

Doktori értekezés

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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	1. oldal
I. Bevezetés	3. oldal
II. Irodalmi áttekintés	5. oldal
II.1. A sejtcikluskutatás kezdete	5. oldal
II.2. Miért vizsgáljuk a növényeket?	7. oldal
II.3. Ciklinfüggő kinázok	7. oldal
II.4. Ciklinek	9. oldal
II.5. Ciklinfüggő kinázok foszforilációja	14. oldal
II.6. Ciklinfüggő kináz inhibitorok	18. oldal
II.7. Ciklinfüggő kináz komplexek tisztázatlan szerepű fehérjéi	20. oldal
II.8. Ciklinfüggő kináz komplexek lokalizációja	22. oldal
II.9. Növényi hormonok és a sejtciklus	23. oldal
II.10. A növényi sejtciklus-szabályozás egy lehetséges modellje	26. oldal
III. Célkitűzések	28. oldal
IV. Kísérleti eredmények és értékelésük	30. oldal
IV.1. A lucerna CDK-k szubsztrátspecifitása különböző	30. oldal
IV.2. A purin analógok szelektíven gátolják az a típusú CDK-kat	33. oldal
IV.3. A p13suc1 fehérje differenciáltan köti a CDK komplexet	35. oldal
IV.4. A G2/M fázisban legkevesebb három CDK működik	36. oldal
IV.5. A Cdc2MsF aktivitása a mitózisra korlátozódik	37. oldal
IV.6. A Cdc2MsA/B aktivitását a tirozinfoszforiláció gátolja	43. oldal
IV.7. A CDK komplexek az osztódó növényi részekben aktívak	47. oldal
IV.8. A mitogén hormonok növelik, az ABA csökkenti a CDK aktivitást	48. oldal
V. Összefoglalás	53. oldal
VI. Anyagok és módszerek	57. oldal
VII. Irodalomjegyzék	64. oldal
VIII. Függelék	72. oldal

Publikációs lista	72. oldal
Köszönetnyilvánítás	74. oldal
Thesis of PhD	75. oldal

Rövidítések jegyzéke

2,4-D	2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
ABA	abszcizinsav
APC	M fázisban aktív ubikvitin ligáz komplex
BAP	benzamino-purin
CAK	CDK aktiváló kináz
Cdc13	hasadó élesztő ciklin
Cdc2	hasadó élesztő ciklinfüggő kináz
Cdc25	Tyr15/Thr14 defoszforilációjáért felelős foszfatáz
cdc28	sarjadzó élesztő ciklinfüggő kináz
CDK	ciklinfüggő kináz
Cip/Kip	emlős CDK inhibitor család
CKI	ciklinfüggő kináz inhibitor
Cks	CDK-ciklin komplexek alegysége
Clb	sarjadzó élesztő ciklin
Cln	sarjadzó élesztő ciklin
CTD	C-terminális domén
Cyc	ciklin
DAPI	4,6-diaminido-2-fenilindol (DNS festék)
E2F	sejtosztódásban szerepet játszó transzkripció faktor
Far1	sarjadzó élesztő CDK inhibitora
GUS	β -glükoronidáz
IAA	indolecetsav
ICK1	Arabidopsis CDK inhibitor
INK4	emlős CDK inhibitor család
KAP	Thr161 defoszforilációjáért felelős foszfatáz
MAT1	CAK komplex összeállítását elősegítő fehérje
MBF	sarjadzó élesztő transzkripció faktor
MBP	mielin bázikus fehérje

MO15	CAK komplex kináz alegysége
MPF	M fázist elősegítő faktor
Myt1	Tyr15/Thr14 defoszforilációjáért felelős foszfatáz
NAA	naftilecetsav
PIA	radioaktív membránok értékelésére alkalmas készülék
R2	rizs CAK
Rb	retinoblasztoma, tumorszupresszor fehérje
SBF	sarjadzó élesztő transzkripció faktor
SCF	G1/S fázisban aktív ubikvitin ligáz komplex
Sic1	sarjadzó élesztő CDK inhibitor
SMP	S fázist elősegítő faktor
SPF	sarjadzó élesztő transzkripció faktor
Suc1	hasadó élesztő Cks
TopoII	TopoizomerázII
Wee1	Tyr15/Thr14 foszforilációjáért felelős kináz

I. Bevezetés

Az utóbbi évtizedekben a biológia robbanásszerű fejlődésen ment keresztül, melynek köszönhetően biológiai ismereteink korábban elképzelhetetlen módon gyarapodtak. Ennek talán egyik legmeggyőzőbb példája a sejtciklus szabályozás molekuláris mechanizmusának feltárása.

A sejtciklus már a múlt század közepén is foglalkoztatta a biológusokat. A fénymikroszkópos megfigyelésekkel szerzett ismeretek azonban nagyon korlátozottak voltak. A morfológiai jellegzetességek alapján a sejtciklust interfázisra és mitózisra osztották. Az interfázisban a sejt méretének növekedésén túl karakterisztikus változások nem láthatók. Ezzel szemben a mitózisban a homogénnek tűnő DNS-állomány kondenzálódik, és megjelennek a kromoszómák.

A morfológiai vizsgálatokkal a sejtciklus legrövidebb szakaszát, a mitózist, több jól megkülönböztethető fázisra osztották, míg az interfázis csak egy fekete doboz maradt. Részletesebb képet e század közepén Howard és mtsi.-nak (1.) kísérletei révén kaptunk. Vizsgálataik nyomán tudjuk, hogy az interfázis három szakaszból tevődik össze, így a sejtciklust ma G1, S, G2, M fázisokkal írjuk le. A DNS-szintézis és a mitózis közötti szünetek az angol gap szóból eredően a G1 illetve G2 nevet kapták, míg az S és M értelemszerűen a szintézis és a mitózis szavak rövidítései.

A sejtosztódás normális lefolyásának több feltétele is van. Mindenekelőtt kedvező külső feltételek szükségeltetnek, elengedhetetlen a sejt megfelelő mérete, az örökítőanyag tökéletes megkettőződése, és a metafázisos kromoszómák mitotikus orsón történő elrendeződése is szigorúan szabályozott.

Hogyan biztosítják a sejtek a sejtciklus egyes fázisainak meghatározott sorrendjét? Hogyan ellenőrzik a folyamatok eredményességét? Hogyan hozzák meg a döntést a ciklus leállításáról, illetve folytatásáról? Mennyire konzervatívak illetve eltérőek a szabályozás elemei a filogenetikailag távol álló élőlények között? Mi áll a hibás sejtosztódások hátterében? Sok kérdésre egyre részletesebb választ tudunk adni. Sok kérdésre nincs válaszuk, és természetesen mindig újabbak

merülnek fel. Munkánkkal a megválaszolandó kérdések számát szeretnénk csökkenteni.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A sejtcikluskutatás kezdete

Miután általánosan elfogadottá vált a sejtciklus négy fázisra történő felosztása, az érdeklődés az egyes fázisok közötti átmenetet szabályozó faktorok felé fordult. Az első eredmények a sejtciklus különböző szakaszait reprezentáló sejtek fuzionáltatásával születtek. A kísérletek során könnyen kezelhető protozoát és a hatalmas szinciciális sejtekkel rendelkező *Physarum polycepalum*-ot használták. A vizsgálatok nyomán kiderült, hogy a késő G2 és M fázisban lévő sejtek tartalmaznak egy faktort, ami képes a korai G2-ben lévő sejtek mitózisba lépését felgyorsítani (2). Ennek alapján az M phase-promoting factor (MPF) nevet kapta, amit magyarra talán M fázist elősegítő faktornak fordíthatnánk. Ezeknek az élőlényeknek nagyon rövid a G1 és S fázisuk, így ezek az átmenetek nem tanulmányozhatók rajtuk. Emlős sejtenyészet alkalmazásával az S fázisos sejtekben találtak egy S phase-promoting faktort (SPF), amely G1-ben lévő sejtek S-fázisba lépését gyorsítja fel. Ezen a kísérleti rendszeren végzett munkák a továbbiakban azt is felfedték, hogy az MPF minden sejtciklus fázisban képes kromoszóma kondenzációt előidézni, míg az SPF csak a G1 fázisos sejtekre fejt ki hatását (3). A munkák során nem tisztították sem az MPF-t, sem az SPF-t, így ezek mibenléte a nyolcvanas évek végéig ismeretlen maradt.

Az MPF biokémiai jellegzetességeit először a karmos békán elemezték. Az már korábban ismert volt, hogy a *Xenopus laevis* meotikus petéinek kivonata az éretlen G2-ben megrekedt petesejtekbe fecskendezve mitózist indukál. A folyamatot olyan szembetűnő változások kísérik, mint a sejtmaghártya lebomlása és a kromoszómák kondenzációja (5). Ezen jellegzetességeket kihasználva oszlop-kromatográfiával elválasztották a változásokért felelős MPF-t tartalmazó frakciókat. A tisztított komplex szerin treonin kinázaktivitással rendelkezett, és két fő komponense egy 33 kDa és egy 42 kDa tömegű fehérje volt (6).

A sejtcikluskutatás egy másik kísérleti állata a tengeri sün volt. Még a karmos béka MPF tisztítását megelőzően végezték el a következő vizsgálatot. A

tengeri sünn megtermékenyített petéjét radioaktív metionin jelenlétében nevelték, majd poliakrilamid-gélelektroforézissel elválasztották a fehérjét. A szeparálást követő autóradiográfiával kimutattak egy fehérjét, melynek mennyisége a sejtciklus során fluktuált. A fehérje szintje a mitózisig fokozatosan emelkedett, majd a mitózis végén hirtelen eltűnt. A fehérjét ezen tulajdonsága nyomán ciklinnek nevezték el (4). A jelenségre ekkor még nem volt magyarázat, és nem feltételezték, hogy ennek a különleges fehérjének központi szerepe lehet az MPF-ben.

A biokémiai kutatások a sejtosztódásban zavart élesztő mutánsokon végzett vizsgálatok eredményeivel együtt kaptak igazi értelmet (7, 8). A sejtosztódásban hibás élesztő mutánsokban meghatározott gének között volt a hasadó élesztő G1-ben és G2-ben egyaránt szerepet játszó cdc2 kináza (9) és ennek sarjadzó élesztő homológja, a cdc28 is (10). A cdc2-ről több oldalról is bizonyították, hogy a *Xenopus laevis* MPF 33 kDa-os fehérjéjének a megfelelője (11, 12), és ismertté vált, hogy az MPF ciklinjének, a cycB-nek a hasadó élesztő homológja a cdc13 a cdc2-vel alkot komplexet (14). Ezen eredmények alapján már leírhatták a sejtciklus-szabályozás kulcs komplexét. Ezek szerint az MPF-ben a cdc2 kináz homológ a sejtciklus során változó mennyiségben jelenlévő ciklinnel kapcsolódva aktiválódik a G2/M fázisban. A ciklin lebomlását követően a kináz inaktívvá válik, ezzel biztosítva a komplex aktivitásának megfelelő időzítését. A kinázaktivitás elengedhetetlen feltétele a ciklin alegységgel való kapcsolódása, ennek nyomán a cdc2 homológokat CDK-nak (cyclin dependent kinase) is nevezik.

A cdc2 kinázból és cycB alegységből felépülő komplex minden valószínűség szerint a sejtciklus-szabályozás legkonzerváltabb eleme. Ezen gének homológjait élesztőtől kezdve emberig (13) minden eddig vizsgált fajban megtalálták. Az ősi egysejtűekben ez a két tagból álló komplex koordinálhatta a teljes sejtciklust (15). Ez az egyszerű komplex az evolúció során azonban finoman összehangolt több, jelre reagáló hálózattá vált, így az MPF komponenseinek azonosítása csak a sejtciklus kutatások kezdete volt.

II.2. Miért vizsgáljuk a növényi sejtciklus-szabályozást?

A helyhez kötött életmód következtében a növényeknek sajátos stratégiát kellett választaniuk a fennmaradáshoz. A szélsőséges környezeti hatásokhoz rugalmas egyedfejlődéssel alkalmazkodtak. A növényi egyedfejlődés elsősorban posztembrionális, és a sejtosztódás csak a merisztematikus régiókra korlátozódik. Az endoreduplikáció a növényvilágban általános jelenség, és a sejtek G2 fázisban is kiléphetnek a sejtciklusból. A növényi sejtek túlnyomó része egész élete során megőrzi totipotenciáját, és környezeti hatásokra a már differenciálódott sejtek is újraosztódhatnak. Merev sejtfaluk következtében a növények fejlődésében a sejtváándorlás nem játszik szerepet, így a morfogenezisük szinte teljes egészében a sejtosztódásokon és a sejtmegegyülésokon keresztül valósul meg.

A merev sejtfal következtében maga a sejtosztódás is jellegzetes módon játszódik le. A korai profázisban a kortikuláris mikrotubulusokból létrejön a leendő sejtfal helyét meghatározó preprofázisos sáv. A metafázisra a preprofázisos sáv eltűnik, és annak a helyén a telofázisban megjelennek a sejtfal alapanyagokat tartalmazó fragmoplasztok. A fragmoplasztok létrehozzák a korai sejtlemezt, amely sejtfal felé irányuló növekedéssel eléri az eredeti plazmamembránt.

A fentebb felsorolt jellegzetességek közül számosnak a háttérében feltehetően sajátos sejtciklusszabályozás is áll. Mindezek alapján joggal várhatjuk, hogy a növényi sejtciklus tanulmányozása új ismeretekkel szolgálhat, nem csak egyszerűen megerősíti az egyéb élőlényeken végzett vizsgálatok eredményeit.

II.3. Ciklinfüggő kinázok

Az elsőként azonosított CDK-nak, a cdc2-nek számos kisebb-nagyobb mértékben eltérő homológját írták le. A szekvencia elemzések nyomán tudjuk, hogy mindegyik rendelkezik a kinázokra jellemző doménnel. Az általános kináz jellegzetességek mellett azonban sajátos aminosav szekvenciákat is azonosítottak, így megtalálható a ciklinkötésben központi szerepet játszó EGVPSTAIRESILLKE

aminosav szekvenciárészlet, illetve ennek különféle módosulatai. Elsősorban ez a régió szabja meg, mely ciklinnel képes kapcsolatba lépni az adott kináz, így ez a rész különös jelentőséggel bír a CDK-k funkciójának meghatározásában. A másik jellegzetes CDK aminosav motívum, az úgynevezett "T hurok" szintén a ciklinkötés fontos régiója, és ez az aminosav szekvenciárészlet is eltéréseket mutat az egyes CDK-kban (32).

Élesztőkben számos CDK-t azonosítottak, azonban mindkét fajban csak egy-egy vesz részt közvetlenül a sejtciklus szabályozásban. A hasadó élesztőben a *cdc2*, míg a sarjadzó élesztőben a *cdc28* gén által kódolt kináz különböző ciklinekkel alkotott komplexe felelős a G1/S és a G2/M átmenetekért is (15, 16).

A gerincesekben több, mint 10 különböző CDK van, és eltérően az élesztőktől itt már többnek van funkciója a sejtciklus-szabályozásban. A bizonyítottan a *cdc2/cdc28* funkcionális homológ *cdk1* és *cdk2* (17) mellett a *cdk4* és *cdk6* (18) működik közvetlenül a sejtciklus koordinálásában. A *cdk2* az S, G2, míg a *cdk1* a G2/M fázisban képez aktív komplexet. A *cdk4,6* alegységet tartalmazó komplexek a nyugalomban lévő sejtek sejtciklusba lépését, a G0/G1 átmenetet ellenőrzik.

Az első növényi *cdc2* homológok meglétére utaló kísérletek óta számos növényi CDK-t azonosítottak (21, 129). A különféle növényfajokból izolált CDK-kat a szekvenciájuk alapján legalább öt típusra oszthatjuk (19). Ezek közül az A és B típusúaknak van igazolt sejtciklus-szabályozó szerepe, a többi funkciója egyelőre ismeretlen, illetve áttételesen működnek a ciklus szabályozásában (119). A *cdc2* legközelebbi növényi homológjai, az A típusú CDK-k ciklinkötő régiójában a klasszikus PSTAIRE aminosav motívumot, míg a B típusú CDK-k családjában eddig csak növényekben leírt PPTALRE és PPTTLRE ciklinkötő motívumokat találjuk (20). Az A típusú kinázokból felépülő komplexek hasonlóan az élesztőkhöz és emlősökhöz, a G1/S és a G2/M átmenetben is aktívak. Ezzel szemben a G2/M fázisokban sajátos módon mind az A, mind pedig a B típusú CDK-k aktív formában vannak jelen (20, 22).

Állati és élesztő sejteken végzett vizsgálatok eredményeként elmondható, hogy ezekben az élőlényekben a *cdc2* mRNS és fehérje a sejtciklus minden

fázisában jelen van. A hasadó élesztő esetében sem az mRNS, sem a fehérjeszint nem változik (23). Ettől eltérően az állati sejteknél a cdc2 transzkripciója alacsony G1-ben, majd öt-tízszeresére emelkedik az S és M fázisok között. Érdekes módon azonban a fehérje mennyisége állandó a sejtciklus során, nem követi az mRNS szint változásait (24). Mindezeket figyelembe véve a CDK kináz-aktivitásának ingadozása elsődlegesen nem a cdc2 mennyiségi változásának a következménye. A létrejövő aktív komplexek számát elsődlegesen az elérhető ciklin partnerek mennyisége határozza meg.

A növényi sejtcikluskutatások némileg más képet mutatnak az egyes fázisokban bekövetkező CDK mRNS és fehérjeszint változásokról. Az A típusú CDK esetében, megegyezően az élesztőknél tapasztaltakkal, a transzkripció szintje és a fehérje mennyisége is azonos a sejtciklus minden fázisában (20, 25-28). Ezzel szemben a B típusú CDK-k mRNS-einek expressziója a G2/M fázisokra korlátozódik. A fehérjék a transzkripciót követően jelennek meg, és a vizsgált rendszerekben a mennyiségük a G2/M fázis után is magas marad (20, 27, 28). Jelenleg még ismeretlen, hogy mi a funkciója ennek a szigorúan G2/M-re korlátozott expressziónak, de valószínűleg a növényeknél általános endoreduplikáció és a növényi sejtek esetében normális G2-ben történő differenciáció lehet a jelenség hátterében.

II.4. Ciklinek

A ciklineket eredetileg úgy írták le, mint a sejtciklus során oszcilláló mennyiségű fehérjéket (4). Miután számos ciklin szekvenciáját meghatározták, és olyanokat is találtak, melyek mennyisége állandó a sejtciklusban, a definíció megváltozott. Ma ciklinek közé soroljuk azokat a fehérjéket, amelyek homológiát mutatnak a mintegy száz aminosavnyi "ciklin elem"-ben (29). A további kutatások nyomán bizonyítást nyert, hogy ez az úgynevezett "ciklin elem" lép kapcsolatba a CDK-k PSTAIRE motívumával, így elengedhetetlen a CDK-ciklin komplex kialakulásánál (30, 31). A röntgen krisztallográfiás vizsgálatok részletesen

feltárták azokat a komplex kialakulása során végbemenő térszerkezeti változásokat is, amelyek végül is a CDK-k aktivitásához vezetnek (32).

Az új definíció alapján a ciklinek családjába sok, már szekvenciális szinten is nagyon eltérő fehérje tartozik. Sarjadzó élesztőben 22 ciklint írtak le, ezekből 9 alkot komplexet a sejtciklus-szabályozásban szerepet kapó cdc28-cal (33). Az emlősökben azonosított ciklinek száma még magasabb. Ezeket az aminosav szekvenciájuk alapján A-tól J-ig terjedő osztályokba sorolták (34). A későbbiekben kiderült, hogy a szekvencia alapján egy osztályba került ciklinek általában funkcionális homológiát is mutatnak, így az osztályozás a ciklinek sejtciklusban betöltött szerepéről is tájékoztatást ad.

Növényekben több, mint 60 ciklint találtak 14 különböző fajban. Az összehasonlító szekvencia-analízist, és az élesztő, állat és ember ciklinekkel való filogenetikai kapcsolatát alapul véve a növényi ciklineket A, B, D és H osztályokra bontották (35). A növényi ciklinekben is megtaláljuk az egyes ciklin családokra jellemző aminosav motívumokat. Így a minden ciklinben meglévő "ciklin elem"-ek, és a később ismerttetendő, lebontásban szerepet játszó elemek mellett, néhány mitotikus ciklinben leírták a cdc25 foszfatáz kötésében szerepet játszó 'P elemet' is (48, 49). A D típusú ciklinek jellegzetes, retinoblasztoma fehérjekötő LXCXE aminosav szekvenciája az eddig azonosított növényi D ciklinekben is jelen van (35).

A CDK-k kinázaktivitásának alapvető feltétele a ciklin alegység jelenléte, és a CDK-ciklin komplex kialakulása. Mivel a kináz alegységek fehérjeszintje állandó a sejtciklus során, így a létrejöheto komplexek számát a megfelelő ciklin alegységek mennyisége határozza meg. Mindezekből következően a ciklin fehérjék szintje szigorúan meghatározott a sejtciklusban. A szabályozás a transzkripció és a fehérjelebontás szintjén valósul meg.

