B 3590

Doktori értekezés tézisei

A G2 és M fázis szabályozásában szerepet játszó ciklinfüggő kinázok vizsgálata lucernában

Írta: Mészáros Tamás
Témavezető: Dr. Dudits Dénes

Növénybiológiai Intézet
MTA, Szegedi Biológiai Központja
1999

Szegedi Egyetemi Könyvtár
SZEGED
13.

Bevezetés

A sejtciklus-szabályozás a molekuláris sejtbiológia egyik legfiatalabb kutatási területe. A szabályozásról szerzett ismereteink döntő része az utóbbi tíz év munkáinak az eredménye. A kezdeti kutatások vizsgálati modelljei elsősorban a különböző állatfajok, élesztők és humán sejttenyészetek voltak. Ezekben a rendszerekben a sejtciklus-szabályozás központi figuráit, a CDK-ciklin komplexeket és ezek működését részletesen feltárták, és napjainkban elsősorban már azt vizsgálják, hogyan kommunikálnak a szabályozás kulcsfigurái a sejten belüli és kívüli szignálokat közvetítő molekulákkal.

A sejtosztódás az élet egyik legalapvetőbb jelensége, így nem meglepő, hogy ezen folyamat ellenőrzése az evolúció során meglehetősen konzerválódott. Az általános sejtciklus-modell a növényekre is érvényes, a sejtciklus-szabályozás középpontjában a CDK-ciklin komplexek állnak, és az ezek aktivitását befolyásoló kinázok, foszfatázok, inhibitorok képviselőit is megtaláljuk a növényekben.

A növények egyedfejlődése sokkal rugalmasabb, mint a többi magasabbrendű élőlényé. A növényi sejtek teljes életük során megőrzik totipotenciájukat, G2 fázisban is nyugalmi állapotba kerülhetnek, illetve visszaléphetnek a sejtciklusba, és az endoreduplikáció is általános jelenség a növényvilágban. A jellegzetes egyedfejlődés mellett, a merev sejtfal következtében a növényi sejtek osztódása is egyedi struktúrákon keresztül valósul meg. Mindezek hátterében egy, csak a növényekre jellemző sejtciklus-szabályozás áll.

A növényi sejtciklus-szabályozásról nincs olyan részletes képünk, mint az állati vagy élesztő sejtek esetében. Az azonban már a jelenlegi ismereteink alapján is nyilvánvaló, hogy a G2 és M fázisok kontrollja sajátságosan növényi vonásokkal rendelkezik. Ezekben a fázisokban minden más vizsgált élőlényben egy, míg növényekben legkevesebb három CDK aktív. Az aktív komplexekben a klasszikus PSTAIRE ciklinkötő motívummal rendelkező

CDK mellett csak növényekben leírt PPTALRE és PPTTLRE szekvenciarészleteket tartalmazó CDK-kat találunk. A G2 és M fázisok további finomítását teszi lehetővé, hogy szemben az állatokkal, a növényekben ezekben a fázisokban expresszáló D típusú ciklinek is ismertek, így a lehetséges CDK-ciklin komplexek száma még magasabb. Az emlős D típusú ciklinek a G0/G1 fázisok "szignálközvetítőiként" ismertek, mitogén hatásokra indukálódnak, és ennek nyomán a nyugvó sejtek belépnek a sejtciklusba. Ennek analógiájára elképzelhető, hogy a növényi, G2-ben expresszálódó D típusú ciklinek hasonló szerepet töltenek be a G2-ben nyugalomban lévő sejtek sejtciklusba lépésekor.

Célkitűzések

Csoportunk egyik fő érdeklődési területe a növényi, azon belül a lucerna sejtciklus-szabályozásának molekuláris háttere. Az ilyen irányú kutatások közel tíz éves múltra tekintenek vissza laboratóriumunkban. Munkánk nagy részében a lucerna A2 folyadék szuszpenziós kultúrát használjuk kísérleti rendszerként. A szuszpenzió legnagyobb előnye, hogy homogén, gyorsan osztódó sejtpopulációból áll, ennek következtében jól szinkronizálható. A növényi sejtciklus vizsgálatoknál ez rendkívül fontos kritérium, ugyanis jó hatékonyságú szinkron elérése távolról sem olyan egyszerű feladat, mint emlős vagy élesztő sejtek esetében. Meg kell jegyezni azonban, hogy a sejtszuszpenzió használatának megvannak a maga határai. Egy lassan egy évtizede szuszpenzió formájában fenntartott kultúra sejtjei minden bizonnyal másként viselkednek, mint az intakt növény sejtjei. Mindemellett a sejtszuszpenziós kísérletek kínálják a leghatékonyabb megközelítési módot a sejtciklus-szabályozás tanulmányozásához, és az ebből a rendszerből származó adatok nélkül elképzelhetetlen a növényi sejtciklus-szabályozás molekuláris hátterének feltárása. A csoportunkhoz

