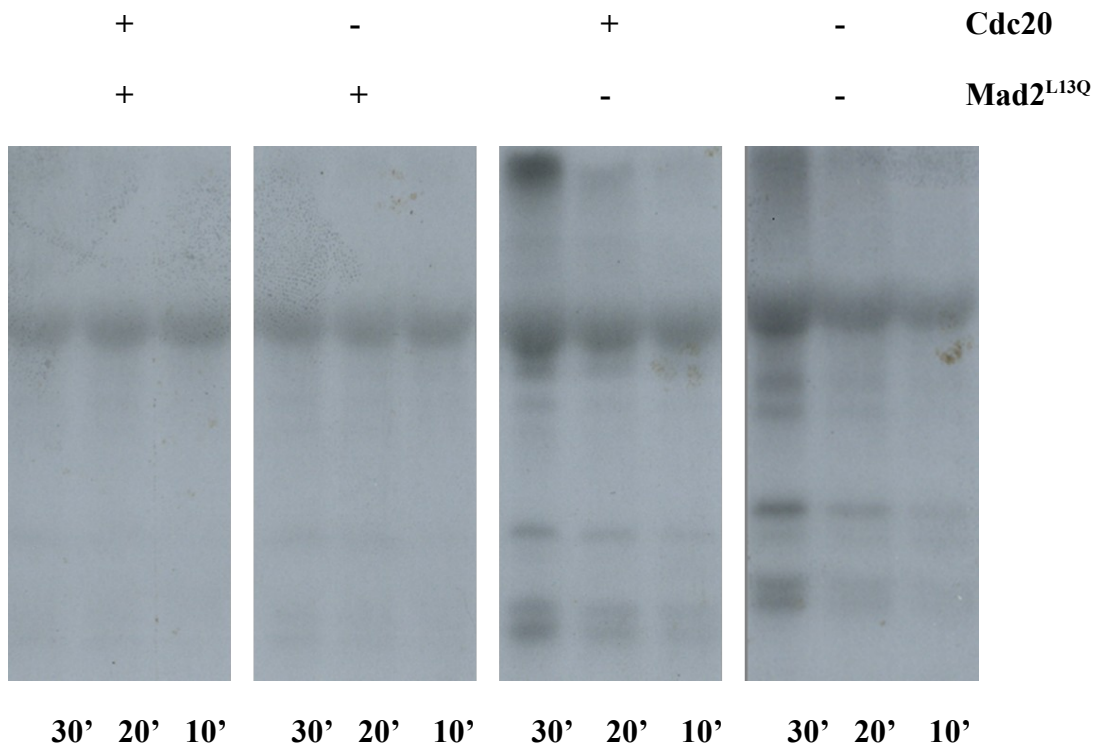


Figura 3.5.3 Effetto di Cdc20 e Mad2^{L13Q} sull'attività dell'APC in HeLa ARRESTATE in Nocodazolo

Mad2^{L13Q} e Cdc20 sono stati aggiunti nella reazione di ubiquitinazione secondo le combinazioni schematizzate ed incubati con l'APC/C immunoprecipitato da cellule HeLa arrestate in Nocodazolo per 12 ore. Ogni tipo di reazione è stata effettuata per 10, 20 e 30 minuti e verificata per SDS-PAGE ed autoradiografia.

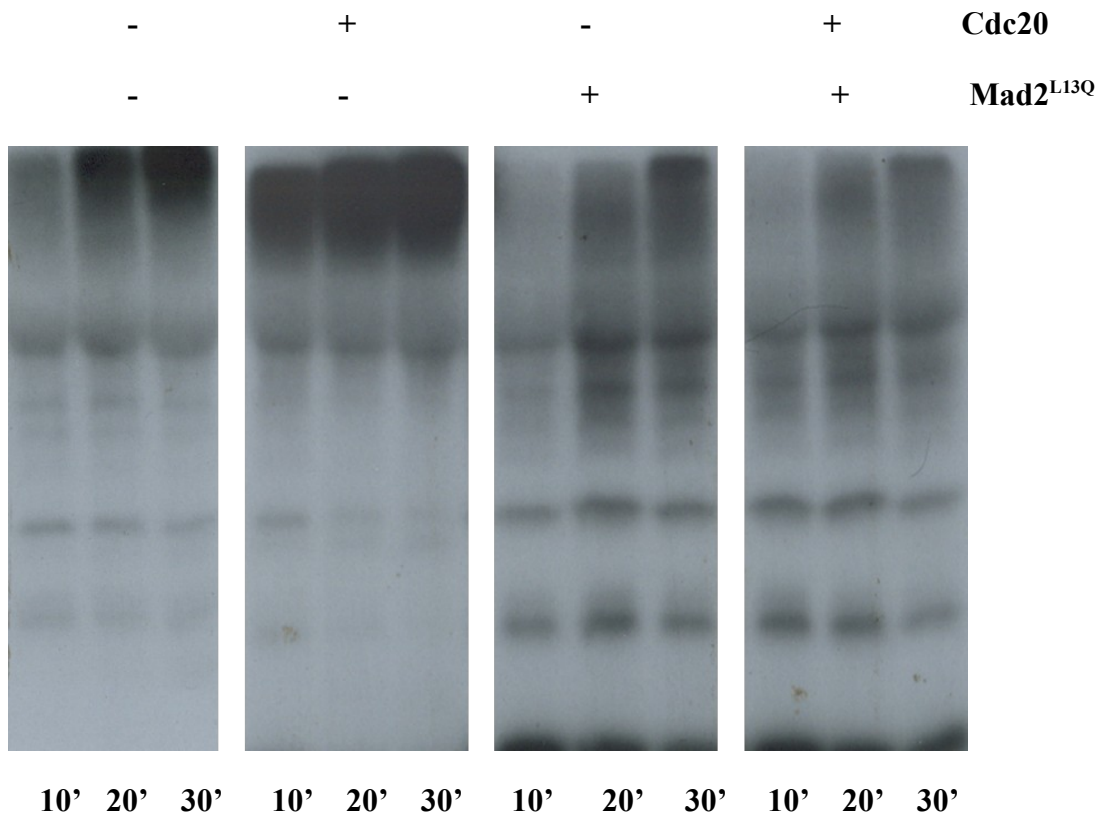


Figura 3.5.4 Effetto di Cdc20 e Mad2^{L13Q} sull'attività dell'APC in HeLa arrestate in Nocodazolo e rilasciate in MG132

Mad2^{L13Q} e Cdc20 sono stati aggiunti nella reazione di ubiquitinazione secondo le combinazioni schematizzate ed incubati con l'APC/C immunoprecipitato da cellule HeLa arrestate in Nocodazolo per 12 ore e rilasciate in mezzo fresco con 10 μ M di MG132 per 2 ore. Ogni tipo di reazione è stata effettuata per 10, 20 e 30 minuti e verificata per SDS-PAGE ed autoradiografia.

