

**Doktori értekezés tézisei**

**Új típusú ciklin-függő kináz inhibitor  
fehérje lucernából**

**Írta: Pettkó-Szandtner Aladár  
Témavezető: Horváth Gábor  
és Dudits Dénes**

**Növénybiológiai Intézet  
MTA, Szegedi Biológiai Központja  
2006**

## Bevezetés

A sejtciklus szabályozás a molekuláris sejtbiológia egyik legfiatalabb kutatási területe. A szabályozásról szerzett ismereteink döntő része az utóbbi tizenöt 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 kulcsfehérjéi 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 növényi sejtciklus legkésőbb felismert komponensei a CDK inhibitorok. Növényekben csupán egy inhibitor család található, a tagok az aminosav szekvencia alapján igen nagymértékben eltérnek mind az élesztő, mind az állati inhibitor fehérjétől. Épp csak elkezdődött a növényi inhibitorok alapvető tulajdonságainak tisztázása. Először Wang és munkatársai izoláltak növényi CDK inhibitorot *Arabidopsis*-ből. Élesztő kettős-hibrid rendszer segítségével kerestek CDKA (az egyetlen A-típusú *Arabidopsis* CDK) illetve CycD3;1 kölcsönható fehérjéket, melyeket ICK-knak neveztek el (interactors of CDK). A család első két megtalált és jellemzett tagja az ICK1 és ICK2 (Wang és mtsai 1997, 1998; Lui és mtsai 2000), a továbbiakat immár KRP néven (Kip related protein) De Veylder és munkatársai 2001-ben írták le.

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 sejtciklus fázisok kontrollja sajátosan 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 szekvenciárszleteket tartalmazó CDK-kat találunk. A G2 és M fázisok további finomítását teszi lehetővé, hogy szemben az állatokkal, a növényekben ezekben a fázisokban expresszázó 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 expresszázó D típusú ciklinek hasonló szerepet töltenek be a G2-ben nyugalomban lévő sejtek sejtciklusba lépésekor.

## **Célkitűzések**

Csoportunk fő érdeklődési területe a növényi sejtciklus szabályozásának molekuláris háttere. Az ilyen irányú kutatások több mint tizenöt éves múltat 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 sejtsuszpenzió használatának megvannak a maga határai. Egy lassan egy évtizede szuszpenzió formájában fenntartott kultúra sejtjei minden bizonnyal másként viselkednek, mint a kifejlett növény különböző sejtjei. Mindemellett a sejtsuszpenziós 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 csoporthoz történt csatlakozásomkor már hat különböző lucerna CDK és három ciklin gént izoláltak laboratóriumunkban.(Magyar és mtsai 1997.) Szakdolgozatom témáját a csoportban az MSV vírus replikációs fehérjéjének élesztő kettős-hibrid rendszerben történő vizsgálata volt (Horváth és mtsai 1998). Így PhD hallgatóként a különböző lucerna CDK-k kölcsönható partnereinek élesztő kettős-hibrid rendszer felhasználásával történő azonosítása lett a feladatomban. Dolgozatomban azokról a munkákról számolok be, amelyekkel a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen kölcsönható partnerei vannak a különböző lucerna CDK-knak élesztő kettős-hibrid rendszerben?
2. Mely más növényi sejtciklus komponensekkel hatnak kölcsön az így kapott partnerek?
3. Milyen hatások befolyásolják a CDK inhibitor gén kifejeződését?
4. Képes-e gátolni a CDK inhibitor homológ (KRP) a különböző lucerna CDK komplexeket?
5. Milyen aktivitásbeli következményei vannak az inhibitor foszforilációjának?
6. Milyen szerepe lehet a Ca<sup>2+</sup>-függő kinázoknak és az inhibitor fehérjének a Ca<sup>2+</sup> jelátviteli utak és a sejtciklus szabályozása közötti kapcsolat megteremtésében?
7. Hol foszforilálják a KRP-t a különböző kinázok és mi ennek a hatása?

## **Eredmények és következtetések**

Munkánk során több fontos sejtciklus gént izoláltunk lucernából elsőként, melyek közül jelen dolgozatban elsősorban a lucerna ciklin-függő kináz inhibitor, a KRPMt jellemzését mutattuk be.