történt csatlakozásomkor már hat különböző lucerna CDK gént izoláltak laboratóriumunkban. A további munkák során először a gének mRNS-szintjének változását vizsgáltuk a sejtciklus során. Ezt követően specifikus ellenanyagokat állítottunk elő, és a fehérjék mennyiségét leellenőriztük. Végül az ellenanyagok segítségével a tisztított CDK komplexek közül kettőnek az aktivitását mértük. Ezen munkák eredményeit részletesen közöltük. Dolgozatomban azokról a munkákról számolok be, amelyekkel a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen biokémiai eltérések mutathatók ki az egyes CDK komplexek között?
2. Mely CDK komplexek aktívak a G2 és M fázisokban? Milyen időrendi sorrendben működnek a komplexek ezekben a fázisokban?
3. Van-e szerepe a növényi CDK komplexek kinázaktivitásának szabályozásában a tirozin foszforilációnak?
4. Szerepet kapnak-e a vizsgált lucerna CDK-k az intakt növények sejtciklus-szabályozásában?
5. Hogyan befolyásolják a különböző növényi hormonok a CDK komplexek aktivitását?

Alkalmazott módszerek

-folyadék szuszpenziós *Medicago varia L.* A2 sejtvonal tenyésztése

-sejtszinkronizálás afidikolinnal és roscovitine-nel

-sejtciklus fázisok nyomonkövetése áramlásos citometriával és mitotikus index meghatározásával

-poliklonális ellenanyagok előállítása és tisztítása

-bakteriális rendszerben túltermeltetett fehérjék tisztítása

-CDK komplexek affinitástisztítása immunoprecipitálással, illetve $p13^{suc1}$-agaróz felhasználásával

-in vitro kinázreakció
-cdc25 foszfatáz kezelés
-immunoblott analízis
-polimeráz láncreakció
-RNS-tisztítás és Northern blott analízis

Eredmények és következtetések

1. Munkánk során biokémiai vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy az egyes CDK-k alkotta komplexeknek eltérő a szubsztrátspecifitása, az inhibitorérzékenysége és a $p13^{suc1}$-kötő képessége is.

Szubsztrátspecifitás vizsgálatainkkal kettős célunk volt. Egyrészt a cdc2MsD komplex az általánosan in vitro szubsztrátként használt hiszton H1-t nagyon gyengén foszforilálta, így a megfelelő szubsztrát azonosítása elengedhetetlen volt a kináz további tanulmányozásához. Másrészt az in vitro szubsztrátok meghatározása megadja a lehetséges in vivo szubsztrátok körét, így alapul szolgál a kinázok funkcionális elemzéséhez. Kísérleteink során a lucerna CDK komplexet immunoprecipitálással tisztítottuk, majd a megfelelő szubsztrátokkal meghatároztuk kinázaktivitásukat. A kísérletek eredményei alátámasztották a CDK-k sejtciklus-szabályozásban betöltött feltételezett szerepét. Az Rb a G1/S fázisokban foszforilálódik, ezáltal lehetővé válik a fázisspecifikus gének átírása. A transzkripció elindításához RNS polimerázII CTD-jának foszforilációja elengedhetetlen, mivel az M fázisban nincs transzkripció, így a CTD defoszforilált ebben a fázisban. Fentiekkel összhangban mindkét fehérjét csak a G1 és S fázisokban aktív kináz komplex, a Cdc2MsA/B foszforilálta in vitro körülmények között.. Ezzel szemben a G2 és M fázisokban aktív cdc2MsD és cdc2MsF kináz komplexek az elsősorban ebben a fázisokban foszforilálódó és aktiválódó TopoizomerázII-t foszforilálták. Az in vivo szintén G2 és M fázisokban foszforilált hisztonH1-t a G2/M specifikus komplexek közül csak a Cdc2MsF

használta szubsztrátként. Vizsgálataink során a G1 és G2 fázisokban egyaránt aktív cdc2MsA/B rendelkezett a legszélesebb szubsztrátspecifitásssal, így a hisztont és a topoizomerázt is foszforilálta. A CDK-k szubsztrátspecifitásában tapasztalt különbségek a komplexek eltérő in vivo szerepére utalhatnak. Ezen eredmények alapján elkezdtük kinázok in vivo szubsztrátjainak azonosítását is.