3.6 Tentativo di eluizione dell'APC/C immunoprecipitato

L'APC/C usato nelle reazioni di ubiquitinazione *in vitro* è stato immunoprecipitato e aggiunto alla miscela legato alla resina anti-Cdc27, come descritto anche nella maggior parte dei protocolli presenti in letteratura. Per poter aumentare però il suo grado di purezza ed eventualmente migliorarne la quantificazione, si è tentato di eluire l'APC/C dalle anti-Cdc27 beads, sfruttando lo stesso frammento di Cdc27 che era stato usato per generare l'anticorpo impiegato nell'immunoprecipitazione. A tal fine la sequenza codificante Cdc27¹⁴⁵⁻³⁴³ (peso molecolare = 21.3 kDa) è stata subclonata in un vettore di espressione batterica pGEX-6P-2rbs ed espresso in *E. coli* a 18°C per 16 ore dopo l'induzione con 0.5 mM di IPTG. Il peptide è stato purificato, secondo lo schema già descritto per le proteine con una GST tag all'N-terminale, sfruttando il legame del tag alle Glutathion sepharose beads. La Prescission è stata utilizzata poi per eliminare il tag e permettere alla proteina di essere isolata attraverso il passaggio su colonna in grado di trattenere solo la resina. Come è visibile in figura 3.6.1, la vicinanza tra i pesi molecolari della GST (25 kDa) e del frammento di Cdc27, non rende chiara la loro separazione e identificazione sul gel. Tuttavia il frammento, privato del tag, è stato sottoposto a due ulteriori passaggi di purificazione: una cromatografia a scambio anionico (il pI del peptide di 5.66) e *size exclusion chromatography*. La maggior parte delle frazioni sono state analizzate non solo in SDS-PAGE seguita da colorazione con Comassie Brilliant Blu (Figura 3.6.2), ma anche in *Western blotting* con anti-Cdc27, data la quantità piuttosto esigua della proteina e la difficoltà di distinguerla dalla GST. A questo proposito, è stata caricata anche la GST ricombinante (ultima lane in Figura 3.6.2) che, dovendosi separare ad un'altezza maggiore rispetto al frammento, è utile nell'identificare, con più sicurezza, le frazioni di eluizione contenenti Cdc27¹⁴⁵⁻³⁴³ e non il tag eventualmente trattenuto ed eluito con esso. La resa è stata di circa 0.5 mg per litro di coltura batterica.

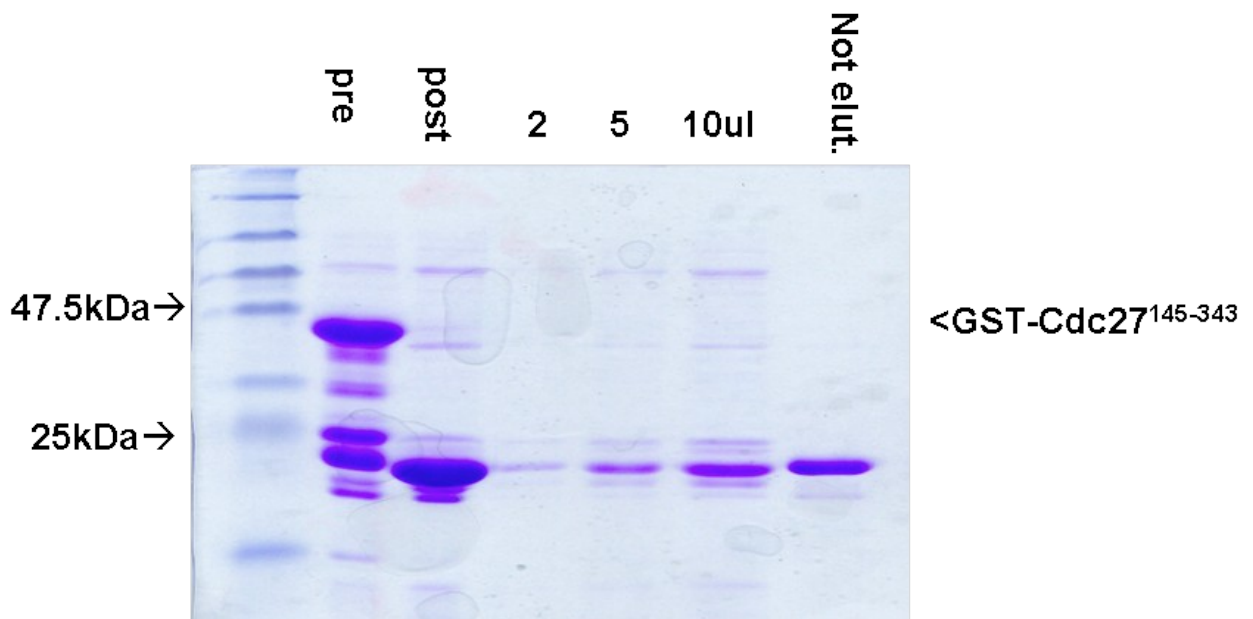


Figura 3.6.1. Eluizione di $\text{Cdc27}^{145-343}$ dopo l'eliminazione della GST tag

La proteasi Prescission è utilizzata per tagliare la GST tag. $\text{Cdc27}^{145-343}$ separata dal tag, viene eluita dalle GST-Glutathion sepharose beads (Pre = 10 μl di campione proteico prima dell'incubazione con la Prescission, Post= 10 μl di campione proteico dopo l'incubazione con la Prescission, 2, 5, 10 μl = volumi di $\text{Cdc27}^{145-343}$ dopo l'eluizione dalle beads, Not elut.= 10 μl di quel che non è filtrato dalla colonna di eluizione)

Frazioni dopo separazione cromatografica

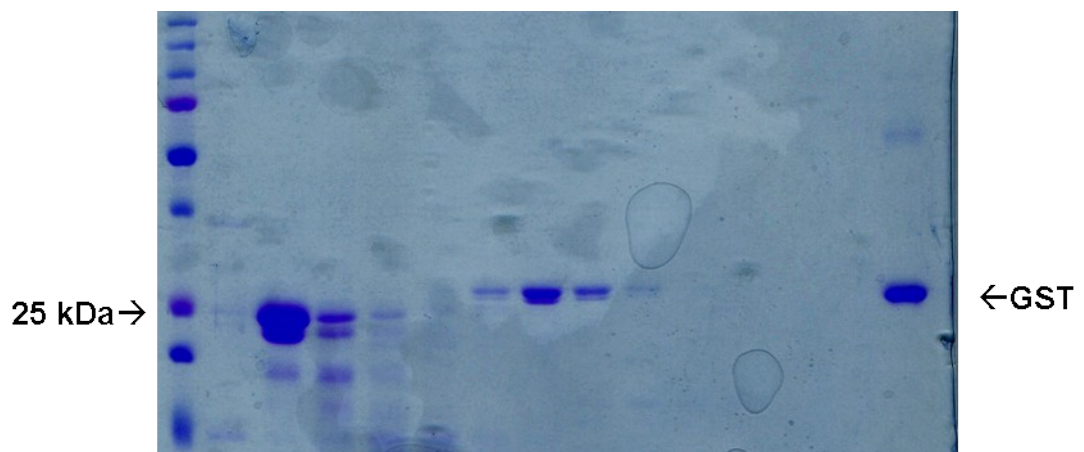


Figura 3.6.2. Cromatografia ad esclusione molecolare di $\text{Cdc27}^{145-343}$

La proteina $\text{Cdc27}^{145-343}$ è sottoposta a cromatografia ad esclusione molecolare. 10 μl delle frazioni raccolte sono analizzate in SDS-PAGE, seguita da colorazione con Comassie Brilliant Blue, 5 μg di GST ricombinante sono caricati nell'ultima lane.