1. A *KRPMt* egy új növényi CDK inhibitor fehérje, mely a pusztai aminosav sorrend hasonlóságok és eltérések alapján nem sorolható be egyértelműen egyetlen eddig jellemzett *Arabidopsis* KRP ortológjaként sem. A legjelentősebb aminosav azonosságot (30%) a KRP4-gyel és KRP3-mal mutatja, megtalálható benne a korábban azonosított hat konzervált aminosav szakasz, melyek közül azonban csak az első három, minden KRP génben megtalálható domén az, melyhez funkciót tudunk kötni. Az első két szakasz a CDKA és D-típusú ciklinek kötéséhez is elengedhetetlen, a harmadik csupán a ciklin-kötést befolyásolja. Az *in silico* vizsgálatok alapján képesek voltunk egy hetedik konzervált motívumot is fölterképezni a 3. és 4. motívum között. A *KRPMt* sejtmagi lokalizációs szignált és a degradációért felelős PEST motívumot tartalmaz.

2. A *KRPMt* génkifejeződéséről megállapítottuk, hogy minden vizsgált lucerna szövetben illetve sejtszuspenzióban kimutatható. A *KRP*-kről általánosságban is elmondható, hogy differenciálódott szövetekben a merisztematikus régiótól távolodva fokozott génkifejeződést mutatnak. Sejtszuspenziók vizsgálata során is kimutatható, hogy a szuspenzió öregedésével egy időben a *KRPMt* expressziója fokozódik. A génkifejeződés jelentősen erősödik sóstressz hatására, mintegy tizenötszörös mértékben. A stressz válaszokban szerepet játszó hormon, az abszcizinsav hatására is csaknem nyolcszorosára emelkedett az mRNA szint a kezelést követő második órában és ez a fokozott génkifejeződés még két nappal a kezelés után is kimutatható volt, ha csökkenő mértékben is.

3. Az inhibitor fehérjéről élesztő kettős-hibrid vizsgálattal bizonyítottuk, hogy képes kölcsönhatni a lucerna CDKA;1-gyel, illetve a D-típusú ciklinekkel. Az N-terminális 96 aminosavat nem tartalmazó fehérje, jelentősen erősebb kölcsönhatója mind a CDKA-knak, mind a D-típusú ciklineknek, mind a teljes hosszúságú. Ezenkívül képes kölcsönhatásba lépni a mitotikus B-típusú ciklinekkel is. Pull-down kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a B-típusú CDK-k is

együtt tisztíthatóak a rekombináns KRPMt-vel, feltehetően a ciklin D4, mint közös kölcsönható fehérjén keresztül. Ezekkel a tisztítási kísérletekkel először bizonyítottuk, hogy egy KRP képes kölcsönhatni B-típusú CDK-kal is.

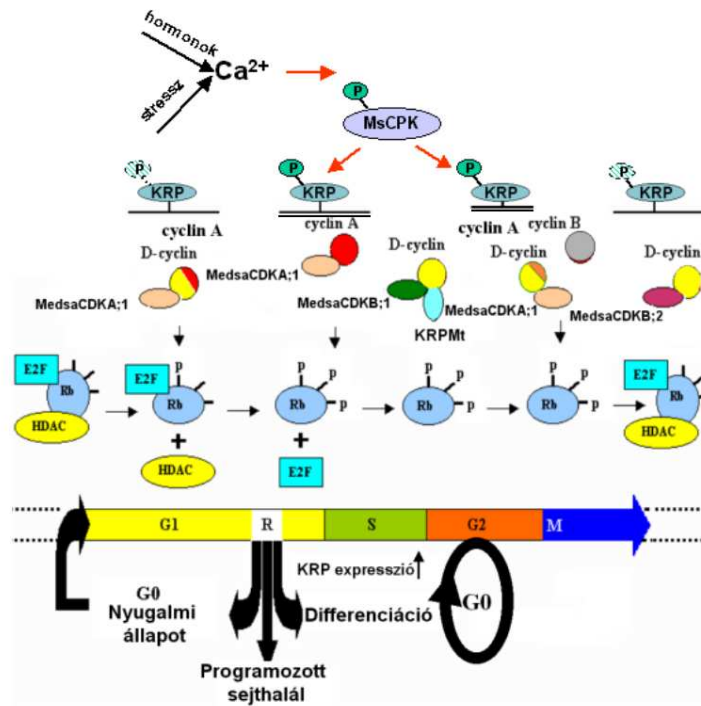
4. A KRPMt különböző mértékben képes gátolni a lucerna ciklin-függő kináz komplexeket, valamint a sejtciklus különböző szakaszaiban lévő sejtekből tisztított kináz együttesekre is differenciáltan hat. A KRPMt gátlására legérzékenyebb CDK, a MedsaCDKB2;1, ami a KRPMt-vel való nagyfokú együtt-tisztíthatóság és a Medtr;CYCD4-gyel való erős kölcsönhatása alapján magyarázható. Elsőként bizonyítottuk be, hogy B-típusú CDK-t gátolhat KRP. A MedsaCDKB1;1-et és a mitotikus ciklinekkel (a MedsaCYCB-vel) nyerhető kinázfrakciót a KRPMt nem gátolja. A MedsaCDKA kinázkomplexet, a p13<sup>Suc1</sup> kötött kinázokat valamint az A-típusú ciklinekkel együttes kinázokat hasonló képpen gátolja az inhibitor fehérje. Megállapítottuk továbbá, hogy a KRPMt erősebb inhibitora a G2/M-fázisban lévő CDKA aktivitásnak, mint az S-fázisú sejtekből izoláltak. A kinázok különböző szubsztrátainak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy nincs jelentős eltérés a gátlás erősségében akkor ha hisztonH1 helyett lucerna retinoblasztóma homológ fehérjét használunk szubsztrátként. Ugyanakkor a humán p107 retinoblasztóma homológ fehérje foszforilációja a sejtciklus S és G2/M-fázisaiban is érzékenyebb volt a KRPMt-vel történő gátlásra.