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a különböző purin analógok mennyire szelektíven hatnak az egyes lucerna CDK komplexekre. Kísérleteinkben három jól ismert inhibitort, az olomoucine-t, a bohemine-t és a roscovitine-t használtuk. A növényi kinetin analóg benzamino-purin kontrollként szolgált. Az A2 lucerna sejtszuszpenzióból immunoprecipitáltuk a Cdc2MsA/B, Cdc2MsD és Cdc2MsF komplexet, majd a tisztított kináz komplexek aktivitását változó koncentrációjú inhibitor jelenlétében mértük. A kísérletek bizonyították, hogy a különböző lucerna CDK-k eltérő inhibitor-érzékenységet mutatnak. A Cdc2MsA/B kinázok legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb inhibitor-koncentrációval gátolhatók, mint a Cdc2MsF komplexek. A Cdc2MsD kináz még kevésbé érzékeny a vizsgált inhibitorokra, aktivitása 200 μM inhibitor jelenlétében is csak közel felére esett vissza, ami megfelel a kontrollként alkalmazott BAP kezelés esetében tapasztalt aktivitás csökkenésnek.

A szinkronizált A2 sejtszuszpenzió fehérje kivonatokat immobilizált $p13^{suc1}$ fehérjével affinitás tisztítottuk, majd az így nyert komplexeket specifikus lucerna CDK ellenanyagok használatával teszteltük. A vizsgálat eredményeként kimutattuk, hogy a Cdc2MsA/B és Cdc2MsF kinázok jól kötődnek a hasadó élesztő $p13^{suc1}$ fehérjéjéhez. Ezzel szemben a Cdc2MsD komplexek ezzel az eljárással nem tisztíthatók a lucerna nyers fehérjekivonatból. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a $p13^{suc1}$ affinitás tisztítás lucerna esetében is jól alkalmazható a sejtosztódási aktivitás meghatározására. Az ily módon izolált komplexek a G1/S és G2/M fázisok kinázaktivitásáról is felvilágosítást adhatnak, mivel kötik mind a cdc2MsA/B, mind a cdc2MsF komplexeket.

A növényi sejtciklus kutatásnak még mindig az egyik alapvető problémája, hogy mely CDK-k mely ciklinekkel lépnek kapcsolatba. Számos laboratórium többféle kísérleti rendszer alkalmazásával keresi a választ erre a kérdésre, ennek ellenére sem sikerült eddig egyértelműen igazolni a komplexek létét. A fent vázolt biokémia vizsgálatok eredményeinek felhasználásával egy újabb megközelítési mód áll rendelkezésünkre, mellyel igazolhatjuk az egyes CDK-k és ciklinek közötti kapcsolatot.

2. A megfelelő in vitro kináz szubsztrátok azonosítása lehetővé tette mindhárom CDK aktivitásának mérését. Ennek segítségével elsőként igazoltuk, hogy a G2 és M fázisokban legalább három CDK aktív. A konzervatív, A típusú cdc2MsA/B mellett két B típusú CDK, a cdc2MsD és cdc2MsF is rendelkezett in vitro kináz aktivitással ezekben a fázisokban. A roscovitine alkalmazásával G2-ben blokkolt sejtek vizsgálata bizonyította, hogy a Cdc2MsA/B, az inhibitorra érzékeny kináz elengedhetetlen a G2-es átmenethez, ugyanis az ily módon kezelt sejtekben semmiféle mitotikus struktúra nem alakult ki. Ezekben a sejtekben a cdc2MsF sem fejeződött ki, ami igazolja, hogy a cdc2MsF specifikusan a mitózisban játszik szerepet. Munkatársam immunolokalizációs vizsgálatai szerint a kináz preprofázisos sávon, a profázisos és a metafázisos orsón és a fragmoplaszton helyezkedett el, ezzel is megerősítve a cdc2MsF mitotikus funkcióját. A dolgozatban bemutatott kinázaktivitás mérések és korábbi eredményeink alapján felállíthatunk egy komplex képet a CDK-k sejtciklus során bekövetkező mRNS-, fehérjeszint valamint aktivitás változásáról.