Il peptide purificato è stato così utilizzato per tentare l'eluizione del complesso dopo la sua immunoprecipitazione.

Come già descritto, l'APC/C è stato isolato da cellule HeLa bloccate in Nocodazolo per 12 ore e poi rilasciate in MG132, incubando, con ogni milligrammo di lisato proteico, 1.5 µg di anti-Cdc27, e aggiungendo poi 30 µl di slurry protein G beads. L'eluizione del complesso è stata tentata con quantità crescenti di Cdc27¹⁴⁵⁻³⁴³, incubando i 30 µl di anti-Cdc27 beads rispettivamente con 1, 2, 5 e 10 µg del peptide in un volume di 30 µl. La miscela è stata tenuta in agitazione continua a 4°C per almeno due ore. In parallelo è stata effettuata anche l'eluizione di controllo, incubando altri 30 µl di anti-Cdc27 beads con 10 µg di FLAG peptide. L'immunoprecipitazione e i tentativi di eluizione sono stati verificati poi, per SDS-PAGE e successivo *Western blotting*. Per ogni eluizione con 1, 2, 5 o 10 µg di Cdc27¹⁴⁵⁻³⁴³ ed anche per l'eluizione di controllo, sono stati caricati sia il volume di eluizione (E) che le relative beads (B). L'immunoblotting è stato effettuato, questa volta, con un anticorpo policlonale generato contro un'altra subunità del complesso, APC7 (vedi paragrafo successivo) che si presuppone esser precipitata, e quindi eventualmente eluita, con tutto il complesso. Analizzando il risultato in figura 3.6.3, la banda relativa ad APC7 (peso molecolare 62 kDa) è riconoscibile in tutte le *lanes* e non solo in quelle relative all'eluizione, mentre ci si aspettava che figurasse esclusivamente (o almeno in quantità maggiore) nel volume di eluizione e non sulla resina da cui il complesso avrebbe dovuto staccarsi. Il dato che però è più in contrasto con le aspettative, è il riscontro delle stesse bande nella reazione di controllo, laddove in corrispondenza del volume di eluizione non doveva essere presente alcuna banda indicativa del complesso. In ogni caso, in tutti gli altri volumi di eluizione, si riconoscono diverse bande aspecifiche che contribuiscono ad invalidare l'utilizzo dell'eluato nella reazione di ubiquitinazione.

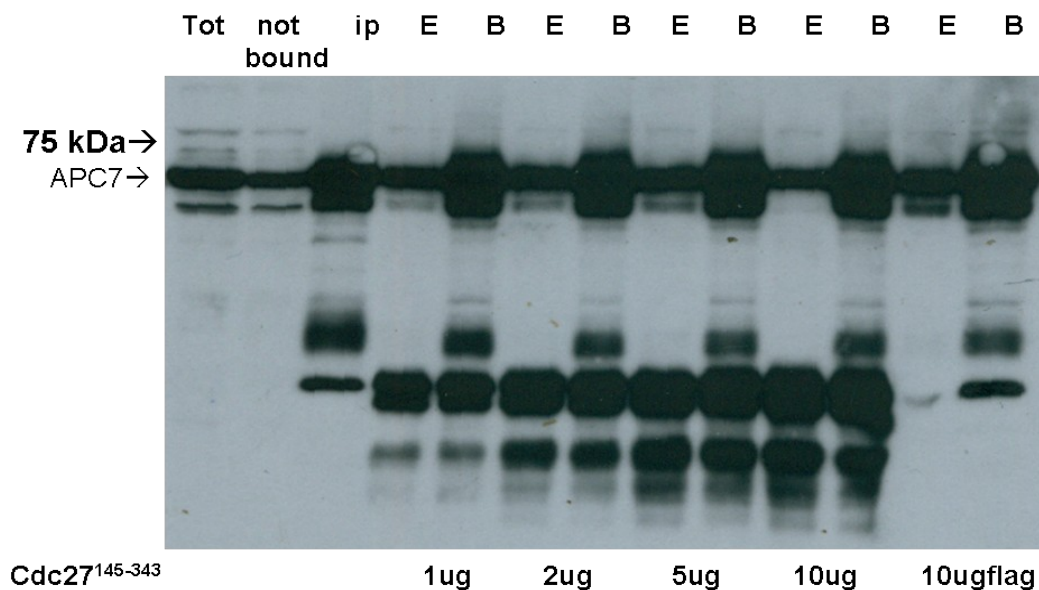


Figura 3.6.3 Tentativo di eluizione dell'APC usando Cdc7¹⁴⁵⁻³⁴³

L'APC/C è immunoprecipitato da cellule HeLa mitotiche. Ogni tentativo di eluizione è effettuato su 30 µl di anti-Cdc27 beads incubate con 1, 2, 5 o 10 µg di Cdc27¹⁴⁵⁻³⁴³ e, per il controllo, con 10 µg di FLAG peptide. Le eluizioni sono verificate per SDS-PAGE e western blot anti-APC7

(Tot = 50 µg di lisato proteico totale, not bound = 50 µg di lisato proteico dopo incubazione con anti-Cdc27, IP beads = 30 µl di anti-Cdc27 beads prima dell'eluizione, E = volume di eluizione contenente rispettivamente 1, 2, 5, o 10 µg di peptide, B = beads dopo l'eluizione).

3.7 Generazione di anticorpi anti-APC7, un'altra subunità dell'Anaphase Promoting Complex

Parallelamente alla ricostituzione del saggio di ubiquitinazione *in vitro*, sono stati generati e testati anticorpi policlonali e monoclonali contro una subunità dell'APC/C, APC7. A tal fine il costrutto pGEX-6P-2rbs-APC7³³⁶⁻⁵⁶⁵, già disponibile in laboratorio, è stato espresso in *E. Coli* a 18°C per 16 ore dopo induzione con 0.1 mM di IPTG. GST-APC7³³⁶⁻⁵⁶⁵ (peso molecolare = 50 kDa) è stata purificata quindi con Glutathion sepharose beads, da cui poi, però, è stata eluita con 20 mM di GSH (in questo caso il tag non è stato rimosso con la proteasi Prescission data l'alta omologia che c'è tra l'APC7 umano, murino e di coniglio. Al fine di potenziare la risposta immunitaria negli animali immunizzati si è perciò deciso di utilizzare la proteina fusa con il suo tag come immunogeno. Dopo l'eluizione dalle beads, GST-APC7³³⁶⁻⁵⁶⁵ è stata quindi purificata per *size exclusion chromatography*, in seguito alla quale, è stata quantificata con una scala comparativa di BSA. La resa riscontrata è stata di circa 16 mg per litro di coltura batterica iniziale.

1 mg di GST-APC7³³⁶⁻⁵⁶⁵ purificata è stato così utilizzato per la produzione di due anticorpi policlonali in coniglio, mentre 3 mg sono stati usati per la produzione di anticorpi monoclonali murini. L'immunizzazione degli animali e la generazione degli anticorpi sono state effettuate e seguite dall'Antibody Facility del consorzio Congentech presente nel Campus IFOM-IEO, mentre tutte le fasi del processo, sono state analizzate da me utilizzando tecniche quali *Western blotting*, immunoprecipitazione e, nelle fasi finali, anche immunofluorescenza. Per quanto concerne gli anticorpi policlonali, sono stati testati prima i cosiddetti *small, large e final bleeding* provenienti dai vari cicli di immunizzazione effettuati in due conigli e poi, alla fine, gli anticorpi purificati, rispettivamente identificati dai codici si0645 e si0651. Le Figure 3.7.1 e 3.7.2 mostrano i test finali effettuati su questi anticorpi purificati, la cui efficienza è stata verificata in *Western blotting* e in immunoprecipitazione.

La capacità di riconoscere l'immunogeno è stata testata sia su 30 µg di lisato proteico di cellule HeLa che esprimevano APC7 a livello endogeno, sia su 30 µg di lisato proteico da cellule HeLa che lo overesprimevano. L'overespressione è stata ottenuta trasfettando le cellule con il costrutto pcDNA-FLAG-APC7 secondo il protocollo Fugene6 (Roche). Su ciascuna coppia di lisati (endogeno ed overespresso) ogni anticorpo è stato utilizzato in concentrazioni crescenti, da 0.1 µg/µl a 0,7 µg/µl e per ognuno di essi è stato ritestato, come riferimento, anche il *final bleeding* precedente alla purificazione. Dalla figura 3.7.1 si evince che entrambi gli anticorpi sono efficienti nel riconoscere l'APC7 endogeno ed overespresso già quando utilizzati a 0.1 µg/µl, tuttavia tra i due anticorpi, il primo (si0645) sembra mettere in evidenza bande più intense e nette, in assenza di segnali aspecifici. La differenza riscontrata invece nell'ibridazione con i *final bleeding*, si potrebbe spiegare col fatto che il *final bleeding* del primo anticorpo è stato probabilmente utilizzato con una diluizione troppo bassa.

La capacità di immunoprecipitare il complesso enzimatico è stata testata invece incubando 1 mg di lisato proteico rispettivamente con 1, 2 e 3 µg di ciascun anticorpo, e aggiungendo poi 30 µl di slurry protein G beads, secondo il protocollo già utilizzato nell'IP anti-Cdc27. Anche questa volta l'immunoprecipitazione è stata verificata in SDS-PAGE e *Western blotting*, utilizzando per l'immunoblotting l'anti-APC7 si0645 (in concentrazione 0.2 µg/µl) precedentemente testato con questa applicazione (Figura 3.7.1). Per ogni immunoprecipitazione sono stati caricati 50 µg di componente proteica che non si era legata alle anti-APC7 beads (not bound), 30 µl di slurry anti-APC7 beads usati per precipitare il complesso (Ip). Come è visibile in Figura. 3.7.2 entrambi gli anticorpi sono in grado di depletare quasi totalmente l'APC7 (e quindi presumibilmente tutto il complesso) anche quando utilizzati in quantità di 1 µg per mg di lisato proteico.

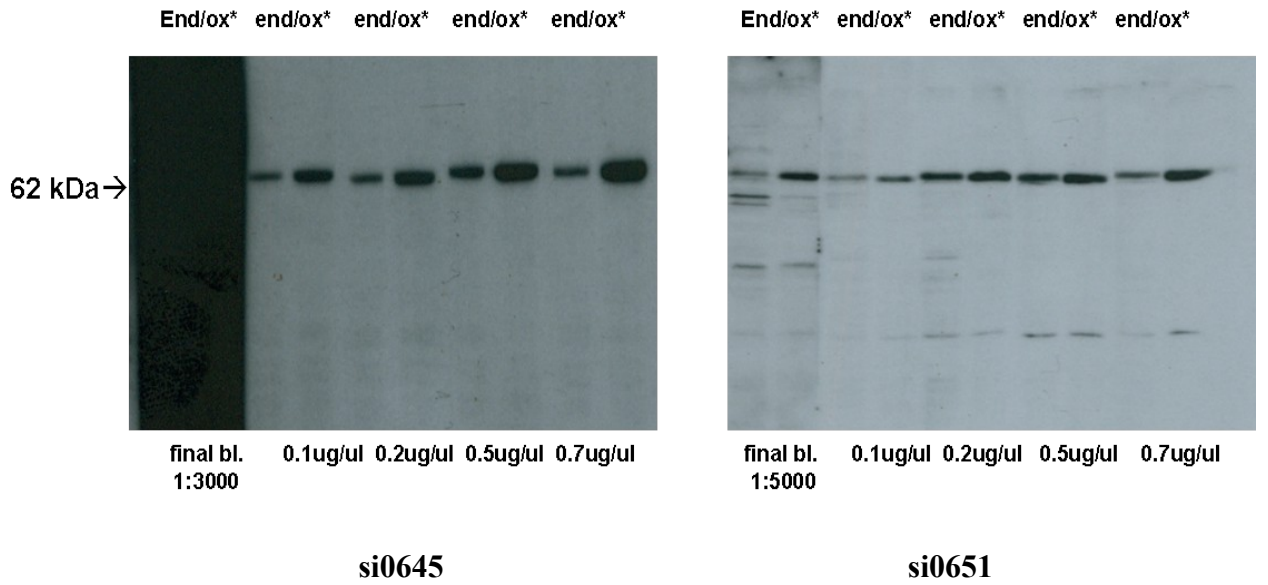


Figura 3.7.1 Western blotting anti-APC7 usando i due anticorpi policlonali si0645 e si0651

30 µg di lisato proteico di cellule HeLa che esprimevano APC7 a livello endogeno ed overespresso sono sottoposti ad SDS-PAGE. Ciascuna coppia di lisati è poi ibridata con il *final bleeding*, in due diverse diluizioni e con 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 µg/µl di ciascuno dei due anticorpi. (Si0645 e si0651= codici identificativi dei due anticorpi policlonali testati).

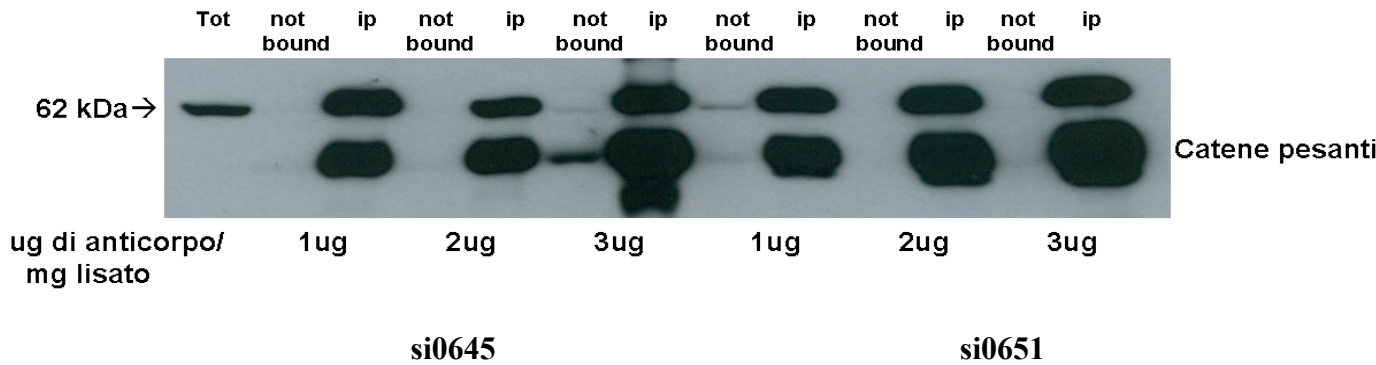


Figura 3.7.2 Immunoprecipitazione anti-APC7 usando i due anticorpi policlonali SI0645 e si0651

1 mg di lisato proteico è stato incubato con 1, 2 o 3 µg di ciascun anticorpo, a cui sono aggiunti poi 30 µl di slurry protein G beads. Ogni immunoprecipitazione è verificata mediante *Western blotting* anti-APC7 si0645 (Tot= 50 µg di lisato proteico totale, not bound= 50 µg di lisato proteico non legato alle anti-APC7 beads, ip.=30 µl di anti-APC7 beads precipitate). Le bande inferiori visibili nelle ip sono identificabili con le catene pesanti dell'anti-APC7 usato per l'immunoprecipitazione.

