

A sejtek osztódásának aktiválásában és szabályozásában szerepet játszó fehérjék lucernában

Doktori értekezés

Miskolczi Pál

Témavezetők:
Dr. Horváth V. Gábor
Dr. Dudits Dénes

Növénybiológiai Intézet
MTA, Szegedi Biológiai Központ

Szeged
2007

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, elsősorban Dudits Dénesnek, minden részletre kiterjedő támogatásáért a csoportjába való bekapcsolódásom kezdetétől a Ph.D. dolgozatom elkészítéséig. Szintén köszönöm Horváth V. Gábornak nélkülözhetetlen támogatását és szakmai segítségét, melyet a disszertáció megírásában is nyújtott.

Szeretném megköszönni Fehér Attilának korábbi szakmai vezetését, hasznos tanácsait és a kooperációs együttműködését. Külön köszönöm Bakó Lászlónak a nagyfokú támogatását, különösen, hogy laboratóriumaiban, Kölnben és Umeában biztosította számomra újabb kutatói tapasztalatok szerzését. Itt szeretnék köszönetet mondani Györgyey Jánosnak, hogy lehetővé tette az informatikai ismereteim gyarapítását a németországi Plant Genome Resources Centerben végzett kooperációs kutatási munkával.

Köszönettel tartozom Magyar Zoltánnak, aki a szakdolgozati munkámban irányított, és a kezdetektől támogatta posztgraduális tanulmányaimat. Hálás vagyok Mészáros Tamásnak, aki megismertetett a fehérjés kísérleti módszerekkel.

Hálás vagyok minden kollégámnak a Sejtciklus és Stresszadaptációs Csoport, valamint a Funkcionális Sejtbiológia Csoport volt és jelen tagjainak, különösen Csordás Tóth Évának, Mai Antalnak, Ötvös Krisztinának, Török Katalinnak, Borka Ildikónak és Cserhádi Mátyásnak segítségükért és kedvességükért.

Végül köszönöm családomnak, elsősorban feleségemnek, Krisztinek, aki megértő gondoskodásával támogatott, hogy a dolgozatom elkészülhessen. Köszönöm gyermekeimnek Violának, Vikinek és Palkónak, valamint szüleimnek odaadó, támogató szeretetüket.

Rövidítések jegyzéke

2,4-D	2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
A2	<i>Medicago sativa</i> L. ssp. <i>varia</i> A2 genotípusa
ABS	abszcizinsav
AL1	paradicsom mozaik vírus replikációs faktor
APC	anafázist elősegítő ubiquitin ligáz komplex
ARF	transzkripció faktor („auxin response factor”)
AUX/IAA	auxin/indolecetsav transzkripció faktor
AXR1	auxin rezisztens, heterodimer tagja
BR	brasszinoszteroid
BY-2	“Bright yellow-2” dohány sejtszuspenzió
CAK	CDK aktiváló kináz
Cdc25	CDK tirozin15/treonin14 defoszforilációért felelős foszfatáz
CDK	ciklin-függő kináz
CDKA	A-típusú növényi CDK, PSTAIRE jellegzetes motívummal
CDKB	B-típusú növényi CDK-k PPTALRE vagy PPTTLRE motívummal
CKI	ciklin-függő kináz inhibitor
CKS	CDK-ciklin komplexek szabályozó alegysége
CMT	kortikális mikrotubulus
CYC	ciklin
CYCD	D-típusú ciklin
DAPI	4,6-diaminido-2-fenilindol (DNS festék)
DEL	E2F szerű transzkripció faktor RB-kötő motívum nélkül
DP	az E2F dimerizációs partnere
E2F	sejtosztódásban szerepet játszó transzkripció faktor
GSH	redukált glutation
HPV E7	humán papillómavírus RB-kötő fehérjéje
IES	indolecetsav
JA	jázmonsav
Kolhicin	mikrotubulus polimerizáció inhibitor
MBF	sarjadzó élesztő transzkripció faktor
MPF	M-fázist elősegítő faktor
Mt-108	<i>Medicago truncatula</i> cv. R 108
ORF13	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> RBR-kötő fehérjéje
p13suc1	hasadó élesztő CKS
PEST	prolin (P), glutaminsav (E), szerin (S) és treonin (T) aminosavakban gazdag fehérje lebontási szignál
PPB	preprofázisos szalag
Propizamid	mikrotubulus polimerizáció inhibitor
PRZ1	transzkripcionális adapter protein
PVDF	polivinilidén-difluorid
Rb	retinoblasztóma, tumorsupresszor
RBR	növényi retinoblasztóma-homológ
Roscovitin	CDK inhibitor (“2-(1-ethyl,2-hyd roxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine”)
SBF	sarjadzó élesztő transzkripció faktor
SCF	Skp1/Cullin/F-box G1/S fázisban aktív ubiquitin ligáz komplex
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TIR1	auxin receptor (“transport inhibitor response”)
Wee1	CDK tirozin15/treonin14 aminosavak foszforilációjáért felelős kináz

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1. A sejtciklus folyamata	9
2.1.1. A sejtciklus ellenőrzési pontjai	10
2.1.2. A növényi sejtciklus	11
2.1.2.1. A növények sejtosztódással kapcsolatos egyedülálló jellemzői	11
2.2. A növényi sejtciklus mechanizmusának fő szabályozó elemei	13
2.2.1. A ciklin/CDK komplexek a sejtciklus szabályozás alapvető alkotóelemei	13
2.2.1.1. A ciklin-függő kinázok (CDK-k).....	14
2.2.2. A CDK aktivitásban nélkülözhetetlen szerepet játszó konzerválódott faktorok	17
2.2.2.1. A növényekben nagyszámú ciklin található	19
2.2.3. D-típusú ciklinek	20
2.2.3.1. A D-típusú ciklin gének kifejeződésének szabályozása	21
2.2.3.2. A D-típusú ciklinek és a CDK-k kölcsönhatása	23
2.2.3.3. A D-típusú ciklinek szerepe a sejtciklusban és fejlődésben	24
2.2.4. RB/E2F/DP szabályozási út.....	25
2.2.4.1. A növényi retinoblasztóma-homológ gének	26
2.2.4.2. A növényi RBR gének expressziója	28
2.2.4.3. Az RB fehérjék konzervált szerkezete	29
2.2.4.4. A növényi RBR fehérjék növekvő számú ismert kölcsönhatói	30
2.2.4.5. A RBR fehérje foszforilációs szabályozása	32
2.2.4.6. A növényi RBR fehérjék alapvető szerepet játszanak a G1/S átmenet szabályozásában	33
2.2.4.7. RBR funkciója a növények organogenezisében	34
2.2.5. Hormonok hatása a növényi sejtciklusra	36
2.2.6. A differenciálódott növényi sejtek sejtciklusos reaktiválása	41
2.3. A növényi sejtciklus szabályozásának molekuláris modellje	43
3. CÉLKITŰZÉSEK	46
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	47
4.1. A kísérleti növények és sejt kultúrák	47
4.1.1. Növények és sejt kultúrák.....	47
4.2. DNS-vizsgálati módszerek	47
4.2.1. Baktérium kultúrák	47
4.2.2. Plazmid tisztítás.....	47
4.3. Fehérje analízis technikák.....	48
4.3.1. Növényi teljes sejtfehérje kivonat készítése	48
4.3.2. SDS poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE)	48
4.3.3. Immunoblot.....	48
4.3.4. A kapcsolt <i>in vitro</i> transzkripció és transzlációs rendszer (TnT)	49
4.3.5. Immunoprecipitálás	49

4.3.6. CDK kináz aktivitás meghatározása	49
4.3.7. Bakteriálisan túltermeltetett fehérjék tisztítása	50
4.3.8. Poliklonális ellenanyag termeltetés és tisztítás	51
4.3.9. Élesztő kettős hibrid kölcsönhatás vizsgálat	51
4.3.10. p13suc1 kötés	52
4.4. Sejtbiológiai módszerek	52
4.4.1. Lucerna A2 szuszpenzió szinkronizálása	52
4.4.2. Lucerna levélprotoplaszt izolálása	53
4.4.3. Immunolokalizáció	53
4.4.4. Az S fázis arányának megállapítása BrdU sejtmagi DNS-be történő beépülésével	54
4.4.5. Áramlásos citometria	54
4.4.6. Mitotikus index meghatározás	55
4.5. Számítógépes szekvencia analízisek	55
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK	56
5.1. Két új D-típusú ciklin gén izolálása lucernából és a fehérjék filogenetikai jellemzése	56
5.1.1. Ellenanyagok készítése a lucerna D-típusú ciklin fehérjék kimutatására	61
5.1.2. Az Medtr;CYCD6;1 fehérje mennyisége a különböző lucerna részekben	63
5.1.3. Medtr;CYCD6;1 ciklin fehérje mennyisége szinkronizált lucerna A2 sejtszuszenzióban	64
5.1.4. A Medsa;CYCD3;1 és Medtr;CYCD6;1 ciklinek sejtmagi lokalizációt mutatnak	65
5.1.5. D-típusú ciklinek és CDK kinázok kölcsönhatásainak vizsgálata	67
5.1.5.1. Az <i>in vitro</i> transzlált CYCD3;1 fehérje kötődése a CDKA1;1 kinázhoz	68
5.1.5.2. A Medsa;CYCD3;1 és Medsa;CDKB2;1 fehérjék szinkronizált mintákból sejtciklus függő hiszton H1 kináz aktivitást kötnek	70
5.2. A lucerna retinoblasztóma-homológ fehérje jellemzése	72
5.2.1. A retinoblasztóma fehérje kimutatása lucerna sejtszuszenzióban	73
5.2.2. A lucerna RBR fehérje mennyiségének sejtciklus függő változása	75
5.2.3. A- és B-típusú CDK komplexek egyaránt foszforilálják a lucerna RBR fehérjét <i>in vitro</i>	77
5.2.4. Az MsRBR1 fehérje szintjének változása hormon kezelés hatására lucerna A2 sejtszuszenzióban	80
5.2.5. Az RBR fehérje feltételezett módosulása <i>M. truncatula</i> kalluszok differenciálódása során	82
5.3. A CDK-k és a sejtciklus fázisok szabályozása lucernában	85
5.3.1. A lucerna levélprotoplaszt sejtek hormonfüggő sejtciklus reaktivációja	86

5.3.1.1. <i>Lucerna protoplasztok sejtciklus aktiválása auxin és kinetin hormon kombinációk hatására</i>	86
5.3.1.2. <i>CDK aktivitás változás a lucerna levélprotoplaszt sejtciklus reaktivációja során</i>	87
5.3.1.3. <i>A citokinin szükséges a lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek osztódásához</i>	87
5.3.2. <i>A lucerna CDK-k szabályozása a G2/M fázis határán</i>	90
5.3.2.1. <i>A kettős blokkot alkalmazó szinkronizációs protokoll optimalizálása lucerna A2 sejtszuszpenzió</i>	91
5.3.2.2. <i>Medsa;CDKB2;1 fehérje termelése a G2/M ellenőrzési pont után elkezdődik</i>	96
5.3.2.3. <i>A Medsa;CDKB2;1 kináz aktiválódik a kolhicin blokkolt lucerna szuszpenziós sejtekben</i>	98
6. ÖSSZEFOGLALÁS	100
7. FÜGGELÉK	104
7.1. <i>Felhasznált irodalom</i>	104
7.2. <i>Publikációs lista</i>	118
7.3. <i>Ph.D. thesis</i>	120

1. BEVEZETÉS

Az élő sejt azon lényegi tulajdonsága, mely képessé teszi természetét átörökítését az utódokra, a sejtfelépítésű organizmusok életének alapvető feltétele élővilágunkban. Bár több mint száz éve ismert tény, hogy a sejtek osztódással szaporodnak, csak az utóbbi három évtized során sikerült azonosítani azokat a molekuláris mechanizmusokat, amelyek sejtciklust szabályozásában központi szerepet játszanak. Ezen kutatások jelentőségét jól jelzi az a tény is, hogy 2001-ben kapott a sejtciklus kulcs szabályozóinak felfedezéséért Nobel-díjat Leland H. Hartwell, R. Timothy (Tim) Hunt és Sir Paul M. Nurse. A sejtosztódási kutatások különös fontossága összefügg azzal, hogy a humán rákos megbetegedések hátterében osztódási zavarok mutathatók ki. Ezért nem meglepő, hogy a sejtosztódási ciklus a legintenzívebben tanulmányozott biológiai folyamatok egyike.

A növények legfontosabb tulajdonsága kétségtelenül az, hogy képesek a napfény energiáját megkötve szerves anyagból az emberiség számára is nélkülözhetetlen szerves tápanyagot előállítani. A gazdaságilag hasznosított növényi szervek felépítése, mérete a sejtek osztódási és differenciálódási folyamatainak eredője. Ezért a növényi sejtosztódás szabályozásának és pontos mechanizmusának megértése meghatározó jelentőségű az emberiség élelmezése szempontjából.

A sejtosztódás alapvető folyamatai és a szabályozásában szereplő molekulák széles köre, hasonló módon működik minden eukarióta organizmusban. A filogenetikai konzerváltság mellett a sejtosztódás növény specifikus szabályozóit is fel lehet ismerni. Ez indokolja a növényi sejtciklus kutatás létjogosultságát az élesztő, *Drosophila* és emlős kísérleti rendszerek vizsgálatán túl. A növények alkalmazkodóképességének egyik meghatározó tényezője sejteik folyamatos osztódása és új szervek képződése, az egyedfejlődésük nagyfokú rugalmassága, melynek a helyhez kötöttségük miatt, a környezettel teljes összhangban kell lennie. Ehhez a plaszticitáshoz hozzájárulhat, hogy meglepően nagy számban azonosítottak a sejtosztódás szabályozásában kulcsfontosságú, a CDK-k aktiválásáért felelős ciklineket, illetve a G2/M fázisátmenet regulációjában kétféle ("A és B") CDK típus vesz részt, melyből az utóbbi növény specifikus CDK kináz.

Csoportunk az utóbbi két évtizedben több sejtciklus szabályozásában fontos szereppel rendelkező gént izolált lucernából és rizsből (CDK-k, ciklinek, CDK inhibitor, RB-homológok és E2F gének), melyek további jellemzésével hozzájárult a növényi sejtciklus szabályozásának mélyrehatóbb feltárásához.

Dolgozatomban az irodalmi áttekintés után, a lucerna D-típusú ciklinekkel és CDK-komplexekkel kapcsolatos kísérleteinket, majd a G1/S fázis átmenetben legfontosabbnak ismert szubsztrát fehérjéjükre, a retinoblasztóma-homológra koncentrált eredményeinket mutatom be. Vizsgálatainkban mint kísérleti objektumot elsősorban az A2 sejtuszuszenziót (*Medicago sativa* ssp. *varia* A2) használtuk. Hasonlóan az A2 szuszpenziót alkalmaztuk, a kettős blokkolt szinkronizációs kísérleteinkben, a G2/M fázisátmenetben szereplő CDK-ciklin komplexek és a lucerna CDKB2;1 kináz mitotikus funkciójának pontosabb megismeréséhez. Beszámolok még az auxin és citokinin hormonoknak a CDK-ciklin komplexek reaktivációjában szerepet játszó, a G1/S és G2/M fázisátmenetre gyakorolt hatásairól, melyeket a lucerna levélprotoplaszt unicelluláris rendszerében vizsgáltunk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A sejtciklus folyamata

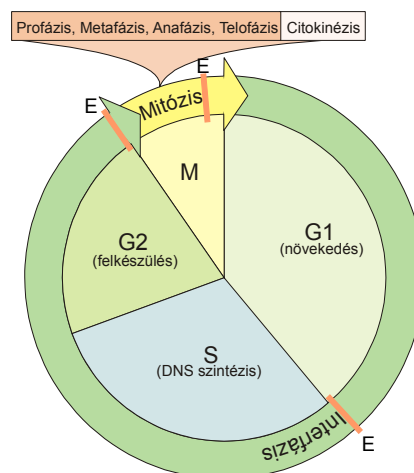
A különböző szervezeteken történő kutatások, mint emlősök, békák, legyek, férgek és növények, hozzásegítettek a sejtciklus alapmechanizmusának megismeréséhez. A természetben a legáltalánosabb sejtosztódási forma négy jellegzetes szakaszra osztható.

A 19. század végétől nyilvánvalóvá vált, hogy a sejtosztódási ciklus legalább két jól elkülöníthető szakaszból áll. A leglátványosabb az M-szakasz, melyben a sejtmag osztódása történik, és magához a sejtosztódás pillanatához vezet. A mitózis kifejezést eredetileg Walther Flemming alkotta meg az 1880-as évek elején a görög szál, fonál szóból a mitotikus kromoszómák alakjára utalva [81].

A két mitózis lejátsszódása között a mikroszkóp alatt egy eseménytelen szakasz látható, amely emiatt az interfázis elnevezést kapta. Ez a szakasz három jellegzetes részre bontható tovább: G1-, S- és G2- fázisokra. Az S-fázisban történik meg a DNS pontos megkettőződése. A sejtek a "gap" szakaszokban (G1 vagy G2) döntenek el, hogy folytassák-e a következő S- vagy M-fázist. A G1-fázis alatt a sejtek ellenőrzik a méretüket és a szükséges környezeti feltételeket, míg a G2-szakaszban az egyik fő feladat a DNS megkettőződés befejeződésének biztosítása. Egy teljes sejtosztódási ciklus a G1-S-G2-M fázisok szigorú sorrendben történik. Ebben az elrendezésben a sejt biztosítani tudja mind a DNS replikációját, mind a megkettőződött kromoszómák leánysejtekbe történő kerülésének pontos szabályozását. Az M-fázis, amelyben a kondenzált kromoszómák láthatóak, még további öt elkülöníthető részre osztható: profázis, metafázis, anafázis, telofázis és citokinézis. A 2.1. ábra a sejtciklus alapvető részeinek jól ismert körfolyamatát mutatja.

A kromoszómák kondenzálódása, mely a profázisban kezdődik és a metafázisban fejeződik be, együtt jár a maghártya eltűnésével és a centroszómákból sugár irányban megnyúlt mikrotubulusok megjelenésével. A növényekben az újonnan alakuló sejtfal előzménye a korai profázisban látható preprofázisos szalag által meghatározott. A metafázisban a kromoszómák a kinetokóron keresztül a mikrotubulusokhoz kapcsolódva az egyenlítői síkba

rendeződnek. Ezt követően az anafázisban az egyes kromoszómák a centromerek közepén eltörnek és a két testvér kromatid az ellenkező centroszóma irányába közelítenek. A szabad mikrotubulusok megnyúlása és a kinetokórhoz tapadt húzófonalak depolimerizációja a testvér kromatidok elválasztását, végül az ellenkező pólusokba érkezését eredményezi. Az elkülönült kromatidok dekondenzálódnak a telofázis során, majd körülveszi őket az újonnan összeszerelődő maghártya, így végül kialakulnak az új sejtmagok. A sejtosztódás befejező lépése a citokinézis, melynek során az állati sejtekben a barázdálódásnak nevezett módszerrel kettéhasad a citoplazma, és ennek következtében az anyasejt két leánysejtté osztódik. A növényi sejteknek merev sejtfa van, ezért szükséges a fragmoplaszt által irányított új sejtfa kiépítése a testvér sejtmagok között. A növény specifikus citokinetikus organelum mikrotubulusokból, aktin szállakból, a sejtfa kialakulásának területére fehérjéket és polisaccharidokat szállító vezikulákból áll. Az új sejtlemez a vezikulák fúziójával növekszik, míg valódi sejtfallá nem zárul. A részleteket Dudits és Fehér (2004) összefoglalója mutatja be [64].



2.1. ábra. Az eukarióta sejtciklus fázisai.

Az interfázisban mikroszkóposan látszólag nem történik semmi a két osztódás között. Az M-fázis folyamán az anyai magból két leány sejtmag keletkezik, és végül a citokinézissel a citoplazma is kettéosztódik a két új leánysejtbe. A G1 ("Gap1") fázis a citokinézist követő, de a DNS szintézis (S-fázis) előtti szakasz. A G2 ("Gap 2") fázisban felkészül a sejt a mitózisra. Az ellenőrzési pontokban (E) a teljesítendő feltételek hiánya esetén leáll a sejtciklus.

2.1.1. A sejtciklus ellenőrzési pontjai

A G1-S és G2-M ellenőrzési pontok létezését először Van't Hof fedezte fel a növényekben, 1966-ban [283]. Megfigyelte, hogy a cukor éheztetett sejtek a

lemetszett borsó gyökér csúcsokban abbahagyták az osztódást és a G1 és G2 szakaszokban megálltak. A sejtciklus ellenőrzési pontjaiban fontos, visszacsatolással szabályozott döntések történnek, amelyek szerepüknek megfelelően megakadályozhatják, hogy a sejt a sejtciklus következő szakaszába juthasson [119]. A sejtosztódás leállítását előidézhetik olyan nem kívánt kockázatok, mint a DNS károsodás vagy más nem kivédhető folyamatok, melyek a sejtosztódás továbbhaladását a sejt számára veszélyessé tennék. Az eukariótákban három a sejtciklust irányításáért felelős fő ellenőrzési pont található. A G1/S ellenőrzési pont a sejtciklus G1-szakaszának végén található, amikor a sejt kulcsfontosságú döntést hoz, hogy készen áll-e az osztódásra vagy nem, késleltesse-e az osztódást, vagy a G0 elnevezésű pihenő szakaszba lépjen. A G1/S ellenőrzési pont az, ahol az eukarióták jellemzően megállítják a sejtciklust, ha a környezeti feltételek a sejtosztódást lehetetlenné teszik, vagy ha a sejt hosszú időre G0-szakaszba megy át. Az állati sejtekben a G1-szakasz végi ellenőrzési pont a korlátozó "restrikciós", míg az élesztő esetében a sejtosztódás kezdeti pontjára utalva a start nevet kapta.

A második ellenőrzési pont a ciklusban a G2-szakasz végén található, az M szakasz elkezdődését szabályozza. A sejtnek ezen a szakaszon való áthaladásához számos tényezőt kell ellenőriznie, melyek biztosítják, hogy a sejt készen álljon a mitózisra. Ha ezen az ellenőrzési ponton áthaladt a sejt, számos molekuláris folyamat indul el. A harmadik ellenőrzési pont az anafázisban található, mely lehetővé teszi a mitózisból való kilépést, illetve a citokinézis lezajlását.

2.1.2. A növényi sejtciklus

2.1.2.1. A növények sejtosztódással kapcsolatos egyedülálló jellemzői

A növényi fejlődés ellentétben az állatokkal, döntően posztembrionális. Új szervek, mint a gyökér, a szár, a levelek és virágok kialakulása az elkülönült merisztematikus zónában történő folyamatos, ismétlődő sejtosztódások eredményei, melyeket sejtnövekedés és differenciálódás követ. A sejtek a merisztematikus szövetekben pluripotensek, amint a hajtáscsúcsban is először levelek képződnek, de megfelelő fejlődési és környezeti feltételek mellett a

hajtáscsúcs virág kezdeményeket képez, melyből kialakul a virág. A számos differenciált növényi sejt másik figyelemre méltó aspektusa az a képesség, hogy bizonyos körülmények hatására dedifferenciálódhatnak és újra pluripotenssé válhatnak. Ezen tulajdonság a növények számára még nagyobb fejlődési plaszticitást biztosít [98, 269]. A jól ismert példa szerint a levél mezofil sejtek protoplaszjai képesek új sejtfalat építeni, osztódni, és gyökeret, embriót vagy hajtást regenerálni megfelelő növényi növekedési faktorokkal történő kezelés hatására [88]. A gyökér esetében a nyugalomban lévő periciklus sejtek oldalsó gyökér képződését *de novo* stimulálni lehet a sejtosztódás indukálásával [28]. A Fabaceae család gyökér kortikális sejtjei, a *Rhizobium* szimbiotikus baktériummal való fertőzés során, képesek újraindítani a sejtosztódásukat, hogy létrehozzák a nitrogént megkötő gümőket [86].

A növények egy másik említésre méltó jellemzője, hogy nem figyelhető meg az állatoknál kialakuló rákos sejtburjánzás. A növényi úgynevezett tumorok specializált válaszként alakulnak ki patogén fertőzést követően [59], illetve egyediként a megfigyelt *Nicotiana glauca* és *N. langsdorffii* vagy *N. glauca* és *suaveolens* hibrideken [261]. Ez valószínűleg a növényi sejteket körülvevő merev sejtfallal is összefüggésben van, mely megakadályoz bármely sejt vándorlást, és egyben rámutat a növények fejlődésének jellegzetes karakterére.

A sejtfal megléte miatt az osztódáshoz a növények kifejlesztettek egy kifinomult mechanizmust a két leánysejt elválasztására, mely magában foglalja a kortikális mikrotubulusokat (CMT), a preprofázisos szalagot (PPB) és a fragmoplasztot, melyek mindegyike növény specifikus sejt szerkezeti képződmény. Ezeket az mikrotubulusos szerkezeteket az interfázis során, a késői G2-szakasztól a profázisig, és az anafázistól a telofázisig lehet megfigyelni az említett sorrendben. A CMT irányítja a sejtformát visszafordíthatatlanul vagy visszafordíthatóan a sejt falban a cellulóz microfibrillumok elhelyezésének orientálásával. A PPB az osztódás helyének kijelölésében meghatározó, míg a fragmoplaszt a sejtlemezt alakítja ki a citokinézis során [9, 262].

A helyi sejtosztódási paraméterek, mint például a merisztémákban létrehozott sejtek száma, fontosak a növényi szövetek szerveződésének meghatározásában. Ezt illusztrálja a lúdfű *scarecrow* mutánsa, melyben egy specifikus aszimmetrikus

osztódás elégtelensége a gyökérmerisztéma sejtek utódaiban egy teljes gyökérsejtréteg hiányát eredményezi [56].

2.2. A növényi sejtciklus mechanizmusának fő szabályozó elemei

Az elmúlt évtizedben jelentős haladás történt a növényi sejtciklus szabályozó mechanizmusainak feltárásában, így a legtöbb más eukariótából ismert kulcs szabályozó gént már azonosították, beleértve a retinoblasztóma fehérje közvetített (RBR/E2F/DP) utat, a ciklin függő kinázokat (CDK) és a hozzájuk kapcsolódó ciklineket, valamint a CDK-inhibitor fehérjéket. A homológ szekvencia keresés során a lúdfű teljes genomjában a legtöbb metazoa sejtciklus szabályozó komponensének a feltételezett homológjait megtalálták, miközben meglepően nagy számban azonosítottak ciklineket. Feltehetőleg ez biztosítja a növények különleges képességét arra, hogy módosítani tudják a posztembrionális fejlődésüket. Sok növényi sejt ráadásul, képes endoreduplikálódni, melynek során a sejtben mitózis nélkül folytatódik a DNS replikáció, poliploid állapotot eredményezve.

A sokat tanulmányozott állati rendszerekhez hasonlóan a növényi sejtciklus szabályozás is a különböző ciklin-CDK komplexek konzekvens aktiválása által regulált. Érdekes módon ugyanakkor a növényekben kétféle CDK típus vesz részt a G2/M fázis szabályozásában, mely ugyancsak növény specifikus tulajdonság. Összegezve, a növényi ciklin-CDK komplexek a további kölcsönhatóikkal együtt ellenőrzik a sejtciklus folyamatát, ahogyan azt más eukarióta élőlényekben is megfigyelték [139, 140]. Ezen folyamatok részleteit a következő fejezetekben tárgyalom.

2.2.1. A ciklin/CDK komplexek a sejtciklus szabályozás alapvető alkotóelemei

A legfőbb áttörést a sejtosztódás szabályozásának megértésében a kétélűek petéiben és korai embrióiban végzett kísérletek eredményei adták, melyek rámutattak, hogy a késői G2 és M fázisban lévő sejtek tartalmaznak egy faktort, ami képes a korai G2-ben lévő sejtek mitózisba lépését felgyorsítani. A G2-fázisban megrekedt embriók mitózisos indukálásához szükséges komponenst

sikerült izolálni, melyet mitózis elősegítő faktornak (MPF) nevezték el [182]. A tisztított MPF aktivitása két proteintól függ. Az egyikük, a p34cdc2, a ciklin-függő protein kinázok (CDK) családjába tartozik, amely más fehérjék szerin vagy treonin aminosavakon történő foszforilációjával előidézi a további szabályozott folyamatok előrehaladását [92]. A komplex másik aktiváló tagját, mennyiségének a sejtciklus függő változása alapján, ciklinnek nevezték el [91]. Az élesztő genetikája az MPF alegységeinek, a CDK és ciklin génjeinek klónozásával értékes hozzájárulást adott és megalapozta a sejtciklus szabályzó apparátus ezen fontos tagjainak funkcionális analízisét. A hasadó élesztő (*Schizosaccharomyces pombe*), *Cdc2* ("cell division cycle") kináz alegységként került azonosításra, míg a *cdc13* gén az MPF komplex ciklin komponensét kódolja [18, 111, 210].

2.2.1.1. A ciklin-függő kinázok (CDK-k)

Minden eddig tanulmányozott eukarióta élőlény rendelkezik legalább egy CDK-val, amely tartalmazza a PSTAIRE szekvenciát a ciklin fehérjét megkötő doménjében (összefoglalóként lásd: [63]). A PSTAIRE szekvenciát tartalmazó, a növényekben, CDKA-ként elnevezett kináz szintén sarkalatos szerepet játszik mind a G1/S, mind a G2/M átmenetet szabályozó pontokban. Az ellenőrzési pontokban detektált CDKA kináz aktivitások alátámasztják a kináz funkciójának szerepét a sejtciklus szabályozási pontjaiban [140, 179, 191].

A PSTAIRE CDK-k univerzális természete legjobban azzal a képességükkel illusztrálható, hogy az élesztő CDK hiányos mutánsait komplementálják [78, 127, 128]. A tanulmányozott növényekben a sejtciklus során a CDKA protein szint állandó marad [179, 223, 266]. A lúdfű domináns negatív CDKA túltermeltetése dohányban kisebb növényeket eredményez, valószínűleg a sejtosztódási ráta átfogó csökkenése miatt. Mivel a CDKA a sejtciklus G1/S és a G2/M fázis átmeneteihez is szükséges, nem meglepő, hogy a G1/G2 arány változatlan maradt [123, 150]. A CDKA feltétlen szükségességét a mitózisba történő belépéshez null mutánsokkal igazolták, ezek elsődleges hiányossága a hím gametofita fejlődése során tüntet elő a második mitózisba történő belépés sikertelenségére kapcsán [142, 209]. Míg az emlősökben két G1/S specifikus CDK gén (*CDK4* és *6*) van, ezek ortológjai nem találhatók meg a növényekben. Ezzel ellentétben, a növényekben

a mitózisba történő belépés szabályozásában több CDK játszik fontos szerepet [139, 140, 179, 191].

A növények egy második, egyedülálló csoportot, az úgynevezett B-típusú CDK-kat tartalmaznak, melyeket nem találtak még a növényeken kívül más élőlényekben [20, 149, 179]. A CDKB kinázokban a CDK PSTAIRE konzervatív szekvencia módosult vagy PPTALRE vagy PPTTLRE szekvenciára, jelezve a meglévő két alcsoport CDKB1 és CDKB2 különbségét [284]. Mind a két B-típusú CDK alcsoport megtalálható egyszikű és kétszikű fajokban, sugallva a fontos, egyedülálló szerepüket a növényekben. Figyelemre méltó, hogy mind a *Chlamydomonas reinhardtii*, mind az *Ostreococcus tauri* csak egy CDKB gént tartalmaz, mely a magasabbrendű növényekben levő CDKB1 gén megfelelője [15, 240]. Ugyanúgy, mint a magasabbrendű növényekben megfigyelt B-típusú CDK az *O. tauri*-ban talált CDKB expressziója is sejtciklus által szabályozottnak tűnik [36]. Érdekes módon, az *O. tauri* CDKB komplementálja az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) CDK mutánsát, míg a magasabbrendű növény homológ képtelen erre. Ebből következően az *O. tauri* rendelkezik egy köztes típusúnak tűnő CDKB-val, mely közeli rokonságban van a legáltalánosabb CDK-kal [36, 127, 223]. *CDKB1* és *CDKB2* kinázok kissé késleltetve fejeződnek ki az S-G2-M szakaszokban. A *CDKB1* transzkripciók az S, G2 és M szakaszok alatt jelentkeznek, míg a *CDKB2* kifejeződés a G2 és M szakaszokra specifikus [304]. Ebben a sorrendben növekszik a fehérje szintjük és a kötött kináz aktivitásuk is a vizsgált növényi fajokban [24, 82, 179, 186, 251, 280].

A mitózison való áthaladáshoz a *CDKB1* aktivitás meglétének szükségességét domináns negatív megközelítéssel sikerült kideríteni. A *CDKB1* aktivitás csökkenése megnövekedett 4C/2C arányt eredményezett, a sejtek G2-ből M-fázisba történő átmeneténél való blokkolódása miatt [21]. Azok a növények, melyek a domináns negatív *CDKB1;1* allélt túltermelik, kevesebb és abnormális morfológiájú légrésekkel, és kisebb méretű sziklevelekkel rendelkeznek. Ezzel igazolásra került a *CDKB1* kináz specifikus szerepe a sztóma létrehozásához szükséges osztódás szabályozásában, melyet az is alátámaszt, hogy a *CDKB1;1* gén magasan fejeződik ki a sztóma minden őssejtjében [19]. Az antiszenszen kifejeztetett *CDKB1* gén, a dexametazon indukálható promoter irányítása alatt, a

sejtméret csökkenés miatt rövid hipokotilokat, és nyitott szikleveleket formált a sötétben nevelt növényben [301]. Ezeken az eredményeken felül CDKB1 kináznak az endoreduplikáció kezdetének szabályozásában betöltött szerepére is utalnak adatok [21].

A CDK-aktiváló kinázok (CAK) fontos szerepet játszanak a CDK-k Thr160 aminosavának foszforilációjával. A növényi CAK-ok két elhatárolható osztályból állnak: CDKD és CDKF [278, 279, 284]. A CDKD-k funkcionális homológjai a gerincesek CAK kinázainak, míg a CDKF növény specifikus CAK, egyedülálló enzim tulajdonságokat mutatva. Csak a CDKD-k foszforilálja az RNS polimeráz II legnagyobb alegységének C-terminál doménjét (CTD). Továbbá ellentétben a CDKD-kel, a CDKF-nek nem szükséges a H-típusú ciklinnel (CYCH) kapcsolódnia [300]. A lúdfűben több CDKF-ről kimutatták, hogy foszforilálja és aktiválja a CDKD-ket [256]. A CAK kinázok az endogén hormon grádiens közvetítésével a sejtciklus potenciálisan fontos szabályozói. A CDKD kinázt túltermelő rizs kalluszkok citokininintől függetlenül nőnek. Ez a hatás egybeesik a CDK komplexek aktiválásával, melyet a CYCH együttes kifejeztetésével még növelni lehet [300].

A növények még tartalmazznak más típusú CDK homológ géneket, melyeknek szerepe tisztázatlan a sejtciklus szabályozásában. Egyikük a CDKC, mely tartalmaz PITAIRE vagy SPTAIRE ciklin-kötő motívumot. A CDKC kináz a metazoa CDK9 fehérjék legközelebbi homológja, melyek a CYCT-vel lépnek kölcsönhatásba. Az RNS polimeráz II CTD-jének foszforilációjával feltételezhetően a transzkripció elongációs fázisában játszanak szerepet [10, 85, 151]. A CDKC transzkriptuma elsősorban differenciálódott szövetekben mutatható ki [10].

Az SPTAIRE motívumot tartalmazó E-típusú CDK-k első képviselőit lucernából izolálták, melyek megegyeznek a HUA ENHANCER3-mal (HEN3) [293]. A *hen3* mutánsok fenotipikus jellemzése feltárta, hogy CDKE szerepet játszik a levelekben a sejtek expansziójában és a sejt differenciáció specifikációjában a virágos szervekben. A CDKC kinázokkal megegyezően a CDKE is foszforilálja az RNS polimeráz II CTD-jét, de ellentétben vele elsősorban az osztódó szöveteken [293].

2.2.2. A CDK aktivitásban nélkülözhetetlen szerepet játszó konzerválódott faktorok

A CDK aktivitást sokrétű szabályozó mechanizmus befolyásolja. A korábban említettekkel megegyezően a CDK-k az aktivitásukhoz szükséges ciklin szabályozó fehérjével kötődő kinázokként ismertek. A ciklinek legtöbbje oszcilláló expressziót mutat az osztódó sejtekben, és ez az átmeneti megjelenés biztosítja az elsődleges mechanizmust a kötött CDK aktivitás szabályozásához. A ciklinek szintje általában a transzkripciósan és a translációt követően specifikus fehérje degradációs módon finoman szabályozott, ami végül a CDK aktivitás csökkenését eredményezi. Több specifikus ciklin létezik növényekben is, melyeket az állati ciklinekhez hasonló nevezéktanba sorolunk [233]. A D-típusú ciklinek indítják a sejtek osztódásba lépését a G1 szakaszban a CDK aktivitás megnövelésével. Továbbítják a sejten kívüli szignálokat az osztódás láncolatát stimulálva és fenntartva, míg le nem bontódnak az ubiquitin degradációs útvonal közvetítésével.

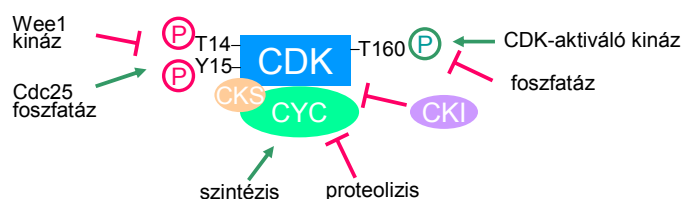
Az állatok esetében a G1/S átmenetnél az E-típusú ciklinek expresszálnak dominánsan, növényi sejteknél eddig közvetlen ortológot még nem izoláltak. Az A-típusú ciklinek általában az S-fázis kezdeténél jelennek meg, míg a G2/M átmenet közelében bontódnak le. A B-típusú ciklinek később, a G2-fázis alatt expresszálnak, és a partner CDK aktivitását az anafázisos lebontásukig biztosítják. Minden eukarióta CDK kétlebenyes struktúrát mutat, melyből a ciklint kötő stabilizálja a CDK katalitikus helyét, az egyébként meglehetősen rugalmas szerkezetén belül [145, 149]. Így a ciklinek szerepe nemcsak az, hogy meghatározzák a megfelelő sejtekben és sejtciklusos fázisban CDK aktivitását, hanem befolyásolják a szubsztrát kiválasztását is [172].

A CDK aktív helyének megközelítése korlátozott a T-hurokként ismert szerkezete miatt, melynek a szubsztrát megkötésében van szerepe [41]. A T-hurkon belül található 160-as treonin aminosav foszforilációja megváltoztatja szerkezetét, és lehetővé teszi a szubsztrát helyes kötődését, és hozzáférést biztosít a kötött ATP γ -foszfát csoportjához. Ez a foszforiláció tehát szükséges a CDK aktivitáshoz, melyet a már említett CDK-aktiváló kináz (CAK) hajt végre. Egy másik foszforiláció a CDK ATP megkötő helyén belül a CDK aktivitás csökkentésében játszik szerepet. A WEE1 kinázt, mely az aminoterminális

közelében a treonin-14 és tirozin-15 aminosavakat foszforilálja, először a hasadó élesztőben azonosították [245]. Wee1 növényi homológokat találtak kukoricában és lúdfűben is [265, 271]. Az eukarióta sejt mitózisba történő belépése érdekében a CDK-n levő mindkét foszfát csoportot specifikus foszfataz távolítja el [208]. Ez a foszfataz, mely cdc25-ként ismert, először élesztőből került izolálásra. Bár a homológ keresése a növényekben nem eredményezett megfelelő gén azonosítását, egy funkcionális ekvivalens jelenléte nagyon valószínű [302, 303]. A CDK működés még módosul az inhibitor és a szupresszor fehérjék kapcsolódásával is. A CDK inhibitorok (CKI), kötődve mind a CDK mind a ciklin alegységhez, fontos szerepet játszanak a sejtciklus folyamatának ellenőrzésben [255]. A lúdfűben az ICK-ként ismert KRP ("Kip-Related" Protein) fehérje homológból hét gén ismert [140]. Az ICK2/KRP2 és CDKA kölcsönhatást *in vivo* bizonyították [286]. A lucerna KRP fehérjéről kimutattuk, hogy differenciáltan gátolja az egyes CDK komplexeket és aktivitása foszforilációs szabályozás alatt áll [216].

A CKS protein családot kis fehérjék alkotják, melyek növényekben és állatokban is jelen vannak. A kódoló gént (*suc1*), először hasadó élesztőben izolálták [120, 121]. Az AtCKS1 túltermelése lúdfűben a vizsgálatok szerint akadályozza a sejtciklus progresszióját, a CDK kinázhoz történő folyamatos kötődése miatt [46]. A CKS kölcsönható fehérjék a CDK komplex aktivitás gátlóként és elősegítőként is viselkedhetnek, és úgy tűnik, szerepük van a CDK komplexek szubsztrátokkal történő kölcsönhatásának kialakításában [22].

Így a CDK-ciklin komplex működése nemcsak ciklin és CDK fehérje szintekkel szabályozott, mely magában foglalja a transzkripció és transzláció, valamint a fehérjék degradációjának szabályozását, de a különböző hozzájuk kapcsolódó fehérjékkel és az említett foszforilációs módosulásokkal is (2.2. ábra).



2.2. ábra. A CDK kinázok aktivitását szabályozó faktork.

A zöld nyilak, és a zöld foszfát csoport jelzi az aktiválódási, a piros színek pedig a gátló módosulásokat. További részletek a szövegben.

Végül az aktív CDK a szubsztrátjainak szerin vagy treonin aminosavain történő foszforilációjával módosítja azok tulajdonságait. A CDK komplex jól ismert szubsztrátjának, a hiszton H1-nek a foszforilációja a mitotikus kromoszómákban fordul elő. A CDK komplex foszforilációs aktivitási vizsgálatainak során ezért használhatóak a hisztonok, mint általános szubsztrátok. Szintén jól ismert CDK foszforilációs célpont a retinoblasztóma fehérje, mely foszforilációja a G1/S átmenetben kulcsfontosságú sejtciklus szabályozási lépés [294]. Ugyanakkor G1- és S-fázisokban a CDK-k különböző transzkripciós faktorokat (SBF, MBF), CKI-eket és foszfatázokat (cdc25A) foszforilálnak, míg G2- és M-fázisos szubsztrátjai között megtalálhatók még kinázok, foszfatázok (NIMA, cdc25) és még számos nem említett szerkezeti fehérje (laminok, nukleolin, vimentin, miozin) [218]. Egyes sejtciklusban szerepet játszó fehérjék foszforilációja után azok megsemmisítése is megtörténhet: az F-box fehérjék közvetítésével, az ubiquitin kapcsolt proteolízis folyamatában. Ezek a foszforiláció által iniciált degradációs folyamatok visszafordíthatatlan irányt jelölnek ki a sejtosztódási ciklus számára [157].

2.2.2.1. A növényekben nagyszámú ciklin található

Az első ciklineket a tengeri sün petesejtben azonosították, elnevezésüket a sejtciklusban változó fehérje szintjük alapján kapták [72]. Az emlősök sejtjeiben található számos ciklint az úgynevezett "ciklin-box" szerint lehet kategorizálni, mely egy a CDK partnerrel történő kölcsönhatásért felelős konzervált fehérjeszakasz. A ciklin fehérje váza, amely körülbelül 250 aminosav hosszúságú, öt alfa-hélix szerkezetet hoz létre két elkülönülő doménbe rendeződve. Az első maga a ciklin-box, mely kb. 100 aminosavat foglal magában [207], és az említett CDK-val kölcsönható felszínt képezi [145].

A növények sokkal többféle ciklint szintetizálnak, mint a vizsgált más élőlények [284]. A lúdfű legalább 32, a sejtciklus folyamatában feltételezett szerepű ciklinnel rendelkezik. A növényi ciklin nevezéktan az emlős megfelelőikkel mutatott funkcionális hasonlóságon alapul. Az *Arabidopsis* gén annotáció során azonosítottak 10 A-típusú, 11 B-típusú, 10 D-típusú és 1 H-típusú ciklint [233, 284, 290]. A korábban már említett, és a következő fejezetben tárgyalásra kerülő növényi D-típusú ciklinek elsősorban a G1/S fázis átmenetet szabályozzák. Az A-

típusú ciklinek irányítják az S-ből az M-be való áthaladást, míg a B-típusú ciklinek a G2/M határán, és az M-fázisban is szerepet játszanak [24, 224].

Az emlősökben egyfajta A-típusú ciklin elégséges a CDK aktivitás megnövekedéséhez, az S-től a G2-fázisig. Ezzel ellentétben, a növényekben többféle A-típusú ciklin létezik, melyek a szekvencia homológia szerint három alcsoportba sorolhatók (A1-A3) [290]. A BY2 dohánysejtek sejtciklusának folyamatában vizsgálták a különböző A-típusú ciklinek időbeli megjelenését. Két A3-típusú ciklin expressziója a G1/S átmenetnél volt magas, míg az A1-típushoz tartozó gén a középső S-fázisban fejeződött ki a legmagasabban [232]. A *Medicago sativa* CYCA2 ciklinről kimutatták, hogy nemcsak a sejtek S szakaszba történő belépéskor, hanem a G2/M átmenetkor is szerepe van a CDK-ciklin komplex aktivitásban [243].

Az A-típusú ciklinek különböző expressziós mintázatot mutatnak, a kutatási eredmények alapján megállapítható, hogy az eltérő alosztályok tagjai különböző biológiai funkciókkal rendelkeznek [26, 232, 243]. Az A-típusú ciklinek, a B-típusú ciklinekhez hasonlóan, az N-terminálisukon elhelyezkedő "destrukciós-box"-nak köszönhetően proteoszómás proteolitikus folyamatok során sejtciklus függően bontódnak le [95].

A B-típusú ciklinek is tovább rendszerezhetők három alosztályra (B1-B3) [290]. Ezek specifikusan a késő G2 és korai M szakaszban expresszálódnak [38, 141, 185]. A dohány CYCB1;1 mRNS mikroinjekciója túljuttatja a *Xenopus* G2/M határán várakozó petesejteket, hasonlóan az emlősök homológ ciklinjeihez, igazolva a növényi CYCB1 szerepét a G2/M átmenetben [227]. A CYCB1;1 fehérjéről bizonyított, hogy *in vitro* kölcsönhatásba lép és aktiválja az A- és a B-típusú CDK kinázokat [295].

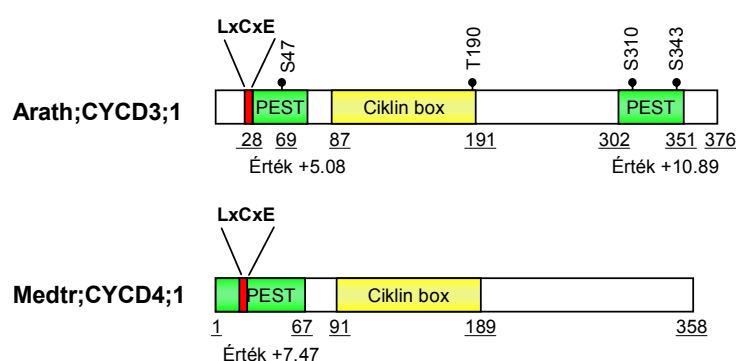
2.2.3. D-típusú ciklinek

Az első növényi D-típusú ciklineket az élesztő G1 ciklin hiányos törzsek komplementációja során azonosították [39, 263]. Azóta számos növény fajból izoláltak már D-típusú ciklint [90, 184, 264]. Lúdfűben 10 D-típusú ciklint azonosítottak, melyeket 7 csoportba lehetett besorolni, CYCD1-CYCD7

megjelöléssel [284]. Az egyes csoportok homológjait is megtalálták már több növényfajban [184].

A növényi D-típusú ciklinek az emlős homológjaikhoz hasonlóan közös strukturális vonásokkal rendelkeznek, például, megvan bennük a retinoblasztóma-kötő LxCxE aminosav motívum a fehérje N-terminális végén (2.3. ábra) [1, 136, 263]. Azonban van kivétel is, a lúdfű két D-ciklin szekvenciájában nincsen meg az ismert LxCxE motívum (CYCD4;2 és CYCD6;1).

A G1 ciklinek mind az élesztőben, mind az emlősökben rövid élettartalmúak. A D-ciklinek gyors lebontása az úgynevezett PEST szekvencia jelenlététől függ, mely négy aminosavban (prolin, glutaminsav, szerin és treonin) gazdag fehérjeszakasz [230]. A dohány CYCD2;1-től eltekintve az összes vizsgált CYCD PEST szekvenciát tartalmazó fehérje, melyeket a PESTFIND program segítségével azonosítottak [264]. Ez azt sugallja, hogy a PEST szekvenciák a G1 ciklinek általános jellemzői, és a legtöbb növényi D-ciklin, hasonlóan az állati homológjaikhoz, rövid életű fehérje.



2.3. ábra. A D-típusú ciklin fehérjék sematikus szerkezete.

A ciklin-box sárgával kiemelt. Az LxCxE régió az RB fehérje kötő peptidszakasza. A PESTfind program feltételeivel talált PEST régiók zöld színnel jelöltek, alattuk az értékek a program által meghatározott valószínűségi számok. A megadott régiók határait az aláhúzott aminosavsorszámok jelölik.

2.2.3.1. A D-típusú ciklin gének kifejeződésének szabályozása

A humán sejtekben D-típusú ciklinek a növekedés faktorok hatására fejeződnek ki, függően az extracelluláris ingerektől [254]. Ezért a D-típusú ciklineket tartják a környezetből jövő ingerek továbbítójának a sejtciklus szabályozás felé. A D-típusú ciklinek expressziója alacsony a nem osztódó BY-2

sejtkultúrákban [264], bár a lúdfű sejtszuspenzióban a *CYCD2;1* és *CYCD3;1* transzkripciók állandóak maradtak a növekedési cikluson át a passzálástól a stacionárius szakaszig. A cukorszint lecsökkentésekor, a stagnáló állapot elérésekor, a *CYCD3;1* expresszió jelentősen lecsökken. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy *CYCD2;1* és *CYCD3;1* kifejeződése nem korlátozódik az aktívan osztódó sejtekre, inkább a médium összetételétől, és ennél fogva, a külső szignáloktól függ. Ezenfelül a cukor visszaadásra mind a *CYCD2;1* és a *CYCD3;1* expressziója indukálódott [239]. Ez az indukálódás *de novo* fehérje szintézis nélkül játszódott le [84], azonban nagyon érzékeny egy protein foszfatáz inhibitorra [239]. További elemzés kimutatta, hogy a *CYCD3;1* protein szintek követték a transzkriptumuk szerinti kinetikát, míg *CYCD2;1* majdnem állandó maradt [122]. Lúdfű szinkronizált sejtszuspenzióban a legtöbb vizsgált D-típusú ciklin expressziója megnövekedett a sejtek ciklusba való belépésnél, de az ezt követő ciklus alatt a transzkriptumok mennyisége viszonylag állandó maradt [187]. Azonban két *CYCD* később is egyértelmű ciklikus kifejeződést mutat: *CYCD5;1* nagyobb mennyiségű a G1-ben, míg a *CYCD4;1* a késői G1/S szakaszban [185].

A *CYCD3;1* gén erősen indukálódik a növényi hormonokra, míg *CYCD2;1* gén nem. A *CYCD3;1* gén citokinin hormonkezelés hatására egy órán belül indukálódik, [238, 263], ugyanúgy, mint brasszinoszteroidok hatására [134]. *CYCD3;1* expressziója megemelkedett a *pt/amp1* magas citokinin tartalmú lúdfű mutánsban, míg a ciklint túltermelő növények kalluszaiban a sejtek citokinin nélkül is tovább osztódtak [238]. A citokininre adott válasz, hasonlóan a ciklinnek a cukorra adott reakciójához, foszfatáz által szabályozott, nem igényel *de novo* fehérje szintézist [238]. Ellentétben az epi-brasszinoszteroid általi indukcióval, melyhez szükséges egy köztes fehérje szintézis, ugyanakkor nincs foszforilációs szabályozás alatt [134]. *CYCD3;1* transzkriptjei a proliferáló hajtás szövetekben, mint például a merisztematikus fiatal levélben és a fejlődő vaszkurális szövetekben akkumulálódnak [53, 238]. A *CYCD4;1* gén a fejlődő mellékgyökerekben, az embriógenézis során és a vaszkuláris szövetekben expresszálódik [47]. A D-típusú ciklinek expressziója az osztódó szövetekhez kötődik, és a differenciálódott szövetekben nem is található meg. Érdekes módon, a növényekben néhány D-

típusú ciklin a G2-fázisból az M-fázisba történő átmenetnél transzkripció csúcsot mutat [185, 264].

Az emberi D-típusú ciklinek ubiquitin-függő proteolízis által bontódnak le, melyhez szükséges a protein treonin-286 aminosavának foszforilációja. A treonin-286 vagy ennek megfelelője a hidrofil PEST doménen belül található, ami a különböző organizmusokban a D-típusú ciklinekben konzerválódott, beleértve a növények esetét is. Így a D-típusú fehérjék mennyiségi szabályozására vonatkozóan hasonló mechanizmust lehet feltételezni a növényekben is [202]. Kimutatták, hogy a CYCD3;1 a proteoszóma degradációs úton bontódik le [222]. A dohány CYCD3;3 foszforilációja a treonin-191 aminosaván a nukleáris lokalizációjához szükséges, miközben a kapcsolódó komplexeinek a legmagasabb lesz a kináz aktivitása [202]. A lúdfű CYCD3;1 *in vivo* foszforilációja a sejtek szacharóz éheztetésekor történik meg [222].

2.2.3.2. A D-típusú ciklinek és a CDK-k kölcsönhatása

A CDK-k szubsztrát specifikálásáról feltételezhető, hogy azt a különböző ciklinekhez való kötődése határozza meg [219]. Az első CDK és növényi D-típusú ciklin közötti kölcsönhatást élesztő két-hibrides megközelítéssel mutatták ki. A lúdfű CDKA-t csaliként használták a CDK feltételezett szubsztrátjainak azonosításához. Ezzel a kísérleti rendszerrel a CDKA-t és CDKB-t is kötő CYCD1;1 ciklint azonosították partnereként [219]. Hasonlóképpen kimutatták a specifikus ellenanyagokkal immunoprecipitált mintákban, hogy a lúdfűben a CYCD2;1 és a CYCD3;1 is aktív komplexeket alkotnak a CDKA-val. Ugyanakkor a CYCD2;1 ciklin a stacionárius állapotban lévő sejt kultúrában nem kötődik a CDKA-hoz [122]. Az *in vitro* "pull-down" vizsgálatokkal igazolták, hogy a dohány D3-típusú ciklinek komplexet alkotnak mind a CDKA mind CDKB kinázokkal [154]. A CYCD3;3 asszociálódott kinázokat aktívnak találták mind a G1/S és G2/M fázishatároknál [202]. A CYCD4;1 ciklinről kimutatták, hogy kapcsolódik és közben aktiválja is a G2/M specifikus CDKB2;1 kinázt [161].

A dohány BY-2-ből az anti-ciklin D ellenanyaggal immunoprecipitált komplexek képesek foszforilálni NtRBR1-et, ami megerősíti a D-típusú ciklinek fontosságát a CDK-k szabályozásában, illetve a retinoblasztóma-homológ fehérjék

foszforilációjában demonstrálva ezzel alapvető funkciójukat a növényi sejtciklus szabályozásában is [203].

2.2.3.3. A D-típusú ciklinek szerepe a sejtciklusban és fejlődésben

A D-típusú ciklinekről feltételezik, hogy a G1 szakaszon történő áthaladást irányítják a külső növekedési szignálok alapján, amint az állatokban is a mitogén faktorokra indukálódik a sejtosztódás [211]. Hasonlóan a magasabbrendű eukariótákhoz, a növényi G1/S átmenet szabályozási útjában, az RBR foszforilációjában és az ebből következő E2F aktiválásban, a D-típusú ciklineknek fontos szerepe van [52, 140, 184]. A hajtásokban és a gyökerekben *CYCD2;1* stimulálja a G1-fázison történő áthaladást, a *CYCD2;1* túltermelő transzgénikus dohány növények gyorsabb növekedését eredményezve [34]. Néhány specifikus D-típusú ciklin mutáns kissé késleltetett sejtciklus reaktiválódást mutatott a gyökér merisztémában a mag csírázása alatt, támogatva a D-típusú ciklinek feltételezett fontos szerepét a sejtek sejtciklusba lépésének szabályozásában [181]. Ellentétben az állatokkal, számos kísérleti eredmény rámutat a D-típusú ciklinek egy további funkciójára a G2-ből az M-fázisba történő átmenetkor [161]. A *CYCD3;1* túltermelése a levélszörök sejtjeiben nemcsak az S-szakaszba történő belépést serkenti, hanem a mitózist is előidézi [248]. Az utóbbi időben azt is igazolták, hogy a *CYCD3;1* domináns a G1/S átmenetben, így a szacharóztól megvont sejtekben a *CYCD3;1* szintek csökkenése végül G1-fázisos megálláshoz vezet. A lúdfű sejtuszuspenzióban a *CYCD3;1* túltermelése esetén a sejtek túljutnak ezen a fajta G1-fázisban történő gátláson [189]. A dohány BY-2 szuszpenziókban a túltermelt dohány *CYCD3;3* illetve az oroszlánszáj (*Anthirrhinum majus*) *CYCD1;1* ciklin ugyanakkor stimulálta mind az S-fázis megjelenését, mind a sejtek mitózisba történő belépését [162, 202].

Az *AINTEGUMENTA* az AP domén család transzkripció faktorát kódolja és olyan génként azonosították, mely szabályozza a sejtosztódást a magkezdeményekben és virágokban [71]. Az *AINTEGUMENTA* túltermeltetése az lúdfűben növeli a levelek méretét a sejt proliferáció hosszának kinyújtásával, és így növeli a levelek sejtszámát, miközben megnövekedett *CYCD3;1* expressziót okoz [198]. A *CYCD3;1* túltermelése is drasztikusan növelte a levél sejtszámot, de nem

volt hatással az *AINTEGUMENTA* kifejeződésre [53], ez azt sejteti, hogy az *AINTEGUMENTA* szabályozhatja a szervfejlődés során a sejtszám kialakulását, a *CYCD3* ciklin regulációján keresztül. Így a *CYCD* ciklinek kulcsfontosságú kapcsolatot biztosíthatnak a fejlődési szabályozás és a sejtosztódás között.

2.2.4. RB/E2F/DP szabályozási út

Az állati sejtekben a retinoblasztóma protein CDK kinázok több helyen történő szekvenciális foszforilációja az pRB inaktivációját, következésképpen az E2F-DF transzkripciós faktorok aktiválását eredményezi. Ez a folyamat a G1-ből S-fázisba történő átjutáshoz szükséges transzkripciós tevékenységek sorozatát indítja el.

Az állatok és növények több mint egymilliárd éve megtörtént evolúciós szétválása ellenére, kétségtelen, hogy az RB/E2F/DP szabályozási út, hasonlóan fontos szerepet játszik a G1/S sejtciklus átmenetben [107, 140]. Az E2F transzkripciós faktor a nevét az adenovírus E2 promóteréhez való kötődéséről kapta, a DNS-t a dimerizációs partnerével (DP) heterodimerként köti meg [7, 57]. Az állatokban a retinoblasztóma család tagjai különbséget mutatnak az E2F transzkripciós faktorokkal történő kölcsönhatásaikban. A pRB köti az E2F transzkripciós aktivátorokat (E2F1,2,3a), és represszor-típusú E2F3b-t. Ezzel ellentétben, a retinoblasztóma család emlős tagjai a p107 és a p130 elsősorban a represszor-típusú E2F-eket kötik meg. Ebből következően a "pocket" fehérjék nemcsak akadályozzák az E2F okozta transzaktiválást, de szerepet játszanak a transzkripció repressziójában is, így együttesen finoman szabályozzák a sejtciklus G1/S fázis átmenetét [33, 61].

A lúdfű három E2F fehérjét (E2Fa, E2Fb és E2Fc), és két DP-t (DPa és DPb) tartalmaz [52, 140]. Bár az állatokban a retinoblasztóma család több tagja található meg, ezzel ellentétben a lúdfű genom csak egy retinoblasztóma homológ gént kódol [160].

Az RBR protein kölcsönhatásba lép az E2F/DP dimerrel, hogy elnyomja az E2F-szabályozott gének transzkripcióját, de az E2Fc-vel is, mely a növényekben az E2F–reszponzív gének negatív szabályozójaként működik [43, 164, 178]. Az RBR megkötő AtE2F-ekkel ellentétben, a DEL-szerű fehérjék, melyekből hiányzik egy RB-kötő motívum, a DP partnerekkel való kölcsönhatás nélkül képesek

specifikusan megkötni a DNS-t. Ezek a génexpressziót nem tudják aktiválni, de képesek meggátolni az E2F-függő gén expressziót a lúdfű sejtekben [180]. Az állati és a növényi E2F-ek átfogó domén szerveződése hasonló az igen konzervált DNS megkötő doménben, és kevésbé a leucin-cipzár "leucine-zipper" doménben, és a C-terminális transzaktiváló doménben, mely tartalmazza a konzervált RB-kötő helyet.

Az állatok és növények E2F/DP transzkripciós faktorai által felismert DNS szekvencia (TTTCCCGC) megegyezik [3, 163]. Az emlősökben nagyszámú E2F célgént jellemeztek, mint a DNS replikáció, mitózis, apoptózis, és differenciálódás alatt működőket [57]. Növényben eddig csupán néhány kísérleti úton is megerősített E2F által szabályozott gént találtak, ilyenek: a *DNS polimeráz α* , *CDC6*, *PCNA*, *RBR*, *MCM3* [43, 45, 178].

Az E2Fa a DPa-val együttesen elősegítik a proliferációt a lúdfű növényben [45, 242]. Azonban E2Fa-DPa heterodimer koncentráció-függő módon el tudta nyomni az M-fázis-specifikus ciklin gének kifejeződését, és képes volt megnövelni az endoreduplikáció gyakoriságát [21, 165]. Megfigyelték, hogy E2Fa és a DPa egyidejű túltermelése során a levélben lényeges sejtméret különbségek keletkeztek, a nagyon kicsitől a jelentősen nagy méretekig [45, 165]. Az E2Fc túltermeltetése az S-fázisos gének csökkent expresszióját eredményezi és késlelteti a sejtosztódást, mely megnagyobbodott sejtekhez vezet [49]. Az utóbbi időben kimutatták, hogy az E2Fe funkciójának elvesztése megnövekedett poliploid szintekhez, míg az E2Fe túltermeltetése csökkent endoreduplikálódáshoz vezet [289]. Az E2Ff túltermelése a differenciálódott sejtek méretének csökkenést eredményezi [228]

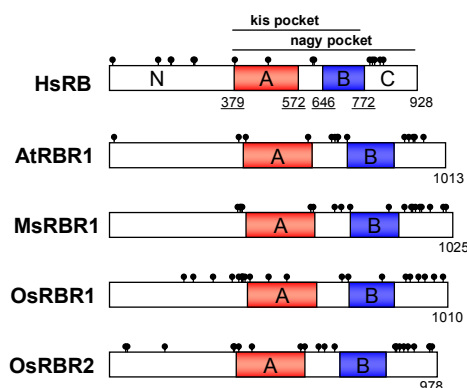
2.2.4.1. A növényi retinoblasztóma-homológ gének

A retinoblasztóma gén volt az első azonosított tumor szupresszor, melyet a szem retinájából származó tumorból pozicionális klónozással izoláltak [168]. Azóta a retinoblasztóma fehérje (pRB) funkciójának széles spektrumát mutatták ki a magasabbrendű eukarióta szervezetekben. További retinoblasztóma-homológ gének izolálására is sor került, melyek a "pocket domént" tartalmazó családként ismertek. Az emlősökben három tagjuk található meg az említett pRB, a p107 [74]

és a p130 [183], melyek részlegesen átfedő funkciókkal rendelkeznek [213]. A retinoblasztóma géncsalád, a sejtnövekedés és differenciálódás számos folyamatában részt vesz, beleértve a sejtciklus, a gén kifejeződés és az apoptózis szabályozását [61, 94, 156].

Az első növényi eredetű retinoblasztóma homológ gént a kukoricából klónozták [1, 99, 299]; később izolálták számos más növényi fajból, mint *Nicotiana tabacum* [203], *Arabidopsis thaliana* [160], *Medicago sativa* [169], *Pisum sativum*, *Euphorbia esula* és *Populus tremula* x *Populus tremuloides* kétszikű fajokat. Az egyszikű kukoricában még izoláltak egy új RBR gént [246], szintén két homológot találtak más egyszikű fűfélékben is, mint például a rizsben (*OsRBR1* és *OsRBR2*) és búzában (*TaRBR1* és *TaRBR2*) [169]. Eddig a kétszikűekben kivétel nélkül csak egyetlen példányát mutatták ki az Rb-homológ szekvenciának, és a rendelkezésre álló szekvencia információra és az *in silico* kutatásra alapozva megállapítható, hogy egyetlen retinoblasztóma-homológ feltételezhető az összes kétszikű fajban [169, 247]. Az ismert növényi retinoblasztóma-homológok filogenetikus fája világosan mutatja, hogy a növényi RBR fehérjék három megkülönböztethető alcsaládba sorolhatók be. Az „A” alcsalád tartalmazza az összes kétszikűből származó, míg a „B” és „C” alcsaládok az összes egyszikű RBR fehérjét [169]. Ezek a megfigyelések érdekes különbségeket engednek feltételezni az RB-homológok közvetítette folyamatokban a kétszikű és egyszikű fajok között, mivel egy valószínűsíthető gén duplikációs esemény lehetővé tette az egyszikű RBR fehérjék funkcionálisan elhatárolható elválasztódását [169, 247].

A növényi RBR fehérjék az állati RB családdal analóg domén szerkezetet, valamint meggyőző szekvencia homológiát mutatnak az A és B zseb (pocket) régióval [1, 99, 299]. A 2.4. ábra négy növény retinoblasztóma-homológ és a humán pRB fehérje fő szerkezeti jellemzőit foglalja össze. Ez alapján is nyilvánvaló, hogy a domén szerveződés a növényi retinoblasztóma fehérjékben hasonlóan fontos, mint a metazoákban (2.4. ábra).



2.4. ábra. A pRB fehérje és néhány növényi RBR fehérje konzervált szerkezetét bemutató sematikus ábra.

A humán RB fehérje rajza alatt a számok a domének aminosav határait jelölik: N-terminális (N), A-pocket (A), B-pocket (B), C-domén (C). A feltételezett CDK foszforilációs helyeket a fekete pontokkal jelöltük. Az ábrához használt fehérjék azonosító számai: HuRB (M15400), AtRBR1 (AF245395); MsRBR1 (AY941773); OsRBR1 (AY941774); OsRBR2 (AY941775)

2.2.4.2. A növényi RBR gének expressziója

A kétszikű dohány esetében az *NtRBR1* mRNS minden vizsgált szervben detektálható mennyiségben van jelen [203], hasonlóan a lucernához, ahol az *MsRBR1* gén kiegyenlített transzkript mennyiségeket mutatott a kifejtett levelek minden részében, a gyökér sejtekben, és szuszpenziós kultúrában [169]. A Genevestigator adatbázisban elérhető expressziós adatok alapján, az *AtRBR1* gén mRNS mennyisége is közel egyforma a különböző lúdfű szervekben [169]. A rizslevelekben az *OsRBR1* génkifejeződése kapcsolható a sejtosztódási aktivitáshoz, ez a gén magasabb kifejeződést mutat a fiatal levelekben és csökkenő mRNS mennyiséget, az alap régióktól a csúcs felé a kifejtett levelekben. Az *OsRBR2* transzkripció szintje a teljesen kifejtett levelekben néhány százszor magasabb volt, mint az *OsRBR1* mRNS mennyisége [169]. A *ZmRBR1* fehérje mennyisége a sejtek sejtosztódásból történő kilépésénél és a levél differenciálódása során növekszik meg [136], míg az RBR3 protein kifejeződése a kukorica endospermium fejlődés alatt a mitotikus stádiumra korlátozódik [246].

A kétszikűekben tehát az egyetlen RBR gén transzkriptje közel egyforma mennyiségeket mutat a vizsgált szövetekben, míg a gabona egyszikű fajokban specializálódás figyelhető meg a két RB alcsalád között, ami az egyszikű RBR alcsalád tagjainak elkülöníthető funkcióját sugallja [169, 246]. Ez a megfigyelés

emlékeztet az emlősnél talált helyzetre, ahol az RB-család három génjének változik az expressziós mintázata a különböző szövetekben a sejtciklus különböző szakaszaiban.

2.2.4.3. Az RB fehérjék konzervált szerkezete

Az RBR fehérjék szabályozó mechanizmusainak megértéséhez érdemes kitérni, ezen fehérjék néhány strukturális jellemzője. Mivel az RB fehérjecsalád strukturális és funkcionális jellemzőiről való jelenlegi ismereteink nagy része a pRB fehérjével kapcsolatosan tisztázódott, ezt a 928 aminosav hosszúságú humán RB fehérjét használjuk a funkcionális régióinak bemutatásához (2.4. ábra). Az pRB (1-378 aminosavak) aminoterminális régiója elengedhetetlen az embrionális és születés utáni fejlődéshez, a tumor szupresszióhoz és az egész pRB funkcionális integritásához [237].

Az N-terminális domén kölcsönhatásba lép egy 84-kD nukleáris mátrix fehérjével [68], egy sejtciklus szabályozott kinázzal [268] és egy hősokk proteinnel [206]. A p84N5 protein szabályozhatja az pRB szubcelluláris elhelyezkedését [68] és az apoptózis gátlását [60].

A kis „pocket” régió, mely tartalmazza az A és B doméneket (379-572 és 646-772 aminosavak, illetve a köztes elválasztó szakasz) eredetileg két virális onkoproteinnel történő kapcsolathoz elengedhetetlen részeként lett jellemezve, ezek az SV40 nagy-T antigénje és az adenovírus E1A fehérjéje [135]. Ez a régió a konzervált LxCxE aminosav motívumot tartalmazó fehérjék kötéséhez szükséges, ilyenek a fent említett virális fehérjék, a humán papillomavírus E7 fehérjéje [69], a D-típusú ciklinek [73], és az LxCxE motív kicsit modifikált verzióját tartalmazó PP1 foszfatáz [66]. Ezen régió fontosságát kihangsúlyozza az a tény, hogy a legtöbb, az pRB fehérje diszfunkciójával kapcsolatos tumorban kimutatható az A vagy B domének legalább egyikének mutációja.

A kis „pocket” a C-terminális doménnel együtt alkotja a pRB nagy „pocket” régióját (373-928 aminosavak). A pRB nagy „pocket” régiójára a legjellemzőbb, hogy az E2F transzkripciós faktorokat képes megkötni, de ez szükséges az eddig azonosított legtöbb RB asszociált fehérjével való kölcsönhatáshoz [199].

Tanulmányok rámutattak, hogy az E2F illetve az LxCxE motívumot tartalmazó fehérjék különböző helyeken kötődnek a pRB fehérjéhez [296].

A C-terminális domén egyedül is kölcsönhatásba léphet fehérjékkel, például a c-Abl tirozin kinázzal [296], vagy a p53 onkoproteinnel [133].

Összegezve, a pRB fehérje elhatárolható régiói különböző fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt, eltérő funkcionális következményekkel, melyek nagyban függenek az pRB legfontosabb poszttranszlációs modifikációjától, a foszforilációjától.

2.2.4.4. A növényi RBR fehérjék növekvő számú ismert kölcsönhatói

Eddig legalább 110 fehérjéről mutatták be, hogy kölcsönhatnak az emlős retinoblasztóma fehérjével (összefoglalásként: [199]). A cikk szerint a kölcsönhatásba lépő partnerek jellemzőit alapul véve ezek három fő csoportba sorolhatók. A legnagyobb csoportban hetven transzkripcionális szabályozóról számolnak be, melyek három alapvető funkcionális kategóriába oszthatók: a) faktorok, melyek visszatartják a transzkripciót, b) faktorok, melyek megindítják a transzkripciót, és c) faktorok, melyek nem ismert vagy nem egyértelmű módon befolyásolják a transzkripciót. A második nagy csoport, több mint egy tucat enzimet tartalmaz (kinázok, foszfatázok és kináz-regulátorok); ezek legtöbbje poszttranszlációsán módosítja a pRB-t. A harmadik csoportba, több mint húsz változatos funkcióval rendelkező kölcsönható tartozik. Ezen fehérjék jelentős része közvetlenül vagy közvetetten szabályozza a DNS replikációt, a sejtciklust és különféle magi folyamatokat. A szekvencia homológiára alapozva elvárható, hogy a növényi RBR fehérjéknek az állati megfelelőjükhöz hasonló biokémiai tulajdonságaik vannak.

A ZmRBR1 és ZmRBR3, az emberi pRB-hez hasonlóan, olyan sejtmagi fehérjék, melyek kötődnek mind a virális és celluláris fehérjékhez [1, 136]. Így a ZmRBR1 fehérje képes kölcsönhatásba lépni az emlős virális onkoproteinekkal, mint a SV 40 nagy-T antigénjével [2], és a humán papillómavírus E7 fehérjével [99, 136]. RBR fehérjék szintén kölcsönhatásba lépnek a növényi virális replikációs fehérjékkel, mint pl. a búza törpeségi vírus RepA [99, 130, 299] és a paradicsom arany mozaik vírus replikációs faktor AL1 fehérjéje [1, 5, 160]. Az ok, amiért sok

virális fehérje képes kapcsolódni az RBR fehérjével, hogy tartalmazzák az LxCxE konzervatív RB-kötő motívumot. Ennek jelenléte ugyanis szükséges az Ad E1A, HPV E7 és a RepA fehérjék számára, hogy képesek legyenek kötődni az *in vitro* transzlált ZmRBR3 fehérjéhez a “pull-down” kísérlet során [246]. Az egyetlen kivétel az AL1 protein, melynek egyedi kötő doménje van az LxCxE motif helyett [5, 160]. Érdekes módon a doménben az azonosított két mutáció a fertőzés szövet specifikusát is módosítja a növényben [160].

A legtöbb vírushoz hasonlóan a növényi D-típusú ciklinek a ZmRBR1-hez szintén kötődnek [1, 136] a konzervált LxCxE motívumot használva a kölcsönhatáshoz [136]. Az NtRBR1 és Nicta;CycD3;1 közötti kölcsönhatás kialakulását élesztő kettős-hibridet és *in vitro* kötési vizsgálatot használva is igazolták [203]. A-típusú ciklin, a Medsa;CycA2 is képes kölcsönhatásba lépni a retinoblasztómával, ha annak a ciklin-box régiója intakt maradt [243].

Kimutatták, hogy ZmRBR1 kötődik mind az emlős [1, 136], mind a vizsgált búza [229] és lúdfű E2F fehérjékhez. NtRBR1 képes kölcsönhatásba lépni dohány E2F-el az élesztő kettős-hibrid vizsgálatokban [252], ami megerősítésre került *in vitro* kötési vizsgálatok során is [277]. Ilyenfajta kölcsönhatást mutattak ki lúdfűben az E2FB és RBR1 proteinek között [178]. Érdekes módon az élesztő kettős-hibrid vizsgálat kimutatta, hogy a Medicago PP2A B” szabályozó alegység az MsRBR1 erős asszociációs partnere, képes kölcsönhatásba lépni az OsRBR1-gyel, de nem volt kimutatható asszociáció az OsRBR2-vel [169].

A jelenleg publikált növényi RBR kölcsönhatók sora a kromatin-asszociált proteinnel zárható. Ilyen például a kukorica hiszton deacetiláz (RPD3), mely ZmRBR1 fehérjével működik együtt a gének transzkripciójának repressziójában [241] vagy a WD-40 domént tartalmazó LeMSI1 fehérje, mely kötődik a pRB proteinhez és a kukorica RBR1 fehérjéhez is [2]. A CURLY LEAF (CLF) a „*polycomb*” csoportba tartozó fehérje [297] és a mostanában jellemzett FVE (AtMSI4) szintén kapcsolódik a ZmRBR1 fehérjével [8]. Ezenfelül egy másik “polycomb” fehérje, a lúdfű FERTILISATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE) kölcsönhatásba lép az emberi pRB-vel, és ennek növényi homológjaival a lúdfű és kukorica RBR1 proteinjével, de a kölcsönhatás meglepően nem a FIE fehérjében meglévő LxCxE konzervált motívumon keresztül történik [200].

Amint a folyamatosan növekvő számú RBR kölcsönható proteinek példáiból kiderül, a növényi retinoblasztóma homológ egy multiprotein komplex része, melynek feltehetőleg fontos közvetítő szerepe van a kromatin szerkezet szabályozásban [105, 200, 253, 297].

2.2.4.5. A RBR fehérje foszforilációs szabályozása

Az emlős pRB több aminosava foszforilálódik sejtciklus függő módon. A pRB foszforilációjáért kiemelten a CDK kinázok a felelősek. A G1-fázisban nagyjából a hipofoszforilált aktív pRB forma található. A retinoblasztóma fehérje hiperfoszforilált formái akkor jelennek meg, amikor a sejtek a sejtciklus S-fázisába lépnek, mígnem a G2- M-szakaszokban túlsúlyba is kerülnek [294]. A pRB foszfopeptid elemzésének eredménye több mint egy tucat foszforilációs helyet mutat a szerin vagy a treonin aminosavakon [197]. A retinoblasztóma defoszforilációjában a protein foszfatáz I bizonyítottan közreműködik az anafázistól a G1-fázisig tartó periódusban, ennek köszönhetően megakadályozza a sejt a következő ciklusba történő belépését [173].

Az emlős RB protein funkció foszforilációs állapotától való függősége jól jellemezett, így feltételezhetően a növényi RBR fehérje aktivitásának foszforiláció általi szabályozása is meghatározó. Erre vonatkozólag, az első kísérleti igazolás ZmRBR1 foszforilációs állapotának megváltozása volt, az endospermium fejlődése alatt. A E2F-asszociált ciklin-függő kináz komplex a RBR1 proteint kimutathatóan foszforilálta *in vitro* [99]. Ugyanúgy mint a pRB, a ZmRBR1 is jó *in vitro* szubsztrátja volt a három humán G1/S fázisos ciklin/CDK komplexeknek [136]. Az NtRBR1 proteinjét a szinkronizált BY-2 dohány sejtek G1- és S-fázisából immunoprecipitált CYCD3;3-CDKA komplexe foszforilálja *in vitro* [202, 203]. Ezek az eredmények egybehangzanak egy korábbi beszámolóval, mely bemutatta, hogy sejtciklus szabályozott kináz aktivitások *in vivo* kötődnek ZmRBR1 fehérjéhez, és ez a komplex hatékonyan foszforilálta a növényi RBR protein C-terminális doménjét *in vitro* [17]. Ezenfelül nemrégiben kimutatták, hogy a kukorica RBR3 protein is jó szubsztrátja a CYCA1;3 asszociált kináz komplexnek *in vitro* [246].

Míg a pRB foszforilációs állapota a kinázok és foszfatázok ellentétes funkciójától függ, néhány aminosavon a hiperfoszforiláció a "pocket" proteinek

lebontását okozhatja [176], és ennek következményeként irreverzibilisen csökkenti a fehérje szintet. A humán sejtekben HPV 16E7 protein az ubiquitin-proteoszómás úton keresztül idézi elő a pRB degradálását [23], ugyanakkor a család többi tagja a p107 és a p130 fehérje szintén lebontódhat proteoszómás mechanizmusokon keresztül [96, 144].

2.2.4.6. A növényi RBR fehérjék alapvető szerepet játszanak a G1/S átmenet szabályozásában

A "pocket" család fehérjéi a leginkább a G1/S átmenetet korlátozó szerepükről ismertek, melyet az E2F transzkripciós faktorok szabályozásán keresztül fejtenek ki [33]. A növényi és állati retinoblasztóma proteinek közötti kimutatott szekvencia és biokémiai hasonlóság, valamint a homológ kölcsönhatók nagy száma erősen sugallja, hogy a növényi retinoblasztóma-homológ fehérjék funkcionális hasonlóságot is mutatnak az állati megfelelőikkel [67, 247]. Ezt a feltevést több kísérleti eredmény is alátámasztja. A búza sejtekben például csökkentett geminivírus DNS replikációt okoz a tranziensen kifejeződő ZmRBR1 vagy a humán p130 fehérje [299]. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a ZmRBR1 gátolja a G1/S átmenetet a növényi sejtekben, és ez megegyezik azzal a ténnyel, hogy a geminivírusok replikációjához szükséges az S-fázisos környezet [299], hasonlóan az állati tumor DNS vírusokhoz [281]. Másodsorban, a tranziens kísérletekben a ZmRBR1 transzkripcionális represszorként viselkedett (hasonlóan az emberi pRB-hez) és képes volt mind a humán HBP1 (egy LxCxE-tartalmú aktivátor) és az E2F általi transzkripciós faktor aktivitásának elnyomására a humán sejtekben [136]. A legutóbbi kutatások megállapították, hogy az NtE2F/NtDP transzaktiváló hatását represszálja az NtRBR1 együttes transzfekciója, ugyanakkor ez a repressziós hatás kivédhető D-típusú ciklin expresszáásával a dohány protoplasztokban [277]. Ezek az eredmények alátámasztják a feltevéseket, mely szerint a sejtciklus szabályozása az RBR fehérjék által az E2F transzkripciós faktorok represszióján keresztül történik, hasonlóan az állatokban azonosított szabályozási folyamathoz [33, 61]. Ez egybeesik a kukorica kalluszban és a BY2 dohány sejt kultúrában megfigyelt RepA protein kiváltotta RBR inaktiválás hatására bekövetkezett sejtosztódások gyakoriságának emelkedésével. A feltételezés alátámasztásaként

a ZmRBR1 protein túltermelése esetén a hatás a vártnak megfelelően fordított lett [97]. Az *Agrobacterium rhizogenes* ORF13 LxCxE RB-kötő motívumot tartalmazó proteinjét túltermelő paradicsomban pedig a vegetatív hajtás apikális merisztémájában növekedett a sejtosztódások száma [270].

A fent említett eredmények alátámasztják azt a széles körben elfogadott nézetet, hogy a G1/S átmenet aktiválása a növényekben az RBR szabályozási úttól függ [42, 44, 106, 108].

2.2.4.7. RBR funkciója a növények organogenezisében

Az RBR mutáns növények sorozatának részletes elemzése bepillantást ad az RBR proteinek funkcióiba. Az első kutatási eredmény a homozigóta *ZmRBR1* gén kukorica mutánsairól szól, melyek nem várt módon, nem mutattak semmilyen nyilvánvaló fenotípusos módosulást, valószínűleg a meglévő másik RBR gén(ek) által biztosított redundanciának köszönhető kompenzáció következményeként [67]. Az első megalapozott választ erre a kérdésre mostanában közölték, mivel a RepA protein mediálta RBR1 aktivitás gátlására kialakult RBR3 expressziójának megnövekedését találták a kukorica sejtszuspenzióban [246].

A lúdfű *RBR* inszerciós mutánsában női gametofiton elhalást találtak, a haploid magban nem állt le a mitózis, így az *AtRBR1* fehérjének egyértelmű feladata van a sejtciklus szabályozásában a gametogenezis alatt [70]. Az *AtRBR1* mutánsok centrális magból induló autonóm endospermium fejlődése emlékeztet a “*fertilization-independed seed*” (*fis*) megtermékenyítés nélküli endospermiumot képző mutánsokra [104], ezért az *AtRBR1* nyilvánvaló funkcióval rendelkezik a gametogenezis alatt a sejtciklus ellenőrzésében és az autonóm endospermium fejlődés repressziójában is [70].

A korábban megemlített kölcsönható RBR proteinek partnerei közül kettő, a FIE és a MSI1 (WD protein) a “polycomb” csoport tagjai (PcG), amelyek a kromatin átrendeződését szabályozó faktorokat kódolnak, és a mutásaik az autonóm endosperm fejlődéshez hasonló hatásokat mutatnak megtermékenyítés hiányában [29, 105, 159, 175, 212, 267]. Az RBR1/FIE/MSI1/MEA komplex szerepe kétségtelen az E2F-szabályzott gének repressziójában, a női gametofiton sejtosztódásainak szabályozásában, amíg a megtermékenyítés következtében újra

nem kezdődik a sejtosztódás a lúdfű embriózsákban [105, 200]. Az állati MSI1 homológok, az RbAp46 és az RbAp48 kölcsönhatnak a pRB fehérjével [226]. Ezek a PcG tagok azokhoz a hiszton deacetiláz komplex alkotókhoz tartoznak, melyek fontos szerepet játszanak a kromatin szerkezet és funkció megváltoztatásában [205]. Az FVE fehérjéről kimutatták, hogy kölcsönhatásba lép az AtRBR1 fehérjével, ugyanakkor az *fve* mutáns növények, genetikai bizonyítékot adtak a virágzást szabályozó *FLOWERING LOCUS C (FLC)* traszkripciójának hiszton deacetiláción keresztüli represszáására [8]. Ezen felül egy másik kromatin módosító, az RPD3-típusú hiszton deacetiláz is részt vesz az RB-mediált traszkripcionális szabályozásban, mivel ennek antiszensz kifejeződése a lúdfűben különböző pleiotrópiás hatásokat mutatott: ilyenek voltak a szerv fejlődésbeli változások, beleértve a virág rendellenességeket, aszimmetrikus leveleket és késői virágzást [241, 275, 298].

A növényekben a módosított RBR protein szintekkel vagy megváltozott E2F-kötő aktivitással elért fenotipikus változások jelzik, hogy a növényi retinoblasztóma-homológ fehérjéknek fontos szerepe van nemcsak a sejtciklus szabályozásban, hanem a növényi organogenezis során is. Ez a folyamat az állatokhoz hasonlóan valószínűleg magában foglalja a kromatin szerveződés szabályozással kapcsolatos utat [113, 177].

A vírus indukálta gén gátlás (VIGS) technika eredményeit használó tanulmány, melyekben az NbRBR1 szerepét vizsgálták dohányban, megerősíti a tényt, hogy a retinoblasztóma-homológnak kulcsszerepe van a sejtosztódás, differenciálódás és endoreduplikáció szabályozásában [214]. Az RBR szupresszió növekedett sejt proliferációt, és extra DNS replikációt okoz az endoreduplikálódó levél sejtekben, ami rendellenes szervfejlődést eredményez, azaz részlegesen retardált trichomákat, rendellenes levél formálódást, és növekedési elégtelenségeket [214].

Más kísérletekből származó növényekben levő E2F homológokkal kapcsolatos megfigyelések, szintén támogatják az általánosan elfogadott nézetet, hogy az RBR proteinek kulcsszerepet játszanak a G1/S átmenet szabályozásában [44, 106, 108, 253].

2.2.5. Hormonok hatása a növényi sejtciklusra

A növények posztembrionális fejlődése megköveteli a szervnövekedés, a sejtosztódás és differenciálódás állandó koordinációját. Ezt a kiterjedt proliferációs potenciált összetett hálózat szabályozza, melyben számos fitohormon szerepe igazolt. Az auxin és a citokinin fontos funkcióiról rendelkezünk a legtöbb adattal, ezeket igazolja számos sejtciklus gén transzkripcionális kifejeződésének ellenőrzésében bemutatott szerepük is. Azonban más hormonok, mint az abszcizinsav (ABS), etilén, jázmonsav és brasszinoszteroidok (BR), melyek hatása sokkal kevésbé jellemzett; szintén hatással vannak a sejtciklus szabályozására.

Az auxin elsősorban a sejtosztódásra és megnyúlásra van hatással, fontos szerepet játszik sok fejlődési folyamatban, mint a vaszkuláris szövet fejlődésében, az apikális dominancia kialakításában, az oldalgyökér- és termésnövekedés szabályozásában. Bár az indolecetsavnak a növényi fejlődésben való fiziológias jelentősége néhány évtizede ismert, az auxinokat észlelő és a jeltovábbító molekuláris mechanizmus komponenseit csak az utóbbi időben kezdték kideríteni (áttekintésként lásd: [225]).

Számos, az auxin jelátviteli vagy válasz mechanizmusában sérült, mutánszt azonosítottak már, ezek közül többen kapcsolatban állnak az SCF és az APC komplexekkel [101, 102, 129].

Cikkek számolnak be az auxin jelátviteli folyamatában központi szerepet játszó specifikus protein degradációról, az ubiquitin-függő proteoszómás útról [55, 225]. A TIR1 auxin receptor egy F-box protein, az SCF komplex egyik alkotórésze [54], az AUX/IAA fehérje degradációját a 26S proteoszómán keresztül szabályozza [102]. Az AUX/IAA transzkripció inhibitor proteinek lebomlása lehetővé teszi az ARF transzkripció faktorok kötődését a specifikus promóter elemekhez [14]. Így a sejtciklusban központi szerepű célgének, mint a CDK kinázok és ciklinek valamint az E2F-ek expressziója is megtörténik [235], [49, 125].

Bár jelenleg keveset tudunk a CDK-k auxin általi közvetlen szabályozásáról, világosan látható az auxin hatása a CDK komplex szabályozó fehérjéire. A CYCA2;2, mely részt vesz a mitotikus ciklusban, lucernában auxin által indukált [244]. A gyökérmerisztéma eredetű dohány BY-2 sejtek szuszpenziós kultúrájában

a sejtosztódás gyakorisága függ az auxin ellátástól, mely biztosítani tudja az állandó endogén auxin szintet a sejtciklus során [231]. A 2,4-D, mint szintetikus auxin, kimerített sejtekben előidézi a D-típusú ciklinek kifejeződését, ezzel elősegíti a sejtek sejtosztódásba történő belépését [117]. Az auxin tehát azáltal is elősegíti a sejtciklus folyamatát, hogy serkenti az inhibitor proteinek degradálását és indukálja a G1/S és G2/M átmeneteknél szükséges gének kifejeződését [16].

A citokinineket a sejtosztódásra gyakorolt serkentő hatásukon keresztül fedezték fel, fontos fiziológias szerepük van a növényi növekedésben, differenciálódásban és fejlődésben [132, 193]. A citokininnek sok folyamatra hatnak, indukálják a sejtosztódást, a hajtás kialakulást [193, 260], növelik a sink erősségét [236], aktiválják az oldalrügyek képződését [166] és késleltetik a levél öregedést [89]. A lúdfűben több kétkomponensű membrán kötött hisztidin kinázt, mint citokinin receptort azonosítottak, melyeknek a ligand specifikitása különbözik [152]. A citokinin kötés után a lúdfűben foszforilációs kaszkád indul el: a hisztidin-tartalmú foszfortranszfer proteinek (AHP) számos foszforilálódott formája a sejtmagba transzlokálódik és ott aktiválja a B típusú ARR válaszregulátor transzkripciósfaktorokat [137, 152]. A sejt eredettől és a viselkedéstől függően a citokininek akadályozhatják is a sejtosztódást, amint azt a dohány BY-2 gyökérből származó szuszpenziós kultúrában nevelt sejtek esetében megfigyelték [117].

A szinkronizált dohány BY-2 sejtek endogén citokinin koncentrációjának elemzése a sejtciklus során jelentős fluktuációt mutatott [58, 231]. A citokinin mérések részletes vizsgálata túlnyomóan a t-zeatin ideiglenes akkumulálódását mutatta ki a fázis átmenetek határán. A citokinin szintek és a különböző ciklin gének fázis-specifikus kifejeződése közötti összefüggést találták, és az endogén citokinin tartalom módosítása a ciklin expresszió megváltoztatását eredményezte [117]. Az endogén citokinin koncentráció módosítása lovasztatin (a citokinin szintézis inhibitora) vagy külső citokinin adagolással kimutatta, hogy a citokinin mennyiségi változások szükségesek a sejtciklus megfelelő haladásához [116]. A sejtekben az endogén citokinin koncentráció csúcsot ér el a mitózis előtt, sugallva ezzel a specifikus szerepét ennél a sejtciklus fázis átmenetnél [167, 231]. A megfigyelés, mely szerint a citokinin képes kapcsolódni a CDK-k ATP-kötő helyére,

azt sugallja, hogy az oszcillációja szabályozni tudja a sejtciklus előrehaladását [221].

A citokininek az auxinokkal együttműködve szabályozzák a CDKA expresszióját és aktivitását [146, 194], és indukálják a D3 ciklinek expresszióját a G1/S átmenetnél [238, 263], mindamellett elindítják DNS replikációt is az S-fázisban [131]. Ezenfelül fontos szereppel rendelkeznek a G2/M átmenet szabályozásában is [50]. Megfigyelhető a dohányyszár bélszövetének parenchima sejtjeiben, hogy egyedül auxin jelenlétében a p13suc1 kötött CDK komplexek inaktívak, citokininnel együtt azonban a CDK aktiválódik is. Kinetin nélkül a dohány szuszpenzióban a sejtek a késői G2 szakaszában állnak le, miközben inaktívak a CDK komplexek [303]. Összefoglalva, úgy tűnik, hogy az auxin kezelés növeli a CDK fehérje mennyiségét, de csak a citokinin-hatására lejátszódó defoszforiláció okoz CDK aktivitás növekedést [302, 303].

Az abszcizinsav (ABS) leginkább mint növekedés-gátló hatással rendelkező hormon ismert. Az ABS kulcs szerepet tölt be a magfejlődés és csírázás alatt is, például, gátolja az éretlen magvak csírázását, befolyásolja a mag tápanyag-felhalmozását [170]. Emellett az ABS-t gyakran stresszhormonnak is nevezik, mivel szerepe van a különböző stresszekre adott válaszfolyamatokban, például a szárazság tűrésben, ahol a vízvesztés megakadályozására a sztóma zárását indukálja. De az ABS befolyásolja a hideg-, a só-, a sérülés vagy patogén stressz válaszok folyamatait is [170, 257].

Az ABS-re adott válasz lehet gyors, melyben ion csatornák indukálásán keresztüli szabályozás játszik szerepet, mint például a sztómazáródás folyamatában. Másrészt az ABS előidézi lassú génexpressziót igénylő válaszreakciókat [80].

A CDKA promóter szabályozása alatt álló β -glükuronidáz (GUS) reporter gén segítségével kimutatták, hogy az ABS gátolja a CDKA aktivitását a gyökérben (kivéve a fő gyökér csúcsot), miközben DNS replikáció sem volt mérhető [124]. Az ABS ugyanakkor a ciklin-függő protein kináz inhibitorok (*AtKRP1*, *KRPMt*) expresszióját indukálja [216, 291]. Valószínűsíthető, hogy az ABS a G1/S átmenetnél gátolja a sejteket, megnövelve a KRP1 inhibitor mennyiségét, bár a közvetlen bizonyítékok még igazolásra várnak. Az exogén hozzáadott ABS

megakadályozza a G1/S átmenetet a BY2 dohány szuszpenziós sejtekben, de úgy tűnik, nem befolyásolja a többi sejtciklus fázist [273]. Az *aba2/gin1* mutáns növényben stressz körülmények hiányában a sejtmegegyülés defektusa miatt kisebbek a sziklevelek, míg a rozetta levelek méretének csökkenése mind a sejtszám, mind a sejt méret csökkenéséből adódik, ami utal az ABS hormon sejtosztódásban betöltött szerepére a levélfejlődés alatt [31].

A brasszinoszteroidok is specifikus szerepet játszanak különféle folyamatokban beleértve a szerv megnagyobbítást, a fejlődést és a sejtosztódást [32]. A közvetlen kapcsolat a brasszinoszteroidok és a sejtciklus szabályozók között abból a megfigyelésből származik, hogy az epi-brasszinoszteroid indukálja a *CYCD3* kifejeződését és elősegíti a sejtosztódást. *CDKB1;1* expressziója megnövekedett brasszinoszteroid kezelés hatására, és a hormon hozzáadása részlegesen képes helyreállítani a csökkentett mennyiségű *CDKB1;1* kinázt tartalmazó növények rövid hipokotil fenotípusát [301].

A etilén feltehetőleg a citokinézis megakadályozásával reverzibilisen szupresszálja a sejtosztódást [40]. Az exogén etilén megvonásával megnövekedik a sejtosztódások száma az uborka hipokotil epidermiszében, így például többsejtes trichómák alakulnak ki [155].

A jázmonsav negatív hatással van mind a G1/S és G2/M átmenetekre [273], de ennek molekuláris mechanizmusa még nem ismert. Érdekes módon, a jázmonsav sejthalált idéz elő és represszálja a sejtosztódást számos humán rák sejtvonalban [79].

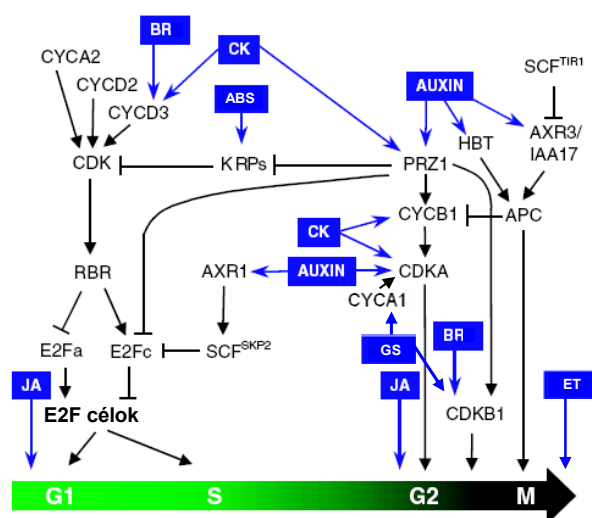
A gibberelinsavat a rizs növekedés stimuláló hatása alapján fedezték fel. A rizsben a gibberelinsav indukálja a *cycA1;1* és *cdc2Os-3* gének kifejeződését, tehát stimulálja a sejtosztódást, és ezzel gyorsabb növekedést is eredményez [6, 75].

Kimutatták, hogy a citokininek az auxinnal szinergetikus kölcsönhatásban szabályozzák a CDKA és D3;1 ciklin alegységének a kifejeződését a dohány hajtásból szövetben [146, 263]. Ezzel ellentétben az auxin és citokinin antagonisztikus jelleggel hat a CDKA kifejeződésre a laterális gyökér kezdeményekben [285]. Szintén pozitív kölcsönhatást mutattak ki a *CYCD2;1* ciklin

esetén, melynek kifejeződése szacharóz és citokinin által szinergetikusan kontrollált a lúdfűben [234].

Az auxin és a citokinin között az egyik nyilvánvaló kölcsönhatás molekuláris szinten is megtalálható az élesztő *PRZ1* növényi homológjában, mely egy hiszton acetil transzferáz komplex része. A *proporz1* (*prz1*) mutáns növény a kallusz-jellegű szövetek létrehozásához, csak auxint vagy csak citokininig igényelt, míg a normál növényeknek a kallusz képzéshez mindkét hormonra szükségük volt. Az feltételezhető, hogy *PRZ1* a kromatin szerveződését és a sejtciklus gének kifejeződését szabályozza, válaszul az auxin/citokinin egyensúlyra [259].

Mindazonáltal a gyökér eredetű BY-2 sejtek irodalomban közölt adatait összehasonlítva a lúdfű hajtás szövetekből vagy zöld sejt kultúrákból származó eredményeikkel ellentétes és szövet specifikus szabályozási kép körvonalazódik a mitogén szignálok szabályozási útvonalain [118].



2.5. ábra. A növényi sejtciklus hormonális szabályozása.

A specifikus CDK/ciklin komplexek ellenőrzik a G1/S és G2/M átmenet szabályozását. A különböző hormon szignál utak (kék négyzetek és nyilak) közvetlenül befolyásolják mind a CDK aktivátorok és inhibitorok szintjét. Néhány sejtciklus szabályozó mennyisége proteoszómás lebontás által szabályozott, vagy az SCF vagy az APC komplexek közvetítésével. További részletek a szövegben találhatóak. ABS, abszcizinsav; APC, anafázis elősegítő komplex; AXR, auxin rezisztens; BR, brasszinoszteroidok; CDK, ciklin függő kináz; CK, citokinin; CYC, ciklin; ET, etilén; HBT, HOBBIT; GS, gibberelin sav; indolecetsav (IES); JA, jázmonsav; p27kip-függő protein (KRP); PROPORZ1 (*PRZ1*); RBR, retinoblasztóma-homológ; Skp1-Cullin1-F-box (SCF).

Összefoglalva, a növényi hormonok összetett hatással vannak a sejtciklus szabályozásra, térben és időben meghatározott módon, figyelembe véve a

környezeti hatásokat, és a fejlődési programot is [100, 225]. Az egyes hormonok egyedi hatásain felül, a hormonok közötti kölcsönhatás számos példáját tárták fel [93, 272]. Bizonyított a hormonális jelátviteli folyamatokban a 26S proteasóma degradációs útvonal fontos szerepe is [83, 114]. A 2.5. ábra összefoglalja a fent részletezett eredmények alapján, a növényi hormonok kapcsolatát a sejtciklus szabályozásával. A sejtciklus molekuláris szabályozásának és a hormonok közötti összetett kölcsönhatásoknak a pontos megértése, tekintetbe véve a növekedés és fejlődés speciális hatásait, ugyanakkor még mesze van.

2.2.6. A differenciálódott növényi sejtek sejtciklusos reaktiválása

A differenciálódott sejtek képesek visszaszerezni a sejtosztódási aktivitásukat új merisztémákat létrehozva. Ilyen példák: a laterális gyökér, a nitrogén-megkötő gümő vagy az apomiktikus embrió képződése bizonyos fejlődési körülmények között. A szomatikus növényi sejtek differenciált állapotának megfordíthatósága leginkább azon képességükön mutatható be, hogy differenciálatlan kallusz sejteket hoznak létre *in vitro* körülmények között. Megfelelő hormonális szignálok hatására, megszabadítva az elfoglalt fiziológiás kényszerüktől, a szomatikus növényi sejtek képesek dedifferenciálódni, és folyamatosan osztódni. Ezenfelül specifikus feltételek mellett az *in vitro* tenyésztett növényi sejtek képesek új szervekké fejlődni, sőt akár újrakezdeni a teljes ontogenikus programot a szomatikus embriogenezisen keresztül, bizonyítva ezzel a totipotenciájukat [62].

A sejtciklus folyamat reaktiválása a G1-fázisban megállított periciklus sejtekben egy szükséges lépés az oldalgyökér kialakításban [11, 28]. Egyértelmű az auxin központi szerepe az oldalgyökér kialakítás előidézésében, azokon a helyeken, ahol auxin szint növekedés tapasztalható, a periciklus sejtek újra belépnek a sejtciklusba, és gyökér primordiumot, majd végül oldalgyökeret hoznak létre [125, 204].

Az auxin szerepét a periciklusban történő sejtosztódás reaktivációjában alátámasztja egy mostanában kifejlesztett indukálható rendszer alkalmazása, melyben gyakorlatilag minden periciklus sejtet lehet osztódásban szinkronizálni az NPA auxin transzport inhibitorral. A gátolt sejtek auxin hozzáadáskor képesek újra belépni a sejtosztódási ciklusba [125, 126]. Ennek a rendszernek a használatával

számos sejtciklus gén indukálhatóságát mutatták ki, az első indukált gének az *AtCYCD3;1*, *AtE2Fa* és a hiszton *AtH4*. A *CDKB* kináz expressziója is megnövekszik bár lényegesen később, mint az S-szakasz génjei. A CDK inhibitorok (*KRP1* és *KRP2*) expressziója, magas volt az NPA–szinkronizált sejtekben, megfelelően a sejtosztódásban betöltött gátló szerepüknek. *KRP1* és *KRP2* kifejeződés gyorsan és erősen csökkent az auxin hozzáadást követően [125]. Nagyszámú mutánst jellemeztek már, melyek az oldalgyökér kialakításban hibát mutatnak. Ezek közül hat esetében az auxin szignál transzdukció hibájából nem indulhatott újra a sejtciklus az indukált sejtekben. Az első azonosított auxin-rezisztens mutáns egyike az *axr1* volt, mely az oldalgyökér kialakítás drámai csökkenését mutatta [28].

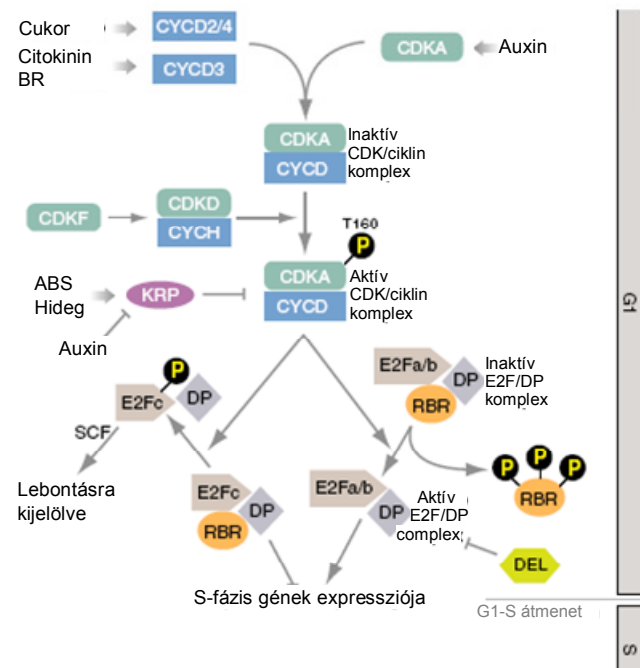
Az *RML1* gén, mely a GSH (redukált glutation) bioszintézisben az első enzimet kódolja, mutációját hordozó növények, képtelenek reaktiválni a sejtosztódást a gyökér csúcsi merisztémában a csírázás után. Ez az elégtelenség javítható GSH-t adva a *rml1* mutánsokhoz, mely szerint a GSH-nak szerepe van a nyugalmi központ sejtciklusos reaktiválásában [288].

A sejtosztódás reaktiválása a levélprotoplasztokban események komplex sorozatát tartalmazza: a protoplaszt izolálás, a sejtfal elvesztése okozta stressz leküzdése, a differenciálódott sejtfunkciók elvesztése, az anyagcsere folyamatok heterotrófra változása [37, 201, 287], az új sejtfal szintézise [192] és a sejtciklus aktiválása [35, 87]. A korai események közül néhány, mint a vágásra adott válaszreakció [103], és a nukleáris RNS szintézis az első 18 óra alatt [13, 35] megfigyelhető a médiumba adott növekedésszabályozók nélkül. A protoplasztok néhány napig életképesek maradnak hormonmentes közegben, azonban az osztódásukhoz szükségük van auxinra és citokininre [27, 35, 276].

Mind az auxint, mind a citokininint nélkülözhetetlennek találták az S-fázis megjelenéséhez dohányban [27, 35], és a petúnia levélprotoplasztokban [276]. Egy specifikus alacsony sűrűségű dohány kultúra rendszerben, az auxin képes volt a DNS szintézist elindítani, de a ciklus a citokinin hiányában endoreduplikációval végződött, míg mitózis lejátsszódásához szükséges volt a citokinin hozzáadása [282].

2.3. A növényi sejtciklus szabályozásának molekuláris modellje

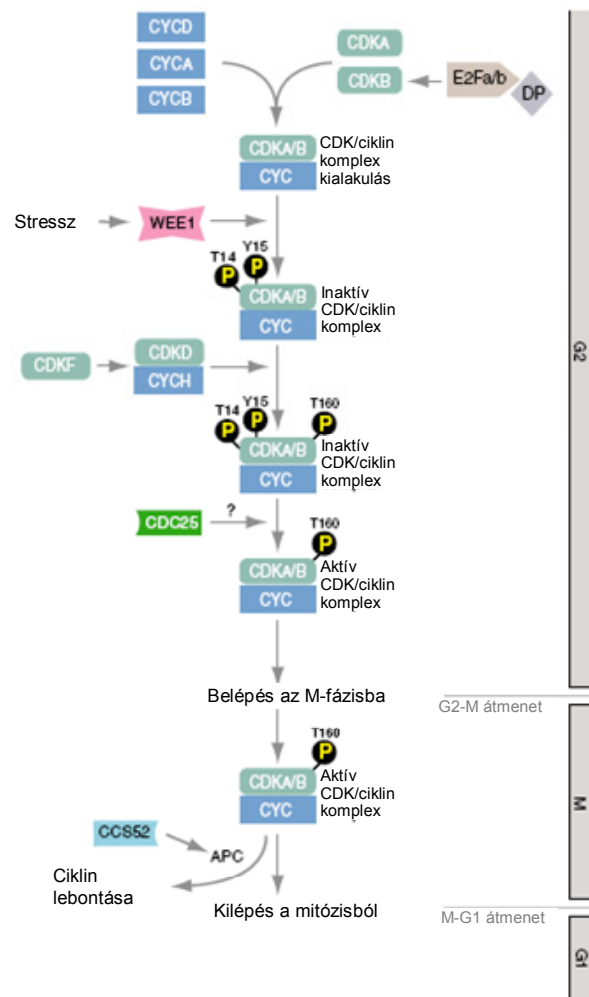
Amint részletezésre került, a sejtciklus átfogó szabályozásának folyamata nagymértékű egyezést mutat a növények és az állatok között. Hasonlóan minden eukariótához, a sejtciklus szabályozás magja tartalmazza a CDK kináz homológokat, ciklineket, inhibitorokat, és foszfatázokat a növényekben is. Ezért nem meglepő, hogy a sejtciklus szabályozás ellenőrzési pontjai is megfelelnek a magasabbrendű eukarióta szervezetekben létezőkkel [52, 140, 184]. Az ábrákon bemutatott modellek szemléltetik a növényi sejtciklus eddig feltárt molekuláris folyamatainak szabályozási mechanizmusát [140].



2.6. ábra. A növények G1-S fázis átmenet szabályozásának modellje.

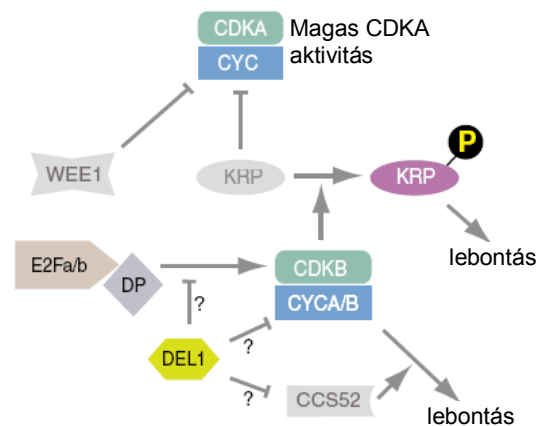
A G1-ből S-fázisba történő átmenet molekuláris szabályozásában, elsődleges szerepük van a D-típusú ciklineknek. Így a D-típusú ciklinek fő jelentősége a mitotikus sejtciklus elindítása. Növekedési szignálok (mint pl.: szacharóz, auxin, citokinin, és brasszinoszteroidok) jelenlétében a D-típusú ciklinek (CYCD) kapcsolódnak a CDKA kinázzal, inaktív CDKA/CYCD komplexet alkotva. Ez a komplex foszforiláción keresztül aktiválódik, a CDK-aktiváló kináz által, melyek a CDKF és CDKD H-típusú ciklinnel (CYCH) alkotott komplexei. Az antimitogenikus stimulusokra válaszolva, mint pl.: abszcizinsav (ABS) vagy hideghatás, a KRP-k képesek gátolni az aktiválódott CDK/CYCD komplexeket.

A CDKA/CYCD komplexek a G1-ből S-be való átmenetet egyrészt az RBR foszforiláción keresztül indítják, mely aktiválja az E2Fa-b/DP/RBR komplexek transzkripcionális tevékenységét. Másrészt párhuzamosan, elindítja az E2Fc/DP/RBR transzkripcionális represszor lebontását az SCF E3-ubiquitin-protein ligáz közbenjárásával. Ennek eredményeképpen, az E2F szabályozott S-fázisos gének transzkripciója aktiválódik.



2.7. ábra. A G2-M fázis szabályozási pont sematikus modellje növényekben.

A G2-fázis alatt az A-, B- és valószínűleg a D-típusú ciklinek (CYCA, CYCB, és CYCD) is részt vesznek mind az CDKA-val és CDKB-vel való kapcsolódásban. A komplexek kináz aktivitását a WEE1 kináz általi foszforiláció negatívan szabályozhatja, mely a DNS integritás elvesztésével indukálódó folyamat. A feltételezett CDC25-homológ foszfatáz, amely az állatokban eltávolítja a gátló foszfát csoportokat az inaktív CDK komplexekről, növényekben még nem került azonosításra, de a funkcióját elvégző enzim létét igazolták. Ha a CDK/CYC komplexek aktívak, megindítják a G2/M átmenetet, több különböző szubsztrát foszforilálásával. A mitózisból történő kilépéshez a ciklin alegységek proteolitikus lebontása szükséges. Ez a lebontás az anafázist-elősegítő komplexek (APC) aktiválásával kezdődik, a CCS52 proteinnel való kölcsönhatásán keresztül.



2.8. ábra. A mitózis szabályozási folyamatának sematikus ábrázolása.

A sejteket a magas CDKA/CYC és CDKB/CYC aktivitás jellemzi az mitózis szakaszában. A B-típusú ciklinek komplexei, melyek családjának néhány tagja az E2F transzkripció szabályozása alatt áll, megakadályozzák a CDKA/CYC komplexek aktivitásának csökkentését a CDK inhibitor fehérjék (ICK/KRP) foszforilációjával, előidézve azok lebomlását.

A mitotikus ciklusból történő kilépés az atípusos E2F-szerű E2Fe/DEL1 transzkripció faktor által negatívan szabályozott. A CCS52 fehérje aktiválása a mitotikus ciklusból az endociklusba tereli a sejteket. A CCS52 valószínűleg a B-típusú ciklineket proteolízist célozza meg az anafázis-elősegítő komplexen (APC) keresztül. A WEE1 kináz is részben felelős lehet a CDKA/CYC aktivitás csökkenéséért. A CDKA/CYC aktivitás csökkenése a mitózis megakadályozását eredményezi, de ennek ellenére a DNS replikációt megtörténhet, így az endoreduplikáció lejátszódhat. A színes és szürkén árnyalt jelek az aktív ill. inaktív molekulákat jelölik.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatócsoportunk a növényi sejtciklus molekuláris szabályozásának vizsgálatában több mint egy évtizedes múltat tekint vissza. A csoportunk kutatómunkájában a lucerna sejtosztódás szabályozásában szerepet játszó fehérjék vizsgálatába kapcsolódtam be. Ehhez elsősorban két kísérleti megközelítésre támaszkodtunk. A lucerna sejtciklusának vizsgálatára az A2 sejtszuszpenziós szinkronizációs rendszert alkalmaztuk. Míg a lucerna levélprotoplaszt tenyésztési rendszerrel, a dedifferenciált sejtek megfelelő hormonkezelésre adott válaszait, a sejtosztódás reaktivációjának első lépéseit vizsgáltuk. Kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen D-típusú ciklinek hatnak kölcsön a lucerna CDK kinázokkal, és így melyik sejtosztódási fázis szabályozásában játszanak szerepet?
- Tudják-e foszforilálni az A- és a növény specifikus B-típusú kináz komplexek a lucerna retinoblasztóma-homológ fehérjét?
- Hogyan változik az MsRBR1 fehérje mennyisége a sejtosztódás folyamata során lucernában?
- Hogyan befolyásolják a növényi hormonok a lucerna RBR fehérje mennyiségét az A2 sejtszuszpenzióban, illetve a közvetlen regenerációra képes *Medicago truncatula* R-108 kallusokban?
- Milyen hormonális feltételek mellett aktiválódnak a G1/S és G2/M fázisátmenet szabályozásában szerepet játszó lucerna CDK-ciklin komplexek?
- Hogyan pontosítható a G2/M fázisátmenet és a mitózis során aktiválódó CDK kinázok funkciója?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A kísérleti növények és sejtkultúrák

4.1.1. Növények és sejtkultúrák

Medicago sativa L. ssp. *varia*; embriogén A2 genotípusú növényeket steril körülmények között, szilárd MS (Murashige, T. 1962) táptalajban 22°C-on 16:8 órás fotoperiódus alatt tartottuk (Pasternak, T.P. 2000; Pasternak, T.P. 2002).

Az ugyanezen genotípusból származó sejtszuspenziót hetente oltottuk át 0,2 µM 2,4-diklórfenoxiecetsavat (2,4-D) és 1 µM kinetint tartalmazó folyékony MS táptalajba 140 rpm rázatás mellett.

A *Medicago truncatula* cv. R 108 sejtszuspenziót hetente oltottuk át 2 mg/l 2,4-D-t tartalmazó folyékony SHM táptalajba.

4.2. DNS-vizsgálati módszerek

4.2.1. Baktérium kultúrák

Munkánk során az *E. coli* XL-1 Blue, DH5 α és α BL21(D3) törzseit használtuk. LB táptalajon (10 g/L tripton, 5 g/L élesztő kivonat, 5 g/L NaCl) vagy 2YT (16 g/L tripton, 10 g/L élesztő kivonat, 5 g/L NaCl) növesztettük a kultúrákat. Az XL-1 Blue baktériumokat 12.5 mg/l tetraciklin jelenlétében 37°C-on tenyésztettük. A baktérium törzsek tárolása -80°C-on LB tápközegben, 25%-os glicerinnel történik. A baktériumok plazmid DNS-sel való transzformálását hagyományos hősokk (42°C 1,5 perc) kezeléssel végeztük.

4.2.2. Plazmid tisztítás

A plazmidokat éjszakán át növesztett 3 ml baktérium kultúrából tisztítottuk. Ehhez részben a módosított alkali-lízis módszert [77], nagyobb tisztaságú illetve nagyobb mennyiségű DNS preparáláshoz a QuiaGene DNS tisztító kitéket használtuk.

4.3. Fehérje analízis technikák

4.3.1. Növényi teljes sejtfehérje kivonat készítése

A folyékony nitrogénben fagyasztott és felhasználásig -80°C -on tárolt növényi mintákat jégen tártuk fel kvarchomok és extrakciós puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 15 mM MgCl_2 , 15 mM EGTA, 75 mM NaCl, 1 mM NaF, 60 mM β -glicero-foszfát, 0.1 % NP40) jelenlétében. Az extrakciós puffer 1 mM PMSF-t (fenil-metil-szulfonilfluorid), 2 mM DTT-t (ditiotritol) és 10 $\mu\text{l/ml}$ proteináz inhibitor keveréket (Complete, Roche) tartalmazott. Ezt követően 4°C -on 14000 rpm fordulattal 15 percig centrifugáltuk, és a felülúszók a fehérje koncentrációját Bradford-reagenssel 595 nm-en spektrofotométerrel határoztuk meg. Több minta esetében az extrakciós pufferrel kiegyenlítettük a koncentrációkat a további használat előtt.

4.3.2. SDS poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjemintákat (100 μg) az SDS tartalmú minta pufferrel 5 percig 95°C -on denaturáltuk, majd 8-12 % akrilamid tartalmú gélen szeparáltuk.

4.3.3. Immunoblot

A mintákban található fehérjéket tömegük alapján SDS-PAGE technikával elválasztottuk. Az elektroforézis végeztével a gélből a fehérjéket PVDF (Millipore) membránra transzferáltuk 50 mM Tris és 50 mM bórsavat tartalmazó pufferben. Majd a megfelelő transzfer ellenőrzésére a filtereket Ponceau-S-el festettük. Majd filtereket tejporos oldatban két órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk 5% tejport és 0.05% Tween 20-at tartalmazó TBS (25 mM Tris-CL, pH8,0, 150 mM NaCl) pufferben, majd az adott elsődleges ellenanyaggal $1\ \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ IgG koncentrációban 2 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az alkalmazott elsődleges ellenanyagok a lucerna Medsa;CDKA, Medsa;CDKB1;1 és a Medsa;CDKB2;1 [179], valamint a Medsa;CYCD3;1 és Medtr;CYCD6;1 fehérjék C terminális peptidjét felismerő ellenanyagok. A lucerna retinoblasztóma-homológ fehérje detektálásához az anti-AtRBR1 csirke ellenanyagot használtuk, melyet Bakó László nyújtott rendelkezésünkre. Az elsődleges ellenanyaggal történt

inkubáció után a membránt mostuk 0,2 % Tweent tartalmazó TBS-el. Mosás után a membránt peroxidáz enzimmel kapcsolt másodlagos ellenanyag tejporos oldatában inkubáltuk a gyártó (Sigma) által javasolt koncentrációban. Újabb mosás után a peroxidáz enzim szubsztrátjával (Pierce, SuperSignal West Pico) kezeltük a membránt, a lumineszcenciát pedig röntgenfilmmel detektáltuk.

4.3.4. A kapcsolt *in vitro* transzkripció és transzlációs rendszer (TnT)

A T7 promóter mögé klónozott cDNS szakaszokkal rendelkező plazmidokat (1 µg) a nyúl retikulocita sejt lizátumban a gyártó előírásainak megfelelően 90 percig 30 °C-on inkubáltuk (Promega, TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System). A transzlált fehérjék radioaktív jelölését a ³⁵S-metionin biztosította. A reakció termékéből (25-50 µl) kísérletenként 4 µl transzlált fehérjét tartalmazó lizátumot használtunk. SDS-gélelektroforézissel és autogradiográfia segítségével ellenőriztük a megfelelő mennyiségű fehérje termelődését.

4.3.5. Immunoprecipitálás

Immunoprecipitáláskor 100 µg teljes sejtfehérje kivonathoz 1-2 µg poliklonális ellenanyagot adtunk, és 1 órán át jégen inkubáltuk. Ezután 25 µl Protein-A-Sepharose-zal kevertettük 1 órán át 4 °C-on. Az ágyhoz nem specifikusan kötődött fehérjéket háromszori RIPA pufferrel (20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 2 mM NaF, 0.2% Nonident P-40, 1 mM fenilmetilszulfonilfluorid és 10 µg/ml aprotinin és leupeptin) távolítottuk el. A immunpercipitált mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk vagy tovább használtuk CDK kináz aktivitás mérésekhez.

4.3.6. CDK kináz aktivitás meghatározása

Az immunoprecipitált mintákat a háromszori RIPA mosás után egyszer kináz pufferrel (50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mM EGTA) is mostuk. A kináz reakciót 0,1 mg/ml H1 hisztonnal és 2,5 µCi γ-³²P-ATP-vel kiegészített kináz pufferrel indítottuk el és 30 perc elteltével SDS minta puffer hozzáadásával és 5 perc 95 °C-os hőkezeléssel állítottuk le. A mintákat a

továbbiakban 12% SDS-PAGE technikával elválasztottuk, és kiszárítottuk. A kapott jelet röntgenfilm segítségével vagy a Molecular Dynamics Phosphorimager 445 SI berendezéssel detektáluk. A jelek kvantitatív analíziséhez a Phosphorimager ImageQuant programát használtuk. Az MsRRB1 foszforilálhatósági vizsgálatában a GST-MsRRB1 C-terminálisát rekombináns fehérjét (60µg/ml) használtuk szubsztrátként

4.3.7. Bakteriálisan túltermeltetett fehérjék tisztítása

A lucerna CDKA1;1, CDKB2;1, CYCD3;1 és a MsRRB1 C-terminálisának bakteriális expressziójához a GST-fúziós expressziós rendszert használtuk. A cDNS szakaszaikat a megfelelő pGEX vektorcsaládba klónoztuk. A vektorokat a DH5α vagy BL21(D3) E. coli törzsbe transzformáltuk, majd 400 ml kultúrát növesztettünk 100 µg/ml karbenicillin tartalmú 2YT-ben 37 C°-on, amíg az OD₆₀₀ 0,5 körüli értéket ért el. Ezután a sejteket 0,2 mM IPTG-vel 3 órán át 37 C°-on indukáltuk, majd Sorvall GSA rotorban 5000 rpm-mel 20 percig 4 C°-on centrifugáltuk.

A sejteket 15 ml lízis pufferben (9 mM DTT, 0,2 mg/ml lizozim) 40 percig szobahőmérsékleten kevertettük, majd a 10% Triton X-100-el kiegészítve 3X15 másodpercig jégen szonikáltuk. A feltárást a centrifugálás követte Sorvall SS-34 rotorban 15000rpm-mel 20 percig 4 C°-on. Az 50 ml felülúszóhoz 0,5 ml Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia) ágyat tettünk a fúziós fehérjék kötéséhez és 1 óra 4 C°-on kevertettük. A kötést követően háromszor mostuk az ágyat 20 ml mosó pufferrel (1XPBS, 10 mM DTT, 1% Triton X-100). A kötött fehérjéket háromszori az eluáló pufferben (TRIS 50mM pH8, 20mM redukált glutation) gyűjtöttük össze.

Az indukált, kötött és elúciós frakciókat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk. A géleket Coomassie Brilliant Blue G-250-al festettük. A fehérjekoncentrációt Bradford-reagens (BIORAD) használatával, spektrofotométerrel 595 nm-en határoztuk meg. Az GST-RRB1 C-terminális fúziós fehérjét trombinnal (1u/10µg emésztendő fehérje), emésztő pufferben (50 Mm TRIS, 2,5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl) hasítottuk.

4.3.8. Poliklonális ellenanyag termeltetés és tisztítás

Az albinó nyulakat KLH-hoz (Keyhole Limpet Hemacyanin) ciszteinen keresztül kapcsolt, Medsa;CYCD3;1 fehérje C-terminális peptidszakaszával (FKKTKNQGG), a Medtr;CYCD1;1 (DKGNSEGRE), illetve Medtr;CYCD6;1 (ESEKTNNGTN) C-terminális peptidszakaszaival immunizáltuk. Az ellenanyag termeltetése és tisztítása során E. Harlow protokollja szerint jártunk el [115]. 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 [158] eljárása alapján. 2 ml EAH-Sepharose 4B ágyat ekvibráltunk 25% dioxán, majd 50% dioxán 10 mM pH 7,0 foszfát pufferben. Az ágy szabad aminosóportjainak kétszeres moláris mennyiségét vettük a maleido-benzoészav-hidroxiszukcinimid-észterből. Dioxánban feloldottuk, majd 4 ml 50% dioxán 10 mM pH 7,0 foszfát pufferben 2 órán át szobahőn az ágygal 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 -merkaptóetenollal fél órán át blokkoltuk. Az ágyat több lépésben ekvibráltuk, végül 4 C° -on PBS + 0,02 % nátrium azid oldatban tároltuk. Az oszlophoz specifikusan kötődő immunglobulinokat az E. Harlow által leírt módszerrel [115], alacsony illetve magas pH értéken eluáltuk. Az affinitás tisztított ellenanyagokat -80 C° -on tároltuk.

4.3.9. Élesztő kettős hibrid kölcsönhatás vizsgálat

A lucerna ciklin és CDK szekvenciák a DNS kötő domént tartalmazó pGBT9 (Clontech) illetve az aktivátor GAD424 (Stratagene) vektorokba klónoztuk és a PJ69-4A (MATa trp1-901, leu2-3,112 ura3-52, his3-200 gal4delta, gal80delta GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, met2::GAL7-lacZ) [143] élesztő törzsekbe transzformáltuk. A transzformánsokat -Trp, -Leu, -His, -Ade minimál táptalajon növesztettük. Az élesztő kettős-hibrid fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatokat a Matchmaker Two-Hybrid System (Clontech) leírásának megfelelően végeztük. A

fehérje kölcsönhatások kvantifikálására ONPG-ot (orto-nitrofenil-galaktozid) használtunk. A relatív β -galaktozid egység meghatározása Horváth és munkatársai által leírt módon történt [130].

4.3.10. p13suc1 kötés

p13suc1 affinitáskötéshez a p13suc1 ágyat Brizuela és mtsai. nyomán készítettük [25]. Az p13suc1 kötés vizsgálathoz a retikulozsejt lizátumban *in vitro* transzlált ^{35}S -metionin jelölt fehérjekivonatát 1 órán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kevertettünk $20\text{ }\mu\text{l}$ ágglyal. A kötést háromszori mosó pufferrel (50 mM Trisz-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 250 mM NaCl, 2,5 mM NaF, 0,1 % NP-40) mostuk. A kötött fehérjéket SDS minta pufferrel 95 perc $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hőkezeléssel denaturáltuk, és analízisre 12% SDS-PAGE gélen szeparáltuk.

4.4. Sejtbiológiai módszerek

4.4.1. Lucerna A2 szuszpenzió szinkronizálása

A szuszpenziót passzállás után egy héttel a szokott tápoldattal négyszeresre hígítottuk, ezzel 5×10^5 db/ml sejtszámot állítottunk be. A hígítás utáni harmadik napon a sejtciklust 10mM végkoncentrációjú hidroxürea hozzáadásával blokkoltuk 36 órán keresztül. A blokkolás eltávolításához a sejteket leüleptítettük, és háromszor 20 percig mostuk az eredeti térfogatnak megfelelő háromszoros mennyiségű friss tápoldattal, majd az eredeti térfogatra állítottuk be a végtérfogatot. A további vizsgálatokhoz a megfelelő időpontokban vettünk mintát, amit folyékony nitrogénnel fagyasztottunk le.

A kettős blokkot alkalmazó szinkronizációs technika használata esetén a hidroxürea kimosása után két órával adtuk a szuszpenzióhoz a másodjára alkalmazott inhibitorokat: roscovitin ($100\text{ }\mu\text{M}$) propizamide ($5\text{ }\mu\text{M}$) vagy kolhicin (0,05 v%).

4.4.2. Lucerna levélprotoplaszt izolálása

4-6 hetes steril körülmények között nevelt lucerna növényekről kb. 1 g levelet gyűjtöttünk, majd azokat K75 oldatban [153] apró darabokra vágtuk steril borotvapengével. A levéldarabokat K75 oldattal átöblítettük. A protoplaszt izolálást K75 tápoldatban oldott enzimkeverékkel (0.5 % Cellulase Onozuka R10, 0.5 % Macerozyme R10, 0.25 % Rhozyme) 16 óráig, 22°C-on, sötétben végeztük. A protoplasztokat 60 µm pórusátmérőjű szűrő segítségével megtisztítottuk, majd a levéldarabokat addig mostuk K75 oldattal, míg belőlük protoplasztok kiszabadulását észleltük. A megmosott protoplasztokat 3 percig 300 g-vel centrifugáltuk. A leülepedett protoplasztokat K75 tápoldatban szuszpendáltuk, kétszer ugyanezzel a tápoldattal mostuk és centrifugáltuk. Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot, majd a sejtsűrűséget 10^5 protoplaszt/ml-re állítottuk. A sejtosztódás reaktivációját 0-5 napos tenyészetekben vizsgáltuk.

4.4.3. Immunolokalizáció

A lucerna sejtszuspenzióból vett sejteket erős enzimoldattal protoplasztáltuk (3% Cellulase RS, 1% Cellulase R-10, 1% Macerozyme R-10, 0,5M mannitol, 5 mM CaCl_2 , pH 5,3) majd 6% formaldehiddel fixáltuk. Ezt követően a sejteket poli-L-lizines tárgylemezen rögzítettük, majd 0,5% Triton X-100 oldattal rehidratáltuk és feltártuk, majd PBS pufferrel mostuk. Elsődleges ellenanyagként a D-típusú ciklint fehérjét felismerő nyúl immunglobulint használtuk (200-szoros hígításban, 50 µl PBS pufferben lemezenként). A tárgylemezt az ellenanyaggal történt inkubálás után PBS pufferrel mostuk, majd fluoreszcein izotiocianát (FITC) kapcsolt másodlagos ellenanyaggal (SIGMA; 1:100) kezeltük. Inkubálás és mosás után DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole, 0,02 µg/µl) festést alkalmaztunk a sejtmag UV fényben való láthatóvá tételére. A felvételeket NIKON TE-300 fluoreszcens mikroszkóppal és SPOT-RT II kamerával készítettük.

4.4.4. Az S fázis arányának megállapítása BrdU sejtmagi DNS-be történő beépülésével

Egy adott sejtpopulációban és egy adott időintervallumban az S fázis arányának megállapításához a protoplaszt eredetű sejteket, a konkrét kísérletnél jelzett időtartam alatt, frissen készített, 30 μM végkoncentrációjú timidin analóg bróm-deoxi-uridinnal (BrdU) inkubáltuk sötétben. A replikáció során a sejtek DNS-ébe beépült BrdU jelenlétét immunológiai eljárással detektáltuk. A sejteket 3,7% formalinnal fixáltuk, háromszor mostuk foszfát pufferes sóoldattal (PBS: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,24 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 liter desztillált vízben oldva), majd egy óráig 28°C-on inkubáltuk a DNS denaturálásához szükséges nukleázt is tartalmazó BrdU specifikus monoklonális egér ellenanyag oldattal (AMERSHAM). Újabb PBS mosás után a sejteket további egy óráig, 28°C-on sötétben FITC (fluorescein izotiocianát) jelölt egér IgG elleni másodlagos ellenanyaggal (SIGMA) kezeltük. A sejteket végül megfestettük a kettősszálú DNS-vel komplexet képző 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ végkoncentrációjú fluoreszcens festék oldatával. A mintákról Nikon Eclipse TE300 típusú invert fluoreszcencia mikroszkóppal és SPOT-RT II. CCD kamerával felvételeket készítettünk. A FITC fluoreszcens festéket 490 nm-en, a DAPI festéket 365 nm-en gerjesztettük egy 100 wattos HBO fényforrás segítségével. Kezelésenként minimum 500 sejtben összesítettük a FITC jelölt (S fázison átesett) sejtmagok arányát.

4.4.5. Áramlásos citometria

A szuszpenzió sejteket a magizolálás előtt rövid sejtfalemésztő kezelésnek vetettük alá (3% celluláz YC, 1% pektináz, 1% macerozim keverékének feloldása 5,4 g mannitolt, 5,4 g szorbitolt és 50 mg CaCl_2 -ot tartalmazó oldatban). A sejtmagokat 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ végkoncentrációjú propidium jodiddal (PI) megfestettük és belőlük 5-10 $\times 10^3$ darab sejtmagban meghatároztuk a relatív DNS tartalmat FACSCalibur áramlásos citométer segítségével. Az adatok analízisét a citométerhez tartozó ModFit[®] szoftverrel végeztük.

4.4.6. Mitotikus index meghatározás

200 µl sejtsuszpenziót 2 percig 1000 rpm-mel centrifugáltunk. A felülúszót leszívtuk, majd a sejteket 1 ml 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.

4.5. Számítógépes szekvencia analízisek

A DNS szekvenciák általános vizsgálatához a Bioedit programcsomagot használtuk [112]. A D-típusú ciklinek keresését a BLASTN (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) segítségével a GenBank adatbázison a Medtr;CYCD1;1 fehérje szekvenciájának fölhasználásával végeztük. Minden olyan növényi gént, ami szignifikáns homológiát mutatott kiválasztottunk. Majd ezt követően a CLUSTALW multiple sequence alignment programmal aminosav szekvencia illesztést végeztünk a Bioedit programon belül. A filogenetikus fa összeállításához a TREECON programot használtuk.

A foszforilációs helyek meghatározására a NetphosK 1.0 szervert használtuk (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>). A PEST motívumokat a PESTFIND programmal (<http://bioweb.pasteur.fr/seganal/interfaces/pestfind.html>) határoztuk meg.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Két új D-típusú ciklin gén izolálása lucernából és a fehérjék filogenetikai jellemzése

A Medsa;CDKA;1 kináz lehetséges ciklin partnereinek az azonosításához az élesztő kettős-hibrid szűrés módszerét alkalmaztuk a *Medicago truncatula* λHybriZAP cDNS könyvtáron [110], melyben az említett kinázt használtuk csaliként. A pillangósok között a *M. truncatula* lett a fő modell növény, mivel kisméretű diploid genommal rendelkezik és rövid a generációs periódusa. Emiatt az EST adatbázisa is dinamikusan növekszik és mindamellett nagyon magas a szekvencia azonossága a *Medicago sativa* génjeivel [12]. Ezért választottuk mi is a *M. truncatulából* készített cDNS könyvtárat, a PSTAIRE peptid motívumot hordozó ciklin-függő kináz partnereinek azonosítására. A kettős-hibrid keresés során sikerült izolálni két új kölcsönható, a szekvencia homológia alapján delta ciklin gént (*Medtr;CycD4;1*, *Medtr;CycD5;1*), melyeket a filogenetikai besorolásuk alapján később *Medtr;CYCD1;1*-nek és *Medtr;CYCD6;1*-nek neveztünk át. Ezeken felül sikerült izolálni egy lucerna ciklin-függő kinázt gátló fehérjét a *KRPMt*-t is [216].

Szekvenálás után megállapítottuk, hogy a *Medtr;CycD1;1* gént tartalmazó klón egy 1587 bázispár hosszú inszertet tartalmaz (5.1. ábra). A szekvencia leghosszabb olvasási kerete egy 358 aminosav hosszúságú és 40,4 kDa tömegű fehérjét kódol. A retinoblasztóma fehérjéhez való kötésben elengedhetetlen, konzervált LxCxE motívum szintén megtalálható, amely majdnem minden D-típusú ciklin fehérje N-terminális végén előfordul [136, 290]. Néhány ciklin szintén tartalmaz egy stabilitási szignál funkciójú, jellegzetes összetételű oligopeptidet, amely gazdag a prolin (P), glutaminsav (E), szerin (S) és treonin (T) aminosavakban, ezért PEST motívumnak nevezik. Ez a szignál erősen meghatározza az adott fehérje stabilitását [230]. A PEST motívum jelenléte alapvetően összefügg a ciklinek funkciójával, fontos szerepe van a gyors lebontódásukban, egyben a ciklin-függő kinázok aktivitásának megszüntetésében a megfelelő sejtciklus szakaszban. A PESTfind program segítségével a *Medtr;CYCD1;1* fehérjében is jósolható a motívum jelenléte az N-terminális végén.

Ennek tudtában feltételezhető, hogy a Medtr;CYCD1;1 rövid életű fehérje hasonlóan a legtöbb növényi D-típusú ciklinhez, és az állati homológjaikhoz.

```

1   GAATTCCTCCGGGATCCATGATTGAAGAAGCAATTGCCGGCAATTCATGCCCTCCGACTCGGAGCTCTCTGCGGGG 80
    M I E E E Q L P A I L M P S D C E F L C G
81   AGGACTCGTCGGAGGTCCTCACCAGGAGATTACCGGAATGCTCCTCCGACCTGGATTTCATCATCATCGCAGTTGCCG 160
    E D S S E V L T G D L P E C S S D L D S S S S S S Q L E
161  TCGTCGTATTATTTGCCGAGGAAGAGGAGGATTGCTGTTTTCATCGAGCAGAGTTCAAGTTTGTCTCTGGTTT 240
    S S S L F A E E E E D S I A V F I E H E F K F V P G F
241  CGACTATGTCTCAAGATTCATCTCGCTCTCTCGAATCCAGCACCAGAGAAGAAGCCATTGCATGGATTCTCAAGGTAC 320
    D Y V S R F Q S R S L E S S T R E E A I A W I L K V
321  ATGAGTATTATGGATTTCAGCCGTTAACGGCGTACCTCTCCGTTAACTATATGGATCGGTTTGGATTCTCGACCTTTA 400
    H E Y Y G F Q P L T A Y L S V N Y M D R F L D S R P L
401  CCGGGAATCAAATGGATGGCCCACTTTTATCTGTTGCATGTTTGTCTTTAGCAGCAAAGATGGAGGAGCCACTGGTTCC 480
    P G I K W M A Q L L S V A C L S L A A K M E E P L V P
481  TTCTCTCTTAGACTTTTCAGATTGAAGGTGCCAAATACATATTTCAACCAAGGACGATGCTTATAATGGAGCTGCTTGTTC 560
    S L L D F Q I E G A K Y I F Q P R T M L I M E L L V
561  TGACTATTTTGGATTGGAGGCTGAGATCAATCACCACCTAGTTTCTCAGTTTCTTTGCGTGCAACTAGATTCACTGGA 640
    L T I L D W R L R S I T H L V S S V S L R A T R F T G
641  ACTTTCAACCACTTCATAATTTACGTGCTACAGAAATCATCTTATCTAATATCCGAGATGCTAGCTTTCTTACTTACAG 720
    T F N H F I I S R A T E I I L S N I R D A S F L T Y R
721  GCCATCATGCATGCTGCGAGCTGCCATACTCTCTGCGAGCTAATGAAATTCCTAATGGTCTTTTGTAACTCTGAGCATG 800
    P S C I A A A A I L S A A N E I P N W S F V N P E H
801  CTGAATCATGGTGTGAAGGACTAAGCAAAGAAAAATATAGGGTGCTATGAGTTGATTCAAGAAATGTGAGTAGCAAT 880
    A E S W C E G L S K E K I I G C Y E L I Q E I V S S N
881  AACCAGAAAGATGCCCGAAAGTGTGCGACAGCTGCGAGTTACAGCTCGGACCACAAGTGGTCCACTGCTCGTCTGCTG 960
    N R R N A P K V L P Q L R V T A R T T R W S T V S S L
961  GTCGTCATCTCCATCTCTCTCTCTTACCCTCTTACTCGTTGCTTTATAAAAAGAGGAAATTAATAGCTGTTTCTGGG 1040
    S S S P S S S S S P S Y S L S Y K K R K L N S C F W
1041 TAGATGTTGACAAAGGAAATTCAGAGGGAAGAGAAAAGAAACAAAGATAATAATAAGGAACAAGAGGAAATAAGGT 1120
    V D V D K G N S E G R E K K Q T R *
1121 GGGCCAGGTTGTCTAGAACTCAACATTTTAAAGAGGGTTTTTGCAATGAAAATTTGACTATATGTTGTATGTATAAGAG 1200
1201 TTTGATGGTTTGGCGAGTACTAGTAGCAGTACTCCTTTTAAATGTTATTTTCATTTTATCTTTTGGTGTAAGTGT 1280
1281 ATCCCTTAGAGGAAGGGGATCTTGAACACAAATTTATGATGTATAGGTGTGAGAGAGAAGCATTGTATGGTAGTAA 1360
1361 TTGTTGGGGATATGAATCAAAGGTTGCATTGATCATAGGTGAAAGATGGTGGGGGCAATGGTCTAGAAAACAGTGAAGAA 1440
1441 AAAACAGAGAGCAGGTATGAAATCAAGACCTTTGGGGATGAAAACCTGAAAGTTATGAGCTGTTTTCAGCTTGTCTG 1520
1521 GAGAGACATTTATGAGTGAAGTTCTTTTCTTGGCGCCAAGCAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1571

```

5.1. ábra. A Medtr;CYCD1;1 DNS és származtatott aminosav sorrendje.

A származtatott aminosav szekvenciát egy betűs kód jelöli. Az N-terminálisan elhelyezkedő konzerválódott RB-kötő LxCxE pentapeptid motívum (ahol az x bármilyen aminosavat jelenthet) piros háttérrel jelölt. A konzervatív ciklin-régió sárgával van kiemelve. A feltételezett PEST motívum, melynek a PESTfind programmal számított valószínűségi értéke +7,47, pedig zöld háttérrel jelölt (1-67 aminosavak). A kékkel kiemelt peptid régiót választottuk a specifikus ellenanyag készítéséhez.

A másik említett izolált D-típusú ciklin klón egy 914 bázispár hosszúságú inszertet tartalmazott. Azonban az első metionint jelentő transzlációs start kodon ATG nukleinsavait nem előzték meg a megfelelő olvasási keretben a stopot jelentő nukleinsavak. Más D-típusú fehérjékkel összehasonlítva a szekvenciát, azonban arra következtettünk, hogy feltehetően csak néhány aminosavat kódoló DNS szakasz hiányzik. Ezért elhatároztuk, hogy megpróbáljuk a hiányzó szakaszt amplifikálni PCR segítségével a cDNS könyvtárból. Mielőtt azonban sikerrel jártunk volna megtaláltuk az NCBI adatbázisban a BLAST szekvencia homológia keresés

alapján a teljes leolvasási keretet tartalmazó EST szekvenciáját. Ez volt egyben a leghosszabb homológ cDNS szekvencia (azonosító száma: BG587739), melyet *Medicago truncatula*/Glomus versiforme kevert EST könyvtárból izoláltak és szekvenáltak. Összeillesztve az eredeti DNS szekvenciánkkal megállapítottuk, hogy az adatbankban szereplő szekvencia az 5' végénél 413 bázispárral hosszabb. Az első lehetséges ATG nukleinsavaknál feljebb az eredeti leolvasási keretbe tartozó stop kodon is megtalálható, amely jelzi, hogy a talált cDNS szekvencia teljes hosszúságú. Így végül megállapítottuk, hogy mindösszesen kettő aminosavnyi szakaszt kódoló szekvencia hiányzott az N-terminális végénél a teljes fehérjéből, amely már a startot jelentő metionin aminosavat is tartalmazza. A meghatározott *Medtr;CYCD6;1* gén teljes leolvasási kerete egy 302 aminosav hosszúságú és 34,6 kDa tömegű fehérjét kódol (5.2. ábra).

```

1      GACAGCGAGGTGGGAGTGGCGCTGATAAGGGGGAGGGAAGGTTTGTGTTGTTGGGTTCCAACGCATACCGATAAGATTTC 80
81     GCCCGTATCTCAACCCCTTACTAGCTTTCATCTGATTCTCAGGAAAAGCTGAAACTCTCTCATTGCCTTTTCTTTATCA 160
161    CTTCCTTTTCTCTCCCTATAACAATGCTTATCATCTTCCTTACTTCTCAACATCACTAACATCTTCTCCACACATCCAT 240
      M

241    GGAGTTTGACCTTGAAAACCTCTTGAATATTTCCATGACCTTCCTAATCTCAAGATGTTTCTTCACTTTTCTCTCATTG 320
      E F D L E N P L E Y F H D L P N S Q D V S S L F L I

321    AATCTGACCACATCCCTCCACTAAATTTACTTTCAAAACCTCAAATCAAATGAGTTTGATGCCTCAGTTAGAACTGATTTC 400
      E S D H I P P L N Y F Q N L K S N E F D A S V R T D F

401    ATCTCTTTGATCTCTCAGTTATCTGTAATTTTGTGACTTACCTAGCTATCAACTATTTGGATCGCTTCTCT 480
      I S L I S Q L S C N F D P F V T Y L A I N Y L D R F L

481    CGCTAACCAAGGGATATTGCAACCAAGCCATGGGCAAACTACTTGCACTAACTTGCTTTTCTCTAGCAGTAAAGA 560
      A N Q G I L Q P K P W A N K L L A V T C F S L A V R

561    TGTGAAACAGAGTACTCTGCTACTGATGTTTCAGGCTCTTATGAATCATGGTGATGGTGGTTTCATTTTGGAGACAAA 640
      M L K T E Y S A T D V Q A L M N H G D G G F I F E T Q

641    ACAATAAAAGAATGGAAGCACTTGTGTTAGGGGCACTACAATGGAGAATGCGTTCCATCACACCTTTCTCTTTTATTC 720
      T I K R M E A L V L G A L Q W R M R S I T P F S F I P

721    TTAATTCACAAATTTGTTTATGCTTGATGATATCACATTAAGTCTTAAAGATCGAACTTCTGAAATTATATTGAAGT 800
      Y F T N L F M L D D I T L K V L K D R T S E I I L K

801    CACAAAAGATGTAAAGGTTATGAAATTAAGCCATCTATAGTTGCTGCTTCATCCCTTCTTTATGCTTCACATGAGTTG 880
      S Q K D V K V M E I K P S I V A A S S L L Y A S H E L

881    TTTCCCTTTCAATATCCATGCTTCTGGGAATAATTTCCAATGGTTCATATGTAATAAGAAAGTGGTATGGAGTGCTA 960
      F P F Q Y P C F W G I I S N G S Y V N K E S G M E C Y

961    TAAAGTAATACAAGATATAACGAAGGAGGAGTATGAGTCCATGTTAATGTGCATTCAAGTTCAGGCACACCGGTTAATG 1040
      K V I Q D I T K E E Y E S M F N V H S S S G T P V N

1041  TGTAGACGAAAATTTCTAAGCTTGGAAGTGAAAAACCAACGGAACCAATGTTGCTCATACTACTATGATACAAGAG 1120
      V L D E N F L S L E S E K T N G T N V A H T T M I Q E

1121  AAGCATTTCAAAAGAGGAAAATTTAAATCATCAATGTTGAAGTACTAGAACAGAAGATAACAACATTAAATCCTTCTGG 1200
      K H F K R R K I *

1201  TCCATACAAGATGATTAAATGCTGCTGTAATAGAACAAAAAAGTTAAGGTGAGAAAAAAGATACAATAATAGAAT 1280
1281  GAGATAGTGATGGAATTAATGGGAATGTGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG 1327

```

5.2. ábra. A *Medtr;CYCD6;1* DNS és származtatott aminosav sorrendje.

A gén származtatott aminosav szekvenciája egy betűs kóddal van jelölve. A ciklinekre jellemző konzervatív ciklin-box sárgával emeltem ki. A kis valószínűségű esetlegesen PEST régió (PESTfind érték: +0,31) pozíciója 259-280, zöld háttérrel jelölt. A kézzel kiemelt peptid régiót használtuk a specifikus ellenanyag készítéséhez.

Ez a D-típusú fehérje mindazonáltal nem tartalmazza az LxCxE konzervatív motívumot, amely az eddig izolált D-típusú ciklinek többségében, ahogy a Medtr;CYCD1;1 fehérje N-terminális végén is megtalálható. A PEST degradációs motívumot kereső program sem talált egyértelmű, a keresett szignált kódoló fehérje szakaszt. Egyedül egy ilyen nagyon kis eshetőséggel prognosztizált szakasz található (PESTfind értéke: +0,31) a Medtr;CYCD6;1 fehérje C-terminális végén.

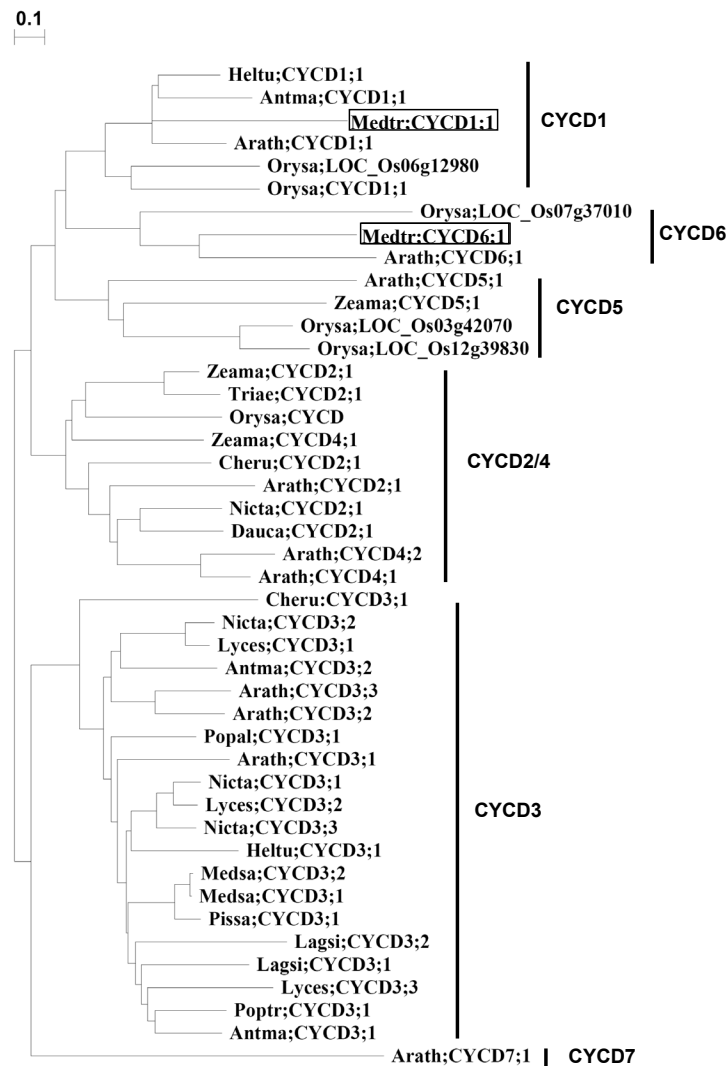
A teljes *Arabidopsis* genomban összesen 10 D-típusú ciklin gént azonosítottak [284]. Az összehasonlító szekvencia analízis a lucerna Medtr;CYCD1;1 és Medtr;CYCD6;1 származtatott aminosavainak az említett összes lúdfű D-típusú ciklinekkel a legnagyobb homológiát nem meglepően a ciklin-box 100 aminosav hosszúságú szakaszán mutatja (5.3. ábra). Ezen felül az LxCxE retinoblasztóma kötő konzervált motívum is megtalálható majdnem minden D-típusú ciklinben az N-terminális végén, amint a Medtr;CYCD1;1 fehérjében is. Ez a motívum nem található meg a Medtr;CYCD6;1 fehérjében, ugyanúgy mint a hozzá leghomológabb lúdfű CYCD6;1 fehérjében sem. Az RB-kötő peptid szakasz hiányának a biológiai funkciója ezekben a ciklinekben, még nem tisztázott.

Az ismert növényi CYCD fehérjék filogenetikus törzsfájuk alapján összesen hat felismerhető csoportba rendeződnek. Ezeket az *Arabidopsis* nevezéktan alapján sorolták be [284]. Az eredetileg külön csoportosított CYCD2 és CYCD4 ciklinek szekvencia összehasonlítás alapján nem igazán elkülöníthetők, ugyanakkor jelenleg a funkcionális analízisük sem ad erre meggyőző támpontot [290]. A filogenetikus törzsfában való elhelyezkedésük alapján egyértelműen megállapítható, hogy a Medtr;CYCD1;1 a CYCD1 csoportba, míg a Medtr;CYCD6;1 ciklin a CYCD6 csoportba tartozik.

Arath;CYCD1;1	1	--RSYRFSYDLHMSVSFNDMLFCGDEG-VFSG-----ESTVFSSSE-----DSWPG-----SLACF	55
Arath;CYCD2;1	1	-----MAENLAGESTESWIIDNDDDD--INYGGGFTNEIDYHOLFADKDDNFGNGSIPMAGSSSSSLSEERKEM	70
Arath;CYCD4;1	1	-----MAEENLSELSTSNVDDEG-----MIVETPIE-----ISIPQNGFSQ-SESEILMEM	50
Arath;CYCD4;2	1	-----MAEFMEPNLVS-----NDDDK-----SNVDI-----RSIPQNGFP--LESEILREM	42
Arath;CYCD3;1	1	MAIRKEESRE--EQSNSFLDALYCEE--KWDE-----GEEVENSSSLSSSS-----PFVVLQDLFWEDDIDVTL	66
Arath;CYCD3;2	1	MALEKEEES--NGAFCVLDGLYCEE--GVVDDDDDDG--DLDFLKSDSEVVKFQ-----FLPL--LDMFLWDDDEILSL	72
Arath;CYCD3;3	1	MALE-EEES--NAPFCVLDGLYCEESEFHEQ-----VDLCDESEVKEFP-----FLNLGLSDHMLWDDDEILSL	64
Medsa;CYCD3;1	1	MAHHHHHHQQLQHTSLLTALYCEEKWEDD-----EGEVDEGAQSIVTINYDILDSTSLPLILLEQNLFNEDEINTL	82
Medsa;CYCD3;2	1	MAHHHH--QHTCSLLTALYCEE--KWEDD-----EGEVDEGEQSIVTINYDILDSTSLPLILLEQNLFNEDEINTL	74
Arath;CYCD5;1	1	-----MGEPDSLALF--CHESESSINEDDETIRSD-----KQEPFTTTTIDDEYVADL	51
Arath;CYCD6;1	1	-----MFHLEHP--SHSSIHNNNDOT-----DYLTPHSL	31
Arath;CYCD7;1	1	-----MDNLLESWPASPLTPEPLPNFRHRSHDN-----DVVKNYPEIDAAAMEIAAM	50
Medtr;CYCD1;1	1	-----MIEEQLPALMPDCELLGCDSEVLTDGLP-----ECSSLLDSSS-----SSQSSSLFAEPESSAVF	64
Medtr;CYCD6;1	1	-----MFDLENPLEY-----HFLP-----ECSSLLDSSS-----SSQSSSLFAEPESSAVF	24
Konszenzus	1	-----S C L P-----	3
Ciklin-box...			
Arath;CYCD1;1	56	LEDHRHFGHYISFOTRSLAA--EDSVANTLRQVATNQPTAYLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	142
Arath;CYCD2;1	71	LVREIFCGGTQYKRLLAGDGLV--NQALDWLRQVATNQPTAYLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	157
Arath;CYCD4;1	51	VEREKHLPDQYKRLPSGDGLV--NQALDWLRQVATNQPTAYLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	138
Arath;CYCD4;2	43	TEERQHSRDRDYKRLRNGLFNV--LQAGNTWACELOGPQCICLANNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	129
Arath;CYCD3;1	67	LSVEEQGLCLDDVY-----LSDRKEAVGTLIRVAHYGFSALTATLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	147
Arath;CYCD3;2	73	LSKNEETNCFGEQLDG-----FLVCEKEALDWLRQVHYGFSALTATLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	156
Arath;CYCD3;3	65	LSKNC-----ECLYDEILDD-----FLVCEKEALDWLRQVHYGFSALTATLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	146
Medsa;CYCD3;1	83	FSKEITQOEYTYEDLNKVINFDLSQPREAEVNMKVNAHYGFSALTATLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	170
Medsa;CYCD3;2	75	FSKEIKQOEYTYEDLNKVINFDLSQPREAEVNMKVNAHYGFSALTATLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	162
Arath;CYCD5;1	52	VLENLRFELPSKTTT-----SSDILLIDNLTITTRFGQHQOTAYLAIS--FLPLHKKRFTGLQDETAMRLSVACLSLAAR	134
Arath;CYCD6;1	32	VLNPFHSSVYFHSKSAFLN--NQAISSTLYVRKDDP--SLTILAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	117
Arath;CYCD7;1	51	DELCLCNHNGKCFVEFFVSKKLDYFHFAPCGLTTSRLNLYEVSALCFDRFYM--TCCDWNTNMYEVAVSLSTASHFN	150
Medtr;CYCD1;1	65	LEHETVFGFYVSIFDRSL--SST--EEAALAVLYEYTGQPTAYLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	150
Medtr;CYCD6;1	25	LTSDHRLPLVFNQKKNFNASW--TTFISLSQLSCNDS--FVTLAVNYDRFTYA--RRLPETSGPMLLAVACLSSLAAR	109
Konszenzus	3	E P LS R A WI F L LA NY DRFL K W QL AV CLSLAAK E	35
Arath;CYCD1;1	143	SILVSEFDFQVA--GVYLFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--SFAYKID-PG--TFLGFTSHATEILSNKEASFL	225
Arath;CYCD2;1	158	EDTVHVFVDQVQ--DPVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	238
Arath;CYCD4;1	139	ETVHVFVDQVQ--DPVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	222
Arath;CYCD4;2	130	ENVVFELQVQVQ--APVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	213
Arath;CYCD3;1	148	ETVFPVLLDQVQ--DYVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	230
Arath;CYCD3;2	157	ETVFPVLLDQVQ--DYVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	239
Arath;CYCD3;3	147	ETVFPVLLDQVQ--DYVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	229
Medsa;CYCD3;1	171	ETVFPVLLDQVQ--DYVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	253
Medsa;CYCD3;2	163	ETVFPVLLDQVQ--DYVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	245
Arath;CYCD5;1	135	SRIVFGLSQVQVQ--HDVYFPAKTIKRMELLVSLDWRLSVTFPD--DYFDKISGHVS--EN--LTYSSRFITNTTALFT	218
Arath;CYCD6;1	118	KPNVSDLP-----VEGEFTLDMIRMENLILGAKRMRSVTFPSFLAFLFLFLEEDPPLLKHSKQTSDDTSTLQHSFL	201
Arath;CYCD7;1	139	SVTFLERLEVEG--LTHHVNVAEMELLILKAEKVNNAVSYTSQTSKIGVGM-----HMMIRIINHLIDTCLML	219
Medtr;CYCD1;1	151	PLVLSLIDFQ--GAKYFPTLIMELIVLTIIDWRLSIT--HLSSVSLAATFG--TFNHFIRSATLIRASFL	232
Medtr;CYCD6;1	110	KTYSATDVQALMNHGCGGLTCTOTIMEALVIGALQRMRSITTFSPVTTLFMDL--ITLKV--KDS--TEILLKQKQVVM	195
Konszenzus	36	E VP L D QV FEAKTI RMELL L L WR TP SF R LS D F	66
Arath;CYCD1;1	226	ETWPSIAAAALIC--ANEPSLSVVNPPEPWCDGSKENIVRIRNMAAIENNR-----INTPVIKLVSVRA--	302
Arath;CYCD2;1	239	DFRPSIAAAAVSV--SISG--ETECIDEKALSILYKRRKRLNMRSTGENVR--GTSLSQCARVAIVAPVGV	319
Arath;CYCD4;1	223	DFRPSIAAAAVSV--SGIT--QRVHFNSFSPFLFQKRRKIRIGMETSDGSD--LCQTPNGCLEVSAC--	291
Arath;CYCD4;2	214	DFRPSIAAAAVSV--SGT--HFKKFSSFSLSL--REVTIK--	254
Arath;CYCD3;1	231	GLPSPVAAATNRI--IECDPPFP--LSOTNLGLVNLTKRVKTYDILLIQLPVDRIQLIQIQSSKRGSHDSSSSLSNPGCV	314
Arath;CYCD3;2	240	RFPSPVLAATNRL--FEKPKCPD--VEVQOITTLKVNCKVNECYELLLEHP--SKKGMNLIDQ--DPSGV	310
Arath;CYCD3;3	230	SPSPVLAATNRL--IRLKMCPD--AVTQOIMTLKVVSEKNCYELVLDSP--SKKGMNMQCP--ASPGV	301
Medsa;CYCD3;1	254	GCVPSPVLAATNRL--IDLEQSDNGVDYKQKLNVLKISKEVDECYALHITN--ANNYGHKRYEETPG--SPGV	329
Medsa;CYCD3;2	246	GCVPSPVLAATNRL--IDLEQSDNGVDYKQKLNVLKISKEVDECYALHITN--ANNYGHKRYEETPG--SPGV	321
Arath;CYCD5;1	219	KYQFNVAATVTLASSSTSDIRLREIAKFGSLNWSNENNYLYCYRTLEEE-----RKHMTPEEIA	289
Arath;CYCD6;1	202	EFKPSVIAGALIFA--SFCP--LQFPCESHINQCTYINDELMECYALQERDILVG-----ENE--GSTETAVN	270
Arath;CYCD7;1	220	QFPSPVLAATNRL--MDKVCRESHINLFEQNHKEIVKVGKMRNDIDHQ-----SSRYSEGSILILQR	289
Medtr;CYCD1;1	233	TYRPSCLAAALIA--ANPNWS-FVNP--HAEWCEGSKENIGYELTQEVSSNR--RNPVLPQLNARTRW	309
Medtr;CYCD6;1	196	EFKPSVIAASSLYA--SHLFP--PQYPCLGITNCYINWSV--ECYNVIC--DAKE-----YESFNVHSSGFPNV	268
Konszenzus	66	PS A A L KE V CY	76
Arath;CYCD1;1	302	---ETTRP--DPESSP-----CRRLLGYSWGDTSTSN-----	335
Arath;CYCD2;1	320	LEATCLAYR--SETRVECTNSSSSPDNNNNNNNSKRRK--	361
Arath;CYCD4;1	291	---CFEFK--THDSSSYTHL-----	308
Arath;CYCD4;2	254	---LHLC--K-----	260
Arath;CYCD3;1	315	LDANPFNSDESNDSSASCNPPPTSSSPQOQPLKRMGAETNEKKPLHLPLWAVATP--	376
Arath;CYCD3;2	311	LDANPFNSDESNDSSASCNPPPTSSSPQOQPLKRMGAETNEKKPLHLPLWAVATP--	367
Arath;CYCD3;3	302	FDASFSDS--SNESWVS--ASASVSSSPS--EDLLKRRVQEQMRSSNRMFFDLVSSSPR--	361
Medsa;CYCD3;1	330	IDA-VFSSD--GSDNSWVG-----ASSYSTSEVFKKTNGNNNSPINRVIVGLATATSP	386
Medsa;CYCD3;2	322	IDA-VFSSD--GSDNSWVG-----ASSYSTSEVFKKTNGNNNSPINRVIVGLATATSP	378
Arath;CYCD5;1	290	VSREPPASG--GAKRR--FDDDCSPPAKRMRR--	323
Arath;CYCD6;1	271	LQOFPSC--EDKS--ITITASSPKRKTRTRY--	302
Arath;CYCD7;1	290	GVMMNMGVNVVLLKFIQIFRYEKKRDRGNHODNIPAKRMTIESNYI-----	341
Medtr;CYCD1;1	310	STVSSSSS--PSSSSPYSLAYKRLNSCFWVDVNGNSGREKQTR-----	358
Medtr;CYCD6;1	269	LENTFLLE--ERTNGTVARTMIQEKHFRRK--	302
Konszenzus	76	S S	78

5.3. ábra. Az ismert *Arabidopsis* és *Medicago* D-típusú ciklinek szekvencia összehasonlítása.

A "ciklin-box" régiót a piros vonal jelöli. A konszenzus aminosavakat minimum 65% homológia esetén színezett háttér jelöli, aminosav egyezés esetén zöld, míg hasonlóságnál kék háttérrel. A LxCxE motívumot (ahol az x bármilyen aminosavat jelölhet) az N-terminális végén pirossal emeltük ki a konszenzus szekvenciában. A ciklin elnevezéseket Renaudin és mtsai. alapján használtuk [233].



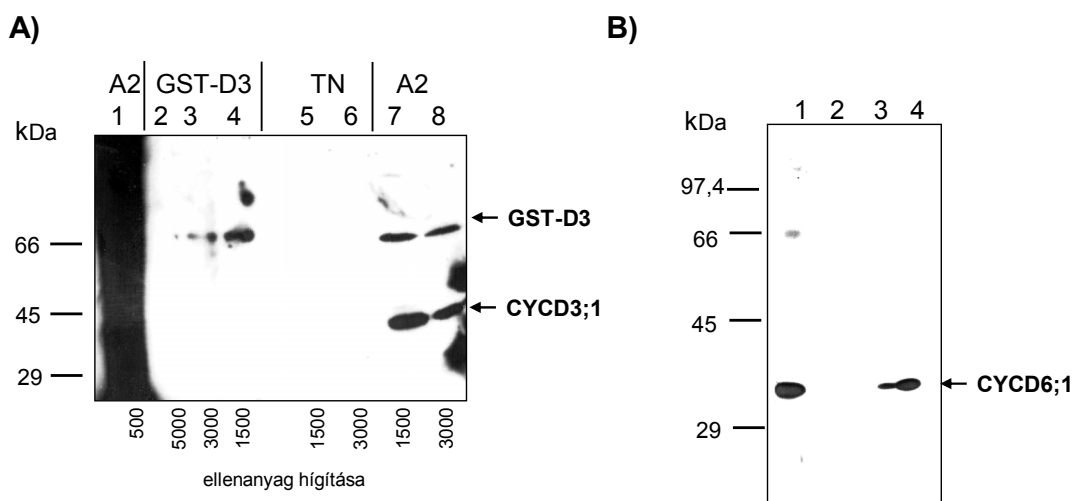
5.4. ábra. Az ismert növényi D-típusú ciklinek filogenetikus törzsfája.

A törzsfát ClustalW program segítségével összeillesztett szekvencia adatok alapján a TREECON program felhasználásával készítettük el. A Medtr;CYCD1;1 és Medtr;CYCD6;1 fehérjék bekeretezettek. A felismerhető 6 CYCD csoport a jobboldaluknál meghúzott vonalakkal vannak megjelölve. Az elnevezéseket Renaudin és mtsai. (1996) munkájának megfelelően használtuk. A bal felső sarokban található az evolúciós távolságot jelölő távolsági egység. A nevekben szereplő rövidítések a következők: Antma, *Antirrhinum majus*; Arath, *Arabidopsis thaliana*; Cheru, *Chenopodium rubrum*; Dauca, *Daucus carota*; Heltu, *Helianthus tuberosus*; Lyces, *Lycopersicon esculentum*; Medsa, *Medicago sativa*; Medtr, *Medicago truncatula*; Nicta, *Nicotiana tabacum*; Orysa, *Oryza sativa*; Pissa, *Pisum sativum*; Phypa, *Physcomitrella patens*; Popal, *Populus alba*; Poptr, *Populus tremula* x *Populus tremuloides*; Triea, *Triticum aestivum*; Zeama, *Zea mays*.

5.1.1. Ellenanyagok készítése a lucerna D-típusú ciklin fehérjék kimutatására

A lucernából izolált két új és már ismert Medsa;CYCD3;1 D-típusú ciklinek fehérje szintű vizsgálatához megfelelő ellenanyagokra volt szükség. Ezért

specifikus peptid szakaszokra tervezett, nyulakban kifejezett poliklonális ellenanyag elkészítése mellett döntöttünk. A Medsa;CYCD3;1 eredetileg cycMs4-nek elnevezett ciklint korábban izolálták [39]. A származtatott fehérjét program segítségével analizáltuk, hogy megállapítsuk melyek azok a peptid szakaszok, amelyek megfelelőnek tűnnek antigenitási és felületi valószínűséget, és egyéb fizikai és kémiai tulajdonságaikat tekintve. Minden ciklin esetében 10 aminosav hosszú peptid szakaszt választottunk ki, amelyeket megszintetizáltattunk és felkötöttünk a KLH ("keyhole limpet hemocyanin") hordozó fehérjére. Ezzel biztosítható a megfelelő immunválasz elérése, esetünkben az ellenanyag termelésre kiválasztott nyulakban. Az immunizálási folyamat intézetünk állatházában végeztük.



5.5.ábra. A Medsa;CYCD3;1 és a Medtr;CYCD6;1 fehérjék affinitás tisztított ellenanyagainak specifikusság vizsgálata

A) Az anti-Medsa;CYCD3;1 ellenanyag specifikusság vizsgálata immunoblot technikával. Az ábrán legfelül a felhasznált a poliakrilamid-gélelektroforézissel szétválasztott fehérje minták eredetét jelöltük: A2: A2 lucerna sejtuszpenziós teljes sejtfehérje minta: 1, 7, 8 (100 µg); GST-D3: a Medsa;CYCD3;1 ciklin GST fuzionáltatott bakteriálisan termeltetett tisztított fehérjéje: 2,3,4 (100ng) mintánként. És teljes in vitro nevelt növény fehérje (100µg) kivonata (TN: 5,6). Az immunoblot során az alul jelzett ellenanyag hígításokban inkubáltuk a membránokat. Az 1. minta esetében az immunizált teljes vérszérumot használtuk.

B) Az anti-Medtr;CYCD6;1 ellenanyag specifikusság vizsgálata peptid telítéses immunoblot technikával. A poliakrilamid gélen mintánként 100 µg A2 szuszpenziós teljes sejtfehérje kivonatot szeparáltunk. Az inkubálás során az affinitás tisztított anti-CYCD6;1 ellenanyagot (1) használtuk. A 3 és 4 minták esetében az ellenanyagot 1 óráig át telítettük a CYCD6 antigénként illetve a CYCD3 antigénként használt 10 µM feleslegben adott peptidekkel. A 2. mintát csak a másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. A molekulásúly markereket mindkét ábrarész esetében baloldalon tüntettük fel.

A vérszérumból affinitás oszlopokon tisztítottuk ki a megfelelő erősséggel specifikusan kötődött ellenanyagokat. Mivel a Medtr;CYCD1;1 esetében nem kaptunk a peptid ellen megfelelő immunválaszt, később a GST-CYCD1;1 fúziós fehérjével folytattuk a nyulak immunizálását. A tisztított poliklonális peptid ellenanyagok specifikusságát az Medsa;CYCD3;1 és Medtr;CYCD6;1 fehérjékre az 5.5. ábra mutatja be. Az ábra immunoblot eredménye alapján az affinitás tisztított anti-Medsa;CYCD3;1 ellenanyag felismeri mind a GST-CYCD3 fúziós fehérjét, mind a lucerna sejtszuspenzióból szeparált megfelelő méretű fehérjét.

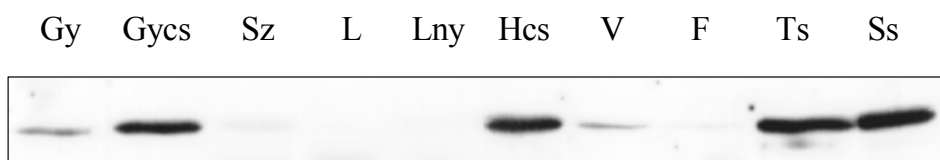
Ugyanakkor egy másik, magasabb molekulatömegű fehérjével is erősen keresztreagál az ellenanyag. Az ábrán látható, hogy a vérszérum affinitástisztításra szükség volt, mert a szérum nagy háttérrel adott (5.5. ábra /A). Az elvégzett teszt alapján az is megállapítható, hogy míg a gyorsan osztódó szuszpenzióban jól kimutatható, a teljes növényi sejtfehérje kivonatban azonban nincsen detektálható mennyiségben a Medsa;CYCD3;1 fehérje.

Az anti-Medtr;CYCD6;1 tisztított poliklonális ellenanyag szintén felismert egy megfelelő méretű fehérjét az A2 lucerna sejtszuspenzió fehérje kivonatában. Az ellenanyag Medtr;CYCD6;1 fehérjére specifikusságát telítési kísérlet segítségével erősítettük meg (5.5. ábra /B). Az ellenanyaghoz a felismerő helyeinek lekötésére az antigénként használt Medtr;CYCD6;1 majd kontrollként a Medsa;CYCD3;1 peptideket alkalmaztuk. Amikor az ellenanyag telítéséhez a megfelelő Medtr;CYCD6;1 peptidet adtuk a detektált jel csaknem teljesen eltűnt, ugyanakkor a Medsa;CYCD3;1 peptid esetében csaknem azonos erősségű jelet kaptunk. Így a detektált lucerna CYCD6;1 fehérjére az ellenanyag specifikitása az A2 szuszpenziós fehérje mintákon megfelelően mutatkozott.

5.1.2. Az Medtr;CYCD6;1 fehérje mennyisége a különböző lucerna részekben

A következőkben megvizsgáltuk a Medtr;CYCD6;1 fehérje szövet specifikusságát, hogy megállapítsuk, lehet-e a fehérjének szövetre jellemző funkciója. A különböző lucerna részekből származó fehérjeminták immunoblotja során az eredmények szerint elsősorban olyan szövetekben detektálható a fehérje, melyekben gyakori a sejtosztódások száma (5.6. ábra). Így a legaktívabban

osztódó gyökércsúcs és hajtáscsúcsból származó fehérje kivonatok tartalmazták a legnagyobb mennyiségben a Medtr;CYCD6;1 fehérjét. A sejtosztódással való összefüggést az is alátámasztotta, hogy a szintén gyorsan osztódó lucerna sejtuszuspenziókban is nagy mennyiségben detektálható a fehérje, hasonlóan a *M. truncatula* és a *M. sativa* sejtuszuspenziók esetében. Az expressziós eredmények alapján feltételezhető, hogy a Medtr;CYCD6;1 fehérje általános sejtosztódáshoz kötött funkcióval rendelkezhet lucernában. Ez a megfigyelésünk egybevág a növényi D-típusú ciklinekkel kapcsolatban közölt adatokkal, miszerint ezek transzkriptje elsősorban a merisztematikus szövetekben halmozódik fel [185, 238]. Így a D-típusú ciklinek közvetíthetik a külső forrásból érkező fejlődési, növekedési jeleket a sejtciklus közvetlen szabályozásába [52].



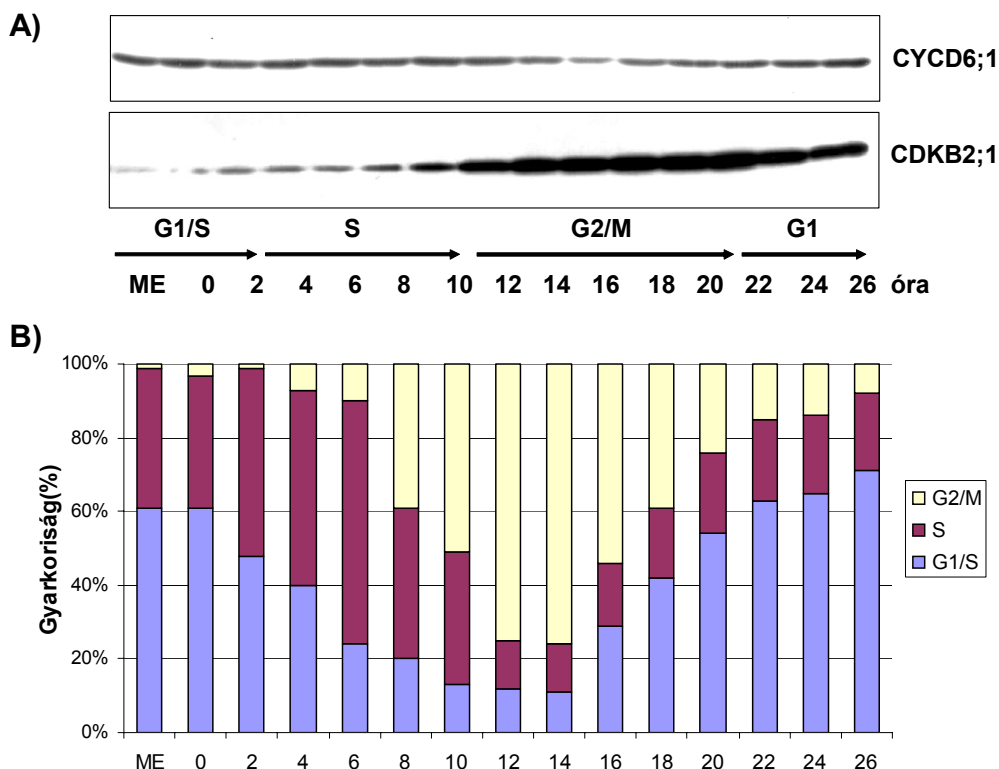
5.6. ábra. A Medtr;CYCD6;1 ciklin mennyisége különböző lucerna részekben.

A jelölések a következők: Gy: gyökér, Gycs: gyökér csúcs, Sz: szár, L: levél, Lny: levélnyél, Hcs: hajtáscsúcs, V: virág, F: 3 hetes teljes növény, Ts: *Medicago truncatula* sejtuszuspenzió, Ss: *Medicago sativa* sejtuszuspenzió.

5.1.3. Medtr;CYCD6;1 ciklin fehérje mennyisége szinkronizált lucerna A2 sejtuszuspenzióban

A következőkben természetesen kíváncsiak voltunk a Medtr;CYCD6;1 fehérje mennyiségének sejtciklus függésére. A vizsgálatra a laborunkban jól működő *Medicago sativa* sejtuszuspenzió szinkronizációs módszer megfelelően mutatkozott, mivel a Medtr;CYCD6;1 fehérje a szuszpenziós mintákban is jól detektálható volt. A hidroxürea szinkronizált minták immunoblotja alapján a ciklizáló sejtekben a Medtr;CYCD6;1 fehérje mennyisége közel egyforma (5.7. ábra). Csak a G2/M sejtciklusos fázisban látható némi fehérje mennyiség csökkenés, ott, ahol a G1/S sejtek is a legkisebb százalékban fordultak elő. A növényi D-típusú ciklinekről sokáig azt gondolták, hogy szabályozó szerepük elsősorban a G1 fázison keresztül érvényesül, a külső növekedési szignálok továbbításban, hasonlóan az állati sejtciklusban megfigyeltekhez [184, 188, 239]. Azonban az utóbbi években már többen igazolták, hogy a növényi D-típusú ciklinek

között vannak a G2/M fázisokban is kifejeződőek illetve kimutatható a fehérjéhez kapcsolódó hiszton kináz aktivitása. Mindemellett sejtciklus során folyamatosan expresszáldó D-típusú ciklinek is vannak [154, 264]. A *Medtr;CYCD6;1* legközelebbi lúdfű homológja a “microarray” adatok alapján G1/S határán mutatja a legnagyobb expressziót, de fehérje szintű vizsgálatból még nem jelent meg adat [185].



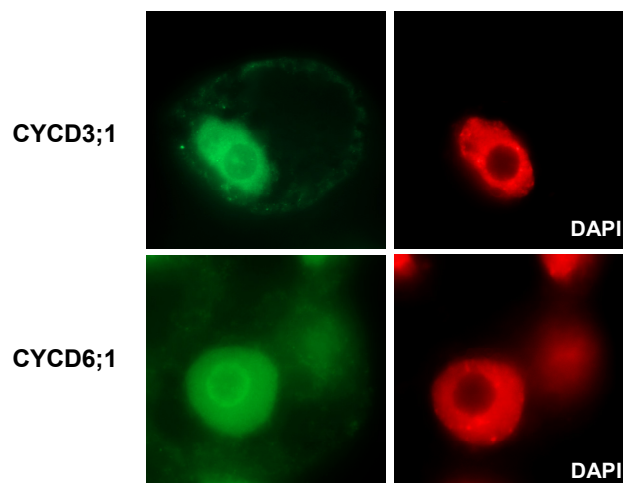
5.7. ábra. A *Medtr;CYCD6;1* fehérje mennyiségének változása szinkronizált lucerna sejtuszuspenzióban.

A) A *Medtr;CYCD6;1* és *Medsa;CDKB2;1* fehérje szinteket immunoblot segítségével detektáltuk a jelzett fehérjék ellenanyagait használva. A hidroxürea blokk eltávolítása után a mintákat kétóránként a jelzett időpontokban gyűjtöttük be. Az immunoblotokhoz egyenlő mennyiségű teljes fehérje kivonatot tartalmazó mintasort szeparáltunk SDS-poliakrilamid gélen. A jelzett időpontokban (kétóránként) vett minták áramlások citometriai vizsgálatából számított sejtciklus fázisait a nyilak mutatják. ME: mosás előtt vett minta. B) A szinkronizációs kísérlet sejtmintáinak áramlások citometriával és a Modfit program segítségével számított sejtciklus fázis eloszlása.

5.1.4. A *Medsa;CYCD3;1* és *Medtr;CYCD6;1* ciklinek sejtmagi lokalizációt mutatnak

Az állati D-típusú ciklinek sejtmagban lokalizáltak, itt az LxCxE RB-kötő motívumon keresztül közvetítik a CDK/ciklin komplex magi szubsztrátjának, a

retinoblasztóma fehérjének a foszforilációját [174]. A két lucerna D-típusú ciklinre elkészült megfelelő ellenanyagok segítségével lehetőség nyílt számunkra is, hogy megvizsgáljuk a sejten belüli elhelyezkedésüket. Az immunolokalizációhoz az A2 sejtuszuspenzióból származó sejteket választottuk, amelyekben már kimutatható mennyiségben tudtuk detektálni mindkét fehérjét immunoblot segítségével. Az immunolokalizációval mindkét ellenanyag esetében jellemzően a magban kimutatható jelet kaptunk (5.8. ábra). Ennek megfelelően a Medsa;CYCD3;1 esetében valószínűsíthető, hogy az állati D-típusú ciklinekhez hasonlóan ténylegesen az RB fehérje homológok foszforilációjában is szerepe van. A feltevésünket a dohány CYCD3 esetében megfigyeltek is alátámasztják. Ami bemutatja, hogy a CYCD3 ciklinekhez kapcsolódott komplex képes foszforilálni a növényi retinoblasztóma-homológot *in vitro* [154]. A Medtr;CYCD6;1 esetében, amelynek legközelebbi lúdfű megfelelőjéből is hiányzik az RB-kötő motívum, feltételezhető, hogy az RBR növényi fehérjét nem tudja foszforilálni. Eddig a D6-os ciklinekkel kapcsolatos ilyen irányú további eredmények sem láttak napvilágot, ezért az RB-kötő régió hiányából adódó feltehetően megváltozott szerepének magyarázatára további vizsgálatok szükségesek.

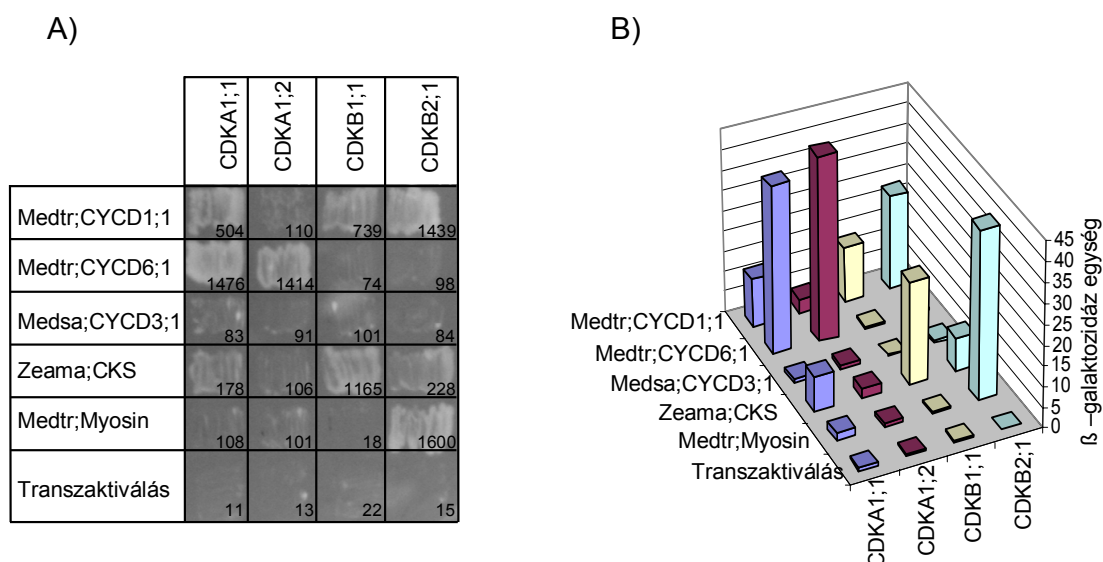


5.8. ábra. A Medsa;CYCD3;1 és Medtr;CYCD6;1 fehérjék immunolokalizációja.

A bal oldali képeken látható a jelölt fehérjék sejtmagi lokalizációja. A jobb oldali képek az azonos minták DAPI festett képei.

5.1.5. D-típusú ciklinek és CDK kinázok kölcsönhatásainak vizsgálata

A cdc2-homológ kinázok foszforilációs aktivitásához szükséges, a megfelelő ciklin partnerekhez történő kötődés. A CDK-k ciklin kölcsönhatóinak azonosító vizsgálata alapvető fontosságú, ahhoz hogy közelebb kerüljünk a komplexeik pontos funkciójának megértéséhez. Mivel két általunk újonnan izolált D-ciklint is élesztő kettős-hibrid segítségével izoláltunk kézenfekvő volt kölcsönhatásaiknak ebben a rendszerben történő visszaellenőrzése. Ennek megfelelően elvégeztük az átfogó kölcsönhatás feltárásokat az élesztő kettős-hibrid segítségével (5.9. ábra).



5.9. ábra. Az élesztő kettős-hibrid kölcsönhatás vizsgálatok lucerna CDK-k és D-típusú ciklinek között.

A) A PJ69-4A élesztő telepek triptofánt, leucint, adenint és hisztidint nem tartalmazó táptalajon nőttek. A folyadék kultúrában meghatározott relatív növekedési értékek szintén fel vannak tüntetve. B) A kölcsönhatások relatív erőssége a β -galaktozidáz aktivitás alapján. Az élesztőbe transzformált a CDK kinázok a pGBT9 vektorba a kölcsönhatás vizsgálatához a másik partnerek a pGAD424 vektorba voltak klónozva. Zeama;CKS: az élesztő CDK kötő suc1 kukorica homológja.

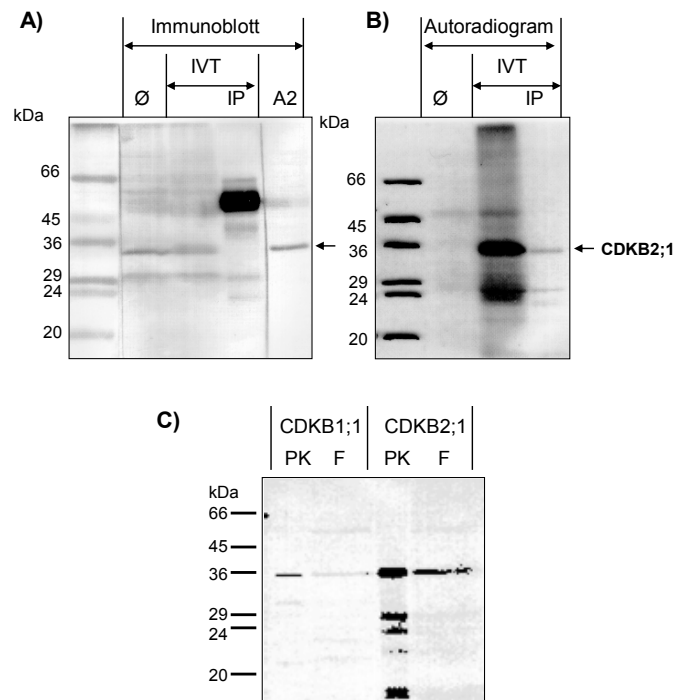
A fehérjék asszociációját a PJ69 4A törzsben vizsgáltuk, ahol a telepek az adenint és hisztidint sem tartalmazó táptalajon is nőnek, ha kapcsolat alakul ki a vizsgált fehérjék között. A kölcsönhatások erősségének relatív meghatározására a β -galaktozidáz enzim aktivitásából lehet következtetni. A CDK kinázokat a pGBT9 vektorba, míg a vizsgált kölcsönhatókat a pGAD424 vektorba klónoztuk. A kettős-hibrid mátrix eredményei alapján megállapítható, hogy a D-típusú ciklinek eltérő

erősséggel kapcsolódnak a vizsgált CDK kinázokhoz. A CYCD1;1 ciklin eltérő intenzitással de mind az A-, mind a B-típusú CDK-kal kölcsönhatásba lépett. Ezért a Medtr;CYCD1;1 fehérjének szerepe lehet mind a két típusú CDK aktiválásában. A *Medtr;CYCD1;1* gén G2/M fázisba is átnyúló expressziója alapján az is valószínűsíthető, hogy időben átfed a B2-típusú CDK kifejeződésével és így képes azt is aktiválni [196]. A közölt irodalmi adatokban ma már több ilyen D-típusú ciklint is jellemeztek, amelyek hasonlóan kötődnek az A- és B-típusú CDK kinázokkal *in vitro* kísérletekben [154, 161]. Az élesztő kettős-hibrid kölcsönhatás alapján feltételezhető, hogy a CDKB2;1/ciklin komplexnek szerepe van a miozin foszforilációjában. A tengeri sünn embrióban a kortikális citoszkeleton-kötött miozint aktiváló foszforiláción megy át az anafázis és telofázis során [258]. Vizsgálataink alapján ezzel egybehangzóan a Medsa;CDKB2;1 aktivitása az említett sejtciklusos fázisokban még magas. A CYCD6;1 fehérje azonban csak az A-típusú CDK-kal mutatott erős kapcsolódási képességet. A CYCD3;1 ciklin csaliként a kettős hibrid rendszerben felhasználva egyetlen ciklin-CDK kölcsönhatást sem sikerült detektálnunk.

5.1.5.1. Az *in vitro* transzlált CYCD3;1 fehérje kötődése a CDKA1;1 kinázhoz

Munkánk során kerestünk olyan használható kísérleti rendszert, amelyben megfelelő módon *in vitro* kölcsönhatás vizsgálatokat tudunk elvégezni a kettős-hibridben meghatározott kapcsolatok alátámasztására, illetve a Medsa;CYCD3;1 ciklin esetében a hiányzó ismeretek pótlására. Kísérleti módszerként a Promega cég kínálta TNT rendszert választottuk, mivel többek között a radioaktív jelölésnek köszönhetően nagy kimutatási érzékenységet tud biztosítani. A módszer kipróbálását a csoportunkban korábban izolált B-típusú CDK kinázok vizsgálatával kezdtük. A módszer használatával a kívánt cDNS szakaszokról a megfelelő fehérjét ³⁵S-metionin jelenlétében a nyúl retikulocita sejt lizátumában párhuzamosan a transzkripciót követően transzláltattuk. A 5.10. ábra szemlélteti, hogy míg az *in vitro* transzlált fehérje az immunoblot segítségével nem volt kimutatható, az azonos membrán autoradiogram képen a termeltetett fehérje immunoprecipitálás után is detektálható. Az 5.10. /A ábra immunoblotjának IP mintájában az immunoprecipitáció során kikötött ellenanyag nehéz láncának 50

kDa magasságban megjelenő erős detektálása látható. Korábban már igazoltunk, hogy a Medsa;CDKB2;1 fehérjét is köti a p13suc1, az élesztőből származó általános CDK kötési képességgel rendelkező fehérje, míg a Medsa;CDKB1;1 kötődése nem volt kimutatható az azonos kísérletben. A ^{35}S -Metionin jelölt mindkét B-típusú fehérjénél sikerült igazolni a kísérleti rendszerünk segítségével, hogy a transzlált fehérjéket *in vitro* köti a Sepharose-p13suc1 ágy (5.10. ábra /C). Ennek megfelelően az élesztő kettős-hibrid kölcsönhatási kísérletben is kapcsolódott mindkét B-típusú vizsgált CDK a suc1 homológ kukorica CKS-el (5.9. ábra). Ezzel egybehangzó eredményre jutottak lúdfüben is a CKS1At fehérje esetében, mert a fehérje mind az A- mind a B-típusú CDK-val kölcsönhatott *in vitro* [48].

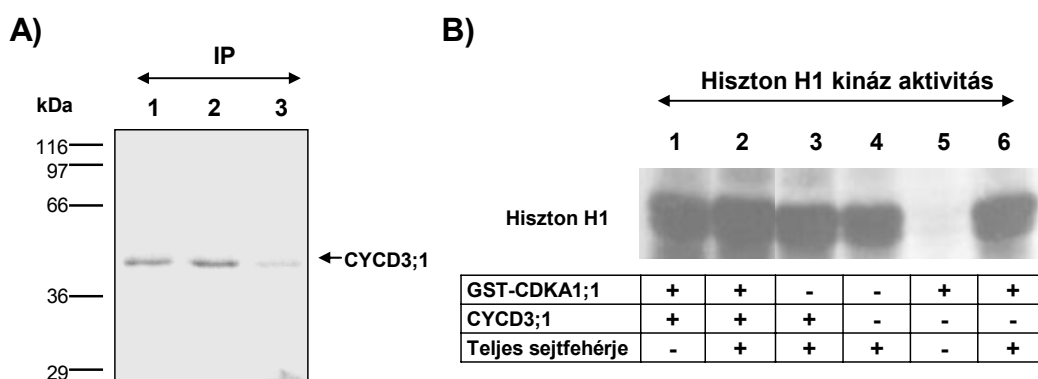


5.10. ábra. Az *in vitro* transzlált B-típusú lucifera CDK-k kötődnek a p13suc1 fehérjéhez.

A) A TNT rendszerben *in vitro* transzlált Medsa;CDKB2;1 fehérje immunoblotja. B) Az A) ábrarész autoradiogramja. A Medsa;CDKB2;1 fehérjét a nyílak jelölik. C) A TNT rendszerben *in vitro* transzlált B1- és B2- típusú kinázok kikötethetők a nyúl retikulocita sejtizátumból. Jelölések: *in vitro* transzlált minták (IVT), immunoprecipitált minta (IP), p13Suc1 kötött minta (PK), felülúszó (F). A molekulásúly markerek a képek bal oldalain vannak berajzolva.

Mivel az élesztő kettős-hibrid rendszer segítségével a Medsa;CYCD3;1 fehérje CDK kölcsönhatóinak keresései nem kaptunk egyértelmű eredményt, ezért továbbiakban a CDK-k transzlálási és funkcionális vizsgálatával tesztelt rendszer

segítségével próbáltuk a lehetséges CDK partnerét azonosítani. Kezdeti kísérleteink során úgy találtuk, hogy egyes transzlált ciklinek a lizátumban található nyúl CDK-val is képesek voltak kölcsönhatni. Ezért a kötési kísérletekben a kialakult CDK-ciklin komplexet a specifikus ellenanyag segítségével immunoprecipitáltuk. A bemutatott kísérlet alapján megállapítottuk, hogy a lucerna CYCD3;1 és a CDKA1;1 fehérjék *in vitro* kölcsönhatnak (5.11. ábra). A 5.11. ábra /A 3. mintájában jóval kevesebb jelölt CYCD3;1 fehérje tudott kapcsolódni, feltehetően azért, mert a fehérjekivonatban az eredetileg meglévő CDK/ciklin komplexek mellett kevés szabad CDK-hoz tudott kötődni a hozzáadott CYCD3;1. Azon mintákban, ahol az elegy tartalmazott lucerna A2 fehérje kivonatot a vártan megfelelően nagy hiszton kináz aktivitást kaptunk. A csak bakteriálisan kifejeztetett és ciklin partner nélküli CDK-nak a vártan megfelelően nem volt hiszton H1 kináz aktivitása, ami kétségtelenül alátámasztja a növényi CDKA aktivitásának ciklin függését.



5.11. ábra. Medsa;CDKA1;1 és a Medsa;CYCD3;1 fehérjék *in vitro* kölcsönhatásának vizsgálata.

A) Az *in vitro* TNT rendszer segítségével kifejeztetett 35S-metionin jelölt Medsa;CYCD3;1 fehérje a GST-CDKA1;1 illetve a teljes A2 fehérje extraktum a B) ábrarész táblázatában jelölt összeállításának megfelelően jégen 1 órán keresztül inkubáltuk. Az anti-CDKA1;1 ellenanyaggal kötött (IP) és SDS-poliakrilamid gélen szeparált mintáinak radiogramja. B) Az anti-Medsa;CDKA1;1/2 ellenanyaggal immunoprecipitált hiszton H1 kináz aktivitások. A táblázatban a minták kísérleti összetevőit jelöltük, GST-CDKA1;1 (1 µg), CYCD3;1 (*in vitro* transzlációs lizátumból 4 µl), Teljes sejtfehérje (100 µg A2 lucerna sejtfehérje kivonat)

5.1.5.2. A Medsa;CYCD3;1 és Medsa;CDKB2;1 fehérjék szinkronizált mintákból sejtciklus függő hiszton H1 kináz aktivitást kötnek

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az előzőekben bemutatott kísérlethez képest fordított helyzetben a bakteriálisan kifejeztetett a fúziós GST partneren

keresztül tisztított CYCD3;1, a lucerna fehérje extraktumból képes-e a teljes fehérje extraktumokból kináz fehérjével kapcsolódni, és ez az aktiválódás hogyan függ össze a sejtciklus fázisaival. Ezért a kísérlet során a hidroxürea szinkronizált A2 lucerna sejtek teljes fehérje extraktumával inkubáltuk a fúziós Medsa;CYCD3;1 fehérjét. A kötést követően hiszton H1 kináz vizsgálattal határoztuk meg a komplex aktivitását. A CYCD3;1 ciklin kötött mintákban a hidroxürea kimosását követő 6. órás mintában adott a legmagasabb kináz aktivitást. Azaz a ciklin a G1/S átmenet során tudott az abban a fázisban aktivált CDK-val kapcsolódni, amely lucernában a CDKA1;1/1;2 kinázt jelentheti. Ezt a kötést támasztja alá a CDKA1;1 és CYCD3;1 fehérjéknek előzőekben bemutatott *in vitro* kölcsönhatási képessége a (5.11. ábra).

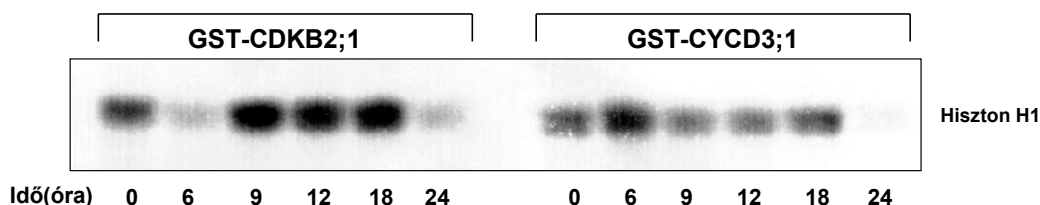
Ugyanakkor megvizsgáltuk, hogy fordított helyzetben az A-típusú CDK aktiválódásához hasonlóan (5.11. ábra) a GST fuzionált B-típusú CDKB2;1 is aktiválható-e a fehérje extraktumból feltehetőleg hozzá kapcsolódott ciklin partnernek, illetve szükséges módosításnak köszönhetően (5.12. ábra). A szinkronizált mintasorból a CDKB2;1 aktiválódása a rá jellemző fázisokban történt meg, azaz a mitotikus sejteket tartalmazó fázisban nőtt meg a kináz aktivitás. Az alternatív módszer során tehát az egyik bakteriálisan termeltetett és tisztított fehérje partner teljes sejtférfje extraktummal való kölcsönhatás eredményeit látjuk, melyet az állati kutatások során alkalmaztak először [217].

A D-típusú ciklin/CDK kölcsönhatás és aktiválódási vizsgálatainkat összegezve megállapíthatjuk, hogy a CYCD3 lucerna ciklin *in vitro* kölcsönhat az A-típusú CDK-val, a kialakult komplexnek a sejtciklus G1/S fázisának szabályozásában lehet szerepe. Ezt támasztja alá az ciklin G1-fázisos expressziós adata is, illetve az, hogy a fehérje G1-ciklin hiányos mutáns élesztő törzsek komplementációjára képes [39]. Mivel a CYCD3 lucerna ciklin tartalmazza a retinoblasztóma kötő LxCxE fehérje motívumot feltehetőleg szerepet játszik az RBR fehérje foszforilációjában, így a G1/S átmenet szabályozásában.

A Medtr;CYCD1;1 esetében az élesztő kettős-hibrid eredményekre támaszkodva feltételezhetjük, hogy a B2 típusú, növény specifikus CDK-val is kölcsönhat. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy több más jellemzett D-típusú növényi ciklinhez hasonlóan szerepet kap a mitózisban is [185, 264]. Az RB-kötő szekvenciájának köszönhetően a Medtr;CYCD1;1/CDK komplexnek a

retinoblasztóma fehérje is szubsztrátja lehet, későbbiekben bemutatott kísérletünk eredménye is demonstrálja, hogy a Medsa;CDKB2;1 képes *in vitro* foszforilálni a lucerna RBR fehérje C-terminális végét (5.16. ábra /B).

A CYCD6;1 lucerna ciklin feltehetőleg szintén szerepet kap a merisztematikus szövetek sejtciklus szabályozásában. A szinkronizációs és élesztő kettős-hibrid kötődési képessége alapján feltehetőleg a G1 fázisban lehet szerepe a CDKA kináz aktivitásának és szubsztrátjának meghatározásában. A Medtr;CYCD6;1 immunoprecipitált formában kísérleteink során nem volt képes sem a hiszton H1 sem, az RB fehérjét foszforilálni. Ez utóbbi magyarázható azzal, hogy a Medtr;CYCD6;1 nem tartalmazza az RB kötő motívumot. Egyelőre továbbra is érdekes kérdés marad, hogy mik a lúdfű CYCD6 csoportba tartozó ciklinek aktív komplexeinek valóságos szubsztrátjai.



5.12. ábra. A GST-CDKB2;1 és a GST-CYCD3;1 fuzionált fehérjék sejtciklus függő hiszton kináz aktivitást kötnek a szinkronizált mintákból.

A mintákat a 10 mM hidroxürea kimosását követően a jelzett időpontokban vettük a lucerna A2 sejtszuszpenzióból. A bakteriálisan kifejeztetett és Glutation Sepharose-4B ágyon tisztított fúziós fehérjéket a teljes sejt fehérje kivonattal inkubáltuk. A kináz reakcióhoz hiszton H1 fehérjét adtunk, mint szubsztrátot, majd SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk. A jelet autóradiográfiásan detektáltuk.

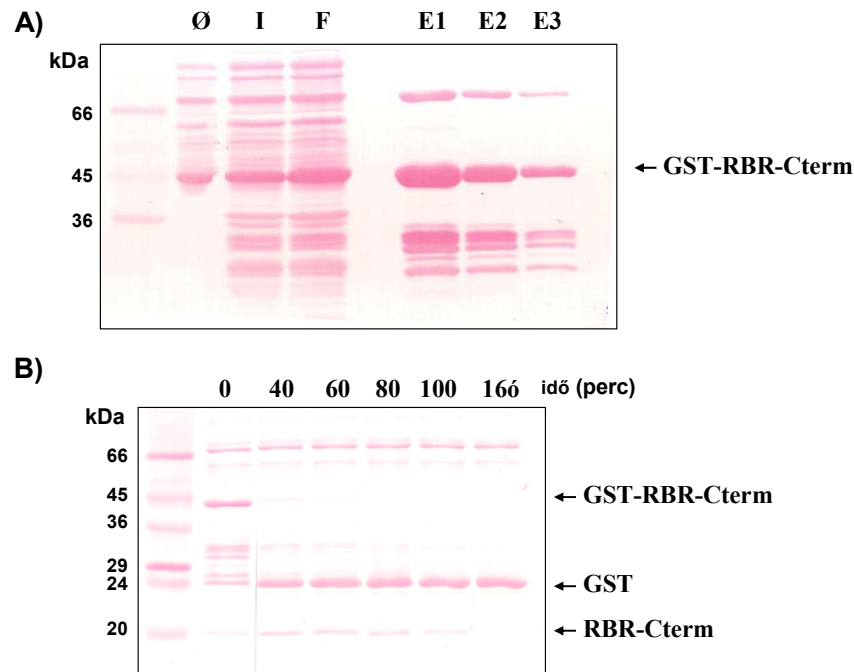
5.2. A lucerna retinoblasztóma-homológ fehérje jellemzése

Az irodalmi bevezetőben említett módon a retinoblasztóma tumor szupresszor fehérje központi szerepe az állati sejtciklus szabályozásában illetve a differenciálódásban és fejlődés szabályozásában már átfogóan jellemzett. Az utóbbi évek megjelent közleményei alapján a növényi RB fehérje homológ kutatása is egyre szélesedik és az állati homológjához hasonlóan, egyre jobban körvonalazódik a hasonlóan fontos összetett központi szabályozó szerepe, mind a sejtciklus, a differenciálódás és a kromatin átalakításának szabályozásában [195].

A csoportunkban is sikerült több RB-homológ gént izolálni és tanulmányozni rizsből és lucernából [169].

5.2.1. A retinoblasztóma fehérje kimutatása lucerna sejtuszuspenzióban

Az *MsRBR1* gén fehérje szintű vizsgálatához specifikus ellenanyagra volt szükségünk, előállításához a teljes, bakteriálisan kifejeztetett, N-terminálisan hat hisztidint tartalmazó fúziós RBR fehérjét kívántuk felhasználni. A fúziós fehérje túltermelésénél azonban nehézségek adódtak, elsősorban a nagy mértékű degradálódásának következtében. Így egy kisebb méretű C-terminális fragmentet tartalmazó GST-RBR-Cterm fúziós fehérjét próbáltuk az immunizáláshoz felhasználni. A termeltetés és tisztítási munka során sikerült több mg fúziós fehérjét előállítani, azonban a GST fúziós partnertől való lehasítás során a levágott C-terminális fehérje instablnak mutatkozott és nagy része a GST fehérjéről szintén degradálódott és a hasítás után kis mennyiségben maradt (5.13. ábra / B). Így a trombinos hasítás következtében a kívánt fehérje nagy részét elvesztettük, és nem maradt megfelelően felhasználható antigén az immunizáláshoz. Végül azonban, mielőtt RBR peptid ellenanyag immunizálási munkába kezdtünk volna, Bakó Lászlótól kaptunk a lúdfű RBR C-terminális fehérje szakaszára készült ellenanyagot, amely felismerte a lucerna 1025 aminosav hosszú, számítottan 114 kDa tömegű *MsRBR1* fehérjét (5.14. ábra). A lucerna *MsRBR1* gén kifejeződésében az expressziós adatok alapján nincsen nagy eltérés a vizsgált különböző növényi szövetekben, amint a sejtuszuspenzióból és levélmintákból származó minták is közel egyforma *MsRBR1* mRNS mennyiséget tartalmaztak [169]. Ezzel egybehangzóan a lúdfűből származó GENEVESTIGATOR adatbázisban az *AtRBR1* gén konstitutív kifejeződése található a vizsgált különböző növényi részekben [169]. Érdekes módon azonban az *MsRBR1* fehérjeszint detektálások során a teljes méretű fehérjét csak a gyorsan osztódó szuszpenzióból sikerült kimutatni.

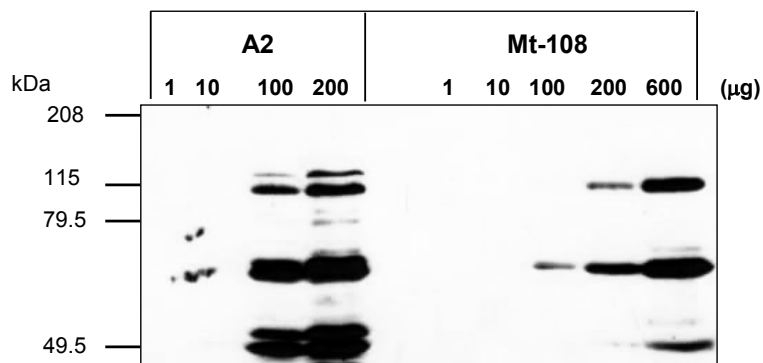


5.13. ábra. A bakteriálisan túltermeltetett GST-RBR-Cterminális fúziós fehérje kifejeztetése és tisztítása.

A) A fúziós fehérje tisztításának lépései. Az expressziós plazmidot tartalmazó baktériumtörzs indukció előtti (Ø), utáni (I), a feltárás utáni felülúszó valamint a kötés utáni elúciós minták SDS-poliakrilamid szeparálása és PVDF membránra blottolt Ponceau festett képe. B) A fúziós GST-RBR-Cterm fehérje trombin hasítási képe. A mintákat SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk és PVDF membránra blottoltuk, majd a fehérjéket Ponceau-val festettük. A fehérjéket nyilakkal jelöltük. Az inkubálási időket a membrán felett adtuk meg. A fehérje molekulásúly markerek az első mintasorban futottak és kDa-ban vannak megadva.

Ez természetesen jelentheti, hogy a különböző szövetekben eltérő a fehérje stabilitása illetve a sejtek feltárása során a normál növényi szövetekben degradálódik a kimutathatósági szint alá a retinoblasztóma-homológ fehérje. Azonban még további vizsgálatok szükségesek az egzakt válasz megadásához. Mindenesetre a *Medicago* A2 és a Mt-108 sejtsuszpenziókban immunoblot segítségével detektálható a lucerna RBR fehérje teljes méretű és több jellegzetes rövidebb, feltételezeten degradációs terméke, melynek szerepe még nem ismert (5.14. ábra). Az emlősök esetében megfigyelték a defoszforilált pRB hasítódását egy hasonló 68 és egy 48 kDa méretű szakaszra, amely az apoptózis folyamatokban játszik szerepet [4]. Az immunoblot alapján az is megállapítható, hogy a gyorsabban osztódó A2 lucerna sejtsuszpenzióban már a 100 µg sejtférfje kivonatból jól detektálható a teljes méretű RBR fehérje, míg a *Medicago*

truncatula lassabban osztódó sejtuszuspenziójában nagyobb kiindulási összfehérje tömeg esetén kaptunk hasonló erősségű jelet.



5.14. ábra. A lucerna RBR fehérje detektálása A2 és Mt-108 sejtuszuspenzióban.

A szeparáláshoz a feltüntetett szuszpenziós lucerna fehérje kivonatokból (*Medicago sativa* A2, *Medicago truncatula* MT-108) a minták felett jelzett mennyiségeket szeparáltunk SDS-poliakrilamid gélen. Ellenanyagként az anti-AtRBR antitestet használtuk. A molekulásúly markereket az ábra bal oldalán jelöltük.

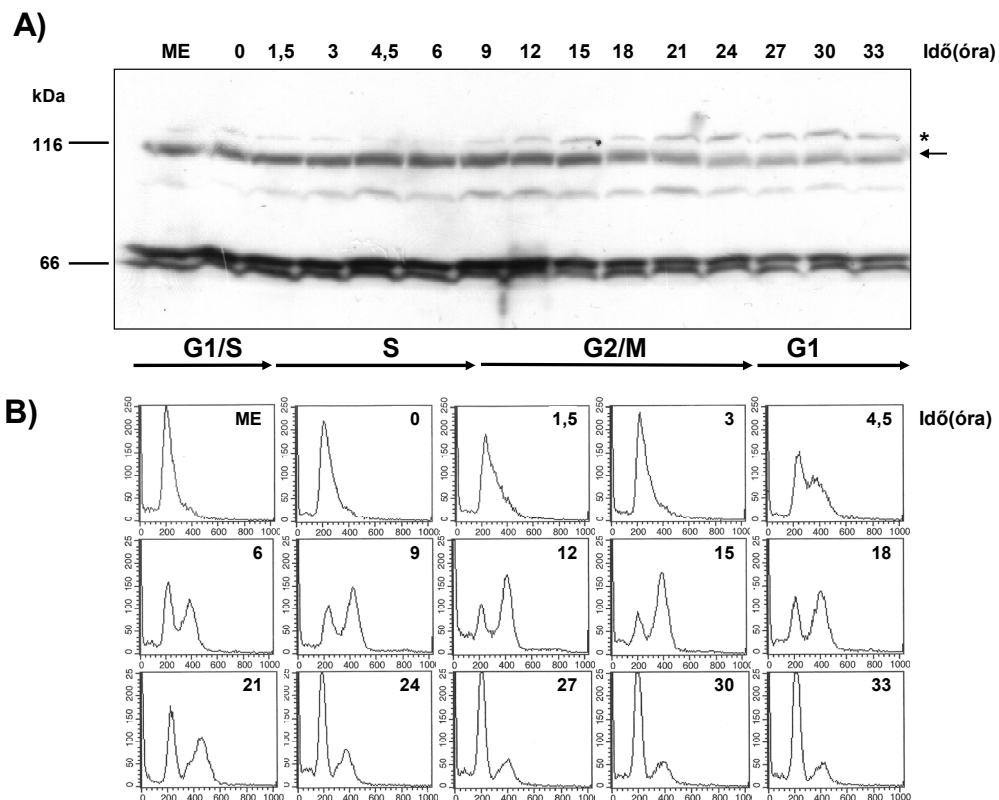
5.2.2. A lucerna RBR fehérje mennyiségének sejtciklus függő változása

A továbbiakban a lucerna sejtuszuspenzióban is megfelelően működő ellenanyag segítségével megvizsgáltuk az MsRBR1 fehérjeszint sejtciklus függőségét (5.15. ábra). Az eredmény alapján az RB-homológ fehérje mennyisége kissé változott a hidroxürea blokkolás és a kimosása utáni sejtosztódási ciklusok haladtával. A 36 órás hidroxürea blokk kimosását követően kissé nőtt az RBR fehérje mennyisége a G2/M fázis határáig, ami után a mitózis fázisában jól látható a fokozatos csökkenése a következő G1-fázisig. Ugyanakkor az ábrán csillaggal jelölt feltételezett RBR foszforilációs formának az S-től a G2-fázisig tartó sejtciklusos szakaszokban detektálható a mennyiségi növekedése.

A későbbiekben bemutatott kettős blokkolt szinkron kísérletünkben szintén megnéztük az RBR fehérje szint változását (5.25. ábra /A). Az anti-RBR ellenanyaggal detektált jelek hasonló mintázatot adtak. A hidroxürea kimosása után a G1/S átmenet szakaszában a legmagasabb és a következő G1 fázisra teljesen lecsökken az RBR fehérje mennyisége. Érdekes módon a másodjára roscovitin blokkolt sejtek esetében késleltetve, de szintén csökkent a fehérje mennyisége, míg a kolhicin gátolt sejtekben az MsRBR1 fehérjéből végig több volt

jelen. Eddig lúdfűben az RBR fehérje szintjének sejtciklusos vizsgálatát még nem mutatták be.

A “mikroarray” technika segítségével azonban a szinkronizált lúdfű sejtuszuspenzióban szintén egy a G1/S kimosást követő megnövekedett mRNS szintet detektáltak, ami aztán visszaesik és a rákövetkező ciklusban csak kisebb eltéréseket mutat a sejtciklusos fázisok előrehaladtával [185]. Reverz transzkripció PCR technikát alkalmazva az *AtRBR1* expressziójának szintén csak kisebb a G1/S fázisokban való megnövekedését találták szinkronizált lúdfű sejtuszuspenzióban [189].



5.15. ábra. Az MsRBR1 fehérje mennyiségének változása a hidroxürea szinkronizált lucerna A2 sejtuszuspenzióban.

A) A hidroxürea blokkolt A2 lucerna sejtuszuspenzióból a mosás előtt (ME) és után két óránként vettük a mintákat, a jelzett időpontokban. Az azonos mennyiségű fehérje mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis szeparálás után PVDF membránra transzferáltuk. Az MsRBR1 fehérjét az anti-*AtRBR* ellenanyaggal detektáltuk. A nyíl a teljes méretű RBR fehérjét jelöli. Az immunoblot alatt a nyilakkal a sejtek sejtciklusos fázisait jelöltük. B) A szinkronizációs kísérlet sejtmintáinak áramlásos citometriai mérései. A molekulásúly markereket az ábra bal oldalán jelöltük.

A kettős blokkolt szinkron kísérlet során is megfigyelhető a feltételezett MsRBR1 hiperfoszforilációs formája, amely a mitózis kezdeti fázisaiban biztosan megmarad (5.25. ábra /A). Az egyszeri hidroxürea szinkronizált sejt kultúrában ugyanez a fehérjeméret szintén jelen maradt a vizsgált mintákban, sőt a kisebb méretű RBR fehérjéhez képest jelentősen nőtt az aránya. Az RB fehérjének hasonlóan ezt a mitózis végéig megmaradó hiperfoszforilációs állapotát az emberi vizsgálatoknál korábban igazolták [294].

5.2.3. A- és B-típusú CDK komplexek egyaránt foszforilálják a lucerna RBR fehérjét *in vitro*

Az irodalomból jól ismert, hogy a retinoblasztóma fehérje foszforilációs szubsztrátja a G1/S fázisban az aktív CDK/ciklin komplexeknek. A retinoblasztóma azon fehérjék közé tartozik, amelyről bizonyított, hogy számos CDK *in vivo* is foszforilálja. Ebben a folyamatban, az emberi sejtekben a CDK2/4/6 kinázok komplexei vesznek részt [274]. Ennek megfelelően a retinoblasztóma fehérje sejtciklus függően foszforilálódik, míg a G1 fázisban hipofoszforilált, addig az S fázisba lépéskor a hiperfoszforilált formája jelenik meg. Az RB fehérje foszforiláltsága meg is marad a G2 folyamán egészen az M fázis végéig [294]. A dolgozatomban később bemutatásra kerülő kettős blokkolt szinkronizációs kísérleteinkben, mi is azt tapasztaltuk, hogy a szinkronizált lucerna sejtekben változik a feltehetően hiperfoszforilációs jelet adó RBR fehérje mennyisége a különböző sejtciklusos fázisokban (5.25. ábra /A). Az RBR fehérje CDK okozta hiperfoszforilációt valószínűsíti az is, hogy a specifikus CDK inhibitor alkalmazásakor, a roscovitin kezelt mintákban a megfelelő magasabb jel nem volt detektálható (5.25. ábra /A). A növényi RBR foszforilációs aminosav helyeinek számítógépes vizsgálata alapján is több prediktálható CDK konszenzus foszforilálható aminosav található (5.1. táblázat).

Csoportunkban korábban bizonyítottuk, hogy a humán RB fehérje C-terminális végét a CDKA1;1/1;2 immunoprecipitált komplexe képes *in vitro* foszforilálni, míg a CDKB komplexek nem [190]. Ugyanakkor kérdés maradt, hogy vajon a növényi retinoblasztóma homológot a B-típusú növény specifikus CDK kináz képes-e foszforilálni. Ez a kérdés azért is volt érdekes, mert amint azt az élesztő kettős-

hibrid adatokból is megállapítottuk, a B-típusú CDK kinázok kölcsönhatottak a Medtr;CYCD1;1 fehérjével is. Ebben a D-típusú lucerna ciklinben szintén megtalálható az RB-kötő motívum, ami lehetővé teszi a CDK komplexének, hogy az RBR fehérjét foszforilálni tudja. Ennek megállapításához elvégeztük a csoportunkban klónozott *Medicago sativa* RBR1 fehérjéjének az *in vitro* foszforilálhatósági vizsgálatát (5.16. ábra /B).

MsRBR1 foszforiláció helyek		
Aminosav	CDK	Valószínűségi érték
S-382	cdk5	0.57
S-389	cdc2	0.55
S-392	cdk5	0.68
S-396	cdk5	0.59
S-602	cdc2	0.57
S-610	cdc2	0.54
S-674	cdk5	0.56
S-694	cdk5	0.62
S-721	cdk5	0.62
S-838	cdk5	0.58
S-885	cdc2	0.57
S-905	cdk5	0.61
S-909	cdk5	0.66
S-918	cdk5	0.62
S-931	cdk5	0.56
S-936	cdc2	0.54
S-962	cdk5	0.61
S-1002	cdc2	0.54
S-1010	cdc2	0.55

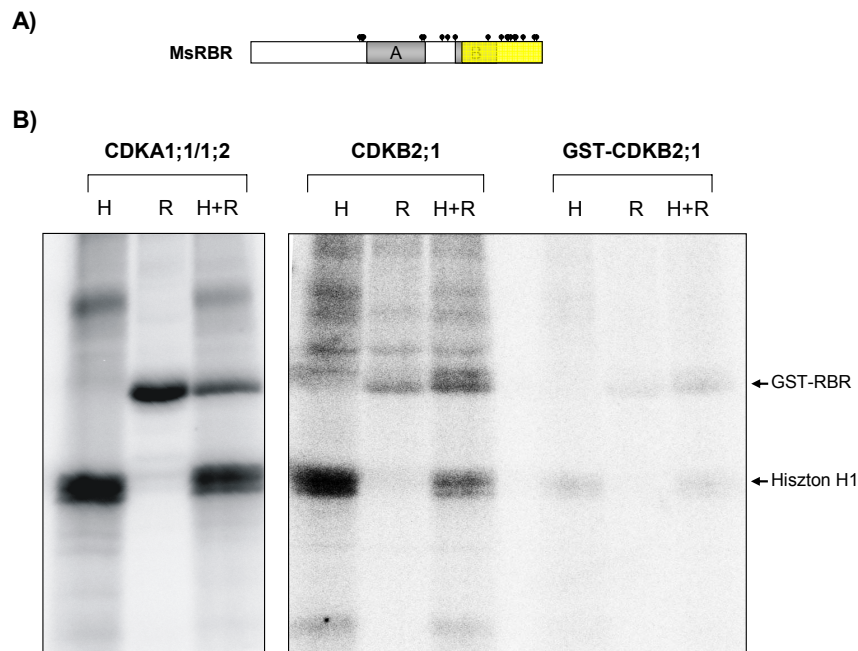
MsRBR1
C-terminális

5.1. táblázat. Az MsRBR1 protein feltételezett CDK foszforilációs helyei.

A jelölt aminosavak pozíciója az első oszlopban található. A CDK foszforilációs valószínűségi értékeket a NetPhosK1 program segítségével határoztuk meg. A középső oszlopban a feltételezett aminosav foszforilációjáért felelős emberi CDK kinázok a találhatóak. Az MsRBR1 fehérje C-terminális régiójába eső foszforilációs helyeket a táblázat oldalán a nyíl jelöli. A sárgával színezett sorok azokat a foszforilációs helyeket jelölik, melyek a GST-RBR-Cterm fúziós fehérjében is szerepelnek. Ezt az MsRBR1 fehérje szakaszt az 5.16. /A ábrában is sárgával emeltük ki.

Szubsztrátként azt a lucerna RBR C-terminális fehérje régiót használtuk, amely fehérjerészben nagy számban fordulnak elő a prediktálhatóan CDK foszforilációs helyek (5.16.A. ábra). Az emberi RB megfelelő C-terminális szakasza, illetve a vizsgált növényi RB-homológok is több foszforilációs helyet tartalmaznak a fehérje C-terminális régiójában (2.4. ábra). A vizsgálat eredményei szerint a mitotikus CDKB2;1 kináz immunoprecipitált komplexe is foszforilálta a szubsztrátként adott a hiszton H1 és C-terminális RBR fehérje szakaszt *in vitro*. Ráadásul a szubsztrátok jelölődésének intenzitásában nem mutatkozott nagy különbség a szubsztrátok együttes hozzáadása alkalmával sem, hasonlóan a CDKA esetéhez. Így megerősítést nyert, hogy a lucerna RBR fehérjét a CDKA és

CDKB típusú ciklin-függő kinázok egyaránt foszforilálják *in vitro*. Hasonlóan, bár jóval kisebb kináz aktivitással, a GST-CDKB2;1 fehérje is aktiválódott a lucerna sejtszuszpenzió fehérje kivonatában az inkubálás során. A dohány RBR fehérje C-terminálisa G1/S fázisokban foszforilálható a cyclinD3;3/CDKA immunoprecipitált komplexeivel [202, 203]. Újabb eredmények alapján ugyanakkor több dohány CYCD3 komplex is képes foszforilálni a dohány RB-homológ fehérjét G2/M fázisban is *in vitro*, amelyek ráadásul kölcsönhatnak a dohány CDKB kinázzal [154]. Arról azonban még nincsenek adataink, hogy van-e valamilyen specifikusan B-típusú CDK-k által foszforilálható aminosav a növényi RBR-ben, illetve ha van milyen egyedi szerepe van, a növényi sejtciklus szabályozásában.



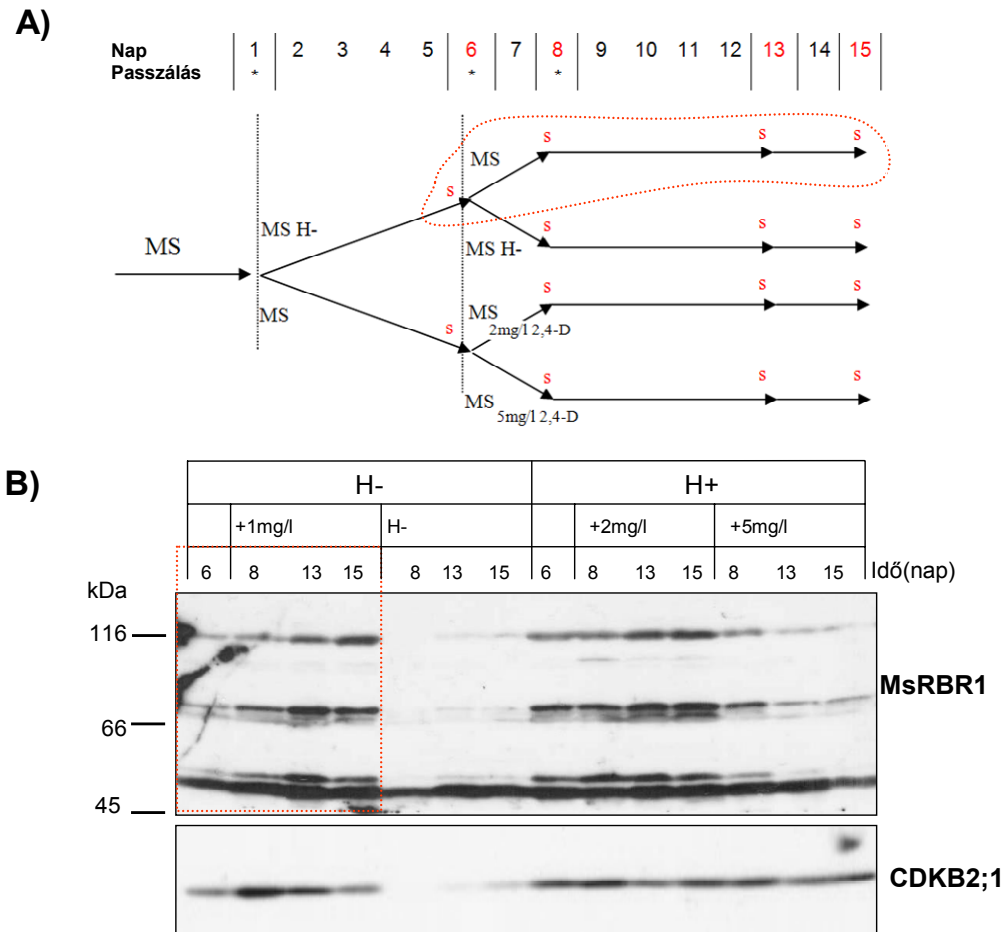
5.16. ábra. Az anti-CDKA1;1/1;2 valamint az anti-CDKB2;1 immunoprecipitált komplex foszforilálja a retinoblasztóma C-terminális doménjét.

A) Az MsRBR1 fehérje sematikus ábrája. Az A és B konzervatív domének szürkék, a C-terminális GST fúziós bakteriálisan túltermeltetett szakaszát sárga színnel jelöltem. Az 5.1. táblázatban bemutatott prediktált CDK foszforilációs helyeket fekete pontok jelik. B) A lucerna A2 sejtféhrje kivonatból az anti-CDKA, anti-CDKB2;1 valamint a GST-CDKB2;1 kötött kináz aktivitások. A kináz reakció szubsztrátjaként hiszton H1 (H), RBR-Cterm (R) és a kettő fehérjét együttesen (H+R) alkalmaztuk. A kináz reakciót leállítás után SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk és a jelet autóradiográfiával detektáltuk.

5.2.4. Az MsRBR1 fehérje szintjének változása hormon kezelés hatására lucerna A2 sejtuszuspenzióban

A növényi hormonhatás mechanizmusában az RBR fehérje által betöltött szerep megállapításához, a kezdeti kísérleteinket szintén lucerna A2 sejtuszuspenzióban végeztük. Kíváncsiak voltunk, hogy az A2 szuszpenziós sejtek fenntartásához alkalmazott hormon mennyiségének megváltoztatása milyen hatással van az MsRBR1 fehérje mennyiségére. Ezért a hormonhatási kísérletekhez először a táptalajban alkalmazott, a folyamatos osztódásához elengedhetetlen hormonokat választottuk (2,4-D, kinetin). Mivel ezek a hormonok az alkalmazott normál táptalajban jelen vannak, először el kellett vonni abból, hogy aztán a visszaadást követően láthassuk az MsRBR1 fehérjeszint változásokat. A kísérletet úgy terveztük, hogy képet kapjunk mind az elvonás, mind a visszaadás illetve a magasabb 2,4-D hormon koncentrációra adott válaszokról (5.17. ábra /A). A fehérje minták anti-RBR ellenanyagával kapott immunoblot képe alapján megállapíthatjuk, hogy a hormonok az alkalmazott összeállításokban jelentősen befolyásolták a lucerna retinoblasztóma-homológ fehérje mennyiségét a sejtekben (5.17. ábra /B).

A teljes hormon megvonás hatására gyakorlatilag detektálhatósági szint alá csökkent az RBR fehérje mennyisége a 8. napra. Ugyanakkor a 6. napon visszaadott kiindulási hormonkoncentrációkkal az RBR fehérje mennyisége jelentősen nőtt, miközben a sejtciklus aktivitás a Medsa;CDKB2;1 immunoblotja alapján a hormon visszaadás kezdeti élénkítő hatása után lelassult. Amikor a normál 1 mg/l 2,4-D és 0,2 mg/l kinetin hormonokat tartalmazó MS tápoldatban növeltük kétszeresére a 2,4-D koncentrációt szintén folyamatosan nőtt az RBR fehérje mennyisége a 15. napig. Amikor azonban 5 mg/l 2,4-D hormont adtunk a szuszpenzióhoz, az RBR fehérje mennyisége éppen ellentétesen folyamatosan csökkent. A vizsgált sejtciklus aktivitás ugyanakkor mindkét utolsó esetben közel hasonló volt a mért Medsa;CDKB2;1 mitotikus kináz fehérjeszintje alapján.



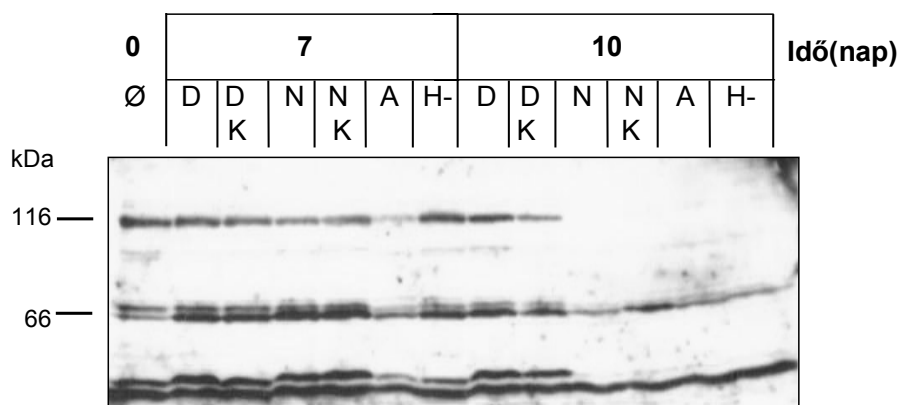
5.17. ábra. 2,4-D, kinetin hormonok okozta RBR fehérje szint változás az A2 lucerna sejtuszuspenzióban.

A) Az A2 lucerna sejtuszuspenzió hormon elvonás illetve visszaadás kezelésének kísérleti sémája. A 2,4-D hormont a feltüntetett, míg a kinetint minden hormonos tápoldatban 0,2 mg/l koncentrációban alkalmaztuk. A mintákat a jelzett időpontokban gyűjtöttük (s). B) A teljes fehérje extraktumokból egyenlő mennyiségeket (100 µg) SDS-poliakrilamid gélen szeparáltunk és a jobb oldalon jelzett fehérjék elleni antitestekkel immunodetektáltunk. A molekulásúly markereket az ábra bal oldalán jelöltük.

A továbbiakban megvizsgáltuk a naftilecetsav és az abszcizinsav illetve az eddig vizsgált hormonok kombinációjának az MsRBR1 fehérjeszintre gyakorolt hatását is. Az utolsó kísérlethez hasonlóan először egy hétig hormont nem tartalmazó táptalajba oltottuk át a sejteket, majd az 5.18. ábra feliratozásának megfelelő párosításban és a jelzett koncentrációkban alkalmaztuk a hormonokat.

A sejt mintákat a hormonok hozzáadása után a 7. illetve a 10. napon gyűjtöttünk. A kimutatott MsRBR1 fehérjeszintek alapján egyértelmű, hogy az abszcizinsav kezelt sejtekben már a 7. npra lecsökkent, míg a naftilecetsavat tartalmazó illetve a hormon nélküli fehérje mintákban a 10. npra gyakorlatilag

eltűnt a teljes méretű lucerna RB-homológ fehérje. A 10. napra csak a 2,4-D hormont tartalmazó sejtuszuspenziókban maradt a kiindulásival összemérhető RBR teljes méretű fehérje (5.18. ábra), amely feltehetően összefüggésben van a szintetikus auxin hormon erősebb auxin hatásával.



5.18. ábra. Növényi hormonok hatása az MsRBR1 fehérje mennyiségére lucerna A2 sejtuszuspenzióban.

A mintákat a hormonok hozzáadása után a 7. illetve a 10. napon gyűjtöttük. Az alkalmazott hormonokat az ábra tetején tüntettük fel, melyeket a következő koncentrációkban használtuk: A kezelés indítási mintája (Ø), 2,4-D 1 mg/l (D), Kinetin 0,2 mg/l (K), NAA 0,5 mg/l (N), ABA 100 µM. A minták teljes fehérje extraktumából egyenlő mennyiségeket (100 µg) szeparáltunk SDS-poliakrilamid gélen, az immunoblot során a lucerna RB-homológ fehérjét az anti-AtRBR ellenanyaggal detektáltuk. (A) A molekulásúly markereket az ábra bal oldalán jelöltük.

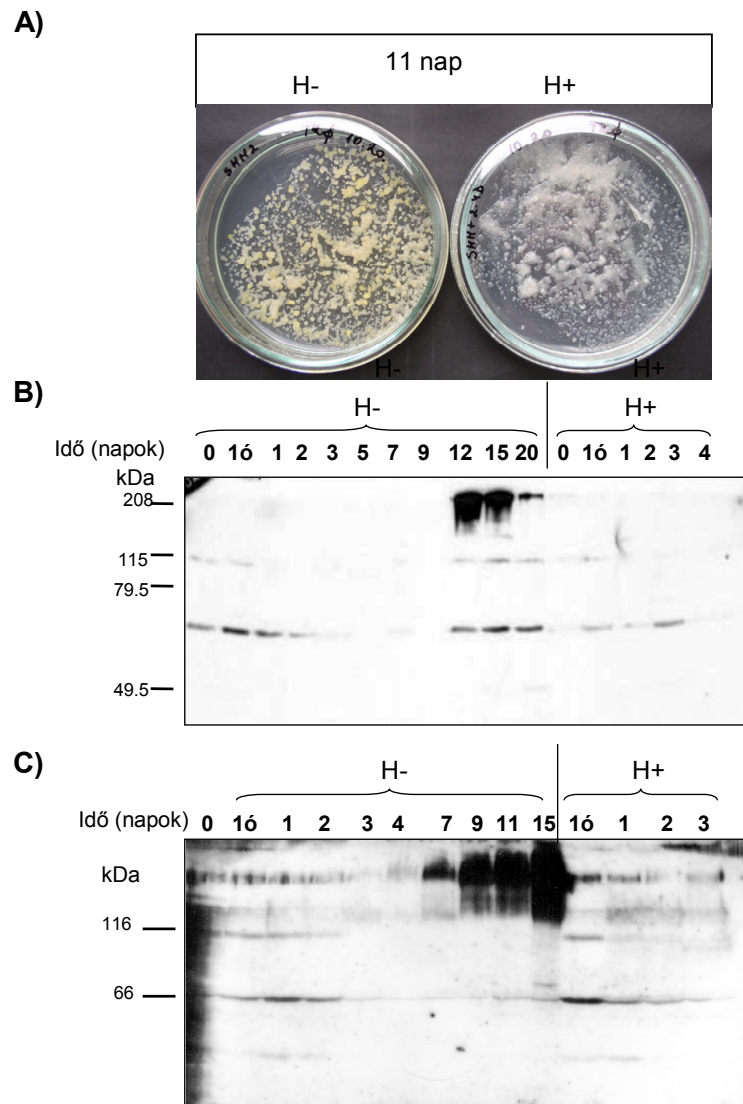
A továbbiakban megpróbáltuk differenciált sejteken is kimutatni az auxin hatását az RBR fehérje mennyiségére, de a vizsgálati objektumként használt lucerna gyökerekből nem sikerült detektálni a teljes méretű RBR fehérjét. Ugyanakkor a degradációnak vélt fehérje mérettartományban hormon koncentráció függő mennyiségi változásokat találtunk, ami közvetve a teljes RBR fehérje mennyiségi változásait is feltételezteti, és alátámasztja a növényekben az RBR fehérje szerepét a 2,4-D hormon kezelésre adott indukált válaszfolyamatokban.

5.2.5. Az RBR fehérje feltételezett módosulása *M. truncatula* kalluszk differenciálódása során

A szintetikus auxin RBR fehérjére gyakorolt hatásának vizsgálatát a közvetlen regenerációra képes *Medicago truncatula* sejtuszuspenzió segítségével folytattuk. A kísérlet során a sejtuszuspenzióban növesztett Mt-108-as kallusz sejteket 2,4-D

szintetikus auxint tartalmazó, illetve hormonmentes, regeneráló lemezre szélesztettük, majd a mintákat két héten keresztül gyűjtöttük. A 2,4-D-t tartalmazó táptalajon a sejtek néhány nap után elhaltak, a hormonmentes lemezekben a kalluszok növekedésnek indultak, közöttük néhányban megfigyeltük a differenciálódás az embriógenézis folyamatának elindulását (5.19. ábra /A). A megismételt kísérletek során mindkét esetben hasonló eredményt kaptunk az anti-RBR ellenanyaggal végzett immunoblotokkal (5.19. ábra /B,C). A lemezre szélesztés után mind a 2,4-D-t tartalmazó, mind a hormont nem tartalmazó mintákból származó teljes fehérjék extraktumában néhány nap múlva jelentősen lecsökkent az RBR fehérje mennyisége. Azonban a hormon nélküli táptalajon növesztett kalluszok valamivel több, mint egy hét után egy 150 kDa feletti széles sávban elhúzódó markánsan megjelenő, feltételezésünk szerint valamivel kapcsolódott, módosult RBR fehérje forma jelent meg. Első feltevésünk az volt, hogy az immunoblot képe alapján az RBR fehérje ubiquitinált módosulása történhetett. A fehérjék lebontásának az ubiquitin-közvetített proteolitikus folyamata fontos szereppel bír a növények életében is, többek között az auxin jelátviteli folyamatok szabályozásában [51, 118, 250].

A papillómavírus E7 onkoproteinjét kifejezve emberi sejtekben az pRB ubiquitin-közvetített proteolízis folyamatában bontódik le [292]. Ezért az ubiquitinációs módosulással kapcsolatos feltételezésünket kísérleti úton is próbáltuk megerősíteni. A fehérje mintákat ubiquitin ellenanyaggal is immunoblotoltuk, de nem kaptunk megerősítő választ. Sikertelenül azonban immunoprecipitálni a detektálható fehérjéket, ezért megpróbáltuk MALDI tömegspektrometriás analízissel meghatározni a feltételezett módosított RBR formákat is. Összesen 7 fehérje tartalmú gélelektroforézissel szeparált mintát vágtunk ki azonosításra a 200 kDa és a 70 kDa tömegtartomány között, amelyekből a 80 kDa körüli mintából egyértelmű növényi fehérjét azonosítottunk, a többi mintában többségében a csirke ellenanyag globulin fehérjéit sikerült kimutatni. A feltételezett módosult RBR fehérje mérettartományában nem volt megfelelően azonosítható növényi fehérje. Így az anti-RBR ellenanyaggal detektált a feltételezett módosult RBR fehérje azonosításához további kutatómunka szükséges.



5.19. ábra. *M. truncatula* regenerációs folyamatában megjelenő feltételezhetően módosított RBR fehérje detektálása.

A) A hormont nem tartalmazó, regeneráló illetve hormonos táptalajra szélesztett *Medicago truncatula* Mt-108 tenyészet. B) és C) A kísérlet során mintákat a lemez felületéről 1 óra után illetve a továbbiakban a jelzett időpontokban gyűjtöttünk. A poliakrilamid gélen szeparált egyenlő mennyiségű fehérje mintákat az anti-RBR ellenanyaggal immunoblotoltuk. A kiszélesztett *M. truncatula* szuszpenziót regeneráló, hormont nem tartalmazó SHM táptalajon (H-) illetve a 2 mg/l 2,4-D-t tartalmazó táptalajon növesztettük. A mintákkal szeparált molekulásúly markereket az ábrák bal oldalán jelöltük.

Az azonosított növényi fehérje a *Nicotiana benthamiana* Hsp90-1 hősokk fehérjével mutatott megbízhatóan nagy homológiát (Génbanki azonosító: 38154482). Az emberi pRB kölcsönható partnerei között is szerepel a hősokk fehérje (Hsp) képviselője. A Hsp75 fehérje szerepet játszik a hősokkot követő pRB stabilizálásában, és a kapcsolatnak köszönhetően a tripszines hasításra is

rezisztens lesz a pRB [30], míg az N-terminálisán kölcsönható Hsc73 feltehetően a nem foszforilált pRB fehérje formát stabilizálja [138]. Számos kísérlet igazolja, hogy a hősokk gének expressziója szorosan kapcsolódik a szomatikus embriógenézis folyamatához [65, 249]. Ráadásul a *Medicago sativa* sejt kultúrában rövid (100 μ M) 2,4-D koncentrációval indukált szomatikus embriógenézis során differenciálisan expresszálandó gének között azonosítására kerültek hősokk fehérjék génjei [109]. Ezért elképzelhető, hogy a tisztított lucerna hősokk fehérjének funkciója van az embriógenézis folyamatában az RBR fehérje stabilizálásával, amit esetleg éppen a feltételezett proteolitikus folyamattal szemben tölt be.

5.3. A CDK-k és a sejtciklus fázisok szabályozása lucernában

A növényi organogenezis során különböző mértékben differenciálódott sejtek, fejlődési programjuknak megfelelően pluripotens állapotú sejtekké alakulnak át. Ezen fejlődési program megvalósulásához a sejtosztódás finom szabályozására, a sejtciklus feltartóztatására vagy reaktivációjára, valamint differenciáció összehangolt működésére van szükség. A sejtciklus során a sejtnak ún. ellenőrzési pontokon kell átjutnia, ahol a sejtosztódási folyamat le is állhat. A növényi sejtekben három ellenőrzési pont ismert: a G1-fázisban, közvetlenül a G1/S-átmenet előtt (tápanyaghiány, hibás DNS), a G2-fázisban, az M-fázisba való átmenet előtt (inkomplett DNS-replikáció, hibás DNS) és a metafázis/anafázis átmenetnél, a testvérkromatidok elválása előtt (összekapcsolatlan kromoszómák). A ciklin-függő kinázok a ciklinekkel képzett komplexeikkel kulcs fontosságú szerepet játszanak a növények sejtosztódás szabályozásában [52, 140]. A növényi sejtciklus hormonális szabályozásáról, a CDK/ciklin komplexre gyakorolt molekuláris hatásmechanizmusokról az utóbbi években egyre több adat gyűlt össze [225]. Az A- és B-típusú CDK kinázok szerepét a sejtosztódási ciklus reaktiválódásában, a lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben vizsgáltuk. A G2/M fázishatár átmenetének molekuláris résztvevőinek vizsgálatát a bemutatott kettős-blokkolást alkalmazva lucerna A2 sejt szuszpenziós szinkronizálási rendszer segítségével tanulmányoztuk.

5.3.1. A lucerna levélprotoplaszt sejtek hormonfüggő sejtciklus reaktivációja

A használható módszerek közül a levélprotoplaszt rendszer jó lehetőséget ad a külsőleg alkalmazott növekedés szabályzók sejtosztódás aktivitására gyakorolt kutatásához [76]. A levélprotoplaszt eredetű differenciált sejtek homogén populációt alkotnak, ezért elfogadható egyszerű vizsgálati objektum mind a sejtbiológia mind a modern molekuláris metódusok számára. A protoplasztok optimális körülmények között a gyorsan megszintetizálják a sejtfalukat, és képesek osztódásra. Mindamellett a teljesen kiterjedt levelek relatív kevés endogén auxint és feltehetően citokinint tartalmaznak [171], így alkalmas vizsgálati objektumot szolgáltatnak az auxin/citokinin hatás elválasztott vizsgálatára.

5.3.1.1. Lucerna protoplasztok sejtciklus aktiválása auxin és kinetin hormon kombinációk hatására

A lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek jelentős hányada a tenyésztés harmadik napjára eléri a sejtciklus S fázisát auxin (2 mg/l 2,4-D), és citokinin (0,5 mg/l zeatin) jelenlétében, míg a negyedik napra már a sejtek 10-30%-a túljut legalább egy sejtosztódáson [215]. Auxin minden esetben szükséges a DNS replikációhoz, azonban a citokinin hiányában, egyes kísérletekben a sejtek 3-20%-át jutottak az S-fázisba, ugyanakkor a mitózis folyamata előtt megrekedtek a sejtciklusukban (5.20. ábra /A). Ha a csak auxint kapott tenyészethez a protoplasztálás után 48 órával citokinint adunk, a sejtek átjutnak a mitózison is ráadásul nagyobb szinkronitással, ami jelzi a sejtek valamikor egy mitózis előtti pontban történő megállását. Más kutatási eredmények alapján is a protoplasztok életképesek maradnak néhány napig hormonmentes tápoldatban, de az osztódásukhoz szükséges auxin és citokinin hozzáadása [27, 35, 276]. A dohány esetében az auxin és a citokinin is elengedhetetlen volt az S-fázis eléréséhez, [27, 35], amint a petúnia levélprotoplasztnál is [276], hasonlóan a dohány szárbél esetén [147, 303]. A dohány szuszpenziós sejt kultúrából származó protoplasztok [148] és a hormontól megvont dohány szuszpenziós sejtek esetében azonban a citokinin csak a mitózis lezárásához volt elengedhetetlen, míg a DNS szintézishez elég volt az auxin jelenléte [147, 303].

5.3.1.2. CDK aktivitás változás a lucerna levélprotoplaszt sejtciklus reaktivációja során

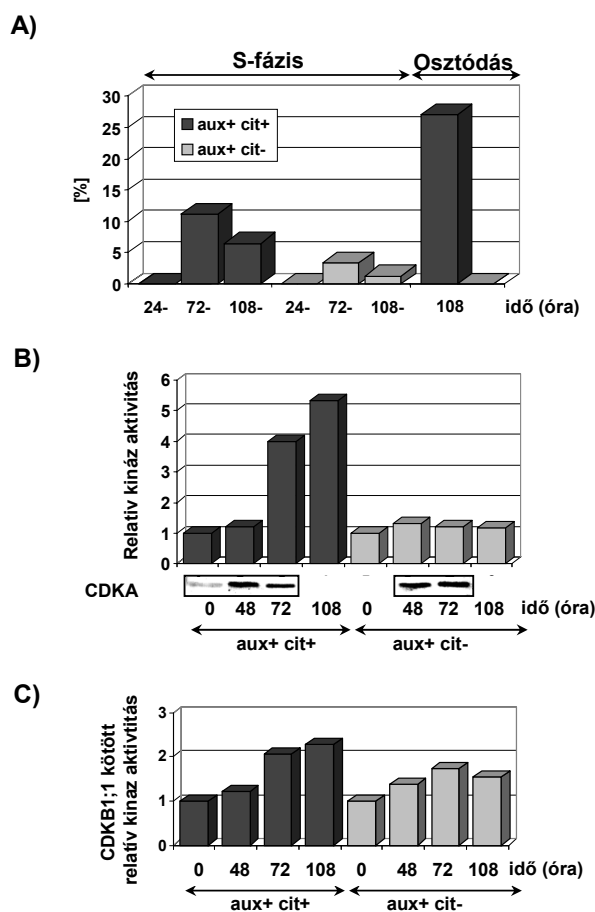
A lucernából izolált CDK kináz komplexek aktiválódásának időbeli sorrendjének megállapításához a sejtciklus reaktiválódása során, az immunoprecipitált kináz aktivitásokat vizsgáltuk. Az A-típusú lucerna CDK az S-fázis gyakoriságával együtt növekvő kináz aktivitást mutatott, kisebb növekedéssel, de a CDKB1;1 is hasonlóan aktiválódott [215]. A Medsa;CDKB2;1 kináz aktivitását a tenyésztés első négy napja alatt nem tudtuk detektálni, ami összhangban van az adott kináz M-fázis specifikus termelődésével [179, 191], és lásd a dolgozat későbbi 5.3.2. fejezetében. Az adatok alapján egyértelmű, hogy a CDKA kinázok aktivitása a legjellemzőbb a levélprotoplasztok sejtciklusba való belépésekor. Az immunoblot segítségével a CDKA fehérje szint vizsgálatokból megállapítottuk, hogy a frissen izolált protoplasztokban drasztikusan lecsökkent a CDKA fehérje szint (5.20. ábra /B, 5.21. /B).

Ennek oka feltételezhetően a protoplasztálás okozta stressz, a protoplasztálás mosási folyamata során az auxin elvonás és a transzkripció és transzláció mintázat átprogramozódása a dedifferenciálódás komplex folyamata során. A CDKA kináz függetlenül a citokinin hozzáadásától, 24 órával a protoplasztálás után jelent meg újra, amikor a dedifferenciálódott sejtek felkészültek a sejtciklusba lépésre [215]. Bár a CDKA fehérje a levélben is kimutatható, ott nincs számottevő hiszton kináz aktivitása (5.21. ábra /B). Az általunk megállapítottakhoz hasonló összefüggést tártak fel dohányban [27], míg a petúnia protoplasztok esetében mind az auxin, mind a citokinin jelenlétére szükség volt a CDKA gén kifejeződéséhez [276].

5.3.1.3. A citokinin szükséges a lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek osztódásához

Ahogy megállapítottuk, a lucerna levélprotoplaszt sejtek auxin nélkül nem osztódnak, sőt aktív CDK komplex sem volt immunoprecipitálható auxin nélküli tenyészetből, még citokinin jelenlétében sem. A sejtosztódáshoz az auxin mellett szükséges a citokinin, de az S-fázisba lépés megtörténhet külsőleg hozzáadott citokinin nélkül is. Ugyanakkor a kísérletek többségében a citokinin szükséges volt

a DNS replikációjához is (5.20. ábra). Abban az esetben, amikor a sejtek nagy része blokkolódott az S-fázis előtt, a citokinin hiánya esetén is hasonló mennyiségű CDKA fehérjét detektáltunk, miközben a hiszton kináz aktivitása jelentősen megemelkedett a citokinin-tartalmazó tenyészetben (5.20. ábra /B). Az azonos kísérletben a CDKB1;1 kináz aktivitása a citokinin-től függetlenül alig változott (5.20. ábra /C).



5.20. ábra. A lucerna levélprotoplaszt sejtek sejtosztódás és CDK aktivitásai auxin és/vagy citokinin hatására.

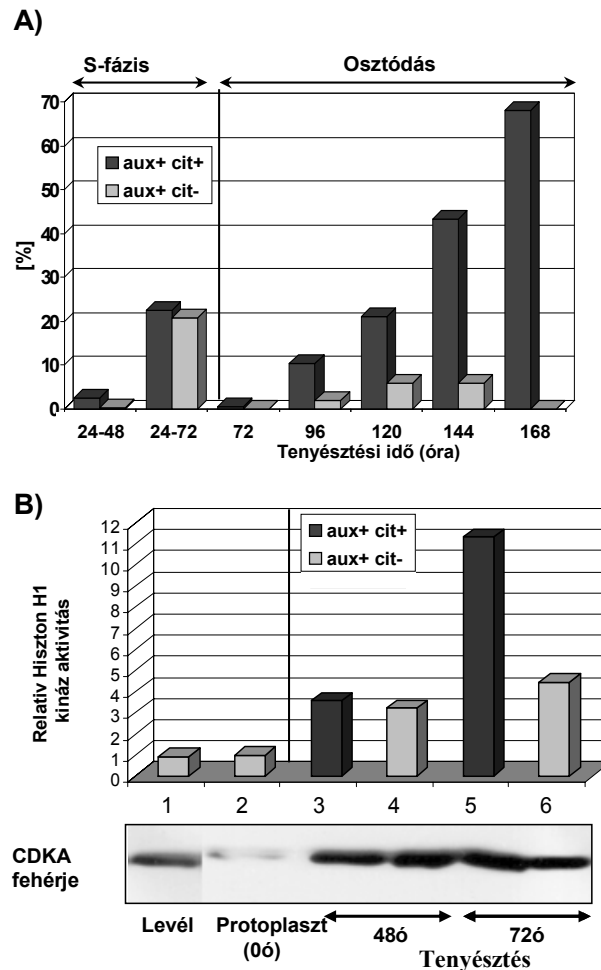
A) Sejtosztódási paraméterek a G1/S fázisátmenetben citokinin-t igénylő protoplaszt tenyészetben, az S-fázisos illetve az osztódott sejtek %-os eloszlása. Az S-fázisos sejtek gyakoriságát a sejtmagi DNS replikáció során történő BrdU beépülésen keresztül határoztuk meg a jelzett időpontoktól 6 órán keresztül. B) A CDKA1 kináz fehérje szintje és kináz aktivitása a vizsgált hormon-összetételű tenyészetek mintáiban. C) A CDKB1;1 kináz aktivitása a kísérlet azonos mintáiban. Hormonok : aux+ = 2 mg/l 2,4-D; cit+ = 0.5 mg/l zeatin. A fehérje szinteket specifikus ellenanyaggal detektáltuk. A CDKA és CDKB1;1 aktivitást immunoprecipitációt követően *in vitro* foszforilációval mértük radioaktív ATP jelenlétében hiszton H1 illetve topoizomeráz II C-terminálist használva szubsztrátnak. Az aktivitásokat a reakció poliakrilamid gélelektroforézises szeparálása után Phosphorimager berendezéssel mértük és az ImageQuant programmal értékeltük. Az aktivitási értékeket az ép levélben mérhető aktivitáshoz viszonyítottuk (relatív aktivitás).

Ez azt támasztja alá, hogy a citokinin hormonnak szerepe lehet a CDKA kináz komplex poszttranszlációs aktiválásában a G1/S fázis átmenet szabályozásában. Mivel a CDKB1;1 aktivitásának szabályozásában azonban nem feltételezhető hasonló citokinin funkció. Bizonyos esetekben azonban jelentős az S-fázisba belépő sejtek száma citokinin hiányos tenyészetben is (5.21. ábra). Ezekben a kísérletekben a sejtek az első mitózis előtt blokkolódtak (5.21. ábra /A).

Ha a sejtek citokinin hozzáadása nélkül is átjutottak az S-fázison a CDKA kináz aktivitása nagyobb mértékben emelkedett a citokinines mint a hiányos tenyészetekben, bár a CDKA fehérje mennyiségek ebben az esetben is megegyeztek (5.21. ábra /B). Ezek a megfigyelések alátámasztják a citokinin szerepét mind a G1/S mind a G2/M fázisban a lucerna levélprotoplaszt sejtekben. Mindemellett bizonyos esetekben a tenyészet, feltehetően a visszamaradt citokinin vagy citokinin-indukált fehérjének köszönhetően, átjut a G1/S fázisátmenet szabályozásában, elsősorban a sejtciklus reaktivációjával az osztódást nem mutató szuszpenziós sejt kultúrában a D-típusú ciklinek indukciójával, a lúdfűben az Arath;CycD3;1 esetében [84, 238]. A lúdfű mutánsok is a ciklin D3-citokinin kapcsolat mellett szólnak, ugyanis a citokinin túlermelő mutáns növényekben emelt szinten volt jelen a ciklin. A CYCD3 fehérjét konstitutívan termelő lúdfű mutánsok pedig, szemben a vad típusú növényekkel, kalluszképzéshez nem igényeltek citokinin [238].

Ahogy megfigyelték a dohány bélszövetében a p13Suc1 kötött CDK komplexek inaktívak maradnak, ha egyedül auxint alkalmaznak, a citokininrel együtt azonban a kötött komplexek aktíválódnak. Emellett citokinin G2/M átmenetben betöltött szerepe is bizonyított dohányban, ahol a G2-fázisban rekedtek meg a sejtek citokinin hiányában, csökkent CDK aktivitás mellett [303]. A citokinin kontrolálja a tirozin-defoszforilációját így aktiválja az A-típusú CDK-t egy funkcionális Cdc25 foszfatáz segítségével a mitózisban [302, 303]. Egyetértésben a mi jelen eredményeinkkel és más laborunkban is született tanulmányokkal úgy látszik, hogy az auxin elsősorban a CDK fehérje mennyiségének növekedését

indukálja, de az aktiválásához egy citokinin-közvetített defoszforilációs lépés szükséges [191, 302, 303].



5.21. ábra. Lucerna levélprotoplasztok osztódásához citokinin hormon szükséges.

A) Sejtosztódási paraméterek mitózishoz citokinit igénylő protoplasztokban. Hormonok: aux+ = 2 mg/l 2,4-D; cit+ = 0.5 mg/l zeatin. Az S-fázisos sejtek gyakoriságát a sejtmagi DNS replikáció során történő BrdU beépülésen keresztül határoztuk meg a jelzett időpontoktól 6 órán keresztül. B) A CDKA1 kináz fehérje szintje és kináz aktivitása a vizsgált hormon-összetételű tenyészetek jelzett időpontjaiban gyűjtött mintáiban. A CDKA fehérje szinteket ellenanyaggal detektáltuk. A CDKA kináz aktivitását immunoprecipitációt követően *in vitro* hiszton H1 foszforilációval mértük radioaktív ATP jelenlétében. Az aktivitásokat a reakciók poliakrilamid gélelektroforézises szeparálása után Phosphorimager berendezéssel mértük és az ImageQuant programmal értékeltük.

5.3.2. A lucerna CDK-k szabályozása a G2/M fázis határán

Csoportunk eredményei már több alkalommal demonstrálták, hogy a növény specifikus B-típusú CDK kinázok sejtciklus regulált expressziót mutatnak lucernában [179, 191]. A lucerna CDKB-k a szinkron sejtpopulációban G2 és M

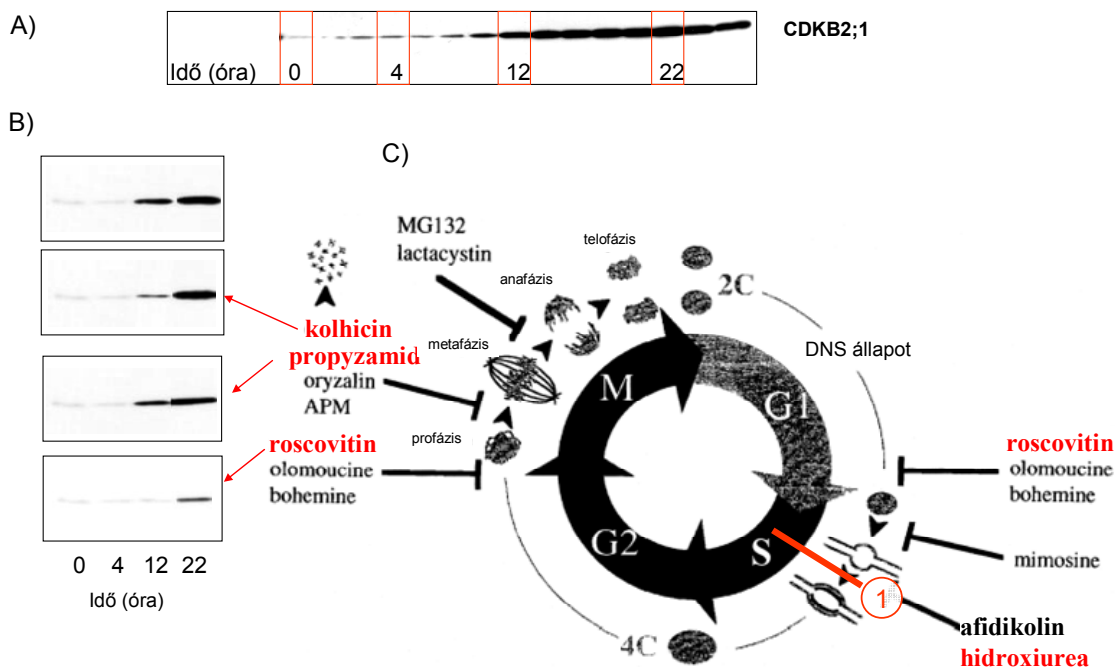
fázisos sejtekben mutatnak a kiemelkedő mRNS és fehérje szinteket, valamint hasonlóan kiugró kináz aktivitásokat [179, 191]. Ezek a megfigyelések jól egybeesnek a más fajokból származó eredményekkel [251, 280]. Szintén igazoltuk, hogy a PSTAIRE peptid motívumot hordozó A-típusú CDK konstitutív módon expresszálódik a ciklizáló sejtuszuspenzióban, de a kináz aktivitása a hozzá kapcsolódott komplexnek két csúcst ad a G1/S és G2/M fázishatároknál. A növényekben ezeknek megfelelően a mitózisba lépés ellenőrzése feltehetően több CDK kináz szabályozása alatt áll [139, 140, 179, 191].

5.3.2.1. A kettős blokkot alkalmazó szinkronizációs protokoll optimalizálása lucerna A2 sejtuszuspenzión

Annak érdekében, hogy közelebb jussunk a CDKB2;1 fehérje G2/M funkciójának pontosabb megismeréséhez, a fázis átmenet viszonyában pontosítani kívántuk a kináz termelődésének és az általa alkotott komplexek aktiválódásának jellemzését. Azt korábbi eredményeinkből már megállapítottuk, hogy a G2/M átmenetben blokkolt sejtekben a *Medsa;CDKB2;1* génről nem íródik át mRNS, így fehérje terméke és természetesen kapcsolódott kináz aktivitása sem detektálható [190]. A vizsgálatokhoz lucerna sejtuszuspenziós szinkronizálási módszerünket optimalizáltuk, melyben a megfelelő sorrendben elért ciklus blokkolások segítségével kívántuk részletesen specifikálni a *Medsa;CDKB2;1* mitotikus funkciójának időbeliségét. A blokkoláshoz fázis specifikus inhibitorokat alkalmaztunk, melyek alacsony koncentráció tartományban hatnak, a sejtosztódás meghatározott pontban történő megállításával. A CDK inhibitorok, mint a purin vázas roscovitin, két pontban blokkolják a BY-2 dohány sejtuszuspenziót: a G1/S és G2/M fázis átmenetben [221]. Ahhoz, hogy megfelelő szinkronitástú sejteket kapjunk a G2 és M fázis után, először a hidroxüreát, majd a kimosása után a specifikus mitotikus inhibitorokat (roscovitin, propizamid, kolhicin) alkalmazva blokkoltuk a lucerna sejtuszuspenziót. A különböző mitotikus fázisokban a kettős blokkolt szinkron technika segítségével megállapított *Medsa;CDKB2;1* fehérje mennyiségeket az 5.22. ábra /B része foglalja össze.

Ebben a szinkronizációs módszerben először megállítottuk a sejteket a G1/S fázis határán az általánosan használt hidroxürea segítségével (5.22. ábra /C). A

legjobb szinkronitás eléréséhez kezdetben optimalizáltuk a használandó inhibitor koncentrációt és a hozzáadás időzítését, valamint néhány technikai részlet kérdéseit. A hidroxürea kimosását követően a másodikként használt roscovitint különböző koncentrációban (25 μ M; 50 μ M; 100 μ M) és a mosást követően eltelt időközönként (2ó; 3ó; 4ó; 5ó) adtuk. A százalékos G1- S és G2 fázisos sejtek arányát a magok DNS tartalmának átfolyásos citometriával meghatározott adataiból számoltuk. A roscovitin G2/M átmenetben történő leghatásosabb blokkolási kombinációja a hidroxürea kimosást követő 2 órával alkalmazott 100 μ M koncentrációval adódott. A lúdfű sejtszuszpenzióban az 50 μ M roscovitin elegendő a sejtciklus leállításához [220].



5.22. ábra. A Medsa;CDKB2;1 fehérje expressziója a mitózis fázisaiban.

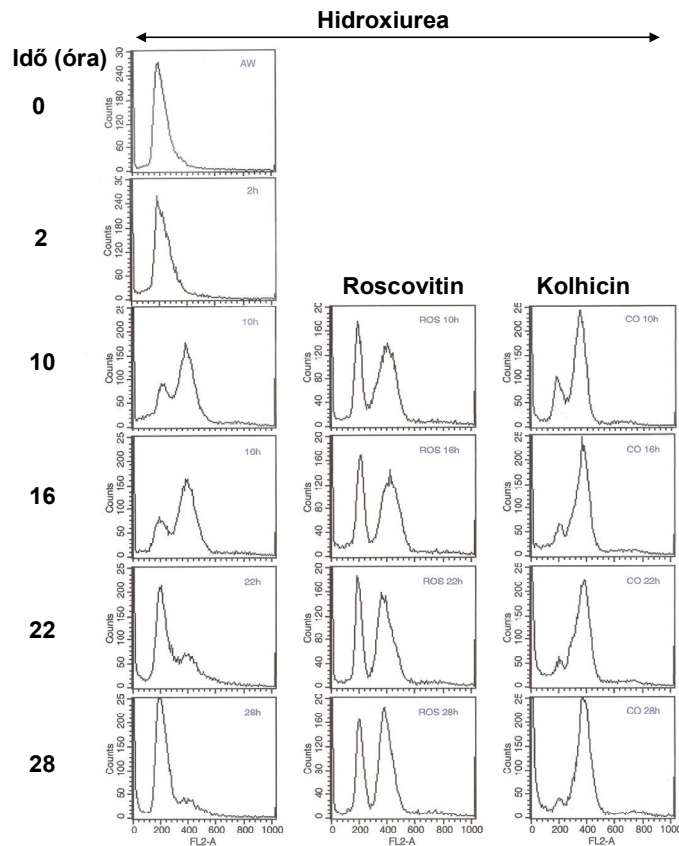
A) A Medsa;CDKB2;1 fehérje expressziós mintázata a 36 órás hidroxürea (10mM) szinkronizált lucerna sejtszuszpenzióban. A mintákat 2 óránként a jelzett időpontokban gyűjtöttük a hidroxürea kimosása után. B) A Medsa;CDKB2;1 fehérje sejtciklus fázis specifikus kifejeződést mutat a lucerna A2 kettős blokkolt sejtszuszpenzióban. A hidroxürea blokk kimosása után a másodikként alkalmazott inhibitorok: roscovitin (100 μ M) propizamide (5 μ M) vagy kolhicin (0,05 v%) A hidroxürea kimosását követően a jelzett időpontokban gyűjtöttük a minták. C) A sejtciklus kettős blokkolt szinkron módszerben használt inhibitorok és alkalmazásának sematikus ábrája.

Ha a hidroxürea kimosást követően később adtuk a roscovitint, a sejtciklus nem állt le a G2/M határán. Ez az adatok alapján azért történhetett, mert a sejtek addigra már átjutottak azon a G2/M szabályozási ponton, ahol a CDK kináz aktivitás szükséges a sejtciklus tovább haladásához. A BY-2 dohány sejteken

végzett kísérleti adatok is azt mutatták, hogy a metafázisban alkalmazott roscovitin már nem befolyásolta a sejtciklus előrehaladását egészen a G1-fázisig [221]. Így a továbbiakban lucerna sejtuszuspenziókon a mitózis fázisainak blokkolását, a legoptimálisabbnak talált fenti kísérleti módszerrel folytattuk, azaz a hidroxürea kimosását követően 2 órával adtuk a megfelelő következő mitotikus inhibitor.

A kettős blokkolt szinkronizációs eljárás során azt találtuk, hogy a roscovitin és az anti-tubulin szerek hatására a Medsa;CDKB2;1 kináz különböző expressziós szinteket mutatott (5.22. ábra). Ezek alapján megállapítható, hogy míg a G2/M határán a roscovitin blokkolt sejtekben nem jelent meg, a metafázisban blokkoló anti-tubulinok használatakor a sejtek fehérje mintáiban nagy mennyiségben kimutatható a B2-típusú kináz fehérje. Az előző kísérletben bemutatott eredményeink alapján a továbbiakban a mitotikus fázisokra koncentráltunk, hogy még részletesebb képet kapjunk mind a fehérje expressziójáról, mind a hozzá kapcsolódott kináz aktivitásokról. Ezért a következő hasonló kísérletben a mintákat a másodikként használt inhibitorok hozzáadása után 6 óránként, a sejtek feltételezeten M fázishoz érése után gyűjtöttük. A minták sejtmagjainak átfolyásos citometriával meghatározott DNS tartama az 5.23. ábra hisztogramjain látható. Az eredmények alapján az egyedül hidroxürea szinkronizált sejtek egyértelműen befejeztek egy sejtosztódási ciklust, míg a másodjára roscovitinnel vagy kolhicinnal blokkolt sejtpopulációk nem.

A 4C DNS mennyisége a roscovitin kezelt A2 szuszpenziós sejtek minden vizsgált mintájában meghatározó volt, ugyanakkor a 2C DNS-t tartalmazó sejtmagok is közel egy szinten maradtak. Ezek a sejtek feltehetően nem voltak képesek elhagyni azt a G1/S sejtciklus fázist, ahol a kezelés idejekor a CDK aktivitásra még szükség lett volna. A kolhicin kezelés esetében egyértelmű a 4C DNS tartalmú sejtmagok felhalmozódása a kísérlet során. A hidroxürea kimosását követő a 10. órában gyűjtött mintákban még közel hasonló a G2/M fázisos sejtek száma. Azonban a következő mintákban az egyedül hidroxüreaas blokkon átesett sejteknél jóval nagyobb a 4C DNS tartalmú sejtek száma. Ráadásul a G1-fázist reprezentáló DNS mennyisége a vizsgált kolhicin kezelt sejtekből majdnem teljesen eltűnik.

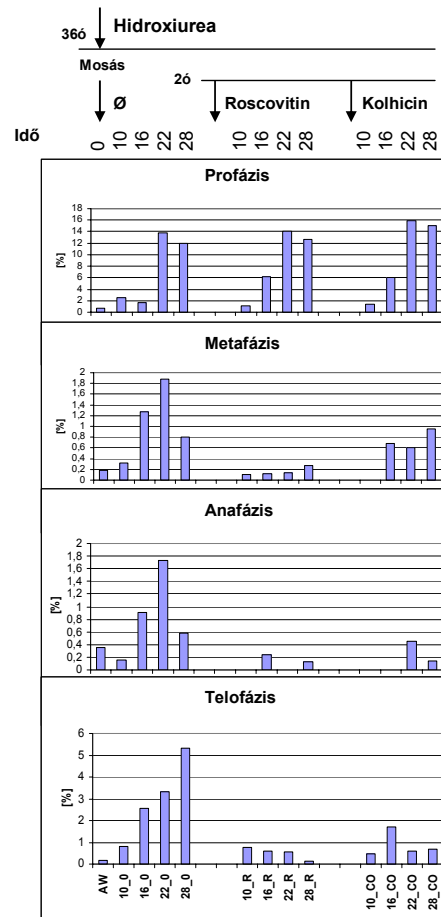


5.23. ábra. A kettős blokkolt szinkronizálási kísérlet áramlásos citometriai mérései.

A baloldalon jelzett időpontokban gyűjtött minták, az oszlopoknak megfelelően alkalmazott inhibitor kezelésekéből.

A bemutatott átfolyásos citometriával meghatározott eredmények megerősítéséhez és kiegészítéséhez meghatároztuk a különböző mitotikus fázisok százalékos eloszlását DAPI festett sejtek UV-mikroszkópos citológiai elemzésével. A részletes analízis alapján jó korrelációt találtunk az inhibitorok okozta gátlás, és a talált mitotikus sejtek fázisainak százalékos eloszlása között (5.24. ábra). A hidroxüurea szinkronizált mintákban az összes mitotikus fázis állapota megtalálható az egymás utániságnak megfelelő gyakoriságban. Nem emelkedett azonban szignifikánsan a metafázisos, illetve az azt követő fázisok aránya másodjára a roscovitin vagy kolhicin feltartott sejtekben. Az 5.24. ábra grafikonjain tisztán látható, hogy a megfigyelt mitózisok sejtek tömegét a profázisos képet mutató sejtmagok adták, a legmagasabb 16 százalékos értékkel. Arányaiban a legnagyobb profázisban mért eltérést a 16 órás mintákban találtunk. Mivel a hidroxüurea blokk után elengedett sejtek továbbjutottak a következő mitotikus

fázisokba a roscovitin és kolhicin kezelés hatására a sejtek azonban újra megakadtak a megfelelő blokkolási fázisokban. Mindamellett a roscovitin kezelt szuszpenzióban csak kezdeti profázisos magokat találtunk, a kolhicin kezelés nem akadályozta meg a metafázisos sejtek megjelenését sem.



5.24. ábra. A kettős blokkolt szinkronizált lucerna sejtek mitotikus eloszlásának részletes analízise.

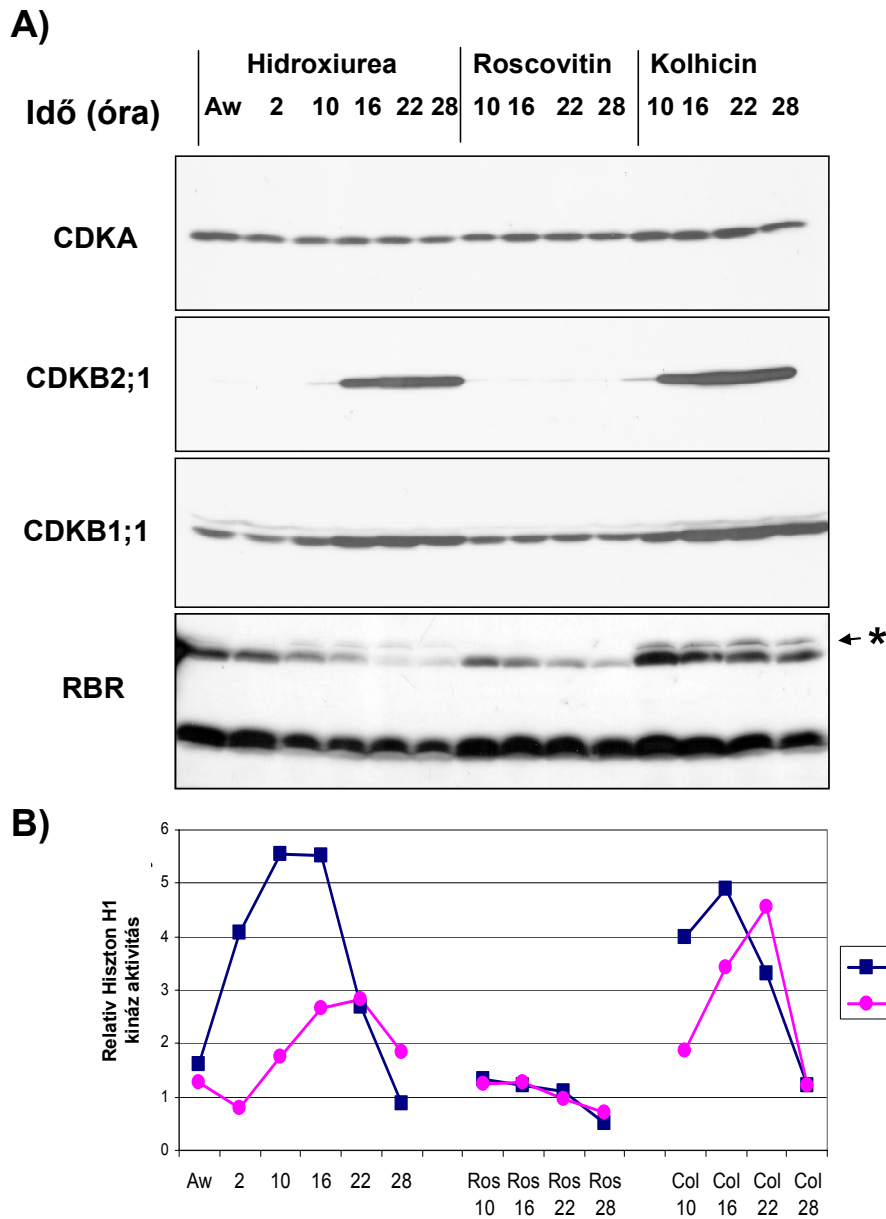
A sejtminék DAPI jelölt DNS mikroszkópos analízise alapján számolt százalékos eloszlása a mitózis fázisokban. A minék azonos kísérletről származnak, mint az 5.23. és 5.25. ábrákon bemutatottak. A minék sorrendjét az ábra tetején jeleztük.

Összegezve a mikroszkópos és az átfolyásos citometriával meghatározott megfigyeléseket az adott kísérleten azt mondhatjuk, hogy hidroxürea kimosása után adott roscovitin hatására a sejtek a G2/M fázis átmenetben blokkolódtak. A kolhicin kezelés esetében azonban a sejtek egyértelműen túljutottak a G2/M fázis határon, sőt elérhették a metafázis állapotáig is.

5.3.2.2. Medsa;CDKB2;1 fehérje termelése a G2/M ellenőrzési pont után elkezdődik

A következőkben immunoblot segítségével meghatároztuk a lucerna A- és B-típusú CDK-k mennyiségét az előzőekben jellemzett kísérlet fehérje mintáiban. Ahogy az 5.25. ábrán látható, a CDKA fehérje mennyisége alig ingadozott. A B-típusú CDK fehérjék expressziója a jól ismert módon változott a hidroxürea szinkron mintákban, míg ettől eltért a másodjára újra blokkolt sejtekben. Ezek az eredmények ismételtén alátámasztják a CDKB kinázok sejtciklus függő kifejeződését, és ebből adódó növényi sejtciklusban betöltött egyedi funkcióját. A CDKB2;1 fehérjének a legnyilvánvalóbb mennyiségi eltérése a roscovitin, illetve kolhicin blokkolt minták között látható (5.25. ábra).

Amíg a CDKB2;1 fehérje jelentősen felhalmozódott a kolhicin blokkolt sejtekben, nem mutatható ki a roscovitinnel korábbi fázisban megállított mintákban. A CDKB2 fehérje szintje a kolhicin kezelt mintákban magasabb, mint az egyedül a hidroxürea blokkból felszabadult későbbi mintákban. Ez azzal magyarázható, hogy CDKB2 fehérje a G2/M fázishatár átlépése után azonnal kifejeződik, mielőtt még a kolhicin okozta metafázisos blokk bekövetkezhetne a lucerna sejtszuszenzióban. Ehhez hasonlóan a Medsa;CDKB1;1 szintén jelentős expressziós eltérést mutatott a két különböző inhibitorral megállított sejtpopuláció között. Az eltérés mégsem olyan egyértelmű, mint a CDKB2;1 esetében, mivel a kifejeződése viszonylag magas volt az összes vizsgált mintában. Ez többek között azt is jelentheti, hogy a Medsa;CDKB1;1 valamivel korábban expresszálódik, vagy jóval kisebb az indukált fázisban az expresszió intenzitása, mint a Medsa;CDKB2;1 esetében a lucerna sejtszuszenziós kultúrában.



5.25. ábra. A Medsa;CDKB2;1 kináz fehérje és kötődött kináz aktivitásának vizsgálata a G2/M fázisokban.

A) Az 5.23. és 5.24 ábrában jellemzett azonos kísérletből származó fehérje minták immunoblot analízisei a baloldalon jelzett fehérjék ellenanyagaival. Azonos mennyiségű (100 µg) fehérjéket szeparáltunk az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével. A csillag a feltételezett hiperfoszforilációs formáját mutatja a retinoblasztóma-homológ fehérjének. B) Az immunoprecipitált CDKA és CDKB2;1 komplexeinek *in vitro* hiszton kináz aktivitásai. Az aktivitások kvantifikálását a poliakrilamid gélelektroforézis szeparálás után Phosphorimager és az ImageQuant program segítségével végeztük.

5.3.2.3. A Medsa;CDKB2;1 kináz aktiválódik a kolhicin blokkolt lucerna szuszpenziós sejtekben

Ahogy a bevezetőben részletezésre került, a CDK kinázok aktivitását sokféle szabályozó tényező befolyásolja. Az analizált mintákból immunoprecipitálás és kináz aktivitás méréssel megállapítottuk, hogy funkcionálisan aktív formában vannak-e jelen a kimutatható CDK fehérjék. A hidroxürea kimosása után kolhicinnel blokkolt mintákból magas hiszton kináz aktivitásokat tudtunk immunoprecipitálni mind az anti-CDKA, mind az anti-CDKB2;1 ellenanyaggal (5.25. ábra /B). Megállapítottuk, hogy mindkét CDK kináznak jelentős kináz aktivitása van a metafázisban blokkolt sejtekben. Ennek következtében a Medsa;CDKB2;1 nem csak mRNS és fehérje szinten fejeződik ki a G2/M fázis átmeneten átjutás után, hanem egyúttal jelentős hiszton kináz aktivitása is kialakul a mitózis azonos periódusában. A roscovitin blokkolt sejtekből a CDK kinázok nem mutattak kináz aktivitás növekedést. A CDKB2;1 esetében ezt a fehérje expressziójának hiányában könnyű megérteni. Azonban a sejtciklus során folyamatosan jelen levő CDKA esetében elképzelhető, hogy az alkalmazott roscovitin az *in vitro* kináz reakcióban is gátolt. De az is lehetséges, hogy a roscovitin kezelés a CDKA aktiválódásához szükséges tárgyalat egyes faktorokra (foszforiláció, ciklin) is negatívan hatott vissza.

Az szintén megállapítható, amint azt már korábban is bemutattuk, hogy a G2/M fázis átmenet határán az A-típusú kináz korábban aktiválódott, mint az anti-CDKB2;1 ellenanyaggal immunoprecipitált kináz komplex (5.25. ábra /B). Ugyanakkor ez a CDKA kötött kináz aktivitás korábban is kezd csökkenni, mint a CDKB2;1 kináz aktivitása, mind a normál hidroxürea szinkronizált mintákban mind a másodjára kolhicinnel blokkolt mintákban. Ezek az eredmények a CDKB2 kináz komplexnek a G2/M fázis átmenet utáni funkcióját támasztják alá, melyet a CDKA kináz aktiválódásának meg kell előznie.

Az RBR fehérje immunoblotos detektálásával további érdekes összefüggést találtunk a hiszton kináz aktivitások és az MsRBR1 feltételezett hiperfoszforilációs mintázatának megjelenése között (5.25. ábra /A). Ahogyan a roscovitin blokkolt sejtekben csak elenyésző hiszton kináz aktivitást mértünk, az RBR fehérje feltételezett hiperfoszforilációs jelét adó magasabb csíkot sem detektáltuk az

immunoblot során. Ez az eredmény is alátámasztani látszik a CDK kinázok szerepét a növényi retinoblasztóma-homológ foszforilációjában, ahogyan ezt az állatokban is igazolták [294]. Az eredményből szintén következtethető, hogy az RBR fehérje hiperfoszforiláltsága szükséges a lucernában a sejtek G2/M fázisba bejutásához.

Összegezve az eredményeket, elmondhatjuk, hogy a B2-típusú CDK lucerna kináz expressziója pontosan szabályozott, a fehérje a G2/M ellenőrzési pont elhagyása után gyorsan termelődik. Ugyanakkor a Medsa;CDKB2;1 fehérje kináz aktivitása a metafázisban blokkolt sejtekben szintén jelentősen megnő. Ezek az eredmények feltételezik, hogy ha szükséges is a CDKB2;1 kináz aktivitásához bármilyen poszttranszlációs modifikáció, az a G2/M fázis határának átlépésekor rögtön megtörténik. Emellett egy idő után, még ha a Medsa;CDKB2;1 fehérje szint magas is maradt a kolhicin blokkolt mintákban, az immunoprecipitált kináz aktivitása jelentősen visszaesett. Ez a megfigyelés szintén feltételezi a CDK2;1 további poszttranszlációs regulációját, amely lehet éppen a kapcsolódó ciklinek degradációjából adódó aktivitás csökkenése.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A megfelelően lejátszódó sejtosztódás alapja mind az egysejtű, mind az összetettebb organizmusok létének, szaporodásának. A sejtosztódás tüzetesebb megismerése egyaránt fontos a humán orvosgenetika és a növénybiológiai szempontjából, hiszen az emberiség számára termesztethető, elegendő mennyiségű és megfelelő minőségű növényi táplálék előállítása alapvető szükséglet. A növényi molekuláris biológia térhódítását bizonyítják az eddig erőfeszítések is, melyek a teljes növényi genomok megismerésére koncentráltak. Ez a fejlődés tette lehetővé, hogy az utóbbi két évtizedben a mikroszkópos megfigyelések adta lehetőségen túl, a növényi sejtciklus szabályozás kutatásában is tekintélyes ismeretanyag gyűlt össze, köszönhetően a molekuláris biológia folyamatosan bővülő eszköztárának.

A magasabbrendű növények morfológiája, sejtosztódásuk és differenciációjuk nagyfokú plaszticitása és helyhez kötött életmódjuk a vizsgált állati modell organizmusok molekuláris szabályozási folyamataihoz viszonyítva jelentős különbségekre enged következtetni. Az eddigi eredmények alapján azonban elmondható, hogy a sejtciklus szabályozásában a főbb résztvevő molekulák nagyfokú szekvenciális és funkcionális homológiát mutatnak az állatok és a növények közt, de a növény specifikus folyamatok szerepe vitathatatlan.

Csoportunkban sikerült többek között a gazdaságilag fontos, nitrogént kötő tulajdonságáról jól ismert pillangós virágú lucernából izolálni az állati sejtciklus szabályozásban megismert és legfontosabbaknak talált fehérjéket (ciklin-függő kinázokat, ciklineket, inhibitort), valamint további kulcsfontosságú szereppel bíró fehérjéket, mint a retinoblasztóma tumor szupresszor és E2F transzkripciósfaktorok homológjait. A kutatómunkánk során a lucerna sejtciklus szabályozásában az említett fehérjék funkciójának részletesebb megismerésére fókuszáltunk és a következőkben összefoglalt fontosabbnak vélt eredményekre jutottunk:

Kerestük, hogy milyen szerepük van a korábban élesztő kettős hibrid technikával izolált új típusú lucerna *Medtr;CYCD1;1* és *Medtr;CYCD6;1* ciklineknek a sejtciklus szabályozásában és mely CDK kinázokkal képezhetnek aktív komplexeket. Az élesztő kettős hibrid kísérleteink során sikerült igazolnunk lucerna D-típusú ciklin és CDK fehérje kölcsönhatásokat. A *Medtr;CYCD1;1* a B-típusú

CDK-kal mutatott erősebb kölcsönhatást, míg a Medtr;CYCD6;1 LxCxE RB-kötő motívumot nem tartalmazó ciklin egyértelműen csak a CDKA-val kapcsolódott az élesztő kettős-hibrid vizsgálatokban. A retikulosejt lizátum segítségével transzlált Medsa;CYCD3;1 ciklin kötődött a CDKA lucerna kinázhoz, miközben aktiválta is azt. A CYCD3;1 ciklin expressziós adatai alapján a CDKA G1/S fázisos aktiválásában lehet szerepe, melyet a szinkronizációs kísérleteinkben a GST-CYCD3;1 fúziós fehérjével kötött kináz aktivitások is alátámasztanak. A D-típusú ciklinek általában, ahogyan a Medtr;CYCD6;1 ciklinről is megállapítottuk, elsősorban az osztódó szövetekben halmozódik fel, ami sejtciklusban betöltött szerepére utal. Bár érdekes módon több más növényi D-típusú ciklinhez hasonlóan a fehérje mennyisége a sejtciklus fázisok során közel egyenlő marad.

In vitro foszforilációs kísérleteinkkel megállapítottuk, hogy a lucerna sejtszuspenzió teljes fehérje extraktumából specifikus ellenanyaggal kikötött CDKA, valamint a mitózisos CDKB2;1 komplexek képesek a lucerna retinoblasztóma-homológ (MsRBR1) fehérjét is foszforilálni.

A retinoblasztóma-homológ vizsgálatok az utóbbi években kiemelt figyelmet kaptak a növényi molekuláris kutatásokban. Kísérleteinkkel megerősítést nyert, hogy a lucerna retinoblasztóma-homológ (MsRBR1) fehérjének szerepe van a növényi sejtciklus szabályozásban. A megfelelő poliklonális ellenanyag segítségével lehetővé vált, hogy megvizsgáljuk a lucerna RBR fehérje mennyiségi változásait a sejtciklus egyes fázisaiban. A lucerna retinoblasztóma-homológ mennyiségét szinkronizált sejt kultúrában vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a sejtciklus S és G2/M fázisáig a fehérje mennyisége lassan nő, majd az M-fázistól egyértelműen visszaesik. Ugyanakkor mind a hidroxürea mind a kettős blokkolt szinkronizációs kísérletekből kapott eredményeink azt támasztják alá, hogy az MsRBR1 feltételezett hiperfoszforilációs formája is sejtciklus függő módon változik. Ennek az MsRBR1 formának a mennyisége az S-fázistól erősödik, és a késő G2/M szakasz után a következő ciklusig megmarad, ellentétben a csökkenő mennyiségű normál méretű MsRBR1 fehérjével. Így feltételezzük, hogy a retinoblasztóma-homológ foszforilációja hasonló szabályozó szerepet tölt be a növényi G1/S sejtciklusos átmenet szabályozásában, mint ahogy az már a humán pRB esetében megállapítást nyert.

Megvizsgáltuk, hogy egyes növényi hormonok hogyan hatnak az MsRBR1 fehérje mennyiségére. Mivel a lucerna retinoblasztóma-homológ detektálhatósága csak sejtszuszpenziós fehérje mintákban bizonyult megfelelőnek, ezért azt választottuk a kísérleteink elvégzéséhez vizsgálati objektumként. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az auxint tartalmazó és a hormonmentes tápoldatokban eltérő RBR fehérje detektálható, amely összefüggést mutat a szuszpenzió sejtciklusos aktivitással.

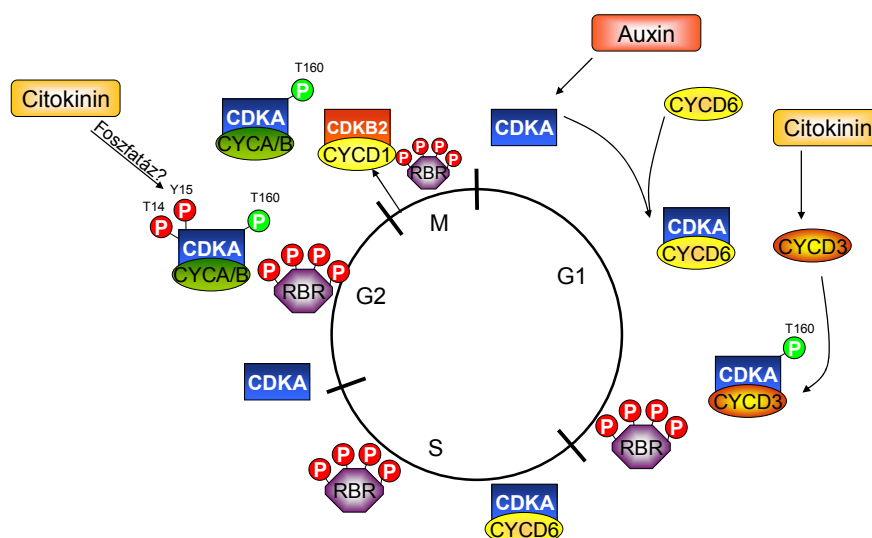
A lucerna RBR1 fehérje érdekes feltételezett modifikációját detektáltuk a *Medicago truncatula* R-108 mikrokallusz sejtenyészetében a hormonmentes táptalajon való növesztés hatására. Néhány nappal a szuszpenzió lemezre szélesztését követően lecsökkent a kimutatható RBR fehérje mennyisége, majd egy-másfél hét múlva megjelent egy erősen detektálható jel az immunoblotton a magasabb molekulású tartományban. Ez a modifikáció feltehetően az RBR fehérjének a kromoszóma átrendeződésben betöltött szabályozó szerepével kapcsolatos, amely a sejtek differenciálódási folyamata során nyilvánvaló. Ennek a feltételezett RBR fehérje modifikáció típusnak a megállapításához még további kutatómunka szükséges. Ugyanakkor az RBR ellenanyaggal immunoprecipitált mintákból sikerült a kölcsönhatók között azonosítanunk egy hősokk proteint, mely az ismert humán példának megfelelően feltehetően a retinoblasztóma fehérje stabilitásában játszhat szerepet.

Arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy milyen molekuláris folyamatok játszanak szerepet a hormon indukált sejtciklus reaktivációban lucerna levélprotoplaszt sejtek esetében, azaz a sejtek első osztódásának folyamán hogyan és mikor aktiválódnak a CDK fehérjék komplexei és ebben milyen szerepe van a vizsgált auxin és citokinin hormonoknak. A kísérleteinkből megállapítottuk, hogy az auxin nélkülözhetetlen a lucerna CDKA kináz szintéziséhez, míg a citokinin hozzáadása a reaktiválódott protoplaszt sejtek mitózisba való belépéséhez volt minden esetben elengedhetetlen.

A lucerna sejtszuszpenzió kettős blokkolós kombinált szinkronizációs technikáját alkalmazva, pedig megerősítettük, hogy a sejteknek szükségük van az aktív CDKA-ciklin komplexre a G2/M ellenőrzési ponton való átjutáshoz. Ezt követően a CDKB2;1 növény specifikus kináz a sejtek G2/M ellenőrzési ponton

való átjutásakor rögtön kifejeződik, miközben jelentős kináz aktivitásra is szert tesz, mely alátámasztja a kináz mitotikus funkcióját.

A lucerna sejtciklus reaktivációjában és szabályozásában szerepet játszó fehérjékkel kapcsolatos, a dolgozatban tárgyalt és legfontosabbnak vélt eredményeink összefoglalását a 6.1. ábra szemlélteti.



6.1. ábra. A dolgozatban tárgyalt saját eredményeink és a megértést szolgáló kapcsolódó ismereteknek, a lucerna sejtciklus szabályozásában szerepet játszó fehérjéivel kapcsolatos összefoglaló modellje.

A további részletek az összefoglalás fejezetben találhatóak. A sejtciklusos ábrában használt rövidítések: lucerna RBR1 (RBR), Medtr;CYCD1;1 (CYCD1), Medtr;CYCD6;1 (CYCD6;1), A-típusú lucerna CDK (CDKA), Medsa;CDKB2;1 (CDKB2), Medsa;CYCD3;1(CYCD3), A- és B-típusú ciklinek (CYCA/B). A piros körben "P" jelenti az inaktíváló foszforilációt, míg a zöld körben az aktiváló, a CDK-k esetében a jelzett konzervatív aminosav sorszámaival és egybetűs jelölésével.

7. FÜGGELÉK

7.1. Felhasznált irodalom

1. Ach, R.A., T. Durfee, A.B. Miller, P. Taranto, L. Hanley-Bowdoin, P.C. Zambryski, and W. Gruissem, (1997) *RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein*. Mol Cell Biol, **17**(9): p. 5077-86.
2. Ach, R.A., P. Taranto, and W. Gruissem, (1997) *A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals*. Plant Cell, **9**(9): p. 1595-606.
3. Albani, D., L. Mariconti, S. Ricagno, L. Pitto, C. Moroni, K. Helin, and R. Cella, (2000) *DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from Daucus carota*. J Biol Chem, **275**(25): p. 19258-67.
4. An, B. and Q.P. Dou, (1996) *Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate*. Cancer Res, **56**(3): p. 438-42.
5. Arguello-Astorga, G., L. Lopez-Ochoa, L.J. Kong, B.M. Orozco, S.B. Settlege, and L. Hanley-Bowdoin, (2004) *A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein*. J Virol, **78**(9): p. 4817-26.
6. Asahina, M., H. Iwai, A. Kikuchi, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, H. Kamada, and S. Satoh, (2002) *Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls*. Plant Physiol, **129**(1): p. 201-10.
7. Attwooll, C., E. Lazzerini Denchi, and K. Helin, (2004) *The E2F family: specific functions and overlapping interests*. Embo J, **23**(24): p. 4709-16.
8. Ausin, I., C. Alonso-Blanco, J.A. Jarillo, L. Ruiz-Garcia, and J.M. Martinez-Zapater, (2004) *Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein*. Nat Genet, **36**(2): p. 162-6.
9. Azimzadeh, J., J. Traas, and M. Pastuglia, (2001) *Molecular aspects of microtubule dynamics in plants*. Curr Opin Plant Biol, **4**(6): p. 513-9.
10. Barroco, R.M., L. De Veylder, Z. Magyar, G. Engler, D. Inze, and V. Mironov, (2003) *Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from Arabidopsis thaliana with a function unrelated to cell division*. Cell Mol Life Sci, **60**(2): p. 401-12.
11. Beeckman, T., S. Burssens, and D. Inze, (2001) *The peri-cell-cycle in Arabidopsis*. J Exp Bot, **52**(Spec Issue): p. 403-11.
12. Bell, C.J., R.A. Dixon, A.D. Farmer, R. Flores, J. Inman, R.A. Gonzales, M.J. Harrison, N.L. Paiva, A.D. Scott, J.W. Weller, and G.D. May, (2001) *The Medicago Genome Initiative: a model legume database*. Nucleic Acids Res, **29**(1): p. 114-7.
13. Bergounioux, C., C. Perennes, S.C. Brown, and P. Gadal, (1988) *Nuclear RNA quantification in protoplast cell-cycle phases*. Cytometry, **9**(1): p. 84-7.
14. Berleth, T., N.T. Krogan, and E. Scarpella, (2004) *Auxin signals--turning genes on and turning cells around*. Curr Opin Plant Biol, **7**(5): p. 553-63.
15. Bisova, K., D.M. Krylov, and J.G. Umen, (2005) *Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol, **137**(2): p. 475-91.
16. Blilou, I., F. Frugier, S. Folmer, O. Serralbo, V. Willemsen, H. Wolkenfelt, N.B. Eloy, P.C. Ferreira, P. Weisbeek, and B. Scheres, (2002) *The Arabidopsis HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation*. Genes Dev, **16**(19): p. 2566-75.
17. Boniotti, M.B. and C. Gutierrez, (2001) *A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex*. Plant J, **28**(3): p. 341-50.
18. Booher, R. and D. Beach, (1988) *Involvement of cdc13+ in mitotic control in Schizosaccharomyces pombe: possible interaction of the gene product with microtubules*. Embo J, **7**(8): p. 2321-7.
19. Boudolf, V., R. Barroco, A. Engler Jde, A. Verkest, T. Beeckman, M. Naudts, D. Inze, and L. De Veylder, (2004) *B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, **16**(4): p. 945-55.
20. Boudolf, V., S. Rombauts, M. Naudts, D. Inze, and L. De Veylder, (2001) *Identification of novel cyclin-dependent kinases interacting with the CKS1 protein of Arabidopsis*. J Exp Bot, **52**(359): p. 1381-2.

21. Boudolf, V., K. Vlieghe, G.T. Beemster, Z. Magyar, J.A. Torres Acosta, S. Maes, E. Van Der Schueren, D. Inze, and L. De Veylder, (2004) *The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis*. Plant Cell, **16**(10): p. 2683-92.
22. Bourne, Y., A.S. Arvai, S.L. Bernstein, M.H. Watson, S.I. Reed, J.E. Endicott, M.E. Noble, L.N. Johnson, and J.A. Tainer, (1995) *Crystal structure of the cell cycle-regulatory protein suc1 reveals a beta-hinge conformational switch*. Proc Natl Acad Sci U S A, **92**(22): p. 10232-6.
23. Boyer, S.N., D.E. Wazer, and V. Band, (1996) *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*. Cancer Res, **56**(20): p. 4620-4.
24. Breyne, P., R. Dreesen, K. Vandepoele, L. De Veylder, F. Van Breusegem, L. Callewaert, S. Rombauts, J. Raes, B. Cannoot, G. Engler, D. Inze, and M. Zabeau, (2002) *Transcriptome analysis during cell division in plants*. Proc Natl Acad Sci U S A, **99**(23): p. 14825-30.
25. Brizuela, L., G. Draetta, and D. Beach, (1987) *p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase*. Embo J, **6**(11): p. 3507-14.
26. Burssens, S., J. de Almeida Engler, T. Beeckman, C. Richard, O. Shaul, P. Ferreira, M. Van Montagu, and D. Inze, (2000) *Developmental expression of the Arabidopsis thaliana CycA2;1 gene*. Planta, **211**(5): p. 623-31.
27. Carle, S.A., G.W. Bates, and T.A. Shannon, (1998) *Hormonal Control of Gene Expression During Reactivation of the Cell Cycle in Tobacco Mesophyll Protoplasts*. Journal of Plant Growth Regulation, **17**(4): p. 221-230.
28. Casimiro, I., T. Beeckman, N. Graham, R. Bhalerao, H. Zhang, P. Casero, G. Sandberg, and M.J. Bennett, (2003) *Dissecting Arabidopsis lateral root development*. Trends Plant Sci, **8**(4): p. 165-71.
29. Chaudhury, A.M., L. Ming, C. Miller, S. Craig, E.S. Dennis, and W.J. Peacock, (1997) *Fertilization-independent seed development in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, **94**(8): p. 4223-8.
30. Chen, C.F., Y. Chen, K. Dai, P.L. Chen, D.J. Riley, and W.H. Lee, (1996) *A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock*. Mol Cell Biol, **16**(9): p. 4691-9.
31. Cheng, W.H., A. Endo, L. Zhou, J. Penney, H.C. Chen, A. Arroyo, P. Leon, E. Nambara, T. Asami, M. Seo, T. Koshiba, and J. Sheen, (2002) *A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions*. Plant Cell, **14**(11): p. 2723-43.
32. Clouse, S.D., (2002) *Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression*. Mol Cell, **10**(5): p. 973-82.
33. Cobrinik, D., (2005) *Pocket proteins and cell cycle control*. Oncogene, **24**(17): p. 2796-809.
34. Cockcroft, C.E., B.G. den Boer, J.M. Healy, and J.A. Murray, (2000) *Cyclin D control of growth rate in plants*. Nature, **405**(6786): p. 575-9.
35. Cooke, R. and Y. Meyer, (1981) *Hormonal control of tobacco protoplast nucleic acid metabolism during in vitro culture* Planta, **152**(1): p. 1-7.
36. Corellou, F., A. Camasses, L. Ligat, G. Peaucellier, and F.Y. Bouget, (2005) *Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase*. Plant Physiol, **138**(3): p. 1627-36.
37. Criqui, M.C., B. Plesse, A. Durr, J. Marbach, Y. Parmentier, E. Jamet, and J. Fleck, (1992) *Characterization of genes expressed in mesophyll protoplasts of Nicotiana glauca before the re-initiation of the DNA replicational activity*. Mech Dev, **38**(2): p. 121-32.
38. Criqui, M.C., M. Weingartner, A. Capron, Y. Parmentier, W.H. Shen, E. Heberle-Bors, L. Bogre, and P. Genschik, (2001) *Sub-cellular localisation of GFP-tagged tobacco mitotic cyclins during the cell cycle and after spindle checkpoint activation*. Plant J, **28**(5): p. 569-81.
39. Dahl, M., I. Meskiene, L. Bogre, D.T. Ha, I. Swoboda, R. Hubmann, H. Hirt, and E. Heberle-Bors, (1995) *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**(11): p. 1847-57.
40. Dan, H., H. Imaseki, G.O. Wasteneys, and H. Kazama, (2003) *Ethylene stimulates endoreduplication but inhibits cytokinesis in cucumber hypocotyl epidermis*. Plant Physiol, **133**(4): p. 1726-31.
41. De Bondt, H.L., J. Rosenblatt, J. Jancarik, H.D. Jones, D.O. Morgan, and S.H. Kim, (1993) *Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2*. Nature, **363**(6430): p. 595-602.

42. de Jager, S.M., S. Maughan, W. Dewitte, S. Scofield, and J.A. Murray, (2005) *The developmental context of cell-cycle control in plants*. Semin Cell Dev Biol, **16**(3): p. 385-96.
43. de Jager, S.M., M. Menges, U.M. Bauer, and J.A. Murra, (2001) *Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities*. Plant Mol Biol, **47**(4): p. 555-68.
44. de Jager, S.M. and J.A. Murray, (1999) *Retinoblastoma proteins in plants*. Plant Mol Biol, **41**(3): p. 295-9.
45. De Veylder, L., T. Beeckman, G.T. Beemster, J. de Almeida Engler, S. Ormenese, S. Maes, M. Naudts, E. Van Der Schueren, A. Jacqumard, G. Engler, and D. Inze, (2002) *Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor*. EMBO J, **21**(6): p. 1360-8.
46. De Veylder, L., G.T. Beemster, T. Beeckman, and D. Inze, (2001) *CKS1At overexpression in Arabidopsis thaliana inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression*. Plant J, **25**(6): p. 617-26.
47. De Veylder, L., J. de Almeida Engler, S. Burssens, A. Manevski, B. Lescure, M. Van Montagu, G. Engler, and D. Inze, (1999) *A new D-type cyclin of Arabidopsis thaliana expressed during lateral root primordia formation*. Planta, **208**(4): p. 453-62.
48. De Veylder, L., G. Segers, N. Glab, P. Casteels, M. Van Montagu, and D. Inze, (1997) *The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt*. FEBS Lett, **412**(3): p. 446-52.
49. del Pozo, J.C., M.B. Boniotti, and C. Gutierrez, (2002) *Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light*. Plant Cell, **14**(12): p. 3057-71.
50. del Pozo, J.C., S. Diaz-Trivino, N. Cisneros, and C. Gutierrez, (2006) *The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis*. Plant Cell, **18**(9): p. 2224-35.
51. del Pozo, J.C. and M. Estelle, (1999) *Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response*. Trends Plant Sci, **4**(3): p. 107-112.
52. Dewitte, W. and J.A. Murray, (2003) *The plant cell cycle*. Annu Rev Plant Biol, **54**: p. 235-64.
53. Dewitte, W., C. Riou-Khamlichi, S. Scofield, J.M. Healy, A. Jacqumard, N.J. Kilby, and J.A. Murray, (2003) *Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3*. Plant Cell, **15**(1): p. 79-92.
54. Dharmasiri, S., N. Dharmasiri, H. Hellmann, and M. Estelle, (2003) *The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in Arabidopsis*. EMBO J, **22**(8): p. 1762-70.
55. Dharmasiri, S. and M. Estelle, (2002) *The role of regulated protein degradation in auxin response*. Plant Mol Biol, **49**(3-4): p. 401-9.
56. Di Laurenzio, L., J. Wysocka-Diller, J.E. Malamy, L. Pysh, Y. Helariutta, G. Freshour, M.G. Hahn, K.A. Feldmann, and P.N. Benfey, (1996) *The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root*. Cell, **86**(3): p. 423-33.
57. Dimova, D.K. and N.J. Dyson, (2005) *The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces*. Oncogene, **24**(17): p. 2810-26.
58. Dobrev, P., V. Motyka, A. Gaudinova, J. Malbeck, A. Travnickova, M. Kaminek, and R. Vankova, (2002) *Transient accumulation of cis- and trans-zeatin type cytokinins and its relation to cytokinin oxidase activity during cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells*. **40**(4): p. 333-337.
59. Doonan, J. and T. Hunt, (1996) *Cell cycle. Why don't plants get cancer?* Nature, **380**(6574): p. 481-2.
60. Doostzadeh-Cizeron, J., R. Evans, S. Yin, and D.W. Goodrich, (1999) *Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is inhibited by association with Rb protein*. Mol Biol Cell, **10**(10): p. 3251-61.
61. Du, W. and J. Pogoriler, (2006) *Retinoblastoma family genes*. Oncogene, **25**(38): p. 5190-200.
62. Dudits, D., L. Bogre, and J. Gyorgyey, (1991) *Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro*. J Cell Sci, **99**: p. 475-484.
63. Dudits, D., M. Cserháti, P. Miskolczi, and G.V. Horváth, (2007) *The growing family of plant cyclin-dependant kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation*, in *Cell Cycle Control and Plant Development*, D. Inzé, Editor. Blackwell Publishing, UK ISBN: 9781405150439: Oxford. p. 384.

64. **Dudits, D. and A. Fehér,** (2004) *Mitosis*, in *Encyclopedia of Plant and Crop Science*, R.M. Goodman, Editor. Marcel Dekker Inc.: New York. p. 734-739.
65. **Dudits, D., J. Györgyey, L. Bögre, and L. Bakó,** (1995) *Molecular Biology of Somatic Embryogenesis*. In *Vitro Embryogenesis in Plants*, ed. T.A. Thorpe. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. 267-308.
66. **Durfee, T., K. Becherer, P.L. Chen, S.H. Yeh, Y. Yang, A.E. Kilburn, W.H. Lee, and S.J. Elledge,** (1993) *The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit*. *Genes Dev*, **7**(4): p. 555-69.
67. **Durfee, T., H.S. Feiler, and W. Gruissem,** (2000) *Retinoblastoma-related proteins in plants: homologues or orthologues of their metazoan counterparts?* *Plant Mol Biol*, **43**(5-6): p. 635-42.
68. **Durfee, T., M.A. Mancini, D. Jones, S.J. Elledge, and W.H. Lee,** (1994) *The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that co-localizes to centers for RNA processing*. *J Cell Biol*, **127**(3): p. 609-22.
69. **Dyson, N., P.M. Howley, K. Munger, and E. Harlow,** (1989) *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. *Science*, **243**(4893): p. 934-7.
70. **Ebel, C., L. Mariconti, and W. Gruissem,** (2004) *Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte*. *Nature*, **429**(6993): p. 776-80.
71. **Elliott, R.C., A.S. Betzner, E. Huttner, M.P. Oakes, W.Q. Tucker, D. Gerentes, P. Perez, and D.R. Smyth,** (1996) *AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth*. *Plant Cell*, **8**(2): p. 155-68.
72. **Evans, T., E.T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, and T. Hunt,** (1983) *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. *Cell*, **33**(2): p. 389-96.
73. **Ewen, M.E., H.K. Sluss, C.J. Sherr, H. Matsushime, J. Kato, and D.M. Livingston,** (1993) *Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins*. *Cell*, **73**(3): p. 487-97.
74. **Ewen, M.E., Y.G. Xing, J.B. Lawrence, and D.M. Livingston,** (1991) *Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein*. *Cell*, **66**(6): p. 1155-64.
75. **Fabian, T., R. Lorbietke, M. Umeda, and M. Sauter,** (2000) *The cell cycle genes cycA1;1 and cdc2Os-3 are coordinately regulated by gibberellin in planta*. *Planta*, **211**(3): p. 376-83.
76. **Fehér, A. and D. Dudits,** (1994) *Plant protoplast for cell fusion and direct DNA uptake: culture and regeneration systems*. *Plant Cell and Tissue Culture*, ed. I.K. Vasile and T.A. Thorpe. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. 71-118.
77. **Feliciello, I. and G. Chinali,** (1993) *A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli*. *Anal Biochem*, **212**(2): p. 394-401.
78. **Ferreira, P.C., A.S. Hemerly, R. Villarroel, M. Van Montagu, and D. Inze,** (1991) *The Arabidopsis functional homolog of the p34cdc2 protein kinase*. *Plant Cell*, **3**(5): p. 531-40.
79. **Fingrut, O. and E. Flescher,** (2002) *Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells*. *Leukemia*, **16**(4): p. 608-16.
80. **Finkelstein, R.R. and T.J. Lynch,** (2000) *The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor*. *Plant Cell*, **12**(4): p. 599-609.
81. **Flemming, W. Zellschlag, Kern, and Zelltheilung,** (1882). FCW Vogel. Leipzig.
82. **Fobert, P.R., V. Gaudin, P. Lunness, E.S. Coen, and J.H. Doonan,** (1996) *Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants*. *Plant Cell*, **8**(9): p. 1465-76.
83. **Frugis, G. and N.H. Chua,** (2002) *Ubiquitin-mediated proteolysis in plant hormone signal transduction*. *Trends Cell Biol*, **12**(7): p. 308-11.
84. **Fuerst, R.A., R. Soni, J.A. Murray, and K. Lindsey,** (1996) *Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **112**(3): p. 1023-33.
85. **Fülöp, K., A. Pettko-Szandtner, Z. Magyar, P. Miskolczi, E. Kondorosi, D. Dudits, and L. Bakó,** (2005) *The Medicago CDKC1-CYCLINT1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription*. *Plant J*, **42**(6): p. 810-20.
86. **Gage, D.J.,** (2004) *Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**(2): p. 280-300.

87. Galbraith, D.W., K.R. Harkins, J.M. Maddox, N.M. Ayres, D.P. Sharma, and E. Firoozabadi, (1983) *Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues*. Science, **220**(4601): p. 1049-1051.
88. Galun, E., (1981) *Plant Protoplasts as Physiological Tools*. Annu Rev Plant Physiology, **32**: p. 237-266.
89. Gan, S. and R.M. Amasino, (1995) *Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin*. Science, **270**(5244): p. 1986-8.
90. Gaudin, V., P.A. Lunness, P.R. Fobert, M. Towers, C. Riou-Khamlichi, J.A. Murray, E. Coen, and J.H. Doonan, (2000) *The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene*. Plant Physiol, **122**(4): p. 1137-48.
91. Gautier, J., J. Minshull, M. Lohka, M. Glotzer, T. Hunt, and J.L. Maller, (1990) *Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus*. Cell, **60**(3): p. 487-94.
92. Gautier, J., C. Norbury, M. Lohka, P. Nurse, and J. Maller, (1988) *Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+*. Cell, **54**(3): p. 433-9.
93. Gazzarrini, S. and P. McCourt, (2003) *Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us*. Ann Bot (Lond), **91**(6): p. 605-12.
94. Genovese, C., D. Trani, M. Caputi, and P.P. Claudio, (2006) *Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family*. Oncogene, **25**(38): p. 5201-9.
95. Genshik, P., M.C. Criqui, Y. Parmentier, A. Derevier, and J. Fleck, (1998) *Cell cycle -dependent proteolysis in plants. Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132*. Plant Cell, **10**(12): p. 2063-76.
96. Gonzalez, S.L., M. Stremlau, X. He, J.R. Basile, and K. Munger, (2001) *Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7*. J Virol, **75**(16): p. 7583-91.
97. Gordon-Kamm, W., B.P. Dilkes, K. Lowe, G. Hoerster, X. Sun, M. Ross, L. Church, C. Bunde, J. Farrell, P. Hill, S. Maddock, J. Snyder, L. Sykes, Z. Li, Y.M. Woo, D. Bidney, and B.A. Larkins, (2002) *Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, **99**(18): p. 11975-80.
98. Grafi, G. and Y. Avivi, (2004) *Stem cells: a lesson from dedifferentiation*. Trends Biotechnol, **22**(8): p. 388-9.
99. Grafi, G., R.J. Burnett, T. Helentjaris, B.A. Larkins, J.A. DeCaprio, W.R. Sellers, and W.G. Kaelin, Jr., (1996) *A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication*. Proc Natl Acad Sci U S A, **93**(17): p. 8962-7.
100. Gray, W.M., (2004) *Hormonal regulation of plant growth and development*. PLoS Biol, **2**(9): p. E311.
101. Gray, W.M. and I. Estelle, (2000) *Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response*. Trends Biochem Sci, **25**(3): p. 133-8.
102. Gray, W.M., S. Kepinski, D. Rouse, O. Leyser, and M. Estelle, (2001) *Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins*. Nature, **414**(6861): p. 271-6.
103. Grosset, J., I. Marty, Y. Chartier, and Y. Meyer, (1990) *mRNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound-inducible*. Plant Mol Biol, **15**(3): p. 485-96.
104. Grossniklaus, U., C. Spillane, D.R. Page, and C. Kohler, (2001) *Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex*. Curr Opin Plant Biol, **4**(1): p. 21-7.
105. Guitton, A.E. and F. Berger, (2005) *Loss of function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 produces nonviable parthenogenetic embryos in Arabidopsis*. Curr Biol, **15**(8): p. 750-4.
106. Gutierrez, C., (2000) *Geminiviruses and the plant cell cycle*. Plant Mol Biol, **43**(5-6): p. 763-72.
107. Gutierrez, C., (2005) *Coupling cell proliferation and development in plants*. Nat Cell Biol, **7**(6): p. 535-41.
108. Gutierrez, C., E. Ramirez-Parra, M. Mar Castellano, A.P. Sanz-Burgos, A. Luque, and R. Missich, (2004) *Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions*. Vet Microbiol, **98**(2): p. 111-9.
109. Györgyey, J., A. Gartner, K. Nemeth, Z. Magyar, H. Hirt, E. Heberle-Bors, and D. Dudits, (1991) *Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis*. Plant Mol Biol, **16**: p. 999-1007.

110. **Györgyey, J., D. Vaubert, J.I. Jimenez-Zurdo, C. Charon, L. Troussard, A. Kondorosi, and E. Kondorosi,** (2000) *Analysis of Medicago truncatula nodule expressed sequence tags*. Mol Plant Microbe Interact, **13**: p. 62-71.
111. **Hagan, I., J. Hayles, and P. Nurse,** (1988) *Cloning and sequencing of the cyclin-related cdc13+ gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis*. J Cell Sci, **91 (Pt 4)**: p. 587-95.
112. **Hall, T.A.,** (1999) *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acids. Symp. Ser., **41**: p. 95-98.
113. **Harbour, J.W. and D.C. Dean,** (2000) *Chromatin remodeling and Rb activity*. Curr Opin Cell Biol, **12**(6): p. 685-9.
114. **Hare, P.D., H.S. Seo, J.Y. Yang, and N.H. Chua,** (2003) *Modulation of sensitivity and selectivity in plant signaling by proteasomal destabilization*. Curr Opin Plant Biol, **6**(5): p. 453-62.
115. **Harlow, E. and D. Lane,** (1988) *Anibodies: a laboratory manual*: Cold Spring Harbour Laboratory.
116. **Hartig, K. and E. Beck,** (2005) *Assessment of lovastatin application as tool in probing cytokinin-mediated cell cycle regulation*. Physiologia Plantarum, **125**(2): p. 260-267.
117. **Hartig, K. and E. Beck,** (2005) *Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells*. Plant Biol (Stuttg), **7**(1): p. 33-40.
118. **Hartig, K. and E. Beck,** (2006) *Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle*. Plant Biol (Stuttg), **8**(3): p. 389-96.
119. **Hartwell, L.H. and T.A. Weinert,** (1989) *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events*. Science, **246**(4930): p. 629-34.
120. **Hayles, J., S. Aves, and P. Nurse,** (1986) *sucl is an essential gene involved in both the cell cycle and growth in fission yeast*. Embo J, **5**(12): p. 3373-3379.
121. **Hayles, J., D. Beach, B. Durkacz, and P. Nurse,** (1986) *The fission yeast cell cycle control gene cdc2: isolation of a sequence sucl that suppresses cdc2 mutant function*. Mol Gen Genet, **202**(2): p. 291-3.
122. **Healy, J.M., M. Menges, J.H. Doonan, and J.A. Murray,** (2001) *The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled*. J Biol Chem, **276**(10): p. 7041-7.
123. **Hemerly, A., A. Engler Jde, C. Bergounioux, M. Van Montagu, G. Engler, D. Inze, and P. Ferreira,** (1995) *Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development*. EMBO J, **14**(16): p. 3925-36.
124. **Hemerly, A.S., P. Ferreira, J. de Almeida Engler, M. Van Montagu, G. Engler, and D. Inze,** (1993) *cdc2a expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division*. Plant Cell, **5**(12): p. 1711-23.
125. **Himanen, K., E. Boucheron, S. Vanneste, J. de Almeida Engler, D. Inze, and T. Beeckman,** (2002) *Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation*. Plant Cell, **14**(10): p. 2339-51.
126. **Himanen, K., M. Vuylsteke, S. Vanneste, S. Vercruysse, E. Boucheron, P. Alard, D. Chriqui, M. Van Montagu, D. Inze, and T. Beeckman,** (2004) *Transcript profiling of early lateral root initiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, **101**(14): p. 5146-51.
127. **Hirayama, T., Y. Imajuku, T. Anai, M. Matsui, and A. Oka,** (1991) *Identification of two cell-cycle-controlling cdc2 gene homologs in Arabidopsis thaliana*. Gene, **105**(2): p. 159-65.
128. **Hirt, H., A. Pay, J. Györgyey, L. Bakó, K. Németh, L. Bögre, R.J. Schweyen, E. Heberle-Bors, and D. Dudits,** (1991) *Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2*. Proc Natl Acad Sci U S A, **88**(5): p. 1636-40.
129. **Hobbie, L. and M. Estelle,** (1994) *Genetic approaches to auxin action*. Plant Cell Environ, **17**(6): p. 525-40.
130. **Horvath, G.V., A. Pettko-Szandtner, K. Nikovics, M. Bilgin, M. Boulton, J.W. Davies, C. Gutierrez, and D. Dudits,** (1998) *Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis*. Plant Mol Biol, **38**(5): p. 699-712.
131. **Houssa, C., G. Bernier, A. Pielain, J. Kinet, and A. Jacquard,** (1994) *Activation of latent DNA-replication origins: a universal effect of cytokinins*. Planta, **193**(2): p. 247-250.
132. **Howell, S.H., S. Lall, and P. Che,** (2003) *Cytokinins and shoot development*. Trends Plant Sci, **8**(9): p. 453-9.
133. **Hsieh, J.K., F.S. Chan, D.J. O'Connor, S. Mittnacht, S. Zhong, and X. Lu,** (1999) *RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2*. Mol Cell, **3**(2): p. 181-93.

134. **Hu, Y., F. Bao, and J. Li,** (2000) *Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis.* Plant J, **24**(5): p. 693-701.
135. **Huang, S., N.P. Wang, B.Y. Tseng, W.H. Lee, and E.H. Lee,** (1990) *Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen.* EMBO J, **9**(6): p. 1815-22.
136. **Huntley, R., S. Healy, D. Freeman, P. Lavender, S. de Jager, J. Greenwood, J. Makker, E. Walker, M. Jackman, Q. Xie, A.J. Bannister, T. Kouzarides, C. Gutierrez, J.H. Doonan, and J.A. Murray,** (1998) *The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins.* Plant Mol Biol, **37**(1): p. 155-69.
137. **Hwang, I. and J. Sheen,** (2001) *Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction.* Nature, **413**(6854): p. 383-9.
138. **Inoue, A., T. Torigoe, K. Sogahata, K. Kamiguchi, S. Takahashi, Y. Sawada, M. Saijo, Y. Taya, S. Ishii, N. Sato, and K. Kikuchi,** (1995) *70-kDa heat shock cognate protein interacts directly with the N-terminal region of the retinoblastoma gene product pRb. Identification of a novel region of pRb-mediating protein interaction.* J Biol Chem, **270**(38): p. 22571-6.
139. **Inze, D.,** (2005) *Green light for the cell cycle.* EMBO J, **24**(4): p. 657-62.
140. **Inze, D. and L. De Veylder,** (2006) *Cell cycle regulation in plant development (1).* Annu Rev Genet, **40**: p. 77-105.
141. **Ito, M.,** (2000) *Factors controlling cyclin B expression.* Plant Mol Biol, **43**(5-6): p. 677-90.
142. **Iwakawa, H., A. Shinmyo, and M. Sekine,** (2006) *Arabidopsis CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis.* Plant J, **45**(5): p. 819-31.
143. **James, P., J. Halladay, and E.A. Craig,** (1996) *Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast.* Genetics, **144**(4): p. 1425-36.
144. **Jang, J.S. and Y.H. Choi,** (1999) *Proteolytic degradation of the retinoblastoma family protein p107: A putative cooperative role of calpain and proteasome.* Int J Mol Med, **4**(5): p. 487-92.
145. **Jeffrey, P.D., A.A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague, and N.P. Pavletich,** (1995) *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex.* Nature, **376**(6538): p. 313-20.
146. **John, P., K. Zhang, C. Dong, L. Diederich, and F. Wightman,** (1993) *P34-cdc2 related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin.* Australian Journal of Plant Physiology, **20**: p. 503-526.
147. **John, P.C.,** (1996) *The plant cell cycle: conserved and unique features in mitotic control.* Prog Cell Cycle Res, **2**: p. 59-72.
148. **Jouanneau, J.P. and N. Tandeau de Marsac,** (1973) *Stepwise effects of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially synchronized tobacco cells.* Exp Cell Res, **77**(1): p. 167-74.
149. **Joubes, J., C. Chevalier, D. Dudits, E. Heberle-Bors, D. Inze, M. Umeda, and J.P. Renaudi,** (2000) *CDK-related protein kinases in plants.* Plant Mol Biol, **43**(5-6): p. 607-20.
150. **Joubes, J., K. De Schutter, A. Verkest, D. Inze, and L. De Veylder,** (2004) *Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures.* Plant J, **37**(6): p. 889-96.
151. **Joubes, J., M. Lemaire-Chamley, F. Delmas, J. Walter, M. Hernould, A. Mouras, P. Raymond, and C. Chevalier,** (2001) *A new C-type cyclin-dependent kinase from tomato expressed in dividing tissues does not interact with mitotic and G1 cyclins.* Plant Physiol, **126**(4): p. 1403-15.
152. **Kakimoto, T.,** (2003) *Perception and signal transduction of cytokinins.* Annu Rev Plant Biol, **54**: p. 605-27.
153. **Kao, K.N. and M.R. Michayluk,** (1980) *Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa.* Z Pflanzenphysiol, **96**: p. 135-141.
154. **Kawamura, K., J.A. Murray, A. Shinmyo, and M. Sekine,** (2006) *Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro.* Plant Mol Biol, **61**(1-2): p. 311-27.
155. **Kazama, H., H. Dan, H. Imaseki, and G.O. Wasteneys,** (2004) *Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl epidermal cells.* Plant Physiol, **134**(4): p. 1614-23.
156. **Khidr, L. and P.L. Chen,** (2006) *RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation.* Oncogene, **25**(38): p. 5210-9.

157. King, R.W., R.J. Deshaies, J.M. Peters, and M.W. Kirschner, (1996) *How proteolysis drives the cell cycle*. Science, **274**(5293): p. 1652-9.
158. Kitagawa, T. and T. Aikawa, (1976) *Enzyme coupled immunoassay of insulin using a novel coupling reagent*. J Biochem (Tokyo), **79**(1): p. 233-6.
159. Kohler, C., L. Hennig, R. Bouveret, J. Gheyselinck, U. Grossniklaus, and W. Gruissem, (2003) *Arabidopsis MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development*. EMBO J, **22**(18): p. 4804-14.
160. Kong, L.J., B.M. Orozco, J.L. Roe, S. Nagar, S. Ou, H.S. Feiler, T. Durfee, A.B. Miller, W. Gruissem, D. Robertson, and L. Hanley-Bowdoin, (2000) *A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants*. EMBO J, **19**(13): p. 3485-95.
161. Kono, A., C. Umeda-Hara, J. Lee, M. Ito, H. Uchimiya, and M. Umeda, (2003) *Arabidopsis D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase*. Plant Physiol, **132**(3): p. 1315-21.
162. Koroleva, O.A., M. Tomlinson, P. Parinyapong, L. Sakvarelidze, D. Leader, P. Shaw, and J.H. Doonan, (2004) *CycD1, a putative G1 cyclin from Antirrhinum majus, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases*. Plant Cell, **16**(9): p. 2364-79.
163. Kosugi, S. and Y. Ohashi, (2002) *E2Fs, E2F-like repressors of Arabidopsis that bind to E2F sites in a monomeric form*. J Biol Chem, **277**(19): p. 16553-8.
164. Kosugi, S. and Y. Ohashi, (2002) *Interaction of the Arabidopsis E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation*. Plant Physiol, **128**(3): p. 833-43.
165. Kosugi, S. and Y. Ohashi, (2003) *Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner*. Plant Physiol, **132**(4): p. 2012-22.
166. Lania, L., B. Majello, and G. Napolitano, (1999) *Transcriptional control by cell-cycle regulators: a review*. J Cell Physiol, **179**(2): p. 134-41.
167. Laureys, F., W. Dewitte, E. Witters, M. Van Montagu, D. Inze, and H. Van Onckelen, (1998) *Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells*. FEBS Lett, **426**(1): p. 29-32.
168. Lee, W.H., R. Bookstein, F. Hong, L.J. Young, J.Y. Shew, and E.Y. Lee, (1987) *Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence*. Science, **235**(4794): p. 1394-9.
169. Lendvai, Á., A. Pettkó-Szandtner, É. Csordás-Tóth, P. Miskolczi, G.V. Horváth, J. Györgyey, and D. Dudits, (2007) *Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies*. J Exp Bot, **58**(7): p. 1663-1675.
170. Leung, J. and J. Giraudat, (1998) *Abscissic Acid Signal Transduction*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, **49**: p. 199-222.
171. Ljung, K., R.P. Bhalerao, and G. Sandberg, (2001) *Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth*. Plant J, **28**(4): p. 465-74.
172. Loog, M. and D.O. Morgan, (2005) *Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates*. Nature, **434**(7029): p. 104-8.
173. Ludlow, J.W., C.L. Glendening, D.M. Livingston, and J.A. DeCarprio, (1993) *Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein*. Mol Cell Biol, **13**(1): p. 367-72.
174. Lukas, J., J. Bartkova, M. Welcker, O.W. Petersen, G. Peters, M. Strauss, and J. Bartek, (1995) *Cyclin D2 is a moderately oscillating nucleoprotein required for G1 phase progression in specific cell types*. Oncogene, **10**(11): p. 2125-34.
175. Luo, M., P. Bilodeau, E.S. Dennis, W.J. Peacock, and A. Chaudhury, (2000) *Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing Arabidopsis seeds*. Proc Natl Acad Sci U S A, **97**(19): p. 10637-42.
176. Ma, D., P. Zhou, and J.W. Harbour, (2003) *Distinct mechanisms for regulating the tumor suppressor and antiapoptotic functions of Rb*. J Biol Chem, **278**(21): p. 19358-66.
177. Macaluso, M., M. Montanari, and A. Giordano, (2006) *Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes*. Oncogene, **25**(38): p. 5263-7.
178. Magyar, Z., L. De Veylder, A. Atanassova, L. Bako, D. Inze, and L. Bogre, (2005) *The role of the arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division*. Plant Cell, **17**(9): p. 2527-41.

179. Magyar, Z., T. Mészáros, P. Miskolczi, M. Deák, A. Fehér, S. Brown, E. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, M. Bilgin, L. Bakó, C. Koncz, and D. Dudits, (1997) *Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells*. Plant Cell, **9**(2): p. 223-35.
180. Mariconti, L., B. Pellegrini, R. Cantoni, R. Stevens, C. Bergounioux, R. Cella, and D. Albani, (2002) *The E2F family of transcription factors from Arabidopsis thaliana. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants*. J Biol Chem, **277**(12): p. 9911-9.
181. Masubelele, N.H., W. Dewitte, M. Menges, S. Maughan, C. Collins, R. Huntley, J. Nieuwland, S. Scofield, and J.A. Murray, (2005) *D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **102**(43): p. 15694-9.
182. Masui, Y. and C.L. Markert, (1971) *Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes*. J Exp Zool, **177**(2): p. 129-45.
183. Mayol, X., X. Grana, A. Baldi, N. Sang, Q. Hu, and A. Giordano, (1993) *Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain*. Oncogene, **8**(9): p. 2561-6.
184. Meijer, M. and J.A.H. Murray, (2000) *The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle*. Plant Mol Biol, **43**(5-6): p. 621-33.
185. Menges, M., S.M. de Jager, W. Gruissem, and J.A. Murray, (2005) *Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control*. Plant J, **41**(4): p. 546-66.
186. Menges, M., L. Hennig, W. Gruissem, and J.A. Murray, (2002) *Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis*. J Biol Chem, **277**(44): p. 41987-2002.
187. Menges, M., L. Hennig, W. Gruissem, and J.A. Murray, (2003) *Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension*. Plant Mol Biol, **53**(4): p. 423-42.
188. Menges, M. and J.A. Murray, (2002) *Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity*. Plant J, **30**(2): p. 203-12.
189. Menges, M., A.K. Samland, S. Planchais, and J.A. Murray, (2006) *The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis*. Plant Cell, **18**(4): p. 893-906.
190. Mészáros, T., (1999) *A G2 és M fázis szabályozásában szerepet játszó ciklinfüggő kinázok vizsgálata lucernában*, PhD tézis
191. Mészáros, T., 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, **43**(5-6): p. 595-605.
192. Meyer, Y. and W.O. Abel, (1975) *Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts*. Planta, **123**(1): p. 33-40.
193. Miller, C.O., F. Skoog, M.H. Von Saltza, and F.M. Strong, (1955) *KINETIN, A CELL DIVISION FACTOR FROM DEOXYRIBONUCLEIC ACID*. J Am Chem Soc, **77**(5): p. 1392 - 1392.
194. Mironov, V.V., L. De Veylder, M. Van Montagu, and D. Inze, (1999) *Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus*. Plant Cell, **11**(4): p. 509-22.
195. Miskolczi, P., Á. Lendvai, A. Pettkó-Szandtner, G.V. Horváth, and D. Dudits, (2007) *Conserved functions of retinoblastoma proteins: from purple retina to green plant cells*. Plant Science, **172**: p. 671-683.
196. Miskolczi, P., A. Pettkó-Szandtner, G.V. Horváth, D. Dudits, A. Fehér, and J. Györgyey, (2000) *A novel plant cyclin /Medicago cyclin D*.
197. Mitnacht, S., (1998) *Control of pRB phosphorylation*. Curr Opin Genet Dev, **8**(1): p. 21-7.
198. Mizukami, Y. and R.L. Fischer, (2000) *Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **97**(2): p. 942-7.
199. Morris, E.J. and N.J. Dyson, (2001) *Retinoblastoma protein partners*. Adv Cancer Res, **82**: p. 1-54.
200. Mosquna, A., A. Katz, S. Shochat, G. Grafi, and N. Ohad, (2004) *Interaction of FIE, a polycomb protein, with pRb: a possible mechanism regulating endosperm development*. Mol Genet Genomics, **271**(6): p. 651-7.
201. Nagata, T., S. Ishida, S. Hasezawa, and Y. Takahashi, (1994) *Genes involved in the dedifferentiation of plant cells*. Int J Dev Biol, **38**(2): p. 321-7.
202. Nakagami, H., K. Kawamura, K. Sugisaka, M. Sekine, and A. Shinmyo, (2002) *Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco*. Plant Cell, **14**(8): p. 1847-57.

203. Nakagami, H., M. Sekine, H. Murakami, and A. Shinmyo, (1999) *Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro*. Plant J, **18**(3): p. 243-52.
204. Nakajima, K. and P.N. Benfey, (2002) *Signaling in and out: control of cell division and differentiation in the shoot and root*. Plant Cell, **14** Suppl: p. S265-76.
205. Nicolas, E., V. Morales, L. Magnaghi-Jaulin, A. Harel-Bellan, H. Richard-Foy, and D. Trouche, (2000) *RbAp48 belongs to the histone deacetylase complex that associates with the retinoblastoma protein*. J Biol Chem, **275**(13): p. 9797-804.
206. Nihei, T., S. Takahashi, S. Sagae, N. Sato, and K. Kikuchi, (1993) *Protein interaction of retinoblastoma gene product pRb110 with M(r) 73,000 heat shock cognate protein*. Cancer Res, **53**(7): p. 1702-5.
207. Noble, M.E., J.A. Endicott, N.R. Brown, and L.N. Johnson, (1997) *The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control*. Trends Biochem Sci, **22**(12): p. 482-7.
208. Norbury, C. and P. Nurse, (1992) *Animal cell cycles and their control*. Annu Rev Biochem, **61**: p. 441-70.
209. Nowack, M.K., P.E. Grini, M.J. Jakoby, M. Lafos, C. Koncz, and A. Schnittger, (2006) *A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis*. Nat Genet, **38**(1): p. 63-7.
210. Nurse, P., (1975) *Genetic control of cell size at cell division in yeast*. Nature, **256**(5518): p. 547-51.
211. Oakenfull, E.A., C. Riou-Khamlichi, and J.A. Murray, (2002) *Plant D-type cyclins and the control of G1 progression*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **357**(1422): p. 749-60.
212. Ohad, N., L. Margossian, Y.C. Hsu, C. Williams, P. Repetti, and R.L. Fischer, (1996) *A mutation that allows endosperm development without fertilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, **93**(11): p. 5319-24.
213. Paggi, M.G. and A. Giordano, (2001) *Who is the boss in the retinoblastoma family? The point of view of Rb2/p130, the little brother*. Cancer Res, **61**(12): p. 4651-4.
214. Park, J.A., J.W. Ahn, Y.K. Kim, S.J. Kim, J.K. Kim, W.T. Kim, and H.S. Pai, (2005) *Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants*. Plant J, **42**(2): p. 153-63.
215. Pasternak, T.P., P. Miskolczi, F. Ayaydin, T. Mészáros, D. Dudits, and A. Fehér, (2000) *Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa*. Plant Growth Regulation, **32**: p. 129-141.
216. Pettkó-Szandtner, A., T. Mészáros, G.V. Horvath, L. Bakó, E. Csordás-Tóth, A. Blastyak, M. Zhiponova, P. Miskolczi, and D. Dudits, (2006) *Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase*. Plant J, **46**(1): p. 111-23.
217. Phelps, D.E. and Y. Xiong, (1997) *Assay for activity of mammalian cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6*. Methods Enzymol, **283**: p. 194-205.
218. Pines, J., (1995) *Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view*. Biochem J, **308** (Pt 3): p. 697-711.
219. Pines, J., (1995) *Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations*. Adv Cancer Res, **66**: p. 181-212.
220. Planchais, S., N. Glab, D. Inze, and C. Bergounioux, (2000) *Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies*. FEBS Lett, **476**(1-2): p. 78-83.
221. Planchais, S., N. Glab, C. Trehin, C. Perennes, J.M. Bureau, L. Meijer, and C. Bergounioux, (1997) *Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension*. Plant J, **12**(1): p. 191-202.
222. Planchais, S., A.K. Samland, and J.A. Murray, (2004) *Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism*. Plant J, **38**(4): p. 616-25.
223. Porceddu, A., L. De Veylder, J. Hayles, M. Van Montagu, D. Inze, and V. Mironov, (1999) *Mutational analysis of two Arabidopsis thaliana cyclin-dependent kinases in fission yeast*. FEBS Lett, **446**(1): p. 182-8.
224. Potuschak, T. and P. Doerner, (2001) *Cell cycle controls: genome-wide analysis in Arabidopsis*. Curr Opin Plant Biol, **4**(6): p. 501-6.
225. Pozo, J.C., M.A. Lopez-Matas, E. Ramirez-Parra, and C. Gutierrez, (2005) *Hormonal control of the plant cell cycle*. Physiologia Plantarum, **123**(2): p. 173-183.

226. **Qian, Y.W. and E.Y. Lee**, (1995) *Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast*. J Biol Chem, **270**(43): p. 25507-13.
227. **Qin, L.X., C. Perennes, L. Richard, M. Bouvier-Durand, C. Trehin, D. Inze, and C. Bergounioux**, (1996) *G2-and early-M-specific expression of the NTCYC1 cyclin gene in Nicotiana tabacum cells*. Plant Mol Biol, **32**(6): p. 1093-101.
228. **Ramirez-Parra, E., M.A. Lopez-Matas, C. Frundt, and C. Gutierrez**, (2004) *Role of an atypical E2F transcription factor in the control of Arabidopsis cell growth and differentiation*. Plant Cell, **16**(9): p. 2350-63.
229. **Ramirez-Parra, E., Q. Xie, M.B. Boniotti, and C. Gutierrez**, (1999) *The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators*. Nucleic Acids Res, **27**(17): p. 3527-33.
230. **Rechsteiner, M. and S.W. Rogers**, (1996) *PEST sequences and regulation by proteolysis*. Trends Biochem Sci, **21**(7): p. 267-71.
231. **Redig, P., O. Shaul, D. Inze, M. Van Montagu, and H. Van Onckelen**, (1996) *Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells*. FEBS Lett, **391**(1-2): p. 175-80.
232. **Reichheld, J.P., N. Chaubet, W.H. Shen, J.P. Renaudin, and C. Gigot**, (1996) *Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in Nicotiana tabacum BY2 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, **93**(24): p. 13819-24.
233. **Renaudin, J.P., J.H. Doonan, D. Freeman, J. Hashimoto, H. Hirt, D. Inze, T. Jacobs, H. Kouchi, P. Rouze, M. Sauter, A. Savoure, D.A. Sorrell, V. Sundaresan, and J.A. Murray**, (1996) *Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization*. Plant Mol Biol, **32**(6): p. 1003-18.
234. **Richard, C., M. Lescot, D. Inze, and L.D. Veylder**, (2002) *Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **69**: p. 167-176.
235. **Richard, C., M. Lescot, D. Inze, and L.D. Veylder**, (2002) *Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **69**(2): p. 167-176.
236. **Richmond, A.E. and A. Lang**, (1957) *Effect of Kinetin on Protein Content and Survival of Detached Xanthium Leaves*. Science, **125**: p. 650-651.
237. **Riley, D.J., C.Y. Liu, and W.H. Lee**, (1997) *Mutations of N-terminal regions render the retinoblastoma protein insufficient for functions in development and tumor suppression*. Mol Cell Biol, **17**(12): p. 7342-52.
238. **Riou-Khamlichi, C., R. Huntley, A. Jacquard, and J.A. Murray**, (1999) *Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin*. Science, **283**(5407): p. 1541-4.
239. **Riou-Khamlichi, C., M. Menges, J.M. Healy, and J.A. Murray**, (2000) *Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression*. Mol Cell Biol, **20**(13): p. 4513-21.
240. **Robbens, S., B. Khadaroo, A. Camasses, E. Derelle, C. Ferraz, D. Inze, Y. Van de Peer, and H. Moreau**, (2005) *Genome-wide analysis of core cell cycle genes in the unicellular green alga Ostreococcus tauri*. Mol Biol Evol, **22**(3): p. 589-97.
241. **Rossi, V., S. Locatelli, C. Lanzanova, M.B. Boniotti, S. Varotto, A. Pipal, M. Goralik-Schramel, A. Lusser, C. Gatz, C. Gutierrez, and M. Motto**, (2003) *A maize histone deacetylase and retinoblastoma-related protein physically interact and cooperate in repressing gene transcription*. Plant Mol Biol, **51**(3): p. 401-13.
242. **Rossignol, P., R. Stevens, C. Perennes, S. Jasinski, R. Cella, D. Tremousaygue, and C. Bergounioux**, (2002) *AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S phase*. Mol Genet Genomics, **266**(6): p. 995-1003.
243. **Roudier, F., E. Fedorova, J. Györgyey, A. Fehér, S. Brown, A. Kondorosi, and E. Kondorosi**, (2000) *Cell cycle function of a Medicago sativa A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein*. Plant J, **23**(1): p. 73-83.
244. **Roudier, F., E. Fedorova, M. Lebris, P. Lecomte, J. Györgyey, D. Vaubert, G. Horváth, P. Abad, A. Kondorosi, and E. Kondorosi**, (2003) *The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs*. Plant Physiol, **131**(3): p. 1091-103.

245. **Russell, P. and P. Nurse**, (1987) *Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog*. Cell, **49**(4): p. 559-67.
246. **Sabelli, P.A., R.A. Dante, J.T. Leiva-Neto, R. Jung, W.J. Gordon-Kamm, and B.A. Larkins**, (2005) *RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, **102**(37): p. 13005-12.
247. **Sabelli, P.A. and B.A. Larkins**, (2006) *Grasses like mammals? Redundancy and compensatory regulation within the retinoblastoma protein family*. Cell Cycle, **5**(4): p. 352-5.
248. **Schnittger, A., U. Schobinger, D. Bouyer, C. Weinl, Y.D. Stierhof, and M. Hulskamp**, (2002) *Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in Arabidopsis trichomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, **99**(9): p. 6410-5.
249. **Schoffl, F., R. Prandl, and A. Reindl**, (1998) *Regulation of the heat-shock response*. Plant Physiol, **117**(4): p. 1135-41.
250. **Schwechheimer, C. and K. Schwager**, (2004) *Regulated proteolysis and plant development*. Plant Cell Rep, **23**(6): p. 353-64.
251. **Segers, G., I. Gadisseur, C. Bergounioux, J. de Almeida Engler, A. Jacqumard, M. Van Montagu, and D. Inze**, (1996) *The Arabidopsis cyclin-dependent kinase gene cdc2bAt is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle*. Plant J, **10**(4): p. 601-12.
252. **Sekine, M., M. Ito, K. Uemukai, Y. Maeda, H. Nakagami, and A. Shinmyo**, (1999) *Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants*. FEBS Lett, **460**(1): p. 117-22.
253. **Shen, W.H.**, (2002) *The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control*. Trends Plant Sci, **7**(11): p. 505-11.
254. **Sherr, C.J.**, (1996) *Cancer cell cycles*. Science, **274**(5293): p. 1672-7.
255. **Sherr, C.J. and J.M. Roberts**, (1999) *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, **13**(12): p. 1501-12.
256. **Shimotohno, A., C. Umeda-Hara, K. Bisova, H. Uchimiya, and M. Umeda**, (2004) *The plant-specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation of cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis*. Plant Cell, **16**(11): p. 2954-66.
257. **Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki**, (2000) *Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways*. Curr Opin Plant Biol, **3**(3): p. 217-23.
258. **Shuster, C.B. and D.R. Burgess**, (1999) *Parameters that specify the timing of cytokinesis*. J Cell Biol, **146**(5): p. 981-92.
259. **Sieberer, T., M.T. Hauser, G.J. Seifert, and C. Luschnig**, (2003) *PROPORIZ1, a putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation*. Curr Biol, **13**(10): p. 837-42.
260. **Skoog, F. and C.O. Miller**, (1957) *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro*. Symp Soc Exp Biol, **54**(11): p. 118-30.
261. **Smith, H.H.**, (1972) *Plant genetic tumors*. Prog Exp Tumor Res, **15**: p. 138-64.
262. **Smith, L.G.**, (2002) *Plant cytokinesis: motoring to the finish*. Curr Biol, **12**(6): p. R206-8.
263. **Soni, R., J.P. Carmichael, Z.H. Shah, and J.A. Murray**, (1995) *A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif*. Plant Cell, **7**(1): p. 85-103.
264. **Sorrell, D.A., B. Combettes, N. Chaubet-Gigot, C. Gigot, and J.A. Murray**, (1999) *Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells*. Plant Physiol, **119**(1): p. 343-52.
265. **Sorrell, D.A., A. Marchbank, K. McMahon, J.R. Dickinson, H.J. Rogers, and D. Francis**, (2002) *A WEE1 homologue from Arabidopsis thaliana*. Planta, **215**(3): p. 518-22.
266. **Sorrell, D.A., M. Menges, J.M. Healy, Y. Deveau, C. Amano, Y. Su, H. Nakagami, A. Shinmyo, J.H. Doonan, M. Sekine, and J.A. Murray**, (2001) *Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells*. Plant Physiol, **126**(3): p. 1214-23.
267. **Spillane, C., C. MacDougall, C. Stock, C. Kohler, J.P. Vielle-Calzada, S.M. Nunes, U. Grossniklaus, and J. Goodrich**, (2000) *Interaction of the Arabidopsis polycomb group proteins FIE and MEA mediates their common phenotypes*. Curr Biol, **10**(23): p. 1535-8.
268. **Sterner, J.M., Y. Tao, S.B. Kennett, H.G. Kim, and J.M. Horowitz**, (1996) *The amino terminus of the retinoblastoma (Rb) protein associates with a cyclin-dependent kinase-like kinase via Rb amino acids required for growth suppression*. Cell Growth Differ, **7**(1): p. 53-64.

269. **Steward, F.C.**, (1970) *From cultured cells to whole plants: the induction and control of their growth and morphogenesis*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, **175**(38): p. 1-30.
270. **Stieger, P.A., A.D. Meyer, P. Kathmann, C. Frundt, I. Niederhauser, M. Barone, and C. Kuhlemeier**, (2004) *The orf13 T-DNA gene of Agrobacterium rhizogenes confers meristematic competence to differentiated cells*. Plant Physiol, **135**(3): p. 1798-808.
271. **Sun, Y., B.P. Dilkes, C. Zhang, R.A. Dante, N.P. Carneiro, K.S. Lowe, R. Jung, W.J. Gordon-Kamm, and B.A. Larkins**, (1999) *Characterization of maize (Zea mays L.) Wee1 and its activity in developing endosperm*. Proc Natl Acad Sci U S A, **96**(7): p. 4180-5.
272. **Swarup, R., G. Parry, N. Graham, T. Allen, and M. Bennett**, (2002) *Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development*. Plant Mol Biol, **49**(3-4): p. 411-26.
273. **Swiatek, A., M. Lenjou, D. Van Bockstaele, D. Inze, and H. Van Onckelen**, (2002) *Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells*. Plant Physiol, **128**(1): p. 201-11.
274. **Taya, Y.**, (1997) *RB kinases and RB-binding proteins: new points of view*. Trends Biochem Sci, **22**(1): p. 14-7.
275. **Tian, L. and Z.J. Chen**, (2001) *Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development*. Proc Natl Acad Sci U S A, **98**(1): p. 200-5.
276. **Trehin, C., S. Planchais, N. Glab, C. Perennes, J. Tregear, and C. Bergounioux**, (1998) *Cell cycle regulation by plant growth regulators: involvement of auxin and cytokinin in the re-entry of Petunia protoplasts into the cell cycle*. Planta, **206**(2): p. 215-24.
277. **Uemukai, K., H. Iwakawa, S. Kosugi, S. de Uemukai, K. Kato, E. Kondorosi, J.A. Murray, M. Ito, A. Shinmyo, and M. Sekine**, (2005) *Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity*. Plant Mol Biol, **57**(1): p. 83-100.
278. **Umeda, M., R.P. Bhalarao, J. Schell, H. Uchimiya, and C. Koncz**, (1998) *A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, **95**(9): p. 5021-6.
279. **Umeda, M., A. Shimotohno, and M. Yamaguchi**, (2005) *Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-Dependent Kinase-Activating Kinases in Plants*. Plant Cell Physiol.
280. **Umeda, M., C. Umeda-Hara, M. Yamaguchi, J. Hashimoto, and H. Uchimiya**, (1999) *Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants*. Plant Physiol, **119**(1): p. 31-40.
281. **Uzvolgyi, E., M. Classon, M. Henriksson, H.J. Huang, L. Szekely, W.H. Lee, G. Klein, and J. Sumegi**, (1991) *Reintroduction of a normal retinoblastoma gene into retinoblastoma and osteosarcoma cells inhibits the replication associated function of SV40 large T antigen*. Cell Growth Differ, **2**(6): p. 297-303.
282. **Valente, P., W. Tao, and J.P. Verbelen**, (1998) *Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of tobacco* Plant Science, **134**(2): p. 207-215.
283. **Van't Hof, J.**, (1966) *Experimental control of DNA synthesizing and dividing cells in excised root tips of Pisum*. Am J Bot, **53**: p. 970-976.
284. **Vandepoele, K., J. Raes, L. De Veylder, P. Rouze, S. Rombauts, and D. Inze**, (2002) *Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis*. Plant Cell, **14**(4): p. 903-16.
285. **Vanneste, S., L. Maes, I.D. Smet, K. Himanen, M. Naudts, D. Inze, and T. Beeckman**, (2005) *Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation*. Physiologia Plantarum, **123**(2): p. 139-146.
286. **Verkest, A., C.L. Manes, S. Vercruysse, S. Maes, E. Van Der Schueren, T. Beeckman, P. Genschik, M. Kuiper, D. Inze, and L. De Veylder**, (2005) *The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor KRP2 Controls the Onset of the Endoreduplication Cycle during Arabidopsis Leaf Development through Inhibition of Mitotic CDKA;1 Kinase Complexes*. Plant Cell, **17**(6): p. 1723-36.
287. **Vernet, T., J. Fleck, A. Durr, C. Fritsch, M. Pinck, and L. Hirth**, (1982) *Expression of the gene coding for the small subunit of ribulosebisphosphate carboxylase during differentiation of tobacco plant protoplasts*. Eur J Biochem, **126**(3): p. 489-94.
288. **Vernoux, T., R.C. Wilson, K.A. Seeley, J.P. Reichheld, S. Muroy, S. Brown, S.C. Maughan, C.S. Cobbett, M. Van Montagu, D. Inze, M.J. May, and Z.R. Sung**, (2000) *The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development*. Plant Cell, **12**(1): p. 97-110.

289. **Vlieghe, K., V. Boudolf, G.T. Beemster, S. Maes, Z. Magyar, A. Atanassova, J. de Almeida Engler, R. De Groodt, D. Inze, and L. De Veylder, (2005) *The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in Arabidopsis thaliana*. Curr Biol, **15**(1): p. 59-63.**
290. **Wang, G., H. Kong, Y. Sun, X. Zhang, W. Zhang, N. Altman, C.W. DePamphilis, and H. Ma, (2004) *Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins*. Plant Physiol, **135**(2): p. 1084-99.**
291. **Wang, H., Q. Qi, P. Schorr, A.J. Cutler, W.L. Crosby, and L.C. Fowke, (1998) *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**(4): p. 501-10.**
292. **Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi, (2001) *Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells*. Oncogene, **20**(34): p. 4740-9.**
293. **Wang, W. and X. Chen, (2004) *HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in Arabidopsis*. Development, **131**(13): p. 3147-56.**
294. **Weinberg, R.A., (1995) *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, **81**(3): p. 323-30.**
295. **Weingartner, M., M.C. Criqui, T. Meszaros, P. Binarova, A.C. Schmit, A. Helfer, A. Derevier, M. Erhardt, L. Bogre, and P. Genschik, (2004) *Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast*. Plant Cell, **16**(3): p. 643-57.**
296. **Welch, P.J. and J.Y. Wang, (1993) *A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle*. Cell, **75**(4): p. 779-90.**
297. **Williams, L. and G. Grafi, (2000) *The retinoblastoma protein - a bridge to heterochromatin*. Trends Plant Sci, **5**(6): p. 239-40.**
298. **Wu, K., K. Malik, L. Tian, D. Brown, and B. Miki, (2000) *Functional analysis of a RPD3 histone deacetylase homologue in Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol, **44**(2): p. 167-76.**
299. **Xie, Q., A.P. Sanz-Burgos, G.J. Hannon, and C. Gutierrez, (1996) *Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins*. EMBO J, **15**(18): p. 4900-8.**
300. **Yamaguchi, M., H. Kato, S. Yoshida, S. Yamamura, H. Uchimiya, and M. Umeda, (2003) *Control of in vitro organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants*. Proc Natl Acad Sci U S A, **100**(13): p. 8019-23.**
301. **Yoshizumi, T., N. Nagata, H. Shimada, and M. Matsui, (1999) *An Arabidopsis cell cycle - dependent kinase-related gene, CDC2b, plays a role in regulating seedling growth in darkness*. Plant Cell, **11**(10): p. 1883-96.**
302. **Zhang, K., L. Diederich, and P.C. John, (2005) *The cytokinin requirement for cell division in cultured Nicotiana plumbaginifolia cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein tyrosine phosphatase: implications for mechanisms of cytokinin response and plant development*. Plant Physiol, **137**(1): p. 308-16.**
303. **Zhang, K., D.S. Letham, and P.C. John, (1996) *Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase*. Planta, **200**(1): p. 2-12.**
304. **Zhiponova, M.K., A. Pettkó-Szandtner, E. Stelkovics, Z. Neer, S. Bottka, T. Krenacs, D. Dudits, A. Fehér, and L. Szilak, (2006) *Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (Medsa;CDKB2;I) is activated by wounding and ethylene in a non-cell division-dependent manner*. Plant Physiol, **140**(2): p. 693-703.**

7.2. Publikációs lista

(* Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

- Lendvai, Á., A. Pettkó-Szandtner, É. Csordás-Tóth, **P. Miskolczi**, G.V. Horváth, J. Györgyey, and D. Dudits, (2007) Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot*, **58**(7): p. 1663-1675.
- *Dudits, D., M. Cserhádi, **P. Miskolczi**, and G.V. Horváth, (2007) The growing family of plant cyclin-dependant kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation, in *Cell Cycle Control and Plant Development*, D. Inzé, Editor., Blackwell Publishing: Oxford UK ISBN: 9781405150439: Oxford. p. 1-30.
- ***Miskolczi, P.**, Á. Lendvai, A. Pettkó-Szandtner, G.V. Horváth, and D. Dudits, (2007) Conserved functions of retinoblastoma proteins: from purple retina to green plant cells. *Plant Science*, **172**: p. 671-683.
- Pettkó-Szandtner, A., T. Mészáros, G.V. Horvath, L. Bakó, E. Csordás-Tóth, A. Blastyak, M. Zhiponova, **P. Miskolczi**, and D. Dudits, (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J*, **46**(1): p. 111-23.
- Fülöp, K., A. Pettko-Szandtner, Z. Magyar, **P. Miskolczi**, E. Kondorosi, D. Dudits, and L. Bakó, (2005) The Medicago CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J*, **42**(6): p. 810-20.
- Ötvös, K., T.P. Pasternak, **P. Miskolczi**, M. Domoki, D. Dorjgotov, A. Szűcs, S. Bottka, D. Dudits, and A. Fehér, (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J*, **43**(6): p. 849-60.
- Espinosa-Ruiz, A., S. Saxena, J. Schmidt, E. Mellerowicz, **P. Miskolczi**, L. Bakó, and R.P. Bhalerao, (2004) Differential stage-specific regulation of cyclin-dependent kinases during cambial dormancy in hybrid aspen. *Plant J*, **38**(4): p. 603-15.
- Fehér, A., T. Pasternak, K. Ötvös, **P. Miskolczi**, and D. Dudits, (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia*, **57**: p. 5-12.
- Pasternak, T., E. Prinsen, F. Ayaydin, **P. Miskolczi**, G. Potters, H. Asard, H.A. Van Onckelen, D. Dudits, and A. Fehér, (2002) The Role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol*, **129**(4): p. 1807-19.
- Fehér A., T. Pasternak, **P. Miskolczi**, F. Ayaydin, D. Dudits, (2001) Induction of the embryogenic pathway in somatic plant cