

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het Aansturen van Mitose Door Cdk1 en Greatwall

Celdeling ligt aan de basis van het vormen van multicellulaire organismen waaronder ook de mens. Het delingsproces is afhankelijk van een zogenaamde celcyclus. De genetische informatie die verpakt zit in ons DNA regelt veel, zo niet alle processen die nodig zijn om deze cyclus sturen. Het menselijke genoom is opgeslagen in 23 chromosoomparen, waarvan er slechts één paar geslachtsbepalend is. Het genoom herbergt ongeveer 19.000 genen, waarvan elk is bestemd om te coderen voor één specifiek eiwit. Hoewel niet alle eiwitten essentieel zijn, hebben velen een bijzondere functie die ze belangrijk maakt voor bepaalde biologische processen. Deze functies kunnen bijvoorbeeld gericht zijn op de energieproductie in de cel die noodzakelijk is om eiwitten te bouwen, maar ook van vitaal belang is voor voortzetting van de celcyclus. De eiwitsynthese vindt met name plaats in G1 fase van de celcyclus en gaat vooraf aan de duplicatie van het genomisch DNA in S fase. Het genoom is van essentieel belang voor de levensvatbaarheid van een cel. De duplicatie ervan is nodig om zo beide kopieën te verdelen over de nieuw gevormde dochtercellen zodra de celcyclus is voltooid. Tijdens G2, een fase waarin cellen blijven groeien, worden aanvullende eiwitten gesynthetiseerd waarmee het begin van de laatste fase, mitose, kan worden ingeluid. Hier wordt het geduplicateerde genoom gescheiden en verdeeld over de twee gevormde cellen. Mechanische krachten bewerkstelligen de fysieke scheiding van de dochtercellen en zorgen er dus voor dat beide kopieën van het DNA gelijkmatig worden verdeeld (zie figuur 1, **Hoofdstuk 1**).

De belangrijkste drijvende krachten achter de celcyclus zijn enzymen die bekend staat als de Cdks, die een eiwitcomplex vormen met een ander eiwit, de cycline. Samen kunnen deze cycline-Cdk complexen een breed scala aan substraten modificeren door een proces genaamd eiwit fosforylering. Deze modificaties zijn berucht om hun regulatie van eiwit functie en zijn nodig om bepaalde cellulaire processen te sturen. De voornaamste Cdk die celdeling bevordert is Cdk1. Deze kinase werkt samen met zowel cycline A als cycline B en het zijn deze cyclines die de substraat specificiteit van Cdk1 bepalen. Er is enigszins een overlap in de substraten die gefosforyleerd worden door cycline A-Cdk1 en cycline B-Cdk1. De fosforylatie status van deze Cdk1 substraten kunnen een positief dan wel een negatief regulerend effect op het desbetreffende substraat hebben. Deze zogeheten 'phosphoregulatie' van Cdk1 substraten is van cruciaal belang om mitose te ondergaan.

Mitose wordt gestuurd door talloze kinasen die gezamenlijk de orders uitvoeren die hen worden opgedragen door hun leidinggevende, Cdk1. In **Hoofdstuk 2** hebben we onderzoek gedaan naar een kinase genaamd MASTL en de bijdrage ervan aan het celdelingsproces. We laten zien dat MASTL functioneert als de humane tegenhanger van de kinase Greatwall, en dat het nodig is voor het onderdrukken van PP2A-B55 activiteit. PP2A is een fosfatase dat Cdk1 tegenwerkt door het uitwissen van de fosforylaties die Cdk1 op zijn substraten zet. Volledig actief Cdk1 is onvoldoende om het repertoire aan mitotische substraten te

fosforyleren; de remming van PP2A-B55 is daarnaast ook nodig en vormt een extra laag van regulatie. Wij laten zien dat MASTL in mitose sterk gefosforyleerd wordt, zeer waarschijnlijk door cycline B-Cdk1. We zien dat tijdelijke uitschakeling van MASTL voorkomt dat PP2A-B55 wordt geremd in de beslissende overgang tussen G2 fase en mitose. Hoewel de cellen nog steeds in staat zijn om cycline B-Cdk1 te activeren, wordt het maximale niveau van substraat fosforylering duidelijk verlaagd. Wij leveren bewijs dat deze vermindering van cycline B-Cdk1 substraatfosforylering schadelijke gevolgen kan hebben voor de dochtercellen die na mitose gevormd worden. We laten zien dat cellen mitose kunnen ondergaan ondanks de hoge activiteit van PP2A-B55, maar vervolgens blijven steken in het eindstadium, de abscissie. Dit is het gevolg van de aanwezigheid van zogenaamde anafasebruggen, die ontstaan door de onvolledige scheiding van bepaalde chromosoomparen. Deze DNA structuren handhaven een open verbinding tussen de dochtercellen (zie ook figuur 3, **Hoofdstuk 5**). Uiteindelijk worden de anafasebruggen opgelost in de erop volgende celcyclus, wat een potentiële bron van genomische instabiliteit met zich meebrengt.