La generazione degli anticorpi monoclonali murini è stata effettuata invece in 4 fasi:

- immunizzazione, mediante 5 iniezioni ad intervalli di due settimane,
- fusione, delle cellule spleniche murine con una linea di mieloma umana immortalizzata per formare ibridomi,
- subclonaggio della linea murina capace di produrre anticorpi monoclonali proveniente da un ibridoma parentale selezionato,
- produzione dell'anticorpo finale.

In seguito alla fusione delle cellule spleniche di uno dei topi immunizzati, sono stati selezionati due ibridomi, identificati rispettivamente come BR21 e BZ79, da ognuno dei quali sono stati ottenuti due subcloni. Del supernatante di questi ultimi, è stata testata l'efficienza in *Western blotting*, immunoprecipitazione ed immunofluorescenza.

Come per gli anticorpi policlonali, la capacità di riconoscere l'immunogeno è stata verificata su lisati di cellule HeLa che esprimevano l'APC7 a livello endogeno o overespresso usando diverse diluizioni del supernatante dei subcloni (non essendo stata definita la concentrazione degli anticorpi in essi contenuti). Per ogni subclone sono state utilizzate tre diverse diluizioni che si sono rivelate tutte funzionali al riconoscimento dell'APC7 overespresso e, salvo in alcuni casi, anche endogeno (Figura 3.7.3 e Fig. 3.7.4).

La capacità di immunoprecipitare l'APC/C è stata testata incubando 500 μ l di ogni supernatante con 30 μ l di slurry protein G beads, le quali sono state in seguito precipitate ed incubate con 1 mg di lisato proteico di cellule HeLa. La scelta di incubare prima il supernatante con la resina nasce dalla mancata quantificazione degli anticorpi presenti nei supernatanti, di cui quindi si sono potuti paragonare soltanto i volumi. L'immunoprecipitazione di ogni subclone, è stata verificata per SDS-PAGE e *Western blotting*, utilizzando, per l'immunoblotting sia l'anticorpo anti-Cdc27, solitamente utilizzato (controllo positivo), che quello anti-APC7 policlonale (si0645), al fine di verificare la presenza di entrambe le subunità del complesso precipitato. La Figura 3.7.5 evidenzia che tutti i subcloni sono in grado di immunoprecipitare, seppur non totalmente, le due subunità (e quindi il complesso) con un'efficienza pressochè paragonabile.

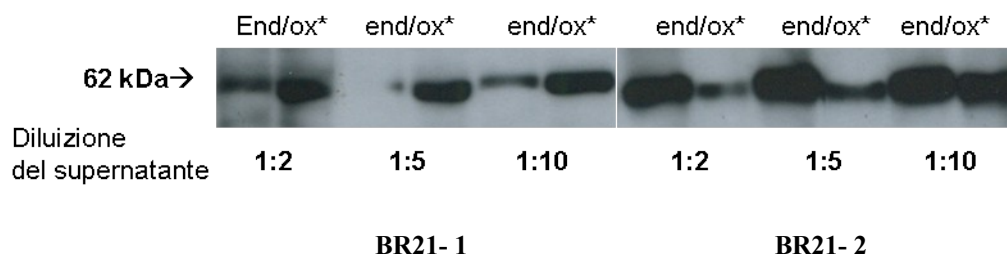


Figura 3.7.3 Western blotting anti-APC7 usando i due subcloni dell'ibridoma BR21

30 µg di lisato proteico di cellule HeLa che esprimevano APC7 a livello endogeno ed overespresso sono sottoposti ad SDS-PAGE. Ciascuna coppia di lisati è poi ibridata con diverse diluizioni del supernatante dei due subcloni BR21-1 e BR21-2.

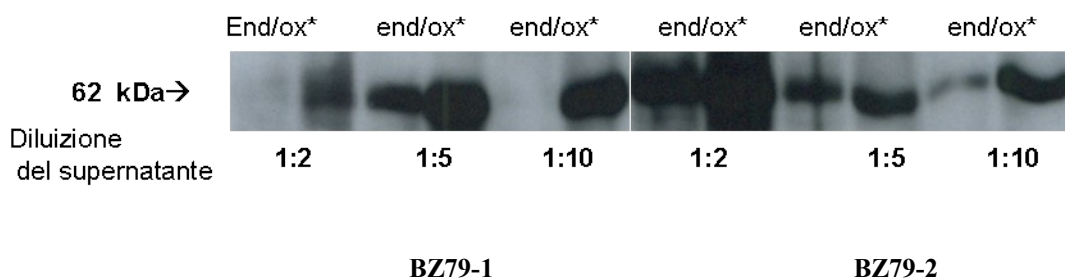


Figura 3.7.4 Western blotting anti-APC7 usando i due subcloni dell'ibridoma BZ79

30 µg di lisato proteico di cellule HeLa che esprimevano APC7 a livello endogeno ed overespresso sono sottoposti ad SDS-PAGE. Ciascuna coppia di lisati è poi ibridata con diverse diluizioni del supernatante dei due subcloni BZ79-1 e BZ79-2.

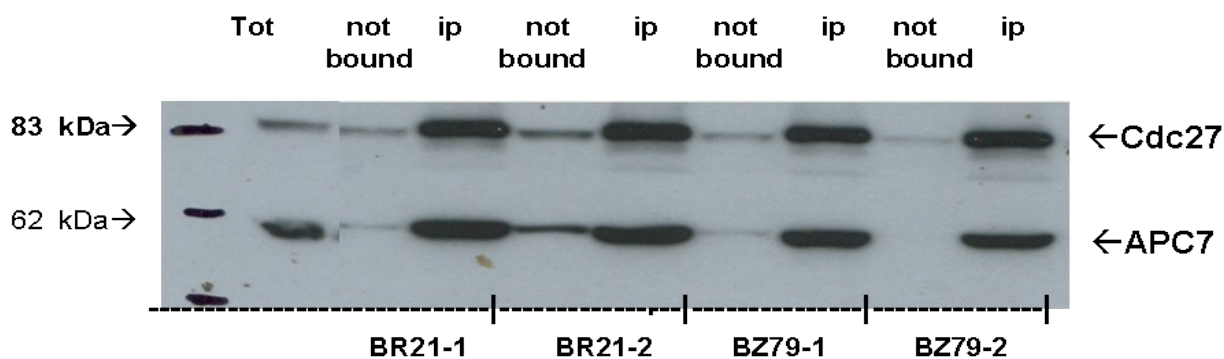


Figura 3.7.5 Immunoprecipitazione anti-APC7 usando i subcloni BR21 e BZ79

500 µl di ogni supernatante è incubato con 30 µl di slurry protein G a cui è aggiunto poi un mg di lisato proteico. Ogni immunoprecipitazione è verificata mediante *Western blotting* anti-APC7 e anti Cdc27 (Tot = 50 µg di lisato proteico totale, not bound = 50 µg di lisato proteico non legato alle anti-APC7 beads di ogni subclone, IP = 10 µl di anti-APC7 beads precipitate).