5. A KRPMt foszforilálható, mind a növényi CDK-k mind pedig a kalmodulin-szerű domén fehérje kináz, az MsCPK3 által. Foszfopeptid és foszfoaminosav térképezési kísérleteink alapján valószínűsíthető, hogy a CDKA és az MSCPCK3 hasonló helyen és hasonló szereppel foszforilál. Ugyanakkor feltételezzük, hogy a CDKB1;1 foszforilációja más helyen következik be és szerepe nem a fehérje aktivitásának növelése, hanem a proteozómán keresztüli lebontás elindítása.

6. A kalmodulin-szerű domén fehérje kináz, az MsCPK3, okozta foszforilációról bizonyítottuk, hogy jelentősen növeli az inhibitor fehérje gátlóképességét, már a fehérje kis mértékű foszforilációja esetén, illetve kis mennyiségű inhibitor fehérje alkalmazása esetén is. Ez a jelenség felveti a KRP-k,  $Ca^{2+}$ -függő jelátviteli utak és a sejtciklus szabályozás közötti összekötő szerepét.

7. Bebizonyítottuk, hogy a fehérje 91. szerin aminosava biztosan szerepet játszik a molekula foszforilálásában. Bemutattuk, hogy az MsCPK3 kináz csupán a teljes hosszúságú illetve a 88-223. aminosavat tartalmazó KRPMt-t foszforilálja, de a 97-223 azaz a 91, szerint mar nem tartalmazót nem. Az elkészített 91. aminosav mutációs változatok vizsgálata alapján valószínűsíthető, hogy az ezen aminosavon bekövetkező foszforiláció valóban fokozza a fehérje gátló képességét.

A következő vázlatos ábrán mutatjuk be összefoglalva azt a lucerna sejtciklus modellt, amelyet a kísérleteink alapján föllálítható.



### A lucerna sejtciklus vázlatos modellje

A lucernában az emlősöknél megismert sejtciklus komponensek legtöbbje megtalálható. Az összefoglaló ábrán a sejtciklus előrehaladása során különböző időben megjelenő CDK-kat tüntettük föl ciklin kölcsönható partnereikkel (Mészáros és mtsai 2000), a szabályozó KRPMt inhibitorral és a szubsztrát reinoblasztóma-homológ fehérjével (Rb). A MedsaCDKA;1 a sejtciklus egész folyamán aktív, képes komplexet alkotni a különböző sejt-fázisokban kifejeződő ciklinekkel. A G2-fázisban először a MedsaCDKB;1 jelenik meg és lép kölcsönhatásba a D4-ciklinnel. Ezt követően a G2/M fázisban erős aktivitást mutat a MedsaCDKB;2 és a D4-ciklin együttese. Ábrázoltuk a KRPMt *in vitro* kinázreakciókból megismert gátló, illetve stabilizáló funkcióit, valamint az általunk feltételezett szerepét a  $Ca^{2+}$ -függő jelátviteli utak és a sejtciklus szabályozás összehangolásában. Megállapítottuk, hogy a KRPMt a sejtciklus minden fázisában gátolja a MedsaCDKA;1 kinázt. Az inhibitor hatására legérzékenyebb a G2/M fázisban szerepet játszó MedsaCDKB;2, azonban a MedsaCDKB;1 és a vele kölcsönható D-típusú ciklin esetében az inhibitor fehérje stabilizáló szerepet játszhat. A KRPMt foszforilálatlan és foszforilált állapotban is aktív, valószínűsíthető, hogy a kalcium-függő kinázok aktiváló hatású foszforilációja összeköttetést jelent a  $Ca^{2+}$ -függő jelátviteli utak és a sejtciklus szabályozása között.