Dit werk is voortgezet in **Hoofdstuk 2 (Addendum)**, waar we onderzoek hebben gedaan naar de vermeende MASTL substraten Arpp19 en Ensa en hun relatieve bijdrage aan de remming van PP2A-B55. Het aminozuur in Arpp19 en Ensa dat door de kinase Greatwall wordt gefosforyleerd in lagere organismen blijkt ook in humane cellen essentieel om deze eiwitten te veranderen in krachtige PP2A remmers. In **Hoofdstuk 3** gaan we vervolgens dieper in op de vorming van anafasebruggen tijdens het beëindigen van mitose. We laten zien dat tijdelijke uitschakeling van MASTL de afbraak van cycline B1 blokkeert, een mechanisme dat normaal zorgt voor de inactivering van Cdk1 in mitose. Deze bevindingen verbreden ons huidige begrip van cycline B1 afbraak door het APC/C, een gigantisch eiwitcomplex dat mitotische cyclines weet te vernietigen. We zien dat MASTL bijdraagt aan de fosforylatie van het APC/C door cycline B1-Cdk1. Dit resulteert erin dat cycline B1-Cdk1 zijn eigen inactivatie mechanisme regelt met als doel cycline B1 af te breken. Wij denken dat overtollig cycline B1, aanwezig in anafase, mogelijk een remmende rol heeft op de scheiding van de chromosoomparen. Meer direct bewijs hiervoor is dat cycline B kan binden aan separase, de protease die de fysieke scheiding elk chromosoompaar regelt, en dat deze binding de activiteit van separase zou remmen. Het gevolg hiervan is dat sommige chromosomen deels verbonden blijven tijdens het beëindigen van mitose, zichtbaar als DNA verbindingen tussen de dochtercellen in G1 fase. Dit benadrukt het belang van een gecoördineerde cycline B1 afbraak, die plaats moet vinden vòòr anafase.

In **Hoofdstuk 4** zijn we een zoektocht gestart naar eiwitten die mogelijk negatief worden gereguleerd door cycline B-Cdk1. Bij onze aanpak maken we gebruik van een chemische verbinding of drug dat specifiek de activiteit van Cdk1 remt. We tonen aan dat cellen, waarin we Cdk1 activiteit deels remmen, mitose ondergaan, maar dat deze remming een ernstig probleem veroorzaakt in promotafase. Cellen met suboptimale Cdk1 activiteit kunnen hun chromosomen niet volledig uitlijnen tijdens metafase en vertragen daardoor aanzienlijk in mitose. Zodra deze cellen mitose beëindigen, produceren ze vaak niet-identieke

dochtercellen door een onevenwichtige chromosoom verdeling in anafase. Het gevolg is dat een fractie van de gevormde cellen niet levensvatbaar zijn, wat in sommige gevallen resulteert in geprogrammeerde celdood. In hetzelfde hoofdstuk beschrijven we vervolgens een elegante drug-gevoeligheids screen. In deze screen identificeren we een variant van het eiwit PRC1 (PRC1-1) en zijn bindingspartner, het motor eiwit KIF4, als belangrijkste factoren die de gevoeligheid voor Cdk1 remmende strategieën bepalen met als gevolg een fatale mitose. Onze resultaten suggereren dat cycline B1-Cdk1 een essentiële rol speelt in de remming van zowel PRC1-1 en KIF4 en daarmee een succesvolle celdeling bevordert.

Tenslotte bespreken we in **Hoofdstuk 5** de gevolgen die Cdk1 remming heeft op de celcyclus. Ook gaan we dieper in op de drempelwaarden omtrent cycline B-Cdk1 activiteit die bepalend zijn of een cel overgaat tot mitose, of, als alternatief, cellen in G2 fase stopzet. Daarnaast bespreken we hoe cycline B1-Cdk1 fosforyleringen tijdens het beëindigen van mitose worden uitgewist door PP2A-B55. Ook bespreken we hoe de verschillende fosfatasen actief worden zodra cycline B1 wordt geëlimineerd. We sluiten af door te benadrukken wat het belang is van een goede cycline B1-Cdk1 activering in de uitvoering van mitose. Eventuele gebreken in de activering kan genomische instabiliteit bevorderen, een belangrijke drijvende kracht achter het ontstaan van tumoren.