I subcloni sono stati inoltre testati per la capacità di individuare l'APC/C nelle cellule. Dei subcloni testati per immunofluorescenza soltanto quelli derivati dall'ibridoma BZ79 hanno rivelato un segnale netto e piuttosto circoscritto. L'immunofluorescenza è stata effettuata su cellule HeLa sincronizzate con un doppio blocco in Timidina (2 mM) per 15 ore, a cui è seguito un rilascio in terreno fresco 7.5 ore, al termine del quale è stato aggiunto l'inibitore del proteasoma MG132 (10 uM) per 90', in modo da arricchire la popolazione di cellule mitotiche e poter eventualmente visualizzare l'APC/C in metafase. Le cellule sono state fissate in formaldeide 1 % e sono state poi permeabilizzate con Triton X100 0.1%; i supernatanti dei subcloni, usati per l'ibridazione, sono stati diluiti 2 volte. L'analisi delle immagini presenti in Figura 3.7.6, mette in evidenza che in metafase, l'APC/C (segnale verde) sembra localizzare a livello dei centrosomi ai poli opposti della cellula, mentre in interfase, il segnale sembra polarizzato e circoscritto ad un lato della cellula al di fuori del DNA, visualizzato dal segnale blu del DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) e quindi del nucleo. La localizzazione centromerica sostenuta da alcuni autori (Acquaviva et al., 2004) sembra, comunque, esclusa dal fatto che in tutte le immagini analizzate non si riscontra mai una sovrapposizione del segnale verde dell'anti-APC7 dei subcloni e quello rosso dato dagli anticorpi anti-centromero. Sebbene la localizzazione centrosomale in metafase sia stata anche confermata dalla colocalizzazione con la gamma tubulina, proteina tipicamente centrosomale (Figura 3.7.7), il fatto che solo un subclone, tra quelli che sono stati testati, dia un segnale del genere, unitamente alla mancanza di dati in letteratura che la avvalorino, non esclude il rischio che questa localizzazione sia frutto di un artefatto tecnico.

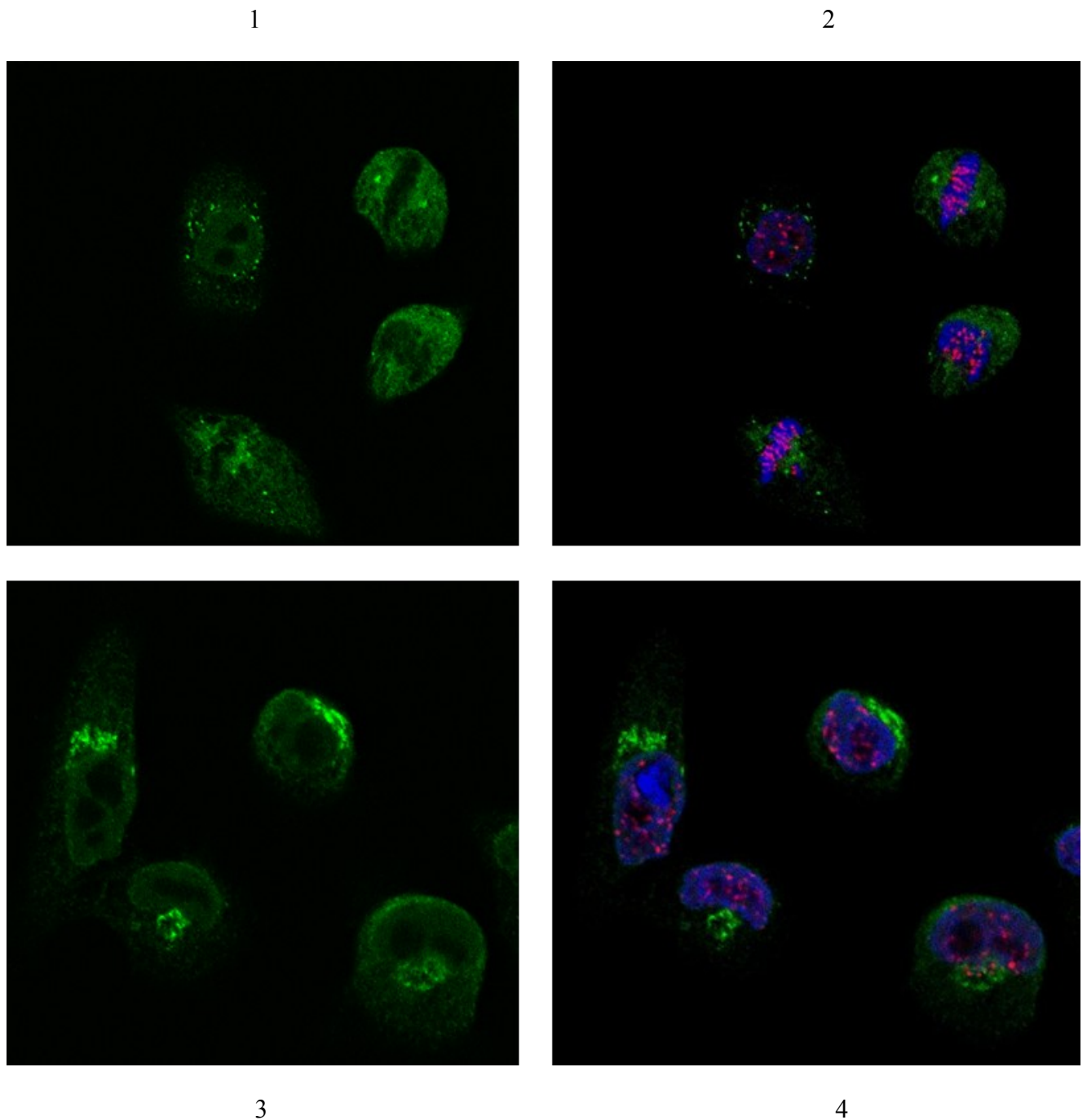


Figura 3.7.6 Immunofluorescenza anti-APC7 usando i subcloni BZ79

Cellule HeLa sono sincronizzate in mitosi , fissate il formaldeide 1%, permeabilizzate con TritonX100 0.1% e sono ibridate col supernatante di uno dei due subcloni BZ79 diluito 1:2., insieme all'anticorpo umano anti-centromero. Nei pannelli 1 e 3, il segnale dato dal subclone, nei pannelli 2 e 4 il segnale dato dal DAPI (blu), dall'anti-centromero (rosso) e dal subclone, identificativi rispettivamente del DNA, dei centromeri e dell'APC7.