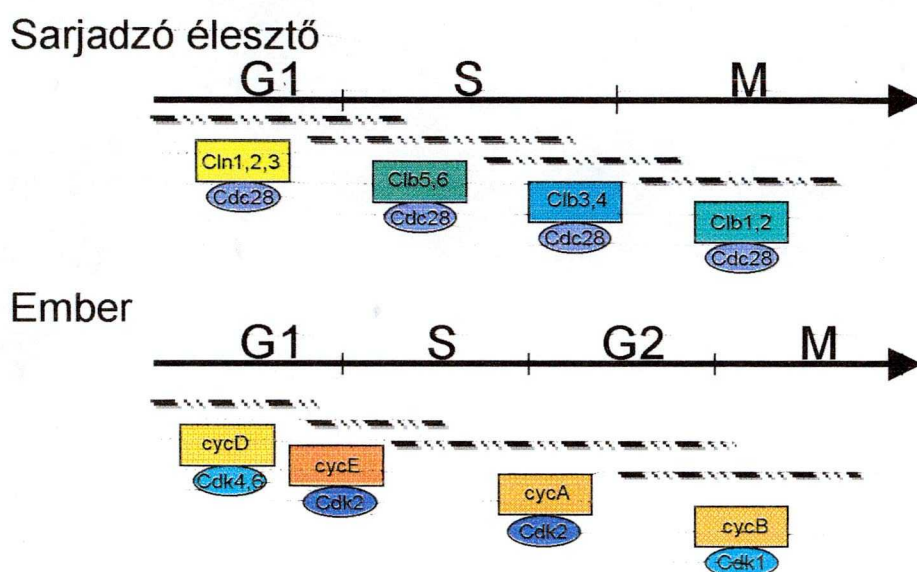
A transzkripcionális szabályozás molekuláris mechanizmusa nagyrészt régebb óta ismert. Az eddig vizsgált sejtciklusgének promoter régióiban több aktiváló és represszáló elemet azonosítottak, és a szabályozásban betöltött szerepüket is ismerjük (120, 121).

A proteolízis sejtciklus-szabályozásban betöltött szerepét csak az utóbbi években kezdték intenzíven tanulmányozni. Ennek ellenére, az állatok és élesztők esetében már bizonyított, hogy az SCF és az APC ubiquitin ligáz komplexek elengedhetetlenek számos ciklin és CKI (CDK inhibitor) lebontásánál, és a komplexek felépítése és működése is jól ismert (36). Ezen komplexek alegységeinek növényi homológjait már azonosították (37). Igaz, hogy a sejtciklusban betöltött pontos szerepük egyelőre ismeretlen, azonban több kísérlet is arra utal, hogy növényeknél is részt vesznek a sejtciklust kontrolláló fehérjék lebontásában. Az ubiquitináláson keresztül lebomló A és B típusú ciklinek N-terminálisán elhelyezkedő jellegzetes "destrukciós elem" a növényi homológokban is megtalálható. A dohánysejtekkel végzett kísérletek pedig igazolták, hogy a "destrukciós elem" megléte a fehérje sejtciklusfüggő instabilitását eredményezi (38). A D és E típusú ciklinekben nincs "destrukciós elem", degradációs szignálként, a "PEST" (prolin, glutaminsav, szerin, treonin aminosavakban gazdag) régiók szolgálnak. Ezeket a "PEST" szekvenciákat a növényi D típusú ciklinekben is megtaláljuk (35). Mindezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a növényi sejtciklust szabályozó fehérjék lebontása az élesztőknél és állatoknál ismert mechanizmusokhoz hasonlóan valósul meg.

A sejtciklus finoman összehangolt szabályozásának alapja a ciklinek és CDK-k sokszínűsége. A ciklinek nem csak az aktív komplexek kialakulásának idejét, hanem a sejten belüli elhelyezkedését is befolyásolják, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül a komplexek szubsztrátspecifitását is biztosítják.

Az élesztők és állatok CDK-ciklin párpai jól ismertek, és az is tudott, hogy az egyes komplexek mely fázisokban aktívak. A sarjadzó élesztő cdc28 kináz a G1-ben a Cln1-3 alegységekkel való kölcsönhatása nyomán aktiválódik. A Cln3 ciklin alacsony szinten az egész sejtciklus során jelen van, és amikor a sejt megfelelő méretet ér el, a cdc28-cal komplexet alkotva az SBF/MBF transzkripció faktorok közreműködésével beindítja a CLN1,2 gének átírását. A Cln1,2-cdc28 kináz komplexek foszforilálják a Clb-cdc28 inhibitor Sic1 fehérjét, amely ezáltal az SCF komplexen keresztül ubiquitinálódik. Az ubiquitinált inhibitor a 26S

proteoszoma által lebomlik, ami végül is a Clb-cdc28 komplexek aktiválását eredményezi. A Cln1,2-cdc28 komplexek saját regulátor alegységüket is foszforilálják, megjelölve ezzel az SCF számára, és így végülis saját aktivitásukat szüntetik meg. Az S fázisos CLB5,6 gének expressziója a G1 végén indul be az MBF transzkripció faktoron keresztül. Ezek után a cdc28 kináz az S fázis végén kifejeződő CLB3,4, majd a M-ben expresszálo CLB1,2 ciklinekkel alkot komplexet (33). (1. ábra)



1. ábra A sarjadzó élesztő és az ember fő, sejtciklus szabályozó CDK-ciklin komplexei. A vonalak a komplexek funkciójának idejét jelölik. A sarjadzó élesztőben az S és M fázis átfedi egymást.

Amint láthattuk, az élesztők sejtciklus-szabályozásában egy CDK kináz alkot komplexet más és más ciklinekkel az egyes fázisokban. A magasabb rendű többsejtűekben a sejtciklus-szabályozás összetettebbé válik. A CDK-k prototípusa, a cdc2 mellett más CDK-k is részt vesznek a sejtciklus fázisainak ellenőrzésében. Ráadásul a ciklus koordinálásában szerepet vállaló ciklinek száma is magasabb, mint az élesztők esetében. Mindezek együttesen egy finomabban szabályozható rendszert eredményeznek. A többsejtűek sejtciklus-szabályozására példaként vehetjük a humán modellt. Emberben a G1-es ellenőrző pontban a különböző ciklin

D és Cdk4 illetve Cdk6 párok aktívak. A D típusú ciklinek "növekedési faktor érzékelők", a sejten kívüli jeleket továbbítják a sejtciklus felé. Expressziójukat a növekedési faktorok indukálják, mRNS és fehérjemennyiségük változatlan a sejtciklus során (50). A D típusú ciklinek alkotta komplexek elsődleges feladata a retinoblasztoma (Rb) fehérje foszforilációja. Az Rb tumorszupresszor fehérje G1 és S fázisokban hiperfoszforilálódik, így leválik az E2F transzkripciós faktorokról, ami által beindulhat számos S fázis specifikus gén átírása. A szabaddá vált E2F hatására az S fázis kezdetén megjelenik a ciklin E, komplexet alkot a Cdk2-vel, és elindítja a DNS-szintézist. Az S fázis későbbi szakaszában a ciklin E az SCF komplex közreműködésével degradálódik. Az SCF komplex számára saját katalitikus alegysége jelöli ki azáltal, hogy foszforilálja. A késő S fázisban Cdk1, az élesztő cdc2 legközelebbi homológja és a ciklin A lép kapcsolatba egymással, és viszi tovább a sejtciklust. A G2/M aktív kináz komplexei a már említett Cdk1-CycA és az MPF-ként ismert Cdk1-CycB (17). (1. ábra)

A növényi sejtciklus szabályozásban szerepet játszó CDK komplexeiről még nincs olyan részletes képünk, mint az ember vagy az élesztők esetében. Egyelőre nincs közvetlen biokémiai bizonyíték a növényi CDK-ciklin komplexeiről, de számos kísérlet utal a létezésükre. Így például a növényi CDK-k ciklinfüggő aktivitását bizonyítja, hogy a lucerna fehérjekivonatból tisztított monomer CDK-k nem mutatnak hiszton kinázaktivitást (22), ugyanakkor ember ciklin A illetve lucerna CYCB2;2 ellenanyaggal immunoprecipitált komplexek sejtciklusfüggő kinázaktivitással rendelkeznek (20, 40). A komputeres szerkezeti modellek is azt támasztják alá, hogy monomer formában a növényi CDK inaktív (39). Mindezek mellett az élesztő kettős hibridrendszer használatával is kimutattak feltételezhető növényi CDK-ciklin párokat (79).

Az emberi sejtek vizsgálatára alapozott modellben bemutatott ciklinek homológjait növényekben is megtaláljuk. Az A és B típusú növényi ciklinek is transzkripcionálisan szabályozottak (19, 41-43), és expressziós mintázatuk jól megegyezik a szekvenciájuk alapján feltételezettel. Nevezetesen mRNS szintjük az S fázis végén, valamint G2 és M fázisokban a legmagasabb. Érdekes kivétel a lucernából izolált A2-es ciklin családba tartozó CYCA2;1. Ennek expressziója a D

típusú ciklinekhez hasonlóan közel azonos a teljes sejtciklusban, így a szerzők szerint szerepe lehet a G1 átmenetben is (44). Az emberi D típusú ciklinek homológjait is megtaláljuk a növényekben. Ezeknek a ciklineknek többsége állatokban és növényekben is állandó szinten expresszálódik a sejtciklus minden fázisában. A növényi D típusú ciklinek egy része az állatiakkal analóg módon valószínűleg a sejten kívüli jeleket közvetíti a sejtciklus felé. Erre a funkciójára utal, hogy az Arabidopsis D2 és D3 típusú ciklin gének cukorral, illetve a citokinin analóg kinetinnel indukálhatók (45, 46). Az állatokban a ciklin D komplexek a G0/G1 fázisban jutnak szerephez. A növényeken végzett kísérletek eredményei ezzel szemben egyes D típusú ciklinek G2/M fázisos funkcióját feltételezik. Dohány sejtkultúra vizsgálatával kimutatták, hogy a CYCD2;1 és a CYCD3;1 transzkripciója a G2/M átmenetben a legmagasabb (47). A növényi D típusú ciklinek G2/M fázisos szerepvállalását alátámasztják az élesztő kettős hibridrendszeren végzett kísérletek is, ugyanis a specifikusan mitotikus cdc2MsF kölcsönhatásba lép több D típusú lucerna ciklinnel (79).

A fenti eredményekből láthatjuk, hogy az emberi, az élesztő és a növényi ciklinek sok hasonlóságot mutatnak. A megegyezéseken túl azonban a növényi ciklinek sajátos vonásokkal is rendelkeznek. Az eredmények alapján a növényekben többféle ciklin és CDK vesz részt ezekben a fázisokban, mint az élesztők, vagy akár az ember esetében. Ez az összetettebb szabályozás lehet az alapja a növényi G2/M fázis speciális tulajdonságainak.

II.5. Ciklinfüggő kinázok foszforilációja

Amint a fentiekben láttuk, a CDK-k kinázaktivitásának szabályozása elsődlegesen a CDK-ciklin komplexek kialakulásán keresztül valósul meg. A felépült komplexek aktivitását azonban a megfelelő aminosavakon történő foszforiláció, defoszforiláció is befolyásolja. Így például számos CDK kinázaktivitása több százszorosára fokozódhat a hasadó élesztő Thr167-nek megfelelő treoninon történő foszforilációt követően. A 'T hurokban' elhelyezkedő

treonin foszforilációja nyomán megnő a CDK-ciklin komplex stabilitása és szubsztrátkötő képessége is (32).

A Thr167-nek megfelelő treoninok posztranszlációs módosításáért felelős kinázok, a CAK-ok (CDK activating kinase) két osztályba sorolhatók, úgymint Cak1 és MO15 típusúak. A Cak1 család prototípusát sarjadzó élesztőben azonosították. A 43 kDa-os fehérje monomerként aktív, és egyetlen igazolt in vivo szubsztrátja a cdc28, melyet jobban foszforilál monomerként, mint a cdc28-ciklin komplex tagjaként. A másik CAK család képviselőit állatokban és hasadó élesztőben fedezték fel. A MO15 egy katalitikus alegységből ($p40^{MO15}$, amely Cdk7 néven is ismert), egy regulátor alegységből (ciklin H) és egy a komplex felépítését elősegítő faktorból (MAT1) áll. A MO15 típusú CAK-ok azon túl, hogy több alegységből épülnek fel, szubsztrátspecifitásukban is eltérnek a Cak1-től. Szemben a Cak1-gyel a monomer Cdk-kat nem, míg a Cdk-ciklin komplexet jól foszforilálják, és szubsztrátként elfogadják az RNS polimerázII nagy alegységének C terminális doménját is, így szerepük lehet a transzkripció szabályozásában. A sarjadzó élesztőben is megvan a MO15 komplex homológja, ez azonban csak az RNS polIII-CTD-t foszforilálja, tehát nem rendelkezik CAK aktivitással. A CAK-ok fehérjeszintje és in vitro kinázaktivitása is állandó a sejtciklus során, így az még kérdéses, milyen módon biztosítják a CDK-k időzített foszforilálását (51).

Növényekben még nem ismert hogy a CDK-k aktivitását fokozza-e a foszforiláció, de a CAK-ok két típusát már azonosították. A rizsben leírt CAK, az R2 tulajdonságai alapján a MO15 családba sorolható. Az emlős $p40^{MO15}$ -tel mutat homológiát, monomerként nem aktív, és csak a hasadó élesztőben képes komplementálni a megfelelő mutánsokat. A szubsztrát specifikusát illetően is hasonló a MO15-ös CAK-okhoz; amellet, hogy specifikusan foszforilálja a cdc2Os1 160-as treonin csoportját, elfogadja szubsztrátként az RNS PolIII CTD-t is (53). Az Arabidopsis-ból izolált CAK1At-t valójában egyik CAK családban sem tudjuk elhelyezni. A $p40^{MO15}$ -tel mutat homológiát, viszont funkcionálisan a Cak1-hez hasonlít. Aktivitása ciklintől független, és csak CDK-t foszforilál. További érdekessége, hogy míg a Cak1 nem komplementálja a hasadó élesztő CAK

hiányos mutánsait, addig a Cak1At mind a sarjadzó élesztőben, mind pedig a hasadó élesztőben pótolja a kiesett CAK gének feladatát (52).

A CAK antagonistá foszfátáz a KAP-ot emberben azonosították. A foszfátáz a CDK-ciklin komplex megszűnte után a megmaradó monomer CDK-ról távolítja el a foszfort, így szabályozva a későbbiekben kialakuló Cdk-ciklin komplexek aktivitását (54). Növényekben egyelőre nem találtak KAP homológot.

A fő sejtciklus szabályozó CDK-k aktivitása foszforilációval nemcsak fokozható, hanem gátolható is. A konzervált Tyr15, és többsejtű eukariótákban a szomszédos Thr14 aminosavak foszforilálása nyomán a CDK-k ATP kötő régiójában bekövetkező térszerkezeti változások a kinázaktivitás gátlását eredményezik (32).

A Thr14, Tyr15 aminosavak foszforilálásának elsősorban a mitózis megfelelő időzítésében van szerepe. Ezt bizonyítja, hogy amennyiben *cdc2* kinázon a Tyr15-t alaninra cseréljük, a hasadó élesztő sejtek DNS-állományuk megkettőzése nélkül is belépnek a mitózisba. Magasabb rendű többsejtűekben normális körülmények között a Tyr15/Thr14 foszforilált Cdc2-ciklin B komplex csak a G2 fázis végén bekövetkező defoszforiláció nyomán válik aktívvá, habár ennek a foszforilációnak nincs akkora jelentősége, mint a hasadó élesztő esetében. Emlősökben Tyr15/Thr14 foszforilációja a G2/M mellett a G1/S fázis szabályozásában is szerepet kap (55).

A gátló hatású foszforilálásért felelős enzim hasadó élesztőben a Wee1 kináz, míg emberben az élesztő Wee1 homológ mellett a Myt1 kináz is hasonló funkciót tölt be. A Tyr15 aminosavat a citoplazmatikus Wee1, a Thr14-t pedig elsősorban az endoplazmatikus retikulumban membránjában lokalizálódó Myt1 foszforilálja (56). A CDK-k aktivitását gátló kinázok hatását a kettős specifitású *cdc25* foszfátázok a Tyr15/Thr14 aminosavak defoszforilálásával szüntetik meg. A *cdc25* foszfátáz családnak emlősökben több tagja van, mindegyiknek a sejtciklus más-más fázisában van szerepe, így a G1/S-ben a *cdc25A* és *cdc25B*, a G2/M-ben pedig a *cdc25C* izoformák aktívak (59).

A CDK-k aktivitását szabályozó kinázok és foszfátázok maguk is sejtciklusfüggő aktivitással rendelkeznek, és aktivitásukat foszforiláltságuk

befolyásolja. A mitózisban a Wee1, Myt1 kinázok és a cdc25 foszfatáz is foszforilált állapotban vannak, ennek a posztranszlációs módosításnak azonban ellentétes a hatása a kinázokra és a foszfatázokra. A foszforiláció következtében a cdc25 aktivitása emelkedik, míg a kinázoké leesik. Ezeknek a változásoknak eredményeként a CDK-k Tyr15/Thr14 foszforiláltsága csökken, ami végül is a CDK-k kinázaktivitás emelkedésében jelentkezik. A folyamatot egy pozitív visszacsatolás továbbberősíti, mivel a Cdk1-ciklin B komplexnek mind a Wee1, mind pedig a cdc25 in vivo szubsztrátja (57, 58). A G1/S fázisban a cdc25A és a Cdk2-ciklin E komplex kölcsönhatásában hasonló pozitív visszacsatolást figyelhetünk meg (59).

Növényekben a Tyr15/Thr14 foszforilációjában, defoszforilációjában közreműködő gének közül eddig csak a Wee1 kinázt sikerült izolálni. A kukoricában leírt gén hasadó élesztőben túltermeltetve "wee" fenotípust váltott ki, és az expressziós vektor segítségével előállított ZmWee1 csökkentette a p13^{suc1} (lsd. 20 old.) affinitás tisztított CDK komplexek in vitro kinázaktivitását (122). A defoszforilációért felelős foszfatáz egyelőre ismeretlen, a mechanizmus létre azonban számos kísérlet utal. Az első ezt megerősítő vizsgálat szerint citokinin megvonás hatására G2-ben megrekedt dohány szárparenchima és dohány sejtszuspenziós sejtekből tisztított CDK komplexek alacsony kinázaktivitása magas foszfortirozin szinttel párosul. Citokinin hozzáadásra a tirozin foszforiláltság csökken a kinázaktivitás pedig emelkedik. Ráadásul a CDK komplexek in vitro élesztő cdc25 foszfatáz kezelése foszfortirozin jelcsökkenést és kinázaktivitás emelkedést eredményez (60). A fenti eredményeket a transzformáns növényeken kivitelezett kísérletek is alátámasztják, ugyanis a citokininhatás az élesztő cdc25 indukciójával kiváltható (61). A cdc25 sejtosztódásban betöltött szerepét a heterológ cdc25-öt konstitutívan expresszáló dohányok is bizonyítják, mivel ezekben a dohányokban a sejtek mérete kisebb, mint a kontrollnövényekben (62, 63). Mindezek a kísérletek alátámasztják a növényi Tyr15 foszforiláció jelentőségét. Az azonban nem kizárható, hogy az ebben szerepet játszó növényi foszfatázok csak funkcionális homológjai az élesztőben és állatokban megismerteknek, és ez a magyarázata a sikertelen génizolálási kísérleteknek.

II.6. Ciklinfüggő kináz inhibitorok

Az evolúció során a CKI-k (CDK inhibitorok) színrelépése a sejtciklus-szabályozás további finomítását tette lehetővé. Az élesztőkben még csak egy illetve kettő, a sejtciklus-szabályozásban funkcionáló CKI-t ismerünk. Emlősökben a CKI-k száma már magasabb, és ezeket két csoportra osztjuk. Az INK4 (inhibitors of Cdk4) család tagjai csak a Cdk4,6-hoz kötődnek, és ezek aktivitását gátolják. Ebbe az inhibitor családba négy fehérje tartozik: a p15^{INK4b}, a p16^{INK4a}, a p18^{INK4c} és a p19^{INK4d}. Szerkezetileg közös sajátságuk az ankyrin motívumok ismétlődése. A CKI-k másik csoportjába, a Cip/Kip családba három inhibítort sorolunk: a p21^{Cip1}-et, a p27^{Kip1}-et és a p57^{Kip2}-et. Ennek a családnak a képviselői több CDK-ra fejtik ki hatásukat, így befolyásolják ciklin a D-, E-, és A-függő kinázok aktivitását. A család tagjainak azonos vonása a C terminálisan elhelyezkedő jellegzetes aminosavmintázat, amely ciklin és CDK alegységekhez való kapcsolódásukat teszi lehetővé (66).