Aktiválás:  $\rightarrow$  gátlás:  $\perp$  fokozott gátlás:  $\perp\perp$



## Publikációs lista

1. **Pettkó-Szandtner A.**, Mészáros T., Horváth G.V., Bakó L., Csordás-Tóth É., Blastyák A., Zhiponova M., Miskolczi P., Dudits D. (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase *The Plant Journal* (in press)  
**IF: 6.367**
2. Miroslava K. Zhiponova, **Aladár Pettkó-Szandtner\***, Éva Stelkovic, Zsuzsanna Neer, Sándor Bottka, Tibor Krenács, Attila Fehér, Dénes Dudits, and László Szilák (2006) Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (*Medsa;CDKB2;1*) is activated by wounding, and ethylene, in a non-cell division dependent manner. *Plant Physiology* (in press) \* azonos hozzájárulás  
**IF: 5.881**
3. Fülöp, K., **Pettkó-Szandtner, A.**, Magyar, Z., Miskolczi, P., Kondorosi, É., Dudits, D. and Bakó, L. (2005) The *Medicago* CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *The Plant Journal*, 42: 810-820  
**IF: 6.367**
4. Lendvai Á., **Pettkó-Szandtner A.**, Horváth G.V., Csordás-Tóth É., Györgyey J. and Dudits D. (2004) The number of retinoblastoma genes may reflect phylogenetic divergence of dicot and monocot plants. *Comparative Biochemistry and Physiology* 137/A: S248  
**IF: 1,556**
5. **Pettkó-Szandtner A.**, Csordás-Tóth É., Mészáros T., Horváth G.V., Bakó L. and Dudits D. (2004) *Medicago* CDK inhibitor. *Comparative Biochemistry and Physiology* 137/A: S248-S253  
**IF: 1.556**
6. Mészáros, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., **Pettkó-Szandtner, A.**, Peres, A., Magyar, Z. Horvath, G.V., Bakó, L., Fehér, A. and Dudits, D. (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol. Biol.* 43: 595-605.  
**IF: 3.510**
7. Horváth, G.V., **Pettkó-Szandtner, A.**, Nikovics, K., Bilgin, M., Boulton, M., Davies, J.W., Gutierrez, C. and Dudits, D. (1998) Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis, *Plant Molecular Biology*, 38: 699-712  
**IF: 3.510**
8. **Pettkó-Szandtner A.** és Horváth G. V. (2005) Élesztő kettős hibrid rendszer a fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására In: Alapvető Molekuláris Biológiai Módszerek, DOTE (Szerk: Dombrádi Viktor) (egyetemi jegyzet)
9. P. Miskolczi, **A. Pettkó-Szandtner**, G.V. Horváth, D. Dudits, A. Fehér, J. Györgyey A novel plant cyclin /*Medicago* cyclin D patent; EP 00870133.6 (16 June 2000) PCT/EP01/06771 (szabadalom)
10. Lendvai Á., **Pettkó-Szandtner A.**, Csordás-Tóth É., Horváth G. V., Györgyey J. and Dudits D.\* Dicot and Monocot plants differ in the complexity of Retinoblastoma-related Protein Subfamilies *Plant Molecular Biology* (beküldve)
11. Bihari, Z., **Pettkó-Szandtner, A.**, Csanadi, G., Balázs, M., Bartos, P., Kesseru, P., Kiss, I. and Mecs, I. Characterization of a novel n-alkane-degrading strain, *Acinetobacter haemolyticus* AR-46 *Applied Microbiology and Biotechnology* (beküldve)