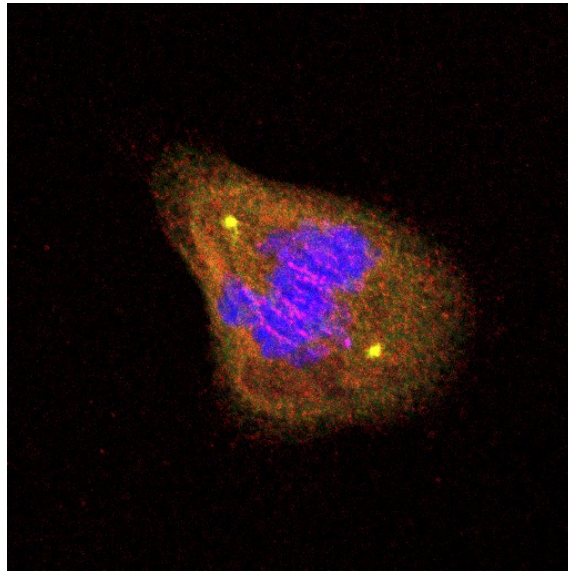


Figura 3.7.7 Colocalizzazione dell'APC7 e della gamma tubulina

Cellule HeLa sono ibridate con anti-gamma tubulina (rosso) e anti-APC7 (verde). I segnali si sovrappongono a livello dei centrosomi (giallo).

4 Conclusioni e prospettive

Il lavoro svolto ha permesso di ricostituire *in vitro* la reazione di ubiquitinazione mediata dall'APC/C, un regolatore essenziale del ciclo cellulare. Il ruolo fondamentale dell'APC/C nella transizione dalla metafase all'anafase, determinante per il corretto e ordinato completamento della mitosi e la sua fine regolazione da parte del SAC (il meccanismo di controllo garante della corretta segregazione dei cromosomi), giustificano l'importanza di avere un sistema che *in vitro*, efficientemente, ne ricostituisca l'attività. Il saggio di ubiquitinazione, che utilizza un frammento di ciclina B1 come substrato, è stato messo a punto in seguito alla purificazione di componenti essenziali del processo, quali il substrato, l'E2 (l'*ubiquitin activating enzyme* Ubch10) e l'E3 ligasi (l'Anaphase Promoting Complex immunoprecipitato) e si è rivelato assai efficace, in quanto permette una completa ubiquitinazione del substrato *in vitro* in circa 30 minuti di reazione. Il sistema che è stato ricostituito, può essere uno strumento utile per studiare e approfondire l'enzimologia dell'APC/C, la sua regolazione, e il legame con "partners" proteici noti e non. Test iniziali sulla dipendenza dell'attività del complesso dall'attivatore Cdc20 e da Mad2, proteina essenziale implicata nel SAC, hanno confermato e sottolineato l'effetto, rispettivamente attivante ed inibitorio, di queste proteine. Inoltre, il ruolo del MCC, di cui essi sono costituenti insieme a Bub3 e BubR1, nel "sequestrare" Cdc20 e bloccare l'attività ubiquitinante dell'APC/C nei confronti del substrato, è stato evidenziato e correlato con lo stato di attivazione del SAC da cui l'APC/C controllato. L'uso del Nocodazolo, che, bloccando la depolimerizzazione dei microtubuli, crea una condizione che attiva il *checkpoint*, ha permesso infatti di verificare lo stato inibitorio dell'APC/C mediato dallo stretto legame del MCC, che viene mantenuto fintantoché l'attaccamento bipolare dei cinetocori ai microtubuli non viene soddisfatto, condizione ottenuta invece, nelle nostre condizioni sperimentali, in seguito al rilascio dal Nocodazolo. Resta da capire, tuttavia, ancora molto sul meccanismo attraverso il quale il MCC si assembli, svolga e mantenga la sua funzione inibitoria e poi si disassembli, facendo luce, anche sulla funzione dell'ubiquitinazione di Cdc20 su cui ci sono ancora modelli contrastanti (vedi paragrafo 1.6 dell'introduzione). Ulteriori approfondimenti sulla modulazione e sulla regolazione dell'APC/C si potranno effettuare prendendo in considerazione anche altre proteine del checkpoint, in particolare chinasi mitotiche come MPS1 o BUB1, che modificando lo stato di fosforilazione dell'APC/C e dei suoi interattori, potrebbero svolgere un ruolo importante nella sua regolazione e nella funzione del MCC. L'aggiunta di proteine del *checkpoint* al saggio di ubiquitinazione o il trattamento con droghe in grado di bloccare selettivamente le chinasi mitotiche, potranno infatti aumentare la comprensione di questi ed altri aspetti.

L'uso del substrato radioattivo, rivelatosi essenziale per l'analisi della reazione di ubiquitinazione, rende tuttavia la manipolazione del saggio poco agevole e sicura. Da qui deriva la prospettiva di utilizzare la fluorescenza come sistema di rivelazione alternativo. A tal fine, si è proceduto alla mutazione semiconservativa di 4 serine del frammento di ciclinaB¹⁻⁸⁷ in cisteine per tentare la produzione di quattro mutanti da marcare con un fluoroforo. La marcatura fluorescente della proteina, infatti, richiede la presenza di residui amminoacidici reattivi dati, solitamente, dall' ϵ -amminogruppo della lisina o dal tiolo della cisteina. Non potendo marcare le lisine del substrato coinvolte nella formazione delle catene di ubiquitina, si è reso necessario ricorrere a residui cisteinici che però, non essendo presenti nel frammento di ciclina usato, sono stati ottenuti con la mutagenesi di quattro serine. L'utilizzo della fluorescenza potrebbe garantire al sistema di rivelazione la stessa specificità e sensibilità ottenuta con la radioattività, ma consentire contemporaneamente maggiore praticità e sicurezza nella manipolazione della reazione, permettendone magari anche una valutazione quantitativa.

Il setting dell'ubiquitinazione APC-mediata, è stato affiancato, inoltre, dalla generazione di anticorpi policlonali e monoclonali contro la subunità APC7 specifica del complesso enzimatico umano. La loro efficacia nel riconoscere ed immunoprecipitare il complesso, è stata verificata in tecniche specifiche quali *Western blotting*, immunoprecipitazione ed, in alcuni casi, immunofluorescenza, assicurando così la possibilità di utilizzare questi anticorpi anche per la purificazione dell'APC/C. L'immunoprecipitazione potrebbe infatti essere facilitata dal crosslinking di uno degli anticorpi monoclonali con le protein G beads utilizzate per la precipitazione del complesso, riuscendo così, a ridurre anche i tempi. In ogni caso, la disponibilità di anticorpi poli e monoclonali resta una risorsa utile per approfondire la comprensione dell'APC/C e del suo ruolo chiave nel ciclo cellulare.