Sarjadzó élesztőben két sejtciklus-szabályozásban érintett inhibítort ismerünk. A Far1 a párosodási feromon és a sejtciklus közötti kapcsolatot biztosítja. A feromon hatására Far1 expresszálódik, és kapcsolódik a Cln2-cdc28 komplexhez, minek következtében a sejtek megrekednek G1-ben (64). A Far1-t a Cln komplexek foszforiláción keresztül kijelölik az SCF számára, ennek eredményeként az inhibitor lebomlik. Így végső soron a Far1 és a Cln-ek aránya dönti el, hogy a sejtek blokkolódnak-e a G1 fázisban (36). A másik sarjadzó élesztő inhibitor, a Sic1 az S fázisban működő Clb5,6-Cdc28 komplexekre fejt ki hatását (65). Hasonlóan a Far1-hez, ez az inhibitor is az SCF komplex által ubiquitinálódik, és csak foszforilált formában érhető el az SCF számára. A foszforilálást egyrészt a Cln komplexek biztosítják, másrészt pozitív visszacsatolás keretében maguk a Clb5,6 komplexek (36).

Emberben központi jelentősége van a CKI-knak a G1 ellenőrző pont szabályozásában. Ezt mi sem bizonyítja jobban, mint az, hogy a legtöbb tumoros elváltozás hátterében a CKI-k hibás működése áll (18). Mitogén stimulus hatására indukálódó ciklin D gének feladata kettős a G1 fázisban. Először a ciklin D alkotta

komplexek mint kinázok foszforilálják az Rb-t, másodsor sztoichiometrikusan kötik a Cip/Kip inhibitorokat. Mindezek következtében az Rb-ről levált E2F transzkripciósfaktor beindítja a ciklin E átírását, a Cdk2-ciklin E komplex inhibitora, a p27^{Kip1} pedig a ciklin D komplexekkel lép kölcsönhatásba. A két folyamat eredményeként a sejtben megjelennek az aktív Cdk2-ciklin E komplexek. A sejtciklus további lépéseinél már nincs szükség a ciklin D komplexekre.

Ez a modell nehezen volt összeegyeztethető a CKI-k funkciójáról alkotott korábbi elképzeléseinkkel. Ma már tudjuk, hogy a Cip/Kip család inhibitorai nem gátolják a ciklin D komplexek aktivitását, így azok Rb foszforiláló képessége nem változik (66). A legújabb vizsgálatok szerint a Cip/Kip fehérjék még elő is segítik a Cdk-ciklin komplexek kialakulását (67), és aktivitásukat tovább emelik a komplex sejtmagba irányításával és a ciklin D stabilitásának növelésével (67, 68). Az INK4 fehérjék hatása is kettős, mivel gátolják a ciklin D komplexek aktivitását, be sem indulhat a ciklin E szintézise. Emellett pedig az INK4 fehérjékkel komplexben lévő Cdk4,6 kinázok nem kötik a Cip/Kip inhibitorokat, így a ciklin a meglévő A,D,E komplexek aktivitása is gátolt marad (69).

A növényi CKI-k szerepéről nincs ilyen részletes képünk, de már több fajban is azonosítottak CDK inhibitor fehérjéket. Az első növényi CKI-ra utaló eredmény kukorica endospermiumon végzett kísérletekből származik. Ezek szerint azokban az endospermium kivonatokban, amelyekben nincs mitózis, a tisztított CDK komplexek aktivitása alacsony. Ezeket a kivonatokat aktív CDK komplexekhez adva, csökkentik azok in vitro kinázaktivitását. A szerzők feltételezték, hogy az aktivitáscsökkenésért egy inhibitor fehérje felelős (80). Az első azonosított növényi CKI gén Arabidopsisből származik. Szekvenciája alapján mutat némi hasonlóságot az emlős p27^{Kip1}, p21^{Cip1} inhibitorokkal, de csak a növényi CDK komplexet gátolja (81). A részletesebb vizsgálatok kiderítették, hogy az Arabidopsis inhibitor C-terminálisán elhelyezkedő, az állati Cip/Kip fehérjékkel homológiát mutató szakasza elengedhetetlen a cdc2aAt-val és CYCD3;1-gyel történő kölcsönhatáshoz (82).

Az utóbbi időben több növényi CKI-t izoláltak (D. Inzé nem publikált, G. Horváth nem publikált), és az élesztő kettős-hibrid adatok szerint az eddig

azonosított növényi CKI-k az A típusú CDK-kal lépnek kölcsönhatásba (D. Inzé nem publikált, 79).

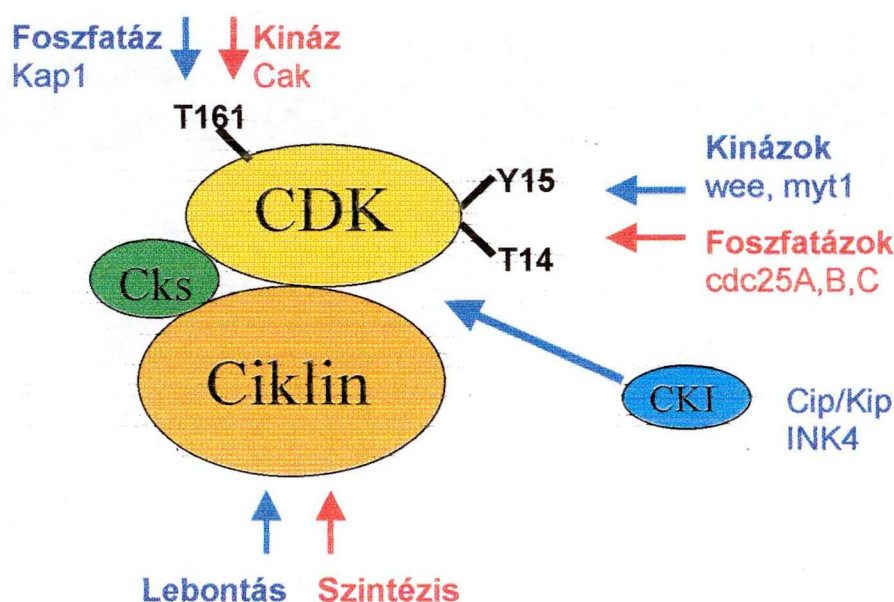
II.7 Ciklinfüggő kináz komplexek tisztázatlan szerepű fehérjéi

A Cks (cdk alegység) család tagjai az elsőként azonosított sejtciklus-szabályozó fehérjék közé tartoznak. A Cks-ek prototípusát, a suc1-t a defektív cdc2 hatást szupresszáló képessége alapján találták meg hasadó élesztőben (70). A gén sarjadzó élesztő homológját a cdc28-cal való kölcsönhatása nyomán izolálták, és ez a tulajdonsága lett a Cks (cdc28 kinase subunit1) család névadója (71). A Cks-eknek emberben két képviselője van, egy 9 kDa-os és egy 13 kDa-os fehérje (72). A növényekben megtalált Cks-ek nagy homológiát mutatnak a család más élőlényekben azonosított tagjaival (73, 74).

Annak ellenére, hogy a Cks-ek régóta ismert és tanulmányozott fehérjék, a pontos funkciójuk még ma sem ismert. Tudjuk, hogy a legtöbb sejtciklus-szabályozásban érintett CDK komplexet képez ezekkel a 9-13kDa méretű fehérjékkel, és hogy elengedhetetlenek a CDK komplexek működéséhez. A sejtciklus szabályozásban betöltött központi szerepüket igazolják a következő élesztő és karmos béka kísérletek. Élesztőkben a Cks mutáns sejtek magas ciklinszint mellett késő mitózisban blokkoltak, és érdekes módon a túl nagy mennyiségű Cks is megállítja a sejtciklust (71, 75). Karmos béka petesejtek sejtmentes kivonatában a magas Cks szint a CDK Tyr15 defoszforilációját gátolja, és így megakadályozza a mitózisba lépést, ugyanakkor a Cks hiánya a mitózisból való kilépést gátolja (76). A Cks-k funkciójára utalhat, hogy élesztőben megfigyelték a SUC1 fehérje és APC asszociációját. Ezek alapján elképzelhető, hogy a Cks-nek szerepe van a CDK komplexek mitotikus degradációs komplexhez való irányításában (77). A Cdk2-Cks komplex szerkezeti vizsgálatai szerint a Cks feladata a megfelelő felületet biztosítása a szubsztrátok és reguláló fehérjék kötéséhez (78).

A növényekben leírt Cks gének közül az Aribodipsis-ét vizsgálták részletesebben. A CKS1At cDNS terméke komplementálja a hasadó élesztő megfelelő mutánsát, míg a túltermeltetése mind a vad típusú, mind pedig a mutáns

élesztőben sejtciklus-blokkot eredményez. A CKS1At fehérje in vitro az Arabidopsis A és B típusú CDK-jával is kölcsönhatásba lép (73). Az Arabidopsis Cks fehérje és a sejtciklus-szabályozás kapcsolatát támasztja alá az is, hogy in situ hibridizációs kísérletek alapján a gén az aktívan osztódó sejtekben fejeződik ki magas szinten. Emellett a CKS1At megtalálható poliploid sejtekben is, ahol az A és B típusú CDK-k nem, vagy csak alacsony szinten találhatók meg. Ezek alapján a szerzők feltételezik, hogy a CKS1At szerepet játszik az endoreduplikációban is (74). (2. ábra)



Kap1 nem ismert
 Cak mindkét típusa megvan
 T161 foszforilálható, de hatása nem ismert
 wee, myt1 wee ismert
 cdc25 nem ismert
 Y15 foszforilálása gátló hatású
 T14 nem ismert a foszforilálhatósága
 CKI 4 különbözőt azonosítottak, gátló hatású
 Cks megvan, hatása ismeretlen
 Ciklinek Ismertek, a CDK aktivitáshoz valószínűleg elengedhetetlenek

2. ábra A CDK-k aktivitását befolyásoló faktorok. A kék szín gátlást, a piros aktiválást jelöl. Az ábra alatti rész a növényekre vonatkozó ismerteinkről ad felvilágosítást.

II.8. Ciklinfüggő kináz komplexek lokalizációja

A sejtciklus-szabályozás kutatás fő célja eleinte a folyamatban résztvevő gének és fehérjék azonosítása volt. A későbbi munkák során tisztázták, hogy az egyes komplexek mely fázisokban kapnak szerepet, és milyen faktorok befolyásolják az aktivitásukat. Az utóbbi időben egyre több olyan eredmény születik, amely azt bizonyítja, hogy a CDK aktivitásának időbeli szabályozásán túl a komplexek sejten belüli pozíciója is szigorúan kontrollált. A komplexek elhelyezkedése egyrészt a lehetséges szubsztrátokat szabja meg, másrészt a komplexek aktivitását módosító kinázokkal, foszfatázokkal való kölcsönhatásnak is alapfeltétele a megfelelő sejten belüli pozíció.

Emlősökben részletesen ismert a CDK komplexek lokalizációja az egyes sejtciklus fázisokban. A ciklin A és E komplexek a sejtmagban találhatóak, ami jól összeegyeztethető a DNS-szintézisben betöltött szerepükkel (83, 84). A D1 ciklin komplex a G1 fázisban a sejtmagban helyezkedik el, majd az S-ben kikerül a citoplazmába (85). A Cdk6-ciklin D3 mind a citoplazmában, mind a sejtmagban jelen van, de csak a magból tisztított formája aktív (86). A mitotikus B1 és B2 ciklinek interfázisban a citoplazmában találhatóak, és míg a B1 ciklin végig ott marad, addig a B2 a profázisban bejut a sejtmagba (87). A komplexek mozgásának mikéntjéről egyre részletesebb képet adnak az emberi sejteken végzett vizsgálatok (88).

Növényekben megfelelő ciklin ellenanyagok hiányában elsősorban a CDK komplexek sejten belüli elhelyezkedéséről vannak információink. Az A típusú CDK-k immunolokalizációját több fajban is vizsgálták. A kukorica gyökércsúcsban interfázisban a sejtmagban, a G2-ben a preprofázisos sávon detektálták, majd diffúz jelet kaptak, míg végül a telofázisban ismét a kialakuló magokba került a vizsgált kináz (89). Az immunolokalizációs eredmények alapján a lucerna sejtekben az A típusú CDK-k elsősorban a sejtmagban találhatóak. A sejtmag izolálása után végzett immunoblott analízis szerint viszont a sejtmagban és a citoplazmában is jelen vannak (22). A lucernán *Arabidopsis* A típusú CDK ellenanyaggal is végeztek immunolokalizációs kísérleteket. Ezek szerint a

gyökérsejtekben, interfázisban a sejtmagban és a citoplazmában is megtalálhatók ezek a kinázok. A mitózis során detektálták őket a preprofázisos sávon, a mitotikus orsón, a fragmoplaszton és a kromoszómákon is (90). B típusú CDK-t eddig csak lucernán vizsgáltak. A lucerna cdc2MsF ellenanyag felhasználásával a mitózisspecifikus CDK preprofázisos sávon, a mitotikus orsón és a fragmoplaszton azonosították (79). A cdc2MsF elhelyezkedése és M fázisos kinázaktivitása együttesen a kináz mitózisban betöltött funkcióját bizonyítja. A növényi CDK komplexek in vivo szerepének tisztázásához elengedhetetlenek a további immunolokalizációs kísérletek.

II.9. Növényi hormonok és a sejtciklus

A növényi növekedés és fejlődés szabályozásának fontos belső tényezői a növényi hormonok. Két klasszikus növényi hormonnál, az auxinról és a citokininről már az ötvenes évek óta tudjuk, hogy elengedhetetlenek a növényi sejtosztódáshoz és DNS-szintézishez (91). Ennek ellenére rengeteg ellentmondó eredmény került nyilvánosságra a pontos funkciójukra vonatkozóan. Beszámoltak olyan kísérletről, ahol a sejt kultúra auxin megvonásra nem blokkolódott kitüntetett sejtciklus fázisban (92), ahol a sejtek G2 fázisban rekedtek meg (93), és olyanról is, ahol a sejtek az auxinhiány hatására a G1-ben halmozódtak fel (94). A citokinin éheztetéses vizsgálatok szintén különböző eredményeket adtak (93, 95). A hormonkezelésekre adott eltérő válaszok valószínűleg a felhasznált sejtek különböző eredetének, fiziológiás sajátosságának és tartási körülményének köszönhetőek.

Az auxinok és citokininek sejtosztódásra gyakorolt pontos hatását csak a növényi sejtciklus-szabályozás kutatások eredményeinek alkalmazásával deríthetjük ki. A sejtciklus szabályozás egyik kulcsmolekulája az A típusú CDK és a hormonok közötti kapcsolatot vizsgálták Arabidopsisban a cdc2aAth promotor GUS konstrukció felhasználásával. A kísérlet során az auxin indukálta a promotert, citokinin hatására a GUS aktivitásnövekedés kisebb mértékű volt, míg a két hormon együttesen magasabb aktivitást eredményezett (26). Lucernaleveleken a

hormonkezelés nyomán a CDK komplexek kinázaktivitásában bekövetkező változások mérése hasonló eredményeket adott. A 2,4-D kezelés a hormonmentes kontrollhoz viszonyítva megemelte a kinázaktivitást, kinetin önmagában alig okozott változást, míg a két hormon együttes alkalmazása szinergesztikus hatást fejtett ki a tisztított CDK komplexek *in vitro* kinázaktivitására (79). A dohány szárbélsejteken végzett vizsgálatok egyfajta magyarázattal szolgálnak az auxin és citokinin szinergesztikus hatására. A dohánysejtekben a 2,4-D kezelés eredményeként megnőtt a *cdc2* fehérjeszintje, a kinázaktivitás növekedéshez azonban kinetin is szükséges volt. A CDK tirozin foszforiláltságát leellenőrizve azt tapasztalták, hogy a kinetin hozzáadására bekövetkező kinázaktivitás emelkedéssel párhuzamosan csökkent a foszfortirozin jel. A tisztított CDK komplexet, a Tyr15-ös foszfort eltávolítandó heterológ *cdc25* foszfatázzal kezelték, és így szintén kinázaktivitás emelkedést értek el (60). A dohány protoplaszt kísérletek megerősítették az előbbi eredményeket. A sejtek kinetinmentes tápoldaton G2-ben rekedtek meg, és ez a blokk kinetin alkalmazásával feloldható volt. Indukálható élesztő *cdc25* konstrukcióval transzformált dohányokból készült protoplasztokon a fenti kísérletet megismételték, és ebben a rendszerben a *cdc25* foszfatáz indukciójával ki tudták váltani a kinetinhatást. Ezek alapján a szerzők feltételezik, hogy a kinetin a *cdc25* stimulációján keresztül a G2 fázisban aktiválja a CDK komplexet (61). A kinetinnek a G2/M-ben betöltött funkcióját más laboratóriumokban végzett munkák is alátámasztják. A dohány protoplasztok a kísérletek során auxin jelenlétében endoreduplikáción mentek át, majd citokinin hozzáadására a sejtek több mitózison keresztül elérték a normális kromoszóma-számot (97). Végül a szinkronizált dohány sejtszuspenzió mért hormon mennyiségi változások is a kinetin G2/M fázisos szerepét hangsúlyozzák. A mérések során az IAA és ABA mennyisége azonos volt minden fázisban. Ezzel szemben a citokininek közül a zeatin és a dihidrozeatin két csúcsot adott, egy kisebbet az S fázisban és egy nagyobbat pedig a mitózisban (98).

A kinetin G2/M-re korlátozódó szerepének ellentmondó eredmények is ismertek. A szinkronizált *Arabidopsis* és *lucerna* sejtszuspenziókban a ciklin D3 mRNS röviddel S fázis előtt jelent meg (45,46), és a kinetin indukálta a gén

kifejeződését (46). Lucerna különböző részeiben mérve a gén expresszióját, a gyökérben, a citokinin előállítás fő szervében kapták a legmagasabb jelet (45). Az Arabidopsis mutánsok is a ciklin D3-citokinin kapcsolat mellett szólnak, ugyanis a citokinin túlermelő mutáns növényekben emelt szinten volt jelen a ciklin. A ciklin D3-t konstitutívan termelő Arabidopsis mutánsok pedig, szemben a vad típusú növényekkel, kalluszképzéshez nem igényeltek citokinin (96). Mindezek az eredmények valószínűsítik, hogy a citokininek a G0/G1 és a G2/M ellenőrző pontban is szükségesek.

A gibberelinsavat a rizs növekedését stimuláló hatása alapján fedezték fel a 30-as években. A napjainkban végzett vizsgálatok már magyarázatot tudnak adni erre a régóta ismert jelenségre. A gibberelinsavval kezelt rizs interkaláris merisztémájában több sejtciklus-szabályozásban szerepet játszó fehérje mRNS szintje megnőtt. Így emelkedett az expressziója cdc2Os-2-nek, a cycOs1-nek, cycOs2-nek és a rizs Cak homológoknak, az R2-nek is. A sejtciklus-szabályozó gének indukciója a G1/S és G2/M fázisok lerövidüléséhez vezetett, és ez végülis gyorsabb növekedést eredményezhet (99).

Az ABA, ellentétben az eddig ismertetett hormonokkal, gátolja a sejtosztódást és a DNS-szintézist. Alma- és borsóembriók ABA jelenlétében nem lépnek ki a nyugalmi állapotból, a G0 fázisból (100,101). Az ABA sejtosztódást gátló tulajdonságának a hátterében a CDK komplexre kifejtett hatása állhat, ugyanis a lucernaleveleken kivitelezett kísérletekben az auxin és citokinin okozta p13^{suc1} kötött kinázok aktivitásnövekedését az ABA megakadályozta (79). Ez a gátlás következhet a növényi CKI expresszió növekedéséből, mert az Arabidopsiban ABA kezelés nyomán az ICK1 (Arabidopsis CKI) mRNS emelt szinten volt jelen, és az ICK1 gátolta p13^{suc1} tisztított CDK komplexek in vitro kinázaktivitását. Ráadásul ez a CDK inhibitor kölcsönhatásra lépett az Arabidopsis cdc2a CDK-val és D3 típusú ciklinnel (82). Ezen eredmények alapján elképzelhető, hogy az ABA okozta G1-es blokk a növényi CKI gének indukcióján keresztül valósul meg.

II.10. A növényi sejtciklus-szabályozás egy lehetséges modellje

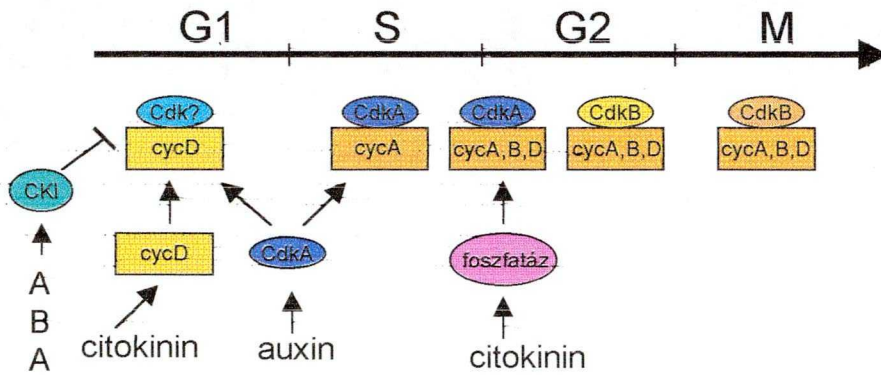
A növényi sejtciklus-szabályozásra vonatkozó ismereteinknek döntő része az utóbbi tíz év munkájának eredménye. Az eddigi kutatások nyomán ismert, hogy a filogenetikailag konzervált elemek mellett a növényi sejtciklus-szabályozásnak más élőlényekre nem jellemző, specifikus vonásai is vannak. A közeljövő feladata a még hiányzó elemek azonosítása, az egyes komponensek egymáshoz való viszonyának és a komplexek funkciójának felderítése. Ezekkel az új vizsgálatokkal nyerhetnek majd igazi értelmet a ma még gyakran megmagyarázhatatlan eredmények.

A hiányosságok ellenére, alapul véve a rendelkezésünkre álló növényi kísérletek eredményeit, kiegészítve azokat az emlős- és az élesztőkutatások nyújtotta ismeretekkel is, felállíthatunk egyfajta modellt a növényi sejtciklus-szabályozásról. Ezek szerint a G₀/G₁ átmenet az emlősökkel analóg módon elképzelhető, mivel a növények is rendelkeznek az ebben a fázisban szerepet játszó emlősökben leírt fehérjékkel. Az ismert, hogy a nyugalomban lévő sejtek citokinin és auxin hatására kezdenek el osztódni, és az auxin az A típusú CDK-k, míg a citokinin a D₃ típusú ciklinek kifejeződését indukálja. A keletkezett ciklinek vagy az A típusú CDK-val, vagy másik, eddig még nem vizsgált CDK-val komplexet alkotnak. Foszforilálják az Rb-t, így szabaddá teszik az E2F transzkripciósfaktort, melynek segítségével beindulhat az S fázisos gének átírása. A G₁-es átmenetet blokkolhatja az ABA hatására kifejeződő CKI, a D típusú ciklinekkel és a CDK-kal történő asszociációján keresztül. Az S fázisban az A típusú CDK-k A típusú ciklinekkel alkothatnak aktív komplexet.

A G₂/M fázisok nem írhatók le sem az élesztő, sem az emberi modell alapján. Szemben minden más eddig vizsgált élőlénnel, a növényekben ezekben a fázisokban nem egy, hanem legkevesebb három különböző CDK működik. Ezek a kinázok elméletileg kapcsolódhatnak az A, B és érdekes módon még a D típusú ciklinek néhány képviselőjéhez is, így a G₂/M fázis szabályozása rendkívül összetetté válik. Növényi sajátosság az is, hogy a G₂ ellenőrzőpontban is szükséges a hormonhatás. Az már ismert, hogy ebben a fázisban az A típusú CDK-t a

citokinin aktiválja azáltal, hogy egy jelenleg még ismeretlen foszfatázon keresztül indukálja a Tyr15 defoszforilációját. A D típusú ciklinek "növekedési faktor" tulajdonságát figyelembe véve az is elképzelhető, hogy a G2 fázisos hormonhatás ezen ciklinek indukciójához is szükséges. A növényi mitózis is jellegzetes abban a tekintetben, hogy ebben a fázisban egy specifikus B típusú CDK aktiválódik, miután az A típusú CDK aktivitása már megszűnt.

Jelenleg a növényi sejtciklus-szabályozást csak hipotetikus modellel tudjuk leírni. Azonban ha a jelenlegi ütemben folynak az ilyen irányú kutatások, talán a nem is olyan távoli jövőben részletes képünk lesz erről az összetett rendszerről. (3. ábra)



3. ábra A növényi sejtciklus-szabályozás egy lehetséges modellje

III. Célkitűzések

Csoportunk egyik fő érdeklődési területe a növényi, azon belül a lucerna sejtciklus-szabályozásának molekuláris háttere. Az ilyen irányú kutatások közel tíz éves múlttal 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 sejtuszuszpenzió 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 sejtuszuszpenziós 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 (20).

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?

IV. Kísérleti eredmények és értékelésük

IV.1. A lucerna CDK-k szubsztrátspecifitása különböző

Az eddig leírt és jellemzett CDK-k számához képest elenyésző azon fehérjék száma, amelyek igazoltan *in vivo* szubsztrátjai a CDK-ciklin komplexeknek. A G1 és S fázisokban a CDK-k különböző transzkripciós faktorokat (SBF, MBF), a transzkripció szabályozásában résztvevő fehérjéket (Rb), CKI-ket (Sic1, Far1) és foszfatázokat (cdc25A) foszforilálnak. A CDK-k G2 és M fázisos szubsztrátjai elsősorban kinázok, foszfatázok (NIMA, cdc25) és szerkezeti fehérjék (hiszton H1, laminok, vimentin, nucleolin) (118). Növényekben eddig még egyetlen fehérjéről sem bizonyították, hogy *in vivo* CDK szubsztrát, sőt még *in vitro* szubsztrátokat sem vizsgáltak, így a növényi CDK-k *in vitro* kinázaktivitás mérésénél szinte kizárólag a hiszton H1-t használják szubsztrátként.

A szubsztrátspecifitás vizsgálatainkkal kettős célunk volt. Egyrészt cdc2MsD komplex a 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 hiszton H1 a leggyakrabban használt *in vitro* CDK szubsztrát. A fehérjében megtalálható az az S/T-P-K-K/R aminosav motívum, melyet a legtöbb CDK foszforilál. A hiszton H1 ennek ellenére nem használható általános CDK szubsztrátként, mert a G1 fázis két kulcs molekulája a Cdk4 és Cdk6 nem képes foszforilálni. Az általunk vizsgált CDK-k közül a Cdc2MsA/B jól foszforilálta a hiszton H1-t. Ezzel szemben a cdc2MsF hatására sokkal kisebb mértékben jelölődött a szubsztrátként használt fehérje, míg a cdc2MsD által történt foszforiláció elhanyagolható mértékű volt (1. táblázat).

A mielin bázikus fehérje (MBP) a MAP kinázreakciók általánosan elterjedt *in vitro* szubsztrátja. Egyes vizsgálatok szerint azonban kísérleti körülmények között

a PITALRE ciklinkötő motívummal rendelkező humán Cdc2 homológ is foszforilálja (108). Vizsgálataink során a három lucerna CDK közül csak a PSTAIRE aminosavszekvencia részletet tartalmazó cdc2MsA/B jelölte radioaktív foszforral (1. táblázat).

A következő szubsztrátunkat, az RNS polimerázII-CTD-t elsősorban a CAK kinázaktivitás meghatározásoknál használják, de van arra mutató eredmény, hogy egérben a cdc2 is képes foszforilálni (109). Kísérleteinkben a bakteriális rendszerben termeltetett Arabidopsis RNS polimerázII-CTD-t alkalmaztuk szubsztrátként. Az immunoprecipitálás után mért kinázaktivitások szerint az RNS polimerázII-CTD csak a cdc2MsA/B kináz komplexek számára megfelelő in vitro szubsztrát (1. táblázat).

A retinoblasztoma azon kevés fehérje közé tartozik, amelyről bizonyított, hogy számos CDK in vivo is foszforilálja. Emberben a cdk2/4/6 is résztvesz ebben a folyamatban (110). Vizsgálatainkban a humán Rb azon régióját használtuk, amely az ismert CDK foszforilációs helyeket tartalmazza. A kísérletet elvégezve hasonló eredményre jutottunk, mint az MBP és az RNS polimerázII-CTD esetében, ugyanis az Rb-t is csak a cdc2MsA/B foszforilálta (1. táblázat).

A TopoizomerázII C-terminális doménje a sejtciklus egyes fázisaiban különböző mértékben foszforilált. A domént több más kináz mellett a CDK-k is képesek foszforilálni (111, 116). Kísérletünkben az in vitro kinázaktivitások meghatározása során az Arabidopsis TopoII C-terminális doménje szolgált szubsztrátként. A kinázreakciók bizonyították, hogy a TopoII megfelelő szubsztrát a cdc2MsD számára, de a cdc2MsF is jobban foszforilálta, mint a hiszton H1-t. A cdc2MsA/B csakúgy, mint a többi vizsgált fehérjét, ezt is jól foszforilálta (1. táblázat).

Kísérleteink bizonyították, hogy a növényi sejtciklus kinázok sem tanulmányozhatók a hisztonnal, mint egyedüli szubsztráttal. Emellett, habár a fenti eredményekből nem vonhatunk le következtetéseket a lucerna CDK-k in vivo szubsztrátjaira vonatkozóan, alátámasztják sejtciklus-szabályozásban betöltött feltételezett szerepüket. Az Rb a G1/S fázisokban foszforilálódik, ezáltal lehetővé válik a fázisspecifikus gének átírása (110). A transzkripció elindításához RNS

polimerázII CTD-jának foszforilációja elengedhetetlen, mivel az M fázisban nincs transzkripció, így a CTD defoszforilált ebben a fázisban (112). 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 (113). Az in vivo szintén G2 és M fázisokban foszforilált hisztonH1-t (114) 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 szubsztrátspecifitással, így a hisztont és a topoizomerázt is foszforilálta.

	Cdc2MsA/B	Cdc2MsF	Cdc2MsD
Hiszton H1	+++	++	+
Mielin bázikus fehérje	+++	-	-
RNS polimerázII	+++	-	-
Retinoblasztoma	+++	-	-
TopoizomerázII	+++	+++	+++

1. táblázat Lucerna CDK-k szubsztrátspecifitás vizsgálata. A keresztek száma a foszforiláció relatív intenzitását jelöli.

IV.2. A purin analógok szelektíven gátolják az A típusú CDK-kat

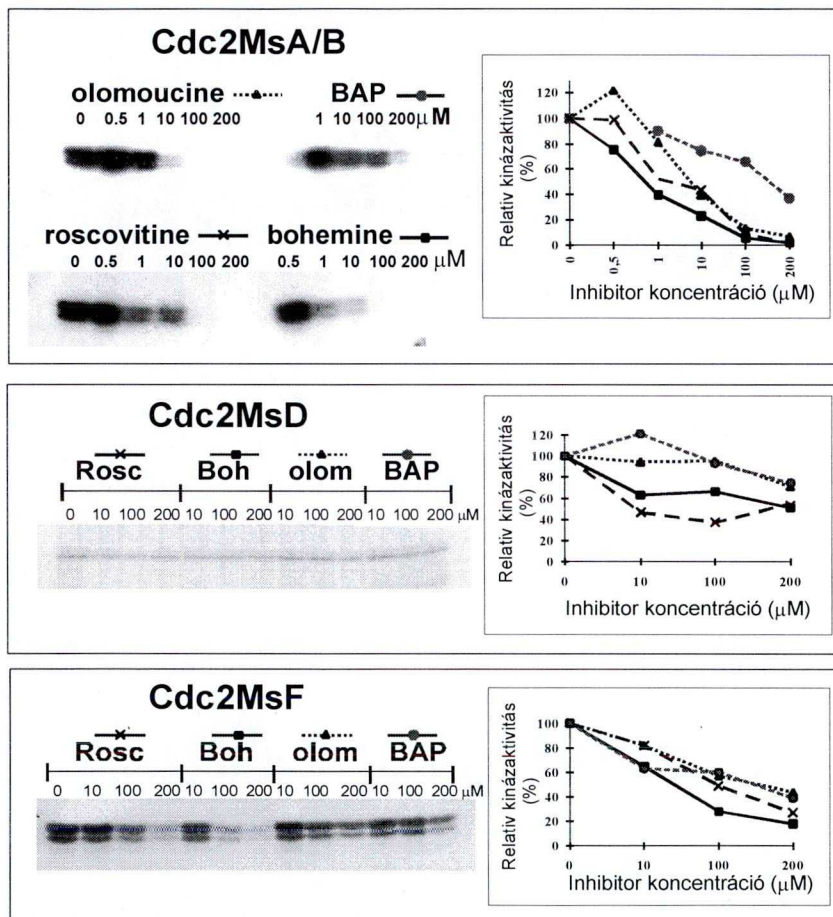
A purinvázis vegyületeket, mint kináz inhibitorokat a 90-es években vizsgálták először. A kísérletekből, melynek során 35 különböző kináz aktivitásának változását tesztelték, eltérő olomoucine koncentrációk mellett kitudt, hogy az inhibitor rendkívüli szelektivitással gátolja a Cdk1 és Cdk2 komplexek in vitro kinázaktivitását (102). Az első CDK-ciklin komplexek kristályosítása és röntgenkristallográfiás vizsgálata lehetővé tette még hatékonyabb inhibitorok kifejlesztését. Az újabban előállított roscovitine és bohemine még alacsonyabb koncentrációban hatékony gátlója a fent említett kináz komplexeknek (103, 104). A purinvázis CDK inhibitorokat növényi sejtciklus blokkolására számos kísérleti rendszerben használták. A növényi CDK-k in vitro kinázaktivitására gyakorolt hatásukat azonban csak a p13^{suc1} affinitás komplexen és Cdc2MsA/B immunoprecipitált komplexen ellenőrizték (107).

Munkánk során azt vizsgáltuk, 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 sejtuszuspenzióból immunoprecipitáltuk a Cdc2MsA/B, Cdc2MsD és Cdc2MsF komplexet, majd a tisztított kináz komplexek aktivitását változó koncentrációjú inhibitor jelenlétében mértük (4. ábra).

Az eredményekből látható, 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 μ M inhibitor jelenlétében is csak közel felére esett vissza, ami megfelel a kontrollként alkalmazott BAP kezelés esetében tapasztalt aktivitás csökkenésnek.

A három inhibitor hatását összevetve látható, hogy az olomoucine az irodalmi adatoknak megfelelően közel egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban ugyanolyan hatékony, mint a roscovitine. A bohemine kísérleteink során a roscovitine-nél is hatékonyabb gátlószernek bizonyult.

Az olomoucine és roscovitine kezelés hatására növényi sejtek a G1 és G2 fázisban is blokkolódnak (105, 106). Ez a jelenség jól magyarázható a fenti eredmények fényében. Az inhibitorokra érzékeny Cdc2MsA/B komplexek G1 és G2 fázisokban is aktívak, így ezen kinázok gátlásának következtében a sejtek megrekedhetnek a G1-es és G2-es ellenőrzési pontokban is.



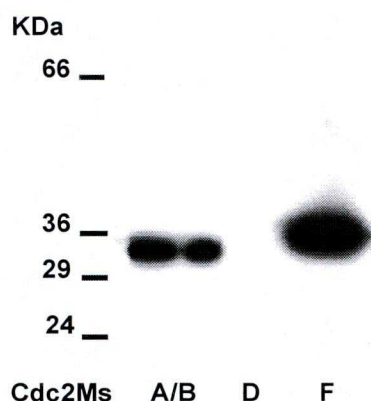
4. ábra A CDK-k inhibitorérzékenységének vizsgálata. A panelek bal oldalán az autoradiogramok fotói, jobb oldalán a PIA mérések alapján számított értékek diagramjai láthatók. A Cdc2MsA/B és Cdc2MsF esetében hisztonH1, a Cdc2MsD esetében a TopoizomerázII szolgált szubsztrátként.

IV.3. A p13^{suc1} fehérje differenciáltan köti a CDK komplexet

A hasadó élesztő p13^{suc1} fehérjeje központi jelentőségű a sejtciklus kutatásokban. A Cks fehérjék pontos szerepe még ma sem ismert, az azonban tudott, hogy nagy specifitással kötnek számos CDK komplexet (ld. Irodalmi áttekintés 20. old.). Ezen tulajdonságát kihasználva az immobilizált p13^{suc1} fehérjét a sejtciklus kutatások kezdete óta elterjedten használják a CDK komplexek affinitás tisztítására (115). Ezt a megközelítési módot laboratóriumunkban is rendszeresen alkalmazzuk a CDK komplexek kinázaktivitásának mérésénél. A következő munkákkal arra kerestük a választ, hogy a három lucerna CDK közül melyik kötődik a p13^{suc1} fehérjéhez.

Szinkronizált A2 sejtuszuspenzió azon mintáiból, amelyekben a G2 és M fázisokban lévő sejtek száma a legmagasabb volt, fehérjekivonatot készítettünk. Ezekben a mintákban mindhárom lucerna CDK könnyen azonosítható immunoblott vizsgálattal. A 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} fehérjéhez. Ezzel szemben a Cdc2MsD komplexek ezzel az eljárással nem tisztíthatók a lucerna nyers fehérjekivonatból (5. ábra).

Munkánk 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. Érdekes módon a cdc2MsD nem tisztítható immobilizált p13^{suc1} fehérjével. Hasonló eredményt adtak az Arabidopsis-on végzett vizsgálatok is. A Cdc2bAt, a lucerna Cdc2MsD megfelelője csak nagyon gyöngén kötődik a p13^{suc1}-hoz, míg az Arabidopsis Cks fehérje jól köti az Arabidopsis Cdc2aAt és Cdc2bAt is (73). A lucerna Cks fehérje jelenleg még ismeretlen, így nem tudjuk, hogy a lucerna CDK-k különböző p13^{suc1} kötő képességének van-e in vivo jelentősége is.



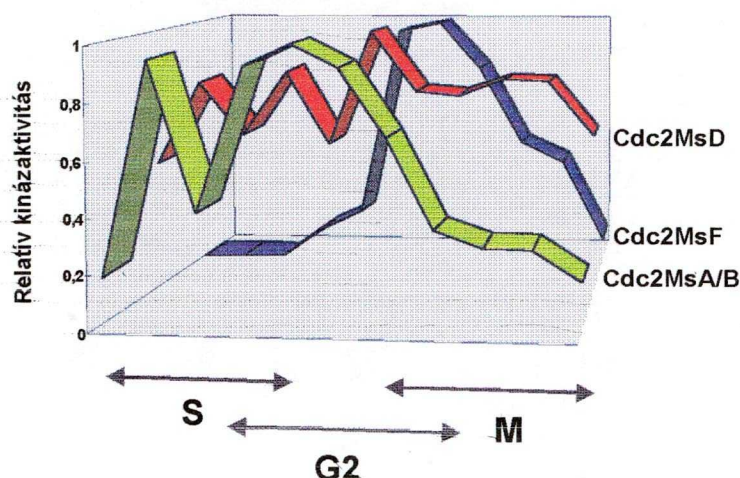
5. ábra p13^{suc1} kötött komplexek immunoblott analízise. A vizsgálat során alkalmazott ellenanyagok az ábra alján jelölve.

IV.4. A G2/M fázisban legkevesebb három CDK működik

Azt már korábbi vizsgálatainkból tudtuk, hogy a G2 és M fázisokban legalább három különböző CDK fehérje van jelen, és a Cdc2MsA/B és Cdc2MsF fehérjék, mint kinázok is aktívak ezekben a fázisokban (20). Megfelelő szubsztrát hiányában azonban a Cdc2MsD aktivitásának sejtciklus függését nem ismertük.

A topoizomerázII használatával lehetőség nyílt a Cdc2MsD in vitro kinázaktivitás mérésére, így a szinkronizált sejtminták felhasználásával megismételtük az immunoprecipitálást. A Cdc2MsA/B és Cdc2MsF esetében a hiszton H1-t, míg Cdc2MsD-nél a TopoizomerázII-t használtuk szubsztrátként a kinázreakciókban. A kísérlet megerősítette a korábbi Cdc2MsA/B és Cdc2MsF aktivitásra vonatkozó adatainkat. A Cdc2MsA/B két aktivitási csúccsal rendelkezik, egy kisebbel az S fázisban és egy nagyobbval a G2/M-ben, míg a Cdc2MsF aktivitása egyértelműen a G2/M fázisra korlátozódik.

A Cdc2MsD in vitro kinázaktivitása némiképp ellentmond az immunoblott analízis alapján vártak. A fehérje csak az S fázis után jelenik meg, ennek ellenére a kinázaktivitás a teljes sejtciklusban kimutatatható, és a komplex aktivitása a G2/M fázis határán is csak mintegy kétszeresére emelkedik (6. ábra).