3. Az eddig leírt növényi CDK-k mindegyike rendelkezik a konzervatív Tyr15 aminosavval, és az is általánosan elfogadott tény, hogy a tirozin-foszforilációnak szerepe van a növényi sejtciklus-szabályozásban. Az eddig elvégzett vizsgálatok azonban arról nem adtak felvilágosítást, hogy mely CDK-k foszforilálódnak tirozinon, és hogy a Tyr15 érintett-e ebben a posztranszlációs módosításban. Munkánk során több oldalról bizonyítottuk a

Cdc2MsA/B kináz tirozinfoszforiláltságát. Először foszfotirozin-specifikus ellenanyag alkalmazásával kimutattuk, hogy egy, a Cdc2MsA/B molekulatömegének megfelelő fehérje tirozonfoszforiláltsága a sejtciklus során fluktuál. A tirozinfoszforiláltság mértéke fordított arányban állt az immunoprecipitált Cdc2MsA/B komplexek in vitro kinázaktivitásával. A megfelelő méretű fehérjét, a Tyr15 régióra specifikus foszfotirozin ellenanyaggal is detektáltuk. A cdc2MsA/B-nek megfelelő fehérje a $p13^{suc1}$ affinitástisztított komplexekben is kimutatható volt mindkét foszfotirozin ellenanyaggal. A $p13^{suc1}$ komplexek in vitro kinázaktivitását a heterológ cdc25 foszfatázkezelés megemelte. Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a CDK-k közül csak a klasszikus PSTAIRE motívummal rendelkező Cdc2MsA/B foszforilálódik, mégpedig a Tyr15 aminosavon, és ezen módosítás gátolja a kináz aktivitását. Jelenleg további kísérleteket végzünk feltételezésünk egyértelmű bizonyítására.

4. Az általunk vizsgált CDK-k sejtosztódásban betöltött szerepét különböző lucernarészek felhasználásával bizonyítottuk. Fehérjekivonatot készítettünk osztódó és nem osztódó sejteket tartalmazó növényi szövetekből, majd a mintákat immunoblott analízissel és in vitro kinázaktivitás méréssel vizsgáltuk. Az így kapott eredmények megerősítették mind a három CDK sejtosztódásban betöltött szerepét. A lucerna A típusú CDK-k (Cdc2MsA/B) fehérjemennyisége és in vitro kinázaktivitása is többszöröse az osztódó szövetekben (hajtáscsúcs, gyökércsúcs), mint a nem osztódókban (hajtás, gyökér és levél). A két B típusú CDK esetében (Cdc2MsD, Cdc2MsF) a változások még szembetűnőbbek. A nem osztódó szövetekben a megfelelő fehérjéket nem tudtuk kimutatni, és az in vitro kinázaktivitás is nagyon alacsony volt. Ezzel szemben az osztódó szövetekben a Cdc2MsD és Cdc2MsF fehérjék jól detektálhatók, és in vitro kinázaktivitásuk is nagyságrendekkel magasabb. Mindezeket figyelembe véve, az intakt növényeken végzett kísérleteink igazolják a három CDK sejtosztódásban betöltött szerepét.

5. A növényi hormonok és a sejtosztódás közötti kapcsolat jól ismert, de ennek molekuláris hátterét még nem ismerjük. A dolgozatban ismertetett levél hormonkezeléses vizsgálatok a CDK-k és hormonok viszonyáról adtak felvilágosítást. A várakozásoknak megfelelően a mitogén hatású 2,4-D kezelés stimulálta, míg az antagonista ABA alkalmazása gátolta a CDK komplexek aktivitását. Érdekes módon a kinetinkezelés önmagában nem okozott aktivitásemelkedést, de fokozta a 2,4-D kiváltotta hatást. A Cdc2MsA/B fehérje szintjét leellenőrizve azt tapasztaltuk, hogy a 2,4-D kezelés hatására megjelenő fehérje mennyisége nem növelhető kinetin hozzáadásával. A mitogén hormonokkal szemben az ABA kezelés eredményeként csökkent mennyiségű Cdc2MsA/B fehérjét detektáltunk. Ezek a kísérletek, annak ellenére, hogy a levélsejteknek csak néhány százaléka reagált a kezelésekre, egyértelműen bizonyítják a hormonok és a CDK-k közötti kapcsolatot. Jelenleg az ilyen irányú kutatásaink a homogénebb levélprotoplaszt rendszeren folynak. A protoplasztok nagy része válaszol a hormonkezelésre, így a sejtciklus fázisok gyakorisága is jól mérhetően változik az alkalmazott hormonok hatására. A kinázaktivitás változásokat összekapcsolva a sejtciklus fázisokra vonatkozó adatokkal, részletesebb képet kaphatunk a hormonok és a sejtciklus-szabályozás közötti viszonyról.

Publikációs lista

1. Magyar Z., **Mészáros** T., Fehér A., Brown S., Deák M., Bottka S., Györgyey J., Pongor S. and Dudits D. (1996) Expression of CDK gene variants and p34^{cdc2}-related protein kinase activities in synchronized alfalfa cells. In. Protein Phosphorylation in Plants e.d. P.R.Shewry, Oxford University Press pp. 197-209

2. Z. Magyar, **T. Mészáros**, P. Miskolczi, M. Deák, A. Fehér, S. Brown, É. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, M. Bilgin, L. Bakó, Cs. Koncz and D. Dudits (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. The Plant Cell, vol. 9, 223-235.

3. Dudits D., Magyar Z., Deák M., **Mészáros T.**, Miskolczi P., Fehér A., Brown S., Kondorosi É., Athanasiadis A., Pongor S., Bakó L., Koncz Cs. and Györgyey J. (1998) Cyclin-dependent and calcium-dependent kinase families: response of cell division cycle to hormone and stress signals. In Plant Cell Division: Molecular and Developmental Control, eds D. Francis, D. Dudits and D. Inzé, Portland Press, London 21-46

4. Z. Kele, T. Janáky, **T. Mészáros**, A. Fehér, D. Dudits and P. T. Szabó (1998) Capillary chromatography/microelectrospray mass spectrometry used for the identification of putative cyclin-dependent kinase inhibitory protein in Medicago. Rapid Comm. Mass Spectrom. 12: 1564-1568

5. **T. Mészáros**, P. Miskolczi, F. Ayaydin, A. Pettkó-Szandtner, A. Peres, Z. Magyar, G. V. Horváth, L. Bakó, A. Fehér and D. Dudits (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. Plant. Mol. Biol. (elfogadva)

6. T. Pasternak, P. Miskolczi, F. Ayaydin, **T. Mészáros**, D. Dudits, A. Fehér (2000) The role of auxin and cytokinin in the reactivation of cell division cycle in alfalfa leaf protoplasts. J. of Plant.Growth Reg. (elfogadva)

7. F. Ayaydin, E. Vissi, **T.. Mészáros**, P.Miskolczi, I. Kovács, A. Fehér, V. Dombrádi, P. Gergely and D. Dudits, Phospatase inhibitor endothall leads early 'microtubular' entry into mitosis and premature activation of alfalfa cdc2MsF kinase at G2/M border Plant J. (beküldve)

8. S. Davletova, **T. Mészáros**, P. Miskolczi, A. Oberschall, K. Török, Z. Magyar, D. Dudits and M. Deák, Differential expression of a novel member of the calcium-dependent calmodulin independent protein kinase during somatic embryo induction and cell cycle progression in alfalfa. Plant . Mol . Biol. (beküldve)

9. **T. Mészáros**, P. Miskolczi, D. Dedeoglu, F. Setenci, L. Bakó, M. Deák, Z. Magyar and D. Dudits, The effect of hormone treatment on cyclin dependent kinase complexes. Cell Biology International 1996, Vol. 20, No. 3, 219-47 (absztrakt)

10. Z. Magyar, **T. Mészáros**, M. Deák, E. Vissy, V. Dombrádi, P. Gergely, P. Miskolczi and D. Dudits, New members of alfalfa CDK gene family protein complexes with CDK and phosphatase activity in synchronized cells. Cell Biology International 1996, Vol. 20, No. 3, 219-47

11. **T. Mészáros**, Z. Magyar, P. Miskolczi, F. Ayaydin, A. Peres, S. Brown, D. Dudits and A. Fehér (1997) Differential regulation of cyclin-dependent kinase complexes during cell cycle progression in hormone treated cells. In: Protein phosphprylation in Plants. Proc. of the second Intern. Eur. Symp., eds.:Gadal P., Kreis M., Dron M., Brulfert J., Bergounioux C. and Vidal J. Universite de Paris-Sud, Orsay, France, 65-66 (absztrakt)

12. A. Fehér T. Pasternak, F. Ayaydin, **T. Mészáros**, P. Miskolczi, Zs. Kelemen, L. Bögre, F. Laureys, H. Van Onckelen, D. Dudits, Hormones and stress in the induction and regulation of cell division in cultured alfalfa cells (1999) Biologia Planatarum 42 (Suppl.): S63 (absztrakt)