Bibliografia

Acquaviva C., Herzog F., Kraft C., Pines J., The anaphase promoting complex/cyclosome is recruited to centromeres by the spindle assembly checkpoint, 2004 *Nature Cell Biol.*

Brown N.R. et al., The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin dependent kinases, 1999 *Nature Cell Biol.*

Carroll C. W., Enquist-Newman M. and Morgan D. O., The APC subunit Doc1 promotes recognition of the substrate destruction box, 2005 *Curr. Biol.*

Chan G.K.T., Jablonski S.A., Sudakin V., Hittle J.C., Yen J.C., Human BubR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CEN-P functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC., 1999 *J.Cell Biol.*

De Antoni A., Pearson C.G., Cimini D., Canman J.C., Sala V., Nezi L., Mapelli M., Sironi L., Faretta M., Salmon E.D., Musacchio A., The MAD1/MAD2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint, 2005 *Curr. Biol.*

Dube P., Herzog F., Gieffers C., Sander B., Riedel D., Muller S.A., Engel A., Peters J.M. and Stark H., Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C, 2005 *Mol. Cell*

Dunphy W.G., The decision to enter mitosis, 1994 *Trends Cell Biol.*

Fang G., Yu H., and Kirshner M.W., The checkpoint protein Mad2 and the mitotic regulator Cdc20 form a ternary complex with the anaphase promoting complex to control anaphase initiation, 1998 *Genes Dev.*

Fang G., Yu H. and Kirshner M.W., Direct binding of Cdc20 protein family members activates the anaphase promoting complex in mitosis and G1, 2000 *Mol. Cell*

Ge S., Skaar J.R., Pagano M., APC/C-and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation, 2009 *Cell Cycle*

Hardwick K.G., Johnson R.C., Smith D.L., Murray A.W., MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, CDC20p and Mad2p., 2000 *J. Cell Biol.*

Jin L., Williamson A., Banerjee S., Philipp I., Rape M., Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex, 2008 *Cell*

Kraft C., Vodemaier H.C., Maurer-Stroh S., Eisenhaber F. & Peters J.M., The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates, 2005 *Mol. Cell*

Kraft C., Herzog F., Gieffers C., Mechtler K., Hangting A., Pines J., and Peters J.M., Mitotic regulation of the human anaphase promoting complex by phosphorylation, 2003 *EMBO J.*

Mapelli M., Massimiliano L., Santaguida S., Musacchio M., The Mad2 conformational dimer: structure and implications for the spindle assembly checkpoint, 2007 *Cell*

Miller M.E. and Cross F.R., Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle? 2001 *J. Cell Sci.*

Morgan D.O., Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors, 1997 *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*

Nilsson J., Yekezare M., Minshull and Pines J., The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction, 2008 *Nature Cell Biol.*

Passmore L. A. et al., Doc1 mediates the activity of the anaphase promoting complex by contributing to substrate recognition., 2003 *EMBO J.*

Pflieger C.M. & Kirshner M.W., The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1, 2000 *Genes Dev.*

Rape M., Reddy S.K., Kirshner, M. W., The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation, 2006 *Cell*

Reddy S.K., Rape M., Margansky W.A. and Kirshner M.W., Ubiquitination by the anaphase promoting complex drives spindle checkpoint inactivation, 2007 *Nature*

Reimann J.D., Freed E., Hsu J.Y., Kramer E.R., Peters J.M., and Jackson P.K., Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex, 2001 *Cell*

Russo A.A., Jeffrey P.D., Pavletich N.P., Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation, 1996 *Nat. Struct. Biol.*

Stegmeier F., Rape M., Draviam V.M., Napela G., Sowa M.E., Ang X.L., McDonald E.R., III, Li M.Z., Hannon G.J., Sorger P.K., et al., Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities, 2007 *Nature*

Sudakin V., Chan G.K., and Yen T.J., Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa Cells is mediated by a complex of BubR1, Bub3, CDC20 and Mad2, 2001 *J. Cell Biol.*

Tang, Z., Li B., Bharadwaj R, Zhu H., Ozkan E., Hakala K., Deisenhofer S., Yu H., APC2 cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase promoting complex, 2001 *Mol. Biol. Cell.*

Tang Z., Bharadwaj R., Li B., and Yu H., Mad2-independent inhibition of APC^{Cdc20} by the mitotic checkpoint protein BubR1, 2001 *Dev. Cell*

Varetti G., Musacchio A., The spindle assembly checkpoint, 2008 *Curr. Biol*

Yu H., Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine, 2007 *Mol. Cell*

Zachariae W., Schwab M., Nasmyth K., and Seufert W., Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hect1 or anaphase promoting complex, 1998 *Science*

Abbreviazioni e sigle presenti nel testo

ATP= adenosina trifosfato

APC= Anaphase Promoting Complex

BUB= Budding Uninhibited by Benzimidazole

BSA= albumina di siero bovino

Cdc= Cell dependent cycle

Cdk= Cyclin-dependent kinase

CAK= Cdk-activating kinase

DAPI= 4',6-diamino-2-phenylindole

DPBS= Dulbecco's Phosphate Buffer Saline

DTT= ditioneitrato

ECL= Enhanced Chemiluminescence

EDTA= acido etilendiamminico

EGTA= Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

GSH= glutathione

GST= Glutathion-S-Transferase

HECT= E6-AP Carboxy Terminus

HEPES= acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazil-etansolfonico

IF= immunofluorescenza

IP= immunoprecipitazione

IPTG= isopropyl β -D-1-thiogalattopiranoside

MAD= Mitotic Arrest Deficient

MAPK= Mitogen-Activated Protein Kinase

MCC= Mitotic Checkpoint Complex

NTA= nitrilotriacetato

Plk1= Polo like-kinase

SAC= Spindle Assembly Checkpoint

SDS-PAGE= Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

TBS= Tri-Buffered Saline

TBST= Tri-Buffered Saline Tween20

USP44= Ubiquitin Specific Peptidase 44

WB= *Western blotting*

Ringraziamenti.

Voglio ringraziare di cuore tutti coloro che, in modi diversi, mi hanno permesso di svolgere questo lavoro attraverso il quale ho imparato molto di più di quello che mi sarei mai potuta aspettare. Grazie di cuore al Dott. Andrea Musacchio, per la possibilità che mi ha dato accogliendomi nel suo gruppo, per la fiducia e la disponibilità mai negate e per l'esempio costante di grande professionalità, in tutte le sue forme. Grazie alla Prof.ssa Marcella Camici per l'aiuto e la disponibilità garantiti sempre, oltre la distanza. Grazie al Dott. Stefano Santaguida per il supporto continuo, per l'esempio, per ogni giornata condivisa e per ogni insegnamento regalatomi, anche in silenzio. Grazie alla Dott.ssa Silvia Monzani per avermi introdotto in questo mondo con bravura e pazienza e grazie a tutti i membri del gruppo ed oltre, per la simpatia, l'aiuto e per tutto ciò che mi hanno trasmesso senza neanche rendersene conto.

Grazie a Lidia , per aver reso il trasferimento a Milano meno difficile da subito e grazie a chi in quest'anno c'è stato oltre ogni distanza, ai miei amici di sempre, così importanti e duraturi, ad Imma e Daniela, più di semplici compagne di "viaggio", a mia nonna per essere stata la prima a crederci e alla mia famiglia, tutta, perché non ha mai smesso di darmi fiducia e di "prendersi cura" di me. E un grazie speciale a Vincenza e Luca, per tutto quello che non ho bisogno di spiegargli, ai miei fratelli, indispensabili per la mia vita, a Luca, per aver "spezzato" ogni momento con me, rendendo ogni cosa migliore ed ai miei genitori, per aver reso possibile tutto e per continuare ancora oggi a farmi sembrare i sogni più reali.