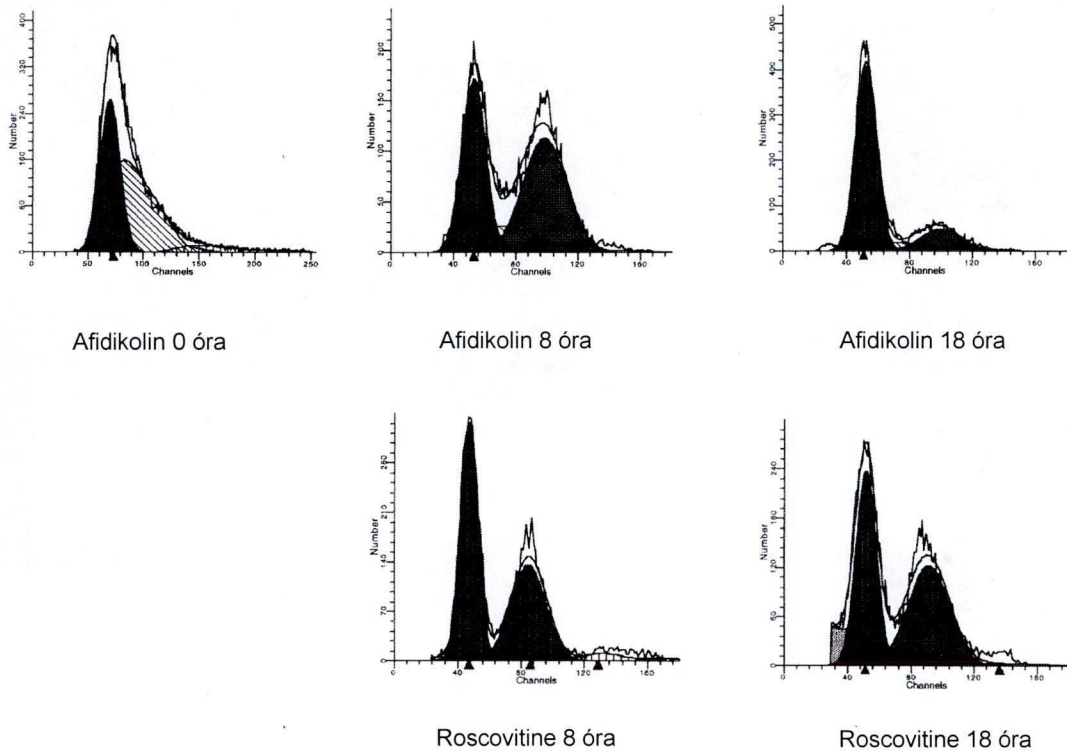
6. ábra Afidikolin szinkronizált mintákból immunoprecipitált CDK komplexek relatív kinázaktivitása az egyes sejtciklus fázisokban. A sejtciklus fázisokat az áramlásos citometria és a mitotikus index eredményei alapján számítottuk.

IV.5. A Cdc2MsF aktivitása a mitózisra korlátozódik

Amint dolgozatomban már bemutatam, a CDK-k eltérő érzékenységgel rendelkeznek a purin analóg inhibitorokkal szemben. Ezt a tulajdonságukat kihasználva, megfelelő koncentrációjú inhibitor alkalmazásával a sejtciklus megállítható azokon a pontokon, ahol a Cdc2MsA/B komplexek aktivitása elengedhetetlen. Előzetes kísérleteinkben 100 μ M roscovitine jelenlétében az A2 sejtuszuspenzió sejtei valóban mind a G1/S mind a G2 fázisban blokkolódtak.

Mivel mi a G2/M átmenet finomabb felbontását tűztük ki célul, kettős blokkot alkalmaztunk. Először a G1/S fázisos sejtek számát növeltük afidikolin hozzáadásával, majd ezt a gátlószert 16 óra után kimostuk. Két órával az afidikolin eltávolítása után, amikor a sejtek már feltételezhetően túljutottak azon a G1/S ponton, ahol a Cdc2MsA/B komplexek aktivitása szükséges, a sejteket két részre osztottuk. Az egyik felét 100 μ M roscovitine jelenlétében tartottuk, a másik fele pedig normál tápoldaton nőtt tovább. A szinkronizálás eredményességét

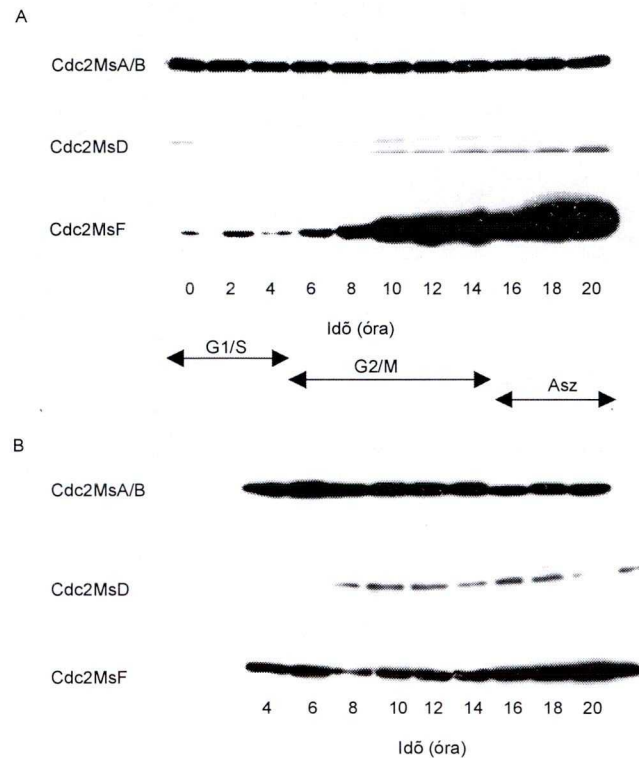
áramlásos citometriával és a mitotikus index meghatározásával ellenőriztük (7. ábra). A kétóránként vett mintákat RNS, fehérje és kinázaktivitás szintjén is elemeztük.



7. ábra Szinkronizált sejtek áramlásos citometriás analízise. Az időpontok az afidikolin eltávolítása után eltelt időt jelölik. A roscovitine-t az afidikolin kimosása után két órával adtuk a sejtuszuspenzióhoz.

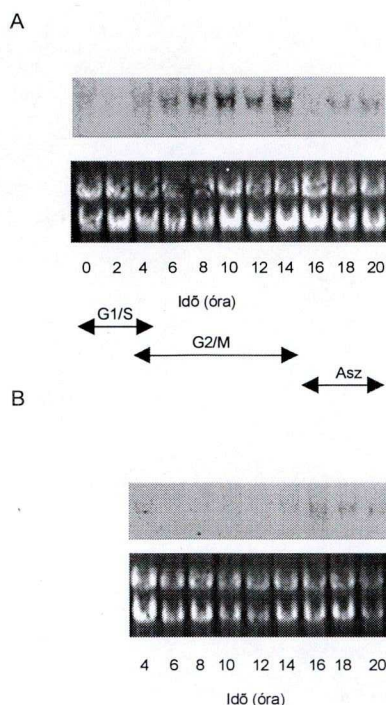
A mintákat először immunoblott analízisnek vetettük alá. A normál afidikolin szinkron eredményei a már ismert adatokat erősítették meg. A Cdc2MsA/B fehérje mennyisége nem változott a sejtciklus során, míg a Cdc2MsD és Cdc2MsF kinázok mennyisége a G2/M fázisban kezdett el emelkedni (8.A. ábra). Ezzel szemben a roscovitine-kezelt sejtek érdekes eltérést mutattak. A Cdc2MsA/B és

Cdc2MsD fehérjék mintázata megfelelt az afidikolin kezelt sejteknek tapasztaltaknak. A roscovitine-nel blokkolt sejtek Cdc2MsF fehérjeszint emelkedése azonban elhanyagolható, ha összevetjük a nem blokkolt sejteknek látottakkal (8.B. ábra).



8. ábra Afidikolin szinkronizált (A panel), illetve a szinkronizáció után roscovitine-nel blokkolt sejtek (B panel) immunoblott analízise. A kísérlethez tartozó áramlásos citometriás és mitotikus index adatok a 7. ábrán láthatók.

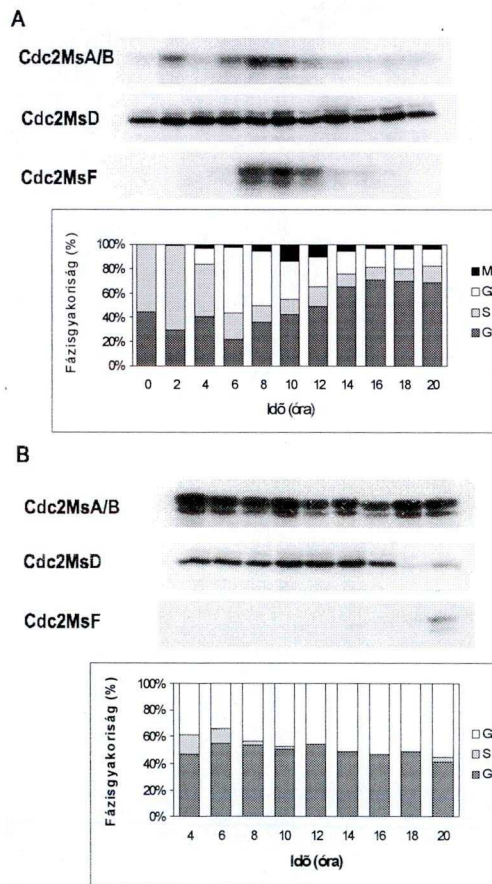
Miután a roscovitine-kezelés ilyen számottevő hatással volt a Cdc2MsF fehérjeszintjére, meghatároztuk a mRNS mennyiségét is. A vizsgálat az immunoblott eredményét támasztotta alá. A cdc2MsF mRNS jóval később, és csak minimális szinten fejeződött ki a kontrollként használt afidikolin szinkronhoz viszonyítva (9.A. 9.B. ábra).



9. ábra Afidikolin szinkronizált (A panel) illetve szinkronizálás után roscovitine-nel blokkolt (B panel) sejtek Cdc2MsF mRNS szintjének meghatározása. A panelek alsó részén az etidium-bromid festett membránok láthatók. A kísérletek áramlások citometriás és mitotikus index adatai a 10. ábrán láthatók.

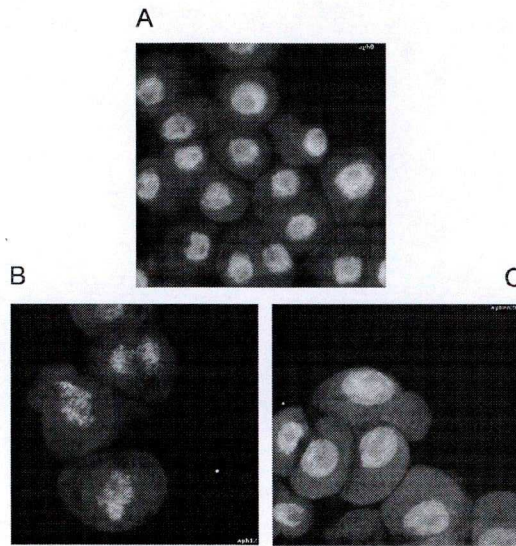
A továbbiakban az egyes kinázok aktivitását immunoprecipitálás segítségével határoztuk meg. Az afidikolin szinkron mintákból tisztított kináz komplexek vizsgálata a korábbi eredményeket erősítette meg. A cdc2MsA/B komplexek aktivitása a G1/S és G2/M fázisokban is jelentősen megemelkedett. A cdc2MsD kináz esetében nem tapasztaltunk ilyen szembetűnő változásokat az egyes sejtciklus fázisokból származó minták kinázaktivitásai között, a komplexek aktivitása körülbelül csak kétszeresére emelkedett a G2/M fázisokban. A leghatározottabb kinázaktivitás változást a cdc2MsF komplexek vizsgálatánál tapasztaltuk. Ezen komplexek in vitro kinázaktivitását gyakorlatilag csak a G2/M fázisokban detektáltuk (10.A. ábra). A roscovitine-kezelt sejtekből készült fehérjemintákban a vizsgált CDK-k mindegyike a fentiekől eltérő in vitro

kinázaktivitási mintázatot mutatott. A Cdc2MsA/B komplexek kinázaktivitása megemelkedett, és minden mintában közel azonos volt. Ennél az eredménynél meg kell jegyezni, hogy a kísérlet során *in vitro* kinázaktivitást mértünk, így az *in vivo* blokkolt cdc2MsA/B komplexek az immunoprecipitálás során, megszabadulva a roscovitine-től válhattak aktívvá. Mindez azt jelenti, hogy a roscovitine a cdc2MsA/B komplexeket aktív formában gátolta a sejtekben, és ez az aktív komplex a kezelés során végig megmaradt. A másik két lucerna CDK kinázaktivitása is másként alakult, mint az afidikolin-kezelt sejtek esetében. A Cdc2MsD aktivitása kis mértékű emelkedés után teljesen visszaesett, míg a Cdc2MsF komplexek kinázaktivitása elhanyagolható volt (10.B. ábra).



10. ábra Afidikolin szinkronizált (A panel) illetve szinkronizálás után roscovitine-nel blokkolt sejtek (B panel) *in vitro* CDK aktivitása. A diagramok a minták sejtciklus fázis gyakoriságát jelzik.

A citológiai elemzés is érdekes különbségeket mutatott a roscovitine-nel blokkolt, illetve a csak afidikolinnal kezelt sejtek között. Az afidikolin-kezelt sejtekben a DAPI festés után jól láthattuk a jellegzetes profázisos, metafázisos, anafázisos kromoszómákat. Ezzel szemben a roscovitine-nel blokkolt sejtekben mitotikus kromoszómát nem, csak nagy méretű G2-re jellemző sejtmagokat találtunk (11. ábra).



11. ábra DAPI festett sejtek mikroszkópos vizsgálata. Afidikolin kezelt sejtek kimosás előtt (A), kimosás után 12 órával (B) és roscovitine blokk után 20 órával (C).

A fenti eredményeket összegezve a következőket mondhatjuk el. A roscovitine-kezeléssel *in vivo* gátolt Cdc2MsA/B aktivitás következtében az *in vitro* kinázaktivitás közel azonos minden mintavételi időpontban. A változatlan kinázaktivitás azt jelenti, hogy a Cdc2MsA/B az általa foszforilált fehérjéken keresztül közvetve vagy közvetlenül, de mindenképp visszahat saját aktivitására is. Ez történhet olyan transzkripció faktorok és sejtciklus-szabályozó fehérjék foszforilációjával, amelyek direkt módon hatnak az aktivitására. Ilyenek lehetnek például a ciklinek, CKI-k foszfatázok, kinázok, illetve ezek transzkripció faktorai. Az is elképzelhető, hogy a Cdc2MsA/B áttételesen hat az aktivitására azáltal, hogy normál körülmények között a sejtciklus későbbi szakaszaiban aktívvá váló faktorok hatnak vissza rá.

A Cdc2MsD fehérjeszintjére nincs hatással a roscovitine-kezelés. A kináz aktivitása is hasonlóan alakul, mint az afidikolin szinkroné, eltekintve attól, hogy az utolsó mintákban szinte teljesen visszaesik. Ezek alapján a Cdc2MsA/B valószínűleg nem befolyásolja közvetlenül a Cdc2MsD aktivitását, transzlációját és feltételezhetően a transzkripcióját sem. Az utolsó mintákban megfigyelt aktivitáscsökkenés magyarázata lehet, hogy a sejtek olyan ponton halmozódtak fel a roscovitine-kezelés hatására, ahol a Cdc2MsD aktivitása minimális.

A Cdc2MsF esetében láttuk a legszembetűnőbb változásokat a roscovitine-kezelés nyomán. A Cdc2MsA/B in vivo aktivitásának gátlásával a gén átírása minimális szintre csökkent. Ennek megfelelően sem fehérjeszint-, sem kinázaktivitás-emelkedést nem tapasztaltunk. A kísérleti eredmények alapján nem tudjuk megmagyarázni a jelenség molekuláris hátterét. Lehetséges, hogy a transzkripció elindításáért maga a Cdc2MsA/B kináz felelős, de az is elképzelhető, hogy a sejtek egyszerűen nem jutnak el addig a sejtciklus pontig, ahol a Cdc2MsF gén átírása más fehérjék segítségével kezdetét veszi. Az eredmények azonban azt egyértelműen bizonyítják, hogy a Cdc2MsF kináz csak a G2-es ellenőrző pont után fejeződik ki, és a mitózisban kap szerepet.

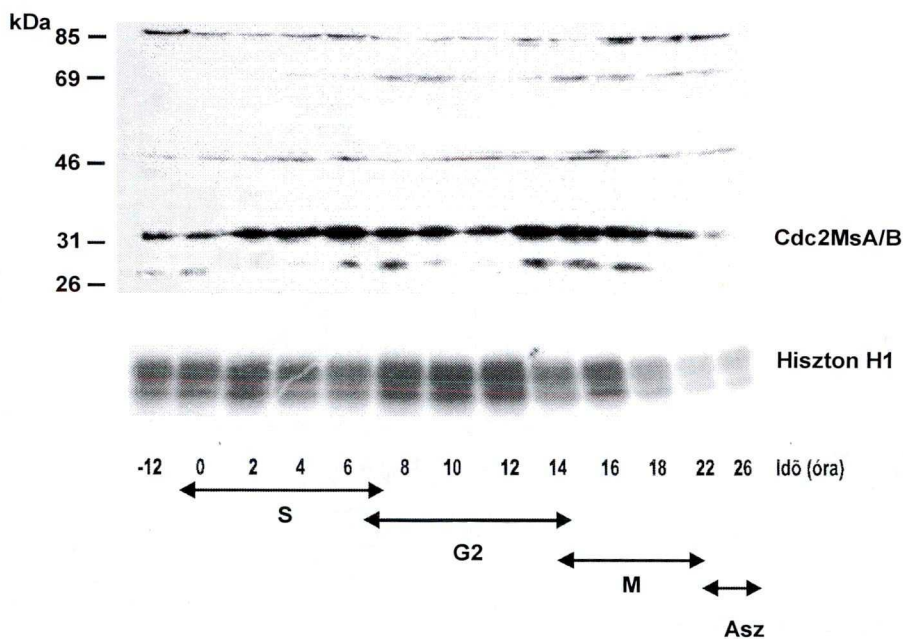
A CDK-k kulcsfontosságát igazolják a citológiai vizsgálatok is. A Cdc2MsA/B G2-es gátlása eredményeként a megkettőződött DNS-állományú sejtek képtelenek belépni a mitózisba. Az in vitro kinázaktivitás mérések és a mikroszkópos elemzések alapján valószínű foratókönyv szerint a Cdc2MsA/B aktivitása dönti el, hogy a sejtek tovább lépnek-e a G2 fázisból, míg a Cdc2MsF szerepe a mitózisra korlátozódik. A Cdc2MsD funkciójáról sajnos a fenti kísérleti rendszerrel sem kaptunk pontosabb képet.

IV.6. A cdc2MsA/B aktivitását a tirozinfoszforiláció gátolja

Élesztőkben és állatokban a CDK-k Tyr15/Thr14 foszforilációjának mechanizmusa és sejtciklus-szabályozásban játszott szerepe jól ismert. Az ezeken az aminosavakon történő foszforiláció gátolja a már kialakult CDK-ciklin komplexek

aktivitását, így tovább finomítja a sejtciklus-szabályozást. Növényekben annak ellenére, hogy a CDK-k tirozin foszforilációja intenzíven kutatott terület, csak részleges információkkal rendelkezünk a kinázok ilyen úton történő szabályozásáról (Isd. Irodalmi áttekintés 14. old).

A tirozinfoszforiláció sejtciklus-szabályozásban betöltött szerepét afidikolin szinkronizált lucerna A2 sejtuszuspenzió vizsgáltuk. Első lépésben arra kerestük a választ, hogy vannak-e sejtciklusfüggő módon tirozinfoszforilált fehérjék a lucernában. Ezért a szinkronizált mintákból készült fehérjekivonatokat foszfortirozin-specifikus ellenanyag segítségével immunoblotton elemeztük. A membránon több, különböző molekulásúlyú fehérje mutatott fázisspecifikus tirozinfoszforiláltságot. Azonban a 30-40 kDa közötti molekulásúly tartományban, ahol az általunk vizsgált CDK-k detektálhatók, csak egy 32 kDa körüli foszfortirozin tartalmú fehérje festődött. Ez a molekulásúly jól egyezik a Cdc2MsA/B esetében várttal (12. ábra).



12. ábra Szinkronizált sejtek fehérjeinek tirozinfoszforiláltsága az egyes sejtciklus fázisokban (felső panel), és ugyanazon minták cdc2MsA/B in vitro kinázaktivitása (alsó panel).

A következő vizsgálatainkkal azt szeretnénk volna alátámasztani, hogy a 32 kDa-os tirozinfoszforilált fehérje valóban a cdc2MsA/B. Mivel a foszfortirozin detektálására monoklonális ellenanyagot használtunk, ugyanezt a membránt a poliklonális Cdc2MsA/B ellenanyaggal is vizsgálhattuk. Az ily módon elvégzett immunoblott analízisen a 32 kDa-os tirozinfoszforilált fehérje pontosan egybeesett a Cdc2MsA/B ellenanyag által felismerttel.

A cdc2MsA/B tirozinfoszforiláltságát a p13^{suc1} tisztított komplexek immunoblott vizsgálatával is megerősítettük. Amint azt a korábbi kísérletekből már tudjuk, a Cdc2MsA/B kötődik a p13^{suc1} fehérjéhez, így amennyiben a cdc2MsA/B tirozinon foszforilált, feltételezhetően a megfelelő foszfortirozin jel is detektálható a p13^{suc1} affinitás tisztított frakcióban. A vizsgálat igazolta elvárásainkat, ugyanis az affinitás tisztított fehérjék közül egy, a molekulásúly alapján Cdc2MsA/B-nek megfelelő fehérje volt tirozinfoszforilált.

A humán Cdk1 foszfo-Tyr15-re specifikus ellenanyag alkalmazása további bizonyítékkal szolgált Cdc2MsA/B tirozinfoszforiláltságáról. A humán tirozinfoszforilált CDK ellen termeltetett ellenanyag által felismert aminosav szekvencia olyan mértékű homológiát mutatott a lucerna cdc2MsA/B megfelelő részével, hogy alkalmas volt a tirozinfoszforilált lucerna CDK kimutatására (13. ábra). Az ellenanyag felhasználásával az immunoblott analízis során mind a p13^{suc1} tisztított frakcióban, mind a nyers lucerna fehérjekivonatban a Cdc2MsA/B-nek megfelelő nagyságú fehérjét tudtunk detektálni.

KIEKIGEGTY(P)GVVYKGRHK Humán cdc2

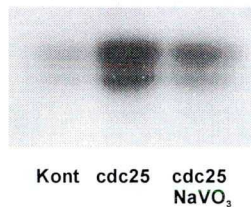
KVEKIGEGTY(P)GVVYKARDR Lucerna Cdc2MsA/B

13. ábra Az antigénként használt humán Cdk1 peptidszekvenciájának összehasonlítása a lucerna Cdc2MsA/B megfelelő szakaszával.

A fenti kísérletek igazolták a cdc2MsA/B tirozinfoszforiláltságát, arról azonban nem adtak felvilágosítást, hogy ez a foszforiláció hogyan befolyásolja a kinázaktivitást. Ezért a foszfortirozin immunoblott analízis során használt afidikolin szinkronizált mintákban a cdc2MsA/B komplexek in vitro kinázaktivitását is

meghatároztuk. Az így tisztított Cdc2MsA/B komplexek kináz aktivitása a sejtciklus során fluktuált. Az első S fázisos aktivitási csúcsot visszaesés követte, majd a komplex aktivitása ismét emelkedett a G2-ben. Az S fázist követő in vitro kinázaktivitás visszaesés egybeesett a 32 kDa-os fehérje tirozinfoszforiláltságának növekedésével, ami azt jelzi, hogy a cdc2MsA/B tirozinfoszforilációja gátolja a komplex kináz aktivitását (12. ábra).

Annak érdekében, hogy a tirozinfoszforiláció és a kinázaktivitás közötti összefüggést közvetlenebbül is bizonyítsuk, újabb kísérleteket végeztünk. A cdc25 foszfatázokról tudott, hogy a gátló hatású Tyr15 foszfor eltávolításáért felelős enzimek, ezért megvizsgáltuk, hogy a p13^{suc1} tisztított komplex in vitro kinázaktivitása heterológ cdc25 foszfatáz kezeléssel befolyásolható-e. A szinkronizált minták közül egy magas Cdc2MsA/B foszfortirozin szinttel rendelkező mintát affinitástisztítottunk, majd ecetmuslica cdc25 foszfatázzal inkubáltuk, minek eredményeként a komplex in vitro kinázaktivitása megemelkedett. A kezelés specifikitását bizonyítja, hogy NaVO₃ foszfatáz inhibitorral csökkenthető volt a cdc25 kiváltotta kinázaktivitás növekedés (14. ábra).



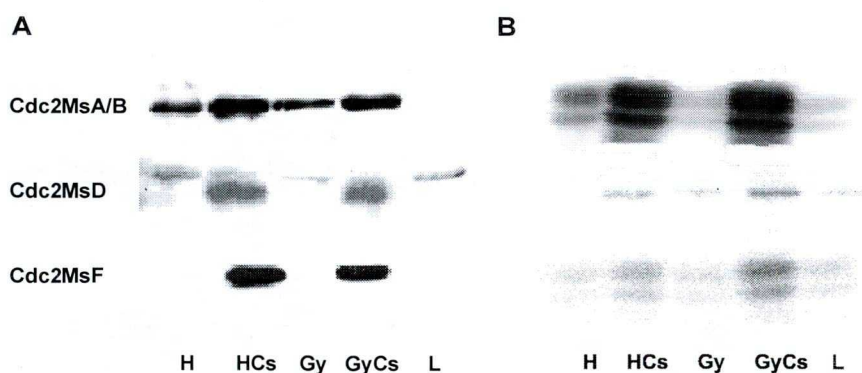
14. ábra p13^{suc1} kötött komplexek kinázaktivitás változása cdc25 kezelés hatására.

Mindezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a három vizsgált lucerna CDK közül csak a Cdc2MsA/B foszforilálódik tirozinon. A foszforiláció a konzervált Tyr15 helyen történik, és ennek következtében csökken a kináz komplex aktivitása. A továbbiakban az immunoprecipitált komplexek foszfatázkezelésével és foszfortirozin ellenanyaggal történő vizsgálatával szeretnénk minden kétséget kizáróan bizonyítani a cdc2MsA/B tirozinfoszforiláltságát.

IV.7. A CDK komplexek az osztódó növényi részekben aktívak

A CDK komplexek funkciójának megismeréséhez a tenyésztett sejtekkel végzett kísérletek mellett fontos az intakt növények vizsgálata is. Az ilyen irányú munkák túlnyomó részében az *in situ* hibridizációs módszert alkalmazzák. Ezen eredmények szerint a különböző CDK-k az aktívan osztódó növényi részekben, illetve a nyugalomban lévő, de osztódási képességgel rendelkező sejtekben fejeződnek ki (19, 25, 27).

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 (15. ábra).



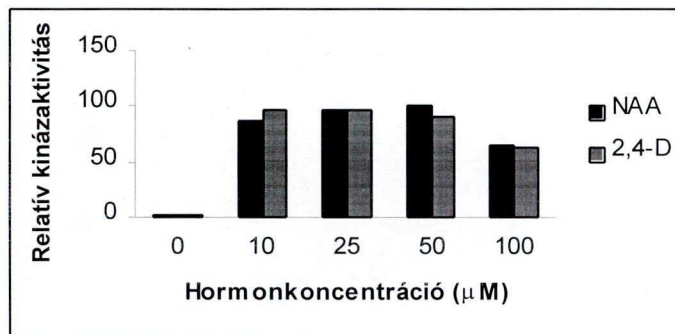
15. ábra Lucerna szövetek immunoblott analízise (A panel), illetve *in vitro* kináz aktivitás mérése (B panel).

A minden vizsgált növényi részben detektált alacsony szintű in vitro kinázaktivitás abból következhet, hogy a túlnyomórészt nyugalomban lévő sejtekből álló részekben található szállítószövetek tartalmaznak aktívan osztódó sejteket is. Ezekben a sejtekben a sejtciklus minden fázisában egyforma mennyiségben jelenlévő Cdc2MsA/B fehérjék szintje elég magas ahhoz, hogy már immunobloton is kimutatható legyen. A cdc2MsD és Cdc2MsF csak a G2/M fázisokban fejeződik ki, így ezek csak az immunoblotnál érzékenyebb in vitro kináz aktivitásmérésnél adnak jelet. Mindezeket figyelembe véve, az intakt növényeken végzett kísérleteink igazolják a három CDK sejtosztódásban betöltött szerepét, és összhangban vannak az in situ hibridizációs kísérletek eredményeivel is.

IV.8. A mitogén hormonok növelik, az ABA csökkenti a CDK aktivitást

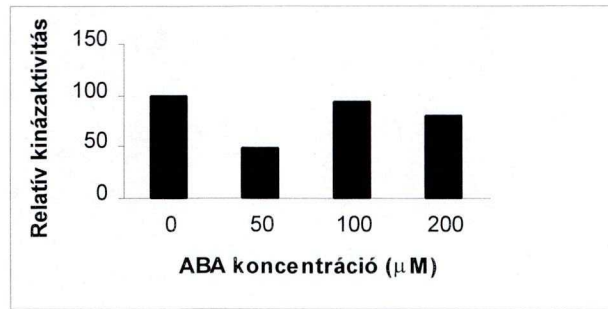
Az auxinról és citokininekről régóta tudott, hogy a növényi sejtosztódás elengedhetetlen hormonjai, hiányukban nem megy végbe DNS szintézis és osztódás sem. A két mitogén hormonnal szemben az ABA a sejtosztódásra ellentétes hatást fejt ki, jelenlétében sejtciklusgátlást figyelhetünk meg, és a sejtek nem osztódnak. A hormonok és a sejtosztódás közötti kapcsolat jól ismert, azonban a jelenség molekuláris hátteréről csak az utóbbi években születtek eredmények (ld. Irodalmi áttekintés 23. old.). Munkánk során a két mitogén hatású szintetikus növényi hormon mellett a sejtosztódást gátló ABA és a CDK aktivitások közötti kapcsolatot vizsgáltuk. Kísérleteink során először a hatékony hormon koncentrációkat szerettük volna meghatározni annak érdekében, hogy a továbbiakban lehetőleg a fiziológiás hormon mennyiségeket megközelítő koncentrációkat alkalmazhassunk. Az auxin-hatás tanulmányozására a nem osztódó sejtek a legalkalmasabbak, ezért a túlnyomórészt G0/G1-es sejteket tartalmazó leveleken végeztük a kezeléseket. A levágott leveleket megfelelő mennyiségű szintetikus auxint tartalmazó tápoldatokon úsztattuk, majd 48 óra múlva megmértük a minták p13^{suc1} kötött kinázaktivitását. A kezeléseknél két

különböző auxin analógot alkalmaztunk bizonyítandó, hogy a hormonok hatása fiziológiás. A szintetikus hormonok koncentrációjának emelése nyomán emelkedő kinázaktivitást tapasztaltunk, ez az emelkedés azonban visszaesett a magasabb koncentrációknál. A 2,4-D az irodalmi adatoknak megfelelően már alacsonyabb koncentrációnál hasonló hatást váltott ki, mint a NAA (16. ábra).



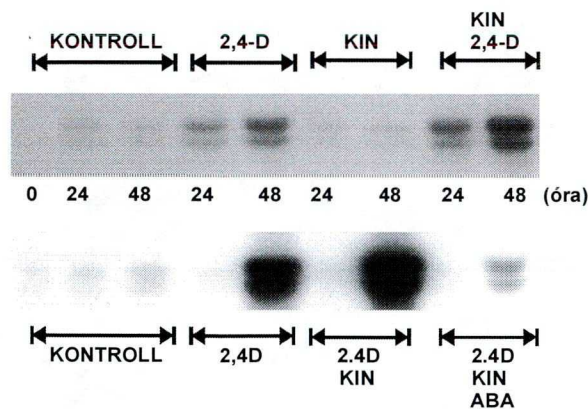
16. ábra A $p13^{suc1}$ affinitás tisztított CDK komplexek 2,4-D és NAA kezelés hatására bekövetkezett kinázaktivitás változása. A relatív aktivitás számításánál a maximális értéket tekintettük 100-nak.

A mitogén növényi hormonokkal szemben, az ABA és a CDK aktivitás közötti kapcsolat elemzésére az osztódó sejtek megfelelőek, így ezeket a kísérleteket A2 sejtuszuspenzióon kiviteleztük. A kezelés során az 1 mg/ml 2,4-D és 0,2 mg/ml kinetin jelenlétében növekvő sejtekhez változó mennyiségű ABA-t adtunk. Az auxin-kezelésekhez hasonlóan 48 óra múlva mértük $p13^{suc1}$ kötött kinázaktivitást. Az ABA CDK kinázaktivitás gátló hatása 50 μ M-nál már maximális volt, sőt a nagyobb koncentrációjú ABA alkalmazásánál a gátlás mértéke némiképp visszaesett (17. ábra).



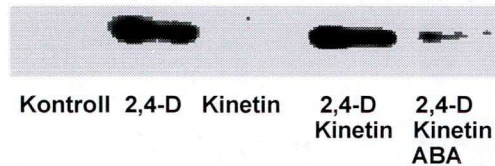
17. ábra A $p13^{suc1}$ kötött CDK komplexek ABA hatására bekövetkezett kinázaktivitás változása. A relatív aktivitás számításánál a maximális éréket tekintettük 100-nak.

Az alkalmazandó hormonkoncentrációk meghatározását követően arra kerestük a választ, hogy az egyes hormonok hogyan befolyásolják egymás hatását. A kísérleteket ebben az esetben is lucernaleveleken végeztük. A kezeléseknél 10 μ M 2,4-D-t, 1 μ M kinetint és 50 μ M ABA-t használtunk. Az egy, illetve két nap múlva mért $p13^{suc1}$ kötött kinázaktivitás a kinetin-kezelt levelekben nem emelkedett jelentősen a kontrollhoz viszonyítva. Ezzel szemben a 2,4-D kezelés látványos aktivitásemelkedéssel járt, és ez a hatás még tovább fokozódott kinetin és 2,4-D együttes alkalmazásakor. Az ABA a várakozásoknak megfelelően gátolta a mitogén hormonok hatását, a 2,4-D és kinetin okozta kinázaktivitás emelkedés jelentősen alacsonyabb volt az ABA jelenlétében (18. ábra).



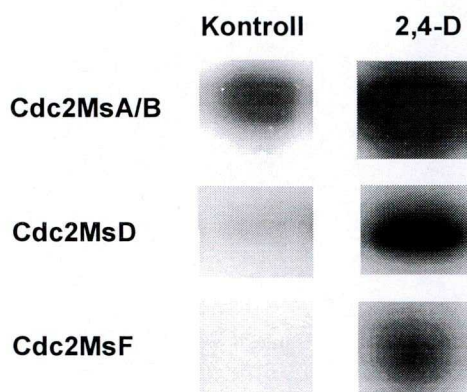
18. ábra A $p13^{suc1}$ affinitás tisztított CDK komplexek hormonkezelés hatására bekövetkezett kinázaktivitás változása. Az alsó panel autoradiogramját hosszabban exponáltuk, hogy az ABA kezelés nyomán bekövetkező változások is jól láthatók legyenek.

A fenti kísérletek kétnapos mintáit Cdc2MsA/B ellenanyaggal immunoblott analízisen is tanulmányoztuk. A vizsgálat eredményei szerint a kinetin-kezelés hatására nem szintetizálódott a fehérje, és a 2,4-D okozta fehérjeszint emelkedés sem fokozható tovább kinetinnel. Az ABA gátló hatása már fehérjeszinten megnyilvánul, ugyanis csak csökkent mennyiségű Cdc2MsA/B kináz mutatható ki a sejtosztódást gátló hormon hatására (19. ábra).



19. ábra Hormonkezelt levelekben immunoblott analízissel detektált Cdc2MsA/B fehérjeszint változások.

Miután előállítottuk a lucerna CDK-k elleni specifikus ellenanyagokat, a 2,4-D-kezelést megismételtük. A 48 óra után vett minták kinázaktivitását ebben az esetben már immunoprecipitálással határoztuk meg. Az ily módon kapott eredmények összecsengenek a $p13^{suc1}$ affinitástisztítással mért kinázaktivitásokkal. A $p13^{suc1}$ -nal kapcsolódó Cdc2MsA/B és Cdc2MsF komplexek aktivitása egyaránt megemelkedett, és emellett a $p13^{suc1}$ -nal nem tisztítható Cdc2MsD in vitro kinázaktivitása is magasabb volt. Így elmondhatjuk, hogy az általunk tanulmányozott CDK-k mindegyike fokozott aktivitással válaszol a szintetikus auxinkezelésre (20. ábra).



20. ábra 2,4-D kezelt levelekből immunoprecipitált CDK komplex kinázaktivitásának változása.

A kísérletek során kapott eredményeink tovább bővítették a hormonok és a sejtciklus szabályozás közötti kapcsolatra vonatkozó ismereteket. Bizonyítottuk, hogy a korábban már ismert 2,4-D hatására bekövetkező A típusú CDK-k transzkripciójának fokozódása fehérjemennyiség és kinázaktivitás emelkedéssel is együtt jár. Láthattuk, hogy a 2,4-D hatására megjelenő Cdc2MsA/B fehérje mennyisége nem nő tovább kinetin hozzáadására, ennek ellenére a $p13^{suc1}$ in vitro kinázaktivitása megemelkedik. A jelenséget okozhatja a kinetin hatására végbemenő cdc2MsA/B Tyr15 defoszforilációja, de az sem kizárható, hogy a kinetin valamilyen módon a Cdc2MsF aktivitását fokozza, és ennek a következménye a $p13^{suc1}$ kinázaktivitás emelkedése.

Az ABA és a CDK-k kapcsolatát eddig nem vizsgálták. A hormonkezeléses vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy az ABA sejtosztódásra kifejtett hatása a CDK-k gátlásában is jelentkezik. A fenti eredményekből nem tudhatjuk, hogy ez közvetlen eredménye-e az ABA kezelésnek, vagy csak másodlagos hatása. Az ABA és a CDK-k közvetlen kapcsolata mellett szól, hogy az Arabidopsis cdc2a promotor régiójában ABA válaszáért felelős elemet azonosítottak (117), és munkánk során az ABA-kezelés következtében a Cdc2MsA/B fehérjeszintje visszaesett. Az ABA kiváltotta CDK aktivitás csökkenést magyarázhatja a hormon hatására indukálódó CKI fehérje CDK aktivitást gátló képessége is (lsd. Irodalmi áttekintés 23. old.).

V. Összefoglalás

A sejtciklus-szabályozás a molekuláris sejtbiológia egyik legfiatalabb kutatási területe. A szabályozásról szerzett ismereteink döntő része az utóbbi tíz év munkájának az eredménye. A kezdeti kutatások vizsgálati modelljei elsősorban a különböző állatfajok, élesztők és humán sejtenyészetek voltak. Ezekben a rendszerekben a sejtciklus-szabályozás központi szereplőit, 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. 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 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 szekvenciárészeket tartalmazó CDK-kat találunk. A G2 és M fázisok további finomítását teszi lehetővé, hogy a növényekben- szemben az állatokkal- ezekben a fázisokban expresszázó D típusú ciklinek is ismertek, így a

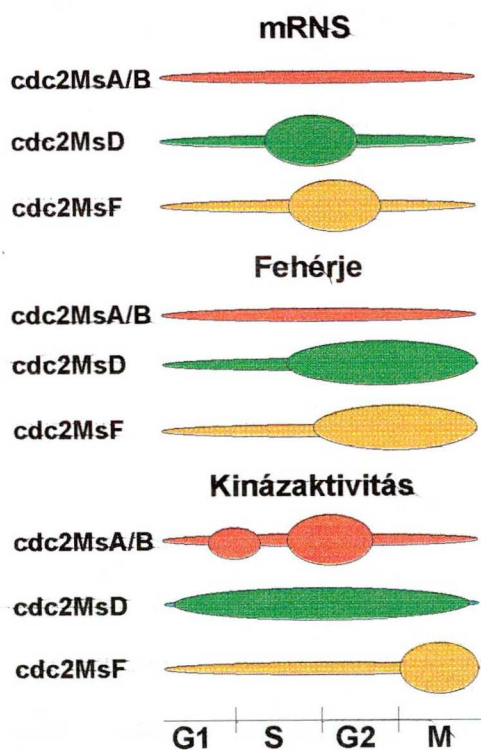
lehetséges CDK-ciklin komplexek száma még magasabb. Az emlős D típusú ciklinek, a G0/G1 fázisok "szignálközvetítőiként" ismertek, mitogén hatásokra indukálódnak, és ennek nyomán a nyugvó sejtek belépnek a sejtciklusba. Ennek analógiájára elképzelhető, hogy a növényi, G2-ben expresszáldó D típusú ciklinek hasonló szerepet töltenek be a G2-ben nyugalomban lévő sejtek sejtciklusba lépésekor.

Dolgozatomban a G2 és M fázisokban közreműködő lucerna CDK-kon történt vizsgálatok eredményeiről számoltam be. Munkánk során biokémiai vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy az egyes CDK-k alkotta komplexeknek eltérő a szubsztrátspecifitása, az inhibitorérzékenysége és a p13^{suc1}-kötő képessége is. A CDK-k szubsztrátspecifitásában tapasztalt különbségek a komplexek eltérő in vivo szerepére utalhatnak. Ezen eredmények alapján elkezdtük kinázok in vivo szubsztrátjainak azonosítását is. Jelenleg azt vizsgáljuk, hogy a Cdc2MsD a sejten belül komplexet képez-e in vitro szubsztrátjával, a Topoizomeráz II-vel.

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 biokémiai vizsgálatok eredményeinek felhasználásával egy újabb megközelítési mód áll rendelkezésünkre, mellyel igazolhatjuk az egyes CDK-k és ciklinek közötti kapcsolatot. Ugyanis amennyiben egy CDK és egy ciklin komplexet képez, a megfelelő ciklin és CDK ellenanyagokkal történő immunoprecipitálással tisztított komplexek feltételezhetően azonos biokémiai jellegzetességekkel rendelkeznek, így ezen sajátságok vizsgálata megerősítheti az egyes in vivo CDK-ciklin párok létét. A rendelkezésünkre bocsátott lucerna ciklin ellenanyagokkal megkezdtük az ilyen irányú kísérleteket.

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 kinázaktivitással 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. (21. ábra)



21. ábra A CDK mRNS-, fehérjeszint és kinázaktivitás változása a sejtciklus során. (A változások arányairól az ábra nem ad felvilágosítást.)

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. Eredményeink 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.

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 antagonist 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 ellenőrizve 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.

VI. Anyagok és módszerek

Növények és sejtvonalak

Kísérleteink során *Medicago varia* cv. Rambler A2 sejtuszuspenziót használtunk. A kultúrát MS tápoldaton 1 mg/l 2,4-D és 0.2 mg/l kinetin jelenlétében, hetenkénti passzállással tartottuk fenn. A levelek ugyanezen lucerna vonal sterilen tartott növényeiről származtak.

Sejtciklus szinkronizálás

A szuszpenziót passzállás után egy héttel a szokott tápoldattal négyszeresre hígítottuk, ezzel 500 000/ml sejtszámot állítottunk be. A sejtek számolhatósága érdekében az áramlásos citometriánál leírtak szerint protoplasztáltuk. A hígítás után hat órával a sejtciklust 10 µg/ml végkoncentrációjú afidikolinnal blokkoltuk. 16 óra múlva a sejteket leülepítettük, és háromszor 15 percig mostuk az eredeti térfogattal azonos mennyiségű friss tápoldattal. A további vizsgálatokhoz kétóránként mintát vettünk.

A kettős gátlás esetén az afidikolin kimosása után két órával 100 µM roszkovitne-t adtunk a szuszpenzióhoz.

Áramlásos citometria

2x 300 µl szuszpenziót 800 rpm-mel 2 percig centrifugáltunk. A sejtekről leszívtuk a felülúszót, majd 300 µl protoplasztáló oldatban 1 órán-át 28 C°-on lassú rázatással emésztettük őket. Ezt 2 perc 800 rpm-en történő centrifugálás követte. A felülúszó eltávolítása után a protoplasztokat 1ml MS oldattal mostuk, és azonos körülmények között centrifugáltuk. A protoplasztokhoz végül 1ml Galbraith puffert adtunk. Ezt követően a protoplasztok 10 percet jégen álltak, majd óvatos szuszpendálással kiszabadítottuk a sejtmagokat. Az izolált sejtmagok 54 µl 37 %-os formaldehid hozzáadásával 4 C° -on egy hétig tárolhatók.

Az áramlásos citometriás mérés előtt 5 perccel 20 µg/ml etidium-bromid koncentrációval festettük a sejtmagokat.

Az áramlásos citometriás mérést Becton-Dickinson, FACSCalibur berendezésén végeztük.

Mitotikus index meghatározás

200 µl sejtszuszpenziót 2 percig 1000 rpm-mel centrifugáltunk. A felülúszót leszívtuk, majd a sejteket 1ml PBS 4 % formaldehiddel egy órán át szobahőn fixáltuk. A rögzített sejtek 4 °C-on két napig tárolhatók. A sejteket festés előtt háromszor PBS-sel mostuk. Tárgylemezre 30 µl 1 µg/ml koncentrációjú DAPI-t cseppentettünk, majd ehhez egy cseppnyi előkészített sejt-PBS keveréket adtunk. 5-10 perc szobahőn történt festés után leszívtuk a DAPI oldatot. A sejtekre egy csepp mounting solution-t (Fluoromount G, Southern Biotech Associates) raktunk, és tárgylemezzel lefedtük. A tárgylemezek határozott nyomásával az összetapadt sejteket eltávolítottuk egymástól. A tárgylemezeket sötétben néhány hónapig tárolhatók. A sejteket UV fényben DAPI filter készlettel vizsgáltuk. A mitotikus sejtek százalékát 500 sejt vizsgálatával adtuk meg.

Poliklonális ellenanyag termeltetés és tisztítás

Az albinó nyulakat KLH-hoz (Keyhole Limpet Hemacyanin) ciszteinen keresztül kapcsolt, Cdc2MsA és Cdc2MsB fehérjék közös C-terminális peptidszakaszával (EYFKDIKFVP), és a Cdc2MsD (PYFDSLDKSQY), illetve Cdc2MsF (DDLDKTHL) C-terminális peptidszakaszaival immunizáltuk. Az ellenanyag termeltetése és tisztítása során E. Harlow protokollját követtük (123). Az antigéneket a megfelelő Freud adjuvánsokban (Sigma) szuszpendáltuk. Az emlékeztető oltásokat háromhetenként adtuk.

A poliklonális szérumok affinitás tisztításához az antigénként használt peptideket kapcsoltuk EAH-Sepharose 4B (Pharmacia) ágyhoz T. Kitagawa (124) eljárása alapján. 2 ml EAH-Sepharose 4B ágyat ekvilibráltunk 25% dioxán, majd

50% dioxán 10 mM pH 7,0 foszfát pufferben. Az ágy szabad aminocsoportjainak kétszeres moláris mennyiségét vettük a maleido-benzoészav-hidroxiszukcinimid-észterből. Dioxánban feloldottuk, majd 4ml 50% dioxán 10 mM pH 7,0 foszfát pufferben 2 órán át szobahőn az ággal kevertettük. A kapcsolás után az ágyat az 50%-os dioxán pufferrel mostuk, majd 3 óra szobahőn történő kevertetéssel ugyanebben a pufferben kapcsoltuk hozzá a 6-7 mg peptidet. Mosás után a szabad csoportokat 100 μ M β -merkaptotienollal fél órán át blokkoltuk. Az ágyat több lépésben ekvilibráltuk, hogy megszabaduljunk a dioxántól, végül 4 C° -on PBS+0,02 % nátrium azid oldatban tároltuk.

Az oszlophoz specifikusan kötődő immunglobulinokat az E. Harlow által leírt módszerrel (123), alacsony illetve magas pH értéken eluáltuk. A tisztított ellenanyagokat -70 C° -on tároltuk.

Fehérjekivonat készítése

A sejtszuspenziós sejteket, illetve a leveleket kétszeres térfogatnyi feltárási pufferben kvarchomok jelenlétében eldörzsöltük, majd 4 C°-on 13000 rpm fordulattal 15 percig centrifugáltuk. A felülúszókat kináz reakciókra azonnal felhasználtuk. Az immunoblott analízisre szánt mintákhoz megfelelő mennyiségű SDS minta puffert adtunk, és -20 C°-on tároltuk.

Immunoblott analízis

A fehérjemintákból 30 μ g futtattunk 10 %-os SDS poliakrilamid gélen. Az ily módon elválasztott fehérjéket transzfer pufferben polivinilidén-difluorid membránra (Millipore) transzferáltuk 10V feszültséggel egy éjszakán át.

A membránt 2 órán át szobahőn tejpor-TBS pufferral telítettük. A foszfo-tirozin ellenanyaghoz (PY-20 klón) a telítő pufferben tejpor helyett BSA-t használtunk. Az első ellenanyaggal 1 μ g/ml koncentrációban telítő pufferben 2 órán át szobahőn inkubáltuk, majd háromszor mostuk TBST-vel. A második ellenanyagot (Anti-Rabbit whole IgG-POD, Sigma) a gyártó ajánlása szerint

hígítottuk a telítő pufferben, és ezzel 1 órán át kezeltük a membránt szobahőn. Ezután a fent vázolt módon ismét mostuk a membránt. TBS-sel történő öblítés után a gyártó protokollja szerint kiviteleztek az ECL (Pierce, SuperSignal West Pico) reakciót.

Immunoprecipitálás, p13^{suc1} affinitástisztítás

Immunoprecipitáláskor 50 µg fehérje kivonathoz 1 µg poliklonális ellenanyagot adtunk, és 1 órán át jégen inkubáltuk. Ezután 25 µl ProteinA-Sepharose-zal kevertettük 1 órán át 4 C° -on. Az ágyhoz nem specifikusan kötődött fehérjéket háromszori RIPA és egyszeri kináz puffer mosással távolítottuk el.

p13^{suc1} affinitáskötéshez a p13^{suc1} ágyat Brizuela és mtsi. nyomán készítettük (115). Az affinitástisztításhoz 50 µg fehérjekivonatot 1 órán át 4 C° -on kevertettünk 20 µl ágygal. A kötést háromszori mosó pufferrel, és egyszeri kináz pufferrel történő mosás követte.

Bakteriálisan túltermeltetett fehérjék tisztítása

Az *A. thaliana* TopoizemerázII C-terminális doménjét a QIAexpress rendszer segítségével tisztítottuk. A TopoII-CTD tartalmazó pQE-30 vektort SG13009 *E. coli* törzsbe transzformáltuk, majd 400 ml kultúrát növesztettünk 25 µg/ml kanamycin és 75 µg/ml carbanecilin tartalmú LB-ben 37 C°-on, amíg az OD₆₀₀ 0,5 körüli értéket ért el. Ezután a sejteket 0,5 mM IPTG-vel 2 órán át 37 C°-on indukáltuk, majd Sorvall GSA rotorban 5000 rpm-mel 30 percig 4 C°-on centrifugáltuk. A sejteket 15 ml lízis pufferben 1 órán át szobahőn kevertettük. A feltárást centrifugálás követte Sorvall SS-34 rotorban 19000rpm-mel 20 percig 4 C°-on. A felülúszóhoz annyi imidazolt adtunk, hogy a végkoncentrációja 1 mM legyen, majd Ni-Agarose 2ml (Invitrogen ProBond Resin) ágyhoz kötöttük 1 óra szobahőn történő kevertetéssel. A kötést követően kétszer mostuk az ágyat 20 ml lízis pufferrel, majd kétszer mosó pufferrel. A kötött fehérjéket az imidazol koncentráció

lépcsőzetes emelésével eluáló pufferben lemostuk. A Topoizomeráz II-CTD tartalmazó frakciókat az urea koncentráció lépcsőzetes csökkentésével dializáló pufferrel szemben dializáltuk.

A cdc25 foszfatáz tisztításánál A. Kumagai és W. G. Dunphy (125), az Rb tisztításánál K. Helin és mtsai (126), az RNS polimerázII-CTD tisztításánál Umeda és mtsai. (52) protokolja szerint jártunk el.

In Vitro kináz reakció és cdc25 foszfatáz kezelés

Az affinitás tisztított, illetve immunoprecipitált komplexet 30 µl kináz pufferben és 4 µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP jelenlétében 30 percig szobahőn inkubáltuk. A kinázreakciót 7,5 µl 5xSDS-mintapuffer hozzáadásával állítottuk le. A fehérjemintákat SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk, és szárítás után autoradiogramot készítettünk. A kvantitatív analízishez a Molecular Dynamics Phosphorimager 445 SI berendezését és szoftverét használtuk. A szubsztrátspecifitás vizsgálatánál hiszton helyett a megadott fehérjéből használtuk 2 µg szubsztrátként.

A foszfatáz kezeléseket A. Kumagai és W. G. Dunphy eljárása alapján végeztük (125).

RNS tisztítás és Northern analízis

Az RNS tisztítást M. Maes és mtsi. (126) eljárása szerint végeztük. Az RNS mintákból 20 µg futtattunk 1,2 %-os formaldehides agaróz gélen. A szeparált RNS-t kapilláris blott módszerrel 20xSSC-ben transzferáltuk Hybond-N (Amersham) membránra. A gélfuttatást és a transzfert is a gyártó ajánlása alapján kiviteleztük. Az elválasztott mintákat Stratagene UV Crosslinker berendezéssel kötöttük a membránra.

A hibridizációs próbát a Cdc2MsF nem transzlálódó régiójának PCR amplifikációjával állítottuk elő, a következő primerek felhasználásával: 5'-TTTAGGTTCCAAATGTTGTT-3' és 5'-CATGTCAGGTAGAACCAATTA-3'. Az ily

módon előállított terméket "random priming" módszerrel jelöltük a gyártó útmutatása alapján (Amersham, Multiprime DNA labelling system, RPN 1601).

A hibridizációt J. Sambrook mtsi. (127) leírása alapján végeztük annyi módosítással, hogy pufferként 100 µg/m hering sperma, 10 x Denhart oldat tartalmú 6 x SSPE-t használtunk, és a filtert 4 órán át előhibridizáltuk. A hibridizáció végeztével a membránt 2 x 10 percig 2 x SSC, 0,1 % SDS oldattal mostuk, majd PIA berendezéssel kiértékeltek.

Felhasznált oldatok

Protoplasztáló puffer:

3 mM MES pH 5.7
5 mM CaCl_2
0.3 M mannitol
2 % celluláz R-10
1 % pektináz

Galbraith puffer:

20 mM MOPS pH 7.0
30 mM Nátrium-citrát
45 mM MgCl_2
0.1 % Triton-X100

Feltáró puffer:

25 mM Tris-HCl pH 7.5
75 mM NaCl
15 mM MgCl_2
15 mM EGTA
15 mM p-nitrofenilfoszfát
60 mM β -glicerofoszfát
1 mM ditiotritol
0,1 % Nonident-P40
0,1 mM Na_3VO_4
0,5 mM NaF
1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid
10 ug/ml leupeptin, aprotinin,
antipain
5 ug/ml pepstatin, chymostatin

RIPA:

20 mM Tris-HCl pH 7.5
5 mM EDTA
2 mM EGTA
100 mM NaCl
2 mM NaF
1 mM Na_3VO_4
0,1 % NP-40

Mosó puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7.5
5 mM EDTA
5 mM EGTA
250 mM NaCl
2,5 mM NaF
0,1 % NP-40

Kináz puffer:

50 mM Trisz-HCl pH 7.6
15 mM MgCl_2
5 mM EGTA
1 mM DTT
15 μg Histon-I Type III-S (Sigma)
10 μM ATP
4 μCi gamma ATP

Telítő puffer:

5% tejpor-0.05% Tween 20 TBS-ben
25 mM Trisz-HCl pH 8.0
150 mM NaCl

Transzfer puffer:

50 mM Trisz bázis
50 mM bórsav

Lízis puffer:

6 M Guanidinium-klorid
10 mM Trisz-HCl
100 mM Na-foszfát pH 8.0

Mosó puffer (TopolI):

8 M Urea
10 mM Trisz-HCl
100 mM Na-foszfát pH 8.0

Eluáló puffer:

6 M Urea
10 mM Trisz-HCl
100 mM Na-foszfát pH 8.0
Imidazol (10 mM, 20 mM, 40 mM,
80 mM, 160 mM)

Dializáló puffer:

25 mM Trisz-HCl pH 7.5
100 mM NaCl
10 % glicerol
Urea (4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M,
0 M)

VII. Irodalomjegyzék

1. A. Howard and S. R. Pelc, Synthesis of nucleoproteins in bean root cells. *Nature* 167, 599-600 (1951)
2. R. T. Johnson and P. N. Rao, Nucleocytoplasmic interactions in the achievement of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 46, 97-155 (1971)
3. P. N. Rao and R. T. Johnson, Mammalian cell fusion: studies on the DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225, 159-64 (1971)
4. T. Evans, E. T. Rosenthal, J. Youngbloom, D. Diestel and T. Hunt, Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-96 (1983)
5. Y. Masui and C. Markert, Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177, 129-45 (1971)
6. M. J. Lohka, M. K. Hayes and J. L. Maller, Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3009-13 (1988)
7. L. Hartwell, J. Culotti, J. R. Pringle and B. J. Reid, Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51 (1974)
8. P. Nurse and P. Thuriaux, Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 96, 627-37 (1980)
9. P. Nurse and Y. Bisset, Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* 292, 558-60 (1981)
10. S. I. Reed, J. A. Hadwigwer and A. T. Lörincz, Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell cycle gene *CDC28*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4055-4059 (1985)
11. W. G. Dunphy, L. Brizuela, D. Beach and J. Newport, The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54, 423-31 (1988)
12. J. Gautier, C. Norbury, M. Lohka, P. Nurse and J. Maller, Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54, 433-39 (1988)
13. M. G. Lee and P. Nurse, Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327, 31-35 (1987)
14. R. N. Booher, C. E. Alfa, J. S. Hymans and D. H. Beach, The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58, 485-97 (1989)
15. B. Stern and P. Nurse, A quantitative model for the *cdc2* control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* 12, 345-50 (1996)
16. K. Nasmyth, At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* 12, 405-12 (1996)
17. E. A. Nigg, Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* 17, 471-80 (1995)
18. C. J. Sherr, Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-77 (1996)
19. G. Segers, I. Gadisseur, C. Bergounioux, J. de Almeida Engler, A. Jacqmard, M. Van Montagu and D. Inzé, Plant Cell Proliferation and Its Regulation in Growth and Development, J. A. Bryant and D. Chiatante, eds 1-19 (1997)

20. Z. Magyar, T. Mészáros, P. Miskolczi, M. Deák, A. Fehér, S. Brown, É. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, M. Bilgin, L. Bakó, C. Koncz and D. Dudits, Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9, 223-235 (1997)
21. P. C. L. John, F. J. Sek and M. G. Lee, A homolog of the cell cycle control protein p34cdc2 participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* 1, 1185-1193 (1989)
22. L. Bögre, K. Zwerger, I. Meskiene, P. Binarova, V. Csizmadia, C. Planck, E. Wagner, H. Hirt and E. Heberle-Bors, The cdc2Ms kinase is differently regulated in the cytoplasm and the nucleus. *Plant Physiol.* 113, 841-52 (1997)
23. C. Wittenberg and S. I. Reed, Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex. *Cell* 54, 1061-72 (1988)
24. P. J. Welch and J. Y. J. Wang, Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3093-97 (1992)
25. M. C. Martinez, J.-E. Jorgensen, M. A. Lawton, C. J. Lamb and P. W. Doerner, Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7360-64 (1992)
26. A. S. Hemerley, P. Ferreira, J. de Almeida Engler, M. Van Montagu, G. Engler and D. Inzé, cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5, 1711-23 (1993)
27. P. R. Fobert, V. Gaudin, P. Lunness, E. S. Coen and J. H. Doonan, Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* 8, 1465-76 (1996)
28. M. Umeda, C. Umeda-Hara, M. Yamaguchi, J. Hashimoto and H. Uchimiya, Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiol.* 119, 31-40 (1999)
29. T. Hunt, Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell Biol.* 2, 213-22 (1991)
30. H. Kobayashi, E. Stewart, R. Poon, P. J. Admczewski, J. Gannon and T. Hunt, Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol. Biol. Cell* 3, 1279-94 (1992)
31. M. E. Lees and E. Harlow, Sequences within conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13 1194-1201 (1993)
32. D. O. Morgan, Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261-91 (1997)
33. B. Andrews and V. Measday, The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* 14, 66-72 (1998)
34. F. R. Cross, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, Starting the cell cycle: What's the point? 790-797 (1997)
35. J. P. Renaudin, J. H. Doonan, D. Freeman, J. Hashimoto, H. Hirt, D. Inzé, T. Jacobs, H. Kouchi, P. Rouzé, M. Sauter, A. Sauré, D. A. Sorrell, V. Sundaresan and J. A. H. Murray, Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and

- D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* 32, 1003-18 (1996)
36. J. M. Peters, SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 759-768 (1998)
37. M. Ruegger, E. Dewey, W. M. Gray, L. Hobbie, J. Turner and M. Estelle, The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev.* 12, 198-207 (1998)
38. P. Genschik, M. C. Criqui, Y. Parmentier, A. Derevier and J. Fleck, Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* 10, 2063-75 (1998)
39. D. Dudits, Z. Magyar, M. Deák, T. Mészáros, P. Miskolczi, A. Fehér, S. Brown, É. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, L. Bakó, Cs. Koncz and J. Györgyey, Cyclin-dependent and calcium-dependent kinase families: response of cell division cycle to hormone and stress signals. *Plant Cell Division*, Portland Press Research Monograph 21-47 (1996)
40. Z. Magyar, L. Bakó, L. Bögre, D. Dedeoglu, T. Kapros and D. Dudits, Active cdc2 genes and cell cycle phase-specific cdc2-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J.* 4, 151-61 (1993)
41. P. R. Fobert, E. S. Coen, G. J. P. Murphy and J. H. Doonan, Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. *EMBO J.* 13, 616-24 (1994)
42. H. Kouchi, M. Sekine and S. Hata, Distinct classes of mitotic cyclins are differentially expressed in the soybean shoot apex during the cell cycle. *Plant Cell* 7, 1143-55 (1995)
43. Y. Y. Setiady, M. Sekine, N. Hariguchi, T. Yamamoto, H. Kouchi and A. Shinmyo, Tobacco mitotic cyclins: cloning, characterization, gene expression and functional assay. *Plant J.* 8, 949-57 (1995)
44. I. Meskiene, L. Bögre, M. Dahl, M. Pirck, D. T. H. Cam, I Swoboda, E. Heberle-Bors, G. Ammerer and H. Hirt, cycMs3, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G0-to-G1 transition of the cell cycle. *Plant Cell* 7, 759-71 (1995)
45. M. Dahl, I. Meskiene, L. Bögre, D. T. H. Cam, I Swoboda, R. Hubmann, H. Hirt and E. Heberle-Bors, The D-type alfalfa cyclin gene cycMs4 complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell* 7, 1847-57 (1995)
- 46 R. Soni, J. P. Carmichael, Z. H. Shah and J. A. H. Murray, A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7, 85-103 (1995)
- 47 D. A. Sorrell, B. Combettes, N. Chaubet-Gigot, C. Gigot and J. A. H. Murray, Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol* 119, 343-51 (1999)
48. W.-F. Zheng and J. V. Ruderman, Functional analysis of the P box, a domain in cyclin B required for the activation of Cdc25. *Cell* 75, 155-64 (1993)
49. P. Ferreira, A. S. Hemerley, J. de Almeida Engler, M. Van Montagu, G. Engler and D. Inzé, Three discrete classes of Arabidopsis cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11311-17 (1994)
50. C. J. Sherr, Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-65 (1993)

51. P. Kaldis, The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 55, 284-96 (1999)
52. M. Umeda, R. P. Bhalearao, J. Schell, H. Uchimiya and Cs. Koncz, A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5021-26 (1998)
53. M. Yamaguchi, M. Umeda and H. Uchimiya, A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II *Plant J.* 16, 613-19 (1998)
54. R. Y. C. Poon and T. Hunter, Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* 270, 90-93 (1995)
55. D. J. Lew and S. Kornbluth, Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 795-804 (1996)
56. F. Liu, J. J. Stanton, Z. Wu and H. Piwnica-Worms, The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell Biol.* 17, 571-583 (1997)
57. P. R. Mueller, T. R. Coleman, A. Kumagai and W. G. Dunphy, Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Mol. Cell Biol.* 6, 119-34 (1995)
58. I. Hoffman, P. R. Clarke, M. J. Marcote, E. Karsenti and G. Draetta, Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* 12, 53-63 (1993)
59. G. Draetta and J. Eckstein, Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Bioch. Bioph. Acta* 1332, 53-63 (1997)
60. K. Zhang, D. S. Letham and P. C. L. John, Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200, 2-12 (1996)
61. P. C. L. John, Cytokinin stimulation of cell division: Essential signal transduction via cdc25 phosphatase. *J. Exp. Bot.* 49, 91 (1998)
62. M. H. Bell, N. G. Halford, J. C. Ormrod and D. Francis, Tobacco plants transformed with cdc25, a mitotic inducer gene from fission yeast. *Plant Mol. Biol.* 23, 445-51 (1993)
63. R. S. McKibbin, N. G. Halford and D. Francis, Expression of fission yeast cdc25 alters the frequency of lateral root formation in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 36, 601-12 (1998)
64. M. Peter and I. Herkowitz, Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265, 1228-31 (1994)
65. E. Schwob, T. Böhm, M. D. Mendenhall and K. Nasmyth, Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Cell* 79, 233-44 (1994)
66. C. J. Sherr and J. M. Roberts, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Gen. and Dev.* 13, 1501-12 (1999)
67. M. Cheng, P. Olivier, J. A. Diehl, M. Fero, M. F. Roussel, J. M. Roberts and C. J. Sherr, The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18, 1571-83 (1999)
68. J. LaBaer, M. D. Garrett, L. F. Stevenson, J. M. Slingerland, C. Sadhu, H. S. Chou, A. Fattaey and E. Harlow, New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Gen. and Dev.* 11, 847-62 (1997)

69. I. Reynisdottir, K. Polyak, A. Iavarone and J. Massague, Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Gen. and Dev.* 9, 1831-45 (1995)
70. J. Hayles, D. Beach, B. Durkacz and P. Nurse, The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol. Gen. Genet.* 202, 291-293 (1986)
71. J. A. Hadwiger, C. Wittenberg, M. D. Mendenhall and S. I. Reed, the *Saccharomyces cerevisiae* *CKS1* gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2034-41 (1989)
72. H. E. Richardson, C. S. Stueland, J. Thomas, P. Russell and S. I. Reed, Human cDNAs encoding the homologs of the small p34 *cdc2/cdc28*-associated proteins of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* 4, 1332-1344 (1990)
73. L. De Veylder, G. Segers, N. Glab, P. Casteels, M. Van Montagu and D. Inzé, The Arabidopsis *Cks1At* protein binds the cyclin-dependent kinases *Cdc2aAt* and *Cdc2bAt*. *FEBS Lett.* 412, 446-52 (1997)
74. A. Jacquemard, L. De Veylder, G. Segers, J. de Almeida Engler, G. Bernier, M. Van Montagu and D. Inzé, Expression of *CKS1At* in Arabidopsis thaliana indicates a role for the protein in both the mitotic and the endoreduplication cycle. *Planta* 207, 496-504 (1999)
75. J. Hayles, S. Aves and P. Nurse, *suc1* is an essential gene involved in both cell cycle and growth in fission yeast. *EMBO J.* 5, 3373-3379 (1986)
76. D. Patra and W. G. Dunphy, *Xe-p9*, a *Xenopus* *Suc1/Cks* homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev.* 10, 1503-15 (1996)
77. V. Sudakin, M. Shteinberg, D. Ganoth, J. Hershko, Binding of activated cyclosome to p13(*suc1*). Use for affinity purification. *J. Biol. Chem.* 272, 18051-18059 (1997)
78. Y. Bourne, M. H. Watson, M. J. Hickey, W. Holmes and W. Rocque, Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein *CksHs1*. *Cell* 84, 863-74 (1996)
79. T. Mészáros, P. Miskolczi, F. Ayaydin, A. Pettkó-Szandtner, A. Peres, Z. Magyar, G. V. Horváth, L. Bakó, A. Fehér and D. Dudits, Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant. Mol. Biol.* in press.
80. G. Grafi and B. A. Larkins, Endoreduplication in maize endosperm: involvement of M-phase promoting factor inhibition and induction of S-phase-related kinases. *Science* 269, 1262-64 (1995)
81. H. Wang, L. C. Fowke and W. L. Crosby, A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* 386, 451-52 (1997)
82. H. Wang, Q. Qi, P. Schorr, A. J. Cutler, W. L. Crosby and L. C. Fowke, ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both *Cdc2a* and *CycD3*, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* 15, 501-10 (1998)
83. J. Pines and T. Hunter, Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* 115, 1-17 (1991)

84. M. Otshubo et al., *Mol. Cell Biol.* 15, 2612-2624 (1995)
85. V. Baldin et al., Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 7, 812-21 (1993)
86. D. Mahony, D. A. Parry and A. Lees, Active cdk6 complexes are predominantly nuclear and represent only a minority of the cdk6 in T cells. *Oncogene* 16, 603-611 (1998)
87. J. Pines and T. Hunter, The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* 13, 3772-81 (1994)
88. J. Yang and S. Kornbluth, All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends in Cell Biol.* 9, 207-10 (1999)
89. J. Colasanti, S. O. Cho, S. Wick and V. Sundaresan, Localization of functional p34 homolog of maize in root tip and stomatal complex cells: Association with predicted division sites. *Plant Cell* 5, 10101-11 (1993)
90. H. Stals, S. Bauwens, J. Traas, M. Van Motagu, G. Engler, D. Inzé, Plant CDC2 is not only targeted to the pre-prophase band, but also co-localizes with the spindle, phragmoplast, and chromosomes. *FEBS Lett.* 418, 229-34 (1997)
91. F. Skoog and C. O. Miller, Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-31 (1957)
92. N. P. Everett, T. L. Wang, A. R. Gould and H. E. Street, Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. II. The effects of 2,4D-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Protoplasma* 106, 15-22 (1981)
93. R. Knösche, The effect of phytohormones on the cell cycle in a suspension cell line from *Beta vulgaris*. Abstracts VIIth Internat. Congr. on Plant Tissue and Cell Culture, p. 281 Amsterdam (1990)
94. A. Nishi, K. Kato, M. Takahashi and R. Yoshida, Partial synchronization of carrot cell cultures by auxin deprivation. *Physiol. Plant.* 39, 9-12 (1977)
95. T. L. Wang, N. P. Everett, A. R. Gould and H. E. Street, Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. III. The effect of cytokinin. *Protoplasma* 106, 23-35 (1981)
96. C. Riou-Khamlichi, R. Huntley, A. Jacquemard and J. A. H. Murray, Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283, 1541-44 (1999)
97. P. Valente, W. Tao and J. P. Verbelen, Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of tobacco. 134, 207-215 (1998)
98. P. Redig, O. Shaul, D. Inzé, M. Van Motagu, H. Van Onckelen, Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett.* 391, 175-80 (1996)
99. M. Sauter, Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and cdc2 genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant J.* 11, 181-90 (1997)
100. M. Bouvier-Durand, M. Real and D. Come, Changes in nuclear activity upon secondary dormancy induction by abscisic acid. *Plant Physiol. Biochem.* 27, 511-518 (1989)
101. M. Levi, P. Brusa, D. Chiatante and E. Sparvoli, Cell cycle reactivation in cultured pea embryo axes, effect of abscisic acid. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29, 47-50 (1993)

102. J. Vesely, L. Havlicek, M. Strnad, J. J. Blow, A. Donella-Deana, L. Pinna, D. S. Letham, J. Kato, L. Detivaud, S. Leclerc and L. Meijer, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* 224, 771-86 (1994)
103. W. F. De Azavedo, S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad and S.-H. Kim, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* 243, 518-26 (1997)
104. L. Havlicek, J. Hanus, J. Vesely, S. Leclerc, L. Meijer, G. Shaw and M. Strnad, Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J. Med. Chem.* 40, 408-12 (1997)
105. N. Glab, B. Labidi, L.-X. Quin, C. Trehin, C. Bergounioux and L. Meijer, Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinases activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. *FEBS. Lett.* 353, 207-11 (1994)
106. S. Planchais, N. Glab, C. Trehin, C. Prennes, J.-M. Bureau, L. Meijer and C. Bergounioux, Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension. *Plant J.* 12, 191-202 (1997)
107. P. Binarova, J. Dolezel, E. Heberle-Bors, M. Strand and L. Bögre, Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. *Plant J.* 16, 101-111 (1998)
108. J. Garriga, E. Segura, X. Mayol, C. Grubmeyer and X. Grana, Phosphorylation site specificity of the CDC2-related kinase PITALRE. *Biochem. J.* 320, 983-89 (1996)
109. L. J. Cisek and J. L. Corden, Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature* 339, 679-84 (1989)
110. Y. Taya, Rb kinases and Rb-binding proteins: new points of view. *Trend Bioch. Sci.* 22, 14-17 (1997)
111. M. E. Cardenas,, R. Walter, D. Hanna and S. M. Gasser, Casein kinase II copurifies with yeast DNA topoisomerase II and re-activates the dephosphorylated enzyme. *J. Cell. Sci.* 104, 533-43 (1993)
112. A. Leresche, V. J. Wolf and J. M. Gottesfeld, Repression of RNA polymerase II and III transcription during M phase of the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 229, 282-88 (1996)
113. D. A. Burden, L. J. Goldsmith and D. M Sullivan, Cell-cycle-dependent phosphorylation and activity of Chinese-hamster ovary topoisomerase II. *Biochem J.* 293, 297-304 (1993)
114. E. M. Bradbury, Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *BioEssays* 14, 9-16 (1992)
115. L. Brizuela, G. Draetta and D. Beach, p13suc1 acts in fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 kinase. *EMBO J.* 6, 3507-14 (1987)
116. M. E. Cardenas, Q. Dang, C. V. C. Glover and S. M. Gasser, Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II in vivo. *EMBO J.* 11, 1785-1796 (1992)
117. S. K. Chung and R. W. Parish, Studies on the promoter of *Arabidopsis thaliana* cdc2a gene. *FEBS Lett.* 362, 215-19 (1992)
118. J. Pines, Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem. J.* 308, 697-711 (1995)

119. V Mironov, L. De Veylder, M. Van Montagu and D. Inzé, Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant Cell* 11, 509-21 (1999)
120. C. Koch and K. Nasmyth, Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 451-59 (1994)
121. C. Trehin, N. Glab, C. Perennes, S. Planchais and C. Bergounioux, M phase-specific activation of the *Nicotiana sylvestris* Cyclin B1 promoter involves multiple regulatory elements. *Plant J.* 17, 263-73 (1998)
122. Y. Sun, B. P. Dilkes, C. Zhang, R. A. Dante, N. P. Carneiro, K. S. Lowe, R. Jung, W.J. Gordon-Kamm and B. A. Larkins, Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4180-85 (1999)
123. E. Harlow and D. Lane, *Anibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory (1988)
124. T. Kitagawa and T Aikawa, Enzyme coupled immunoassay of insulin using a novel coupling reagent. *J. Bioch.* 79, 233-36 (1976)
125. A. Kumagai and W. G. Dunphy, The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 64, 903-14 (1991)
126. M. Maes and E. Messens, Phenol as griding material in RNA preparation. *Nucleic Acids Res.* 16 4374 (1992)
127. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis *Molecular Cloning: A laboratory manual* (1989)
128. K. Helin, J. A. Lees, M. Vidal, N. Dyson, E. Harlow and A. Fattaey, A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* 70, 337-50 (1992)
129. H. Hirt, A. Páy, J. Györgyey, L. Bakó, K. Németh, L. Bögre, R. J. Schweyen, E. Heberle-Bors and D. Dudits, Complementation of yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1636-40 (1991)

Publikációs lista

1. Magyar Z., **Mészáros T.**, Fehér A., Brown S., Deák M., Bottka S., Györgyeey 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 phosphorylation in Plants. Proc. of the second Intern. Eur. Symp., eds.: Gadal P., Kreis M., Dron M., Brulfert J., Bergounioux C. and Vidal J. Université 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 Plantarum 42 (Suppl.): S63 (absztrakt)

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka. Sivók Béla és Soós Katalin vezetett be először a kutató laboratórium rejtelseibe. Ezt a dolgozatot elsősorban Dudits Dénesnek köszönhetem, aki minden értelemben támogatott munkám során. Megteremtette a megfelelő körülményeket, és szakmai tanácsokkal is ellátott. Rengeteget tanultam Bakó Lászlótól, Fehér Attilától és Magyar Zoltántól. Naponta együtt dolgoztam Miskolczi Pállal és Dobrovichné Ágoston Évával, sok eredményem ezen közös munkáknak köszönhető. Bögre Lászlóval történt együttműködésünk nagyban hozzájárult a dolgozatban bemutatott eredményekhez.

Hálás vagyok azoknak is, akiket név szerint nem említettem, családomnak barátaimnak és munkatársaimnak.

Thesis of Ph.D.**Introduction and aims**

In the last decades there has been a revolution in biology. Perhaps one of the most impressive example of this is the revealing of the molecular basis of the cell cycle control.

Cyclin-dependent kinases (CDKs) play a central role in the regulation of eukaryotic cell cycle. CDKs are specific serine/threonine kinases which are activated at defined cell cycle phases. Yeast genetic studies demonstrated that a single CDK gene (*cdc2* in *S. pombe* and *CDC28* in *S. cerevisiae*) is required for cell cycle transitions. By contrast, several CDKs are implicated in the cell cycle control of higher eukaryotes. For example human phase transitions are regulated by at least eight different CDKs.

The activity of CDKs is controlled post-transcriptionally at multiple levels. CDKs form diverse complexes with cyclins whose levels oscillate during the cell cycle. The CDK-cyclin complexes are activated by phosphorylation of Thr-160 and Thr-161 residues of the kinase subunits, whereas their activity is inhibited by phosphorylation of CDK residues Thr-14 and Tyr-15 as well as by binding CDK inhibitors.

In order to cope with their immobile life style, plants display developmental characteristics permitting a flexible response to environmental factors. Plant development is mainly postembryonic, and cell division is restricted to meristematic regions. Endoreduplication is commonly observed in plants. Most plant cells are totipotent and are able to change their fate at any moment in response to external signals. Due to the rigid cell wall, cell migration does not play any role in development in contrast to the development of many animal tissues and organs.

The basic components of cell cycle control are evolutionary conserved among eukaryotes, but due to the unique plant developmental strategy, it is not surprising that beside the conserved elements specific components are also involved in plant cell cycle regulation. The main differences can be seen at the

G2/M transition point. In our previous work we demonstrated that mRNA and protein levels of two out of the six so far identified alfalfa CDKs oscillate during the cell cycle peaking at G2/M phase. These two kinases, Cdc2MsD and Cdc2MsF, exhibit a nontypical plant specific PSTAIRE motif: PPPTALRE and PPTTLRE, respectively. In that study by measuring the in vitro kinase activities we proposed that at least two different CDKs (Cdc2MsA/B and Cdc2MsF) are active as kinase at the G2/M phase. Based on these results, we suggested that the regulation of this control point in plants considerably differs from what was observed in other eukaryotes.

In my thesis I present the results which attempt to answer the following questions:

1. What kind of biochemical differences can be found between the three alfalfa CDK complexes?
2. Which alfalfa CDK complexes are active at G2 and M phases?
3. Is there any role of Tyr-15 phosphorylation in the regulation of the activity of the different alfalfa CDKs?
4. Do the CDKs have function in the intact alfalfa plants indeed?
5. What is the correlation between the plant hormones and the activity of CDK complexes?

Results and discussion

1. To identify the substrates of CDKs is very important step toward the understanding of the in vivo function of the kinases. However the general CDK substrate Histone H1 is very poorly phosphorylated by Cdc2MsD, so it was inevitable to find an appropriate protein in order to make further studies on this kinase. We tested several different proteins as putative substrates of the immunoprecipitated CDK complexes. Cdc2MsA/B had a broad substrate specificity; it phosphorylated every tested protein. By contrast, the Cdc2MsD and Cdc2MsF kinase complexes had higher substrate specificities. The Cdc2MsF

phosphorylated the Histon H1 and Topoisomerase II, while for Cdc2MsD the Topoisomerase II was the only substrate. The results were in good correlation with the putative function of the CDKs. The Cdc2MsA/B is active both in G1/S and G2/M transition points, so it can phosphorylate the proteins which are in vivo phosphorylated in G1/S (Rb, RNA-Polimerase II), and which are phosphorylated in G2/M (Topoisomerase II, Histone H1). The Cdc2MsD and Cdc2MsF function in G2/M phase, and in accordance with this only the Topoisomerase II and Histone H1 were phosphorylated by these kinases.

The *suc1* gene was originally identified in fission yeast, the homologues of the gene were described in wide range of organisms. The strong interaction of the Suc1 protein with different CDKs allows the affinity purification of CDKs from other species, as well. We have demonstrated that Suc1 protein is suitable for the purification of Cdc2MsA/B and Cdc2MsF but not for Cdc2MsD.

The purin analogue olomucine, roscovitine and bohemine are known as specific CDK inhibitor chemicals in micromolar range. We have shown that the Cdc2MsA/B complexes are sensitive for this inhibitor at 1 μ M concentration while the Cdc2MsF complexes need at least one order of magnitude higher concentration of inhibitors for the same effect. Cdc2MsD was almost completely insensitive for the tested purin analogue chemicals.

2. By application of the appropriate in vitro substrate of Cdc2MsD (Topoisomerase II) we tested the kinase activity of these complexes in aphidicoline synchronized alfalfa cells. We could detect slightly increasing kinase activity toward the G2/M phases. We dissected the G2/M transition point in a more detailed manner by blocking the aphidicoline synchronized cells with roscovitine. Blocking the in vivo kinase activity of Cdc2MsA/B complexes resulted in the arrest of the cell cycle at G2 phase. Interestingly, there were neither mRNA and protein level nor kinase activity elevations of Cdc2MsF in the roscovitine treated cells. Based on these results we suggest that the G2/M phases controlled at least by three CDKs, the activity of Cdc2MsA/B complexes are inevitable in G2 phase and the function

of Cdc2MsF is restricted to M phase.

3 The role of Tyr-15/Thr-14 phosphorylation is well known in yeast and mammals. There is some indication that the tyrosine phosphorylation of an unknown aminoacid residue is also inhibitory for the plant CDKs. In this work we have given evidences that the Cdc2MsA/B are the only tyrosine phosphorylated CDK in alfalfa, and the conservative Tyr-15 residue is involved in this phosphorylation. Furthermore, the tyrosine phosphorylation level of Cdc2MsA/B showed fluctuation during cell cycle progression in inverse relation with the in vitro kinase activity of Cdc2MsA/B complexes. All of these data suggest that the Tyr-15 of Cdc2MsA/B has a role in the regulation of the alfalfa cell cycle.

4. For studying the cell cycle one has to get enough well synchronized cell samples, so we used the fast growing A2 alfalfa cell suspension for the major part of the experiments. To prove that the alfalfa CDKs are involved in the cell division in intact plant, we examined the CDKs in different plant tissues. The results confirmed the role of alfalfa CDKs in cell cycle regulation because we could detect much higher protein level and kinase activity of tested CDKs in the dividing parts of the plant than in the nondividing.

5. There are several pieces of evidence that auxin and cytokinin induce the cell division while ABA has an antagonistic effect. However, our knowledge about the correlation between these hormones and cell cycle regulating kinase is still poor. We have studied this problem on alfalfa leaves. 2,4-D treatment increased the kinase activity of p13^{suc1} affinity purified CDK complexes. Kinetin further increased the kinase activity, but it was not effective alone. ABA reduced the elevated kinase activity caused by 2,4-D and kinetin treatment. We have tested the Cdc2MsA/B protein level of hormone treated leaves. The application of 2,4-D resulted in higher amount of protein, but kinetin did not increase this level and was not effective alone. The effect of ABA treatment was antagonistic on the protein level too. We have measured the kinase activities of the three kinases in 2,4-D treated leaves and, all the kinases featured higher values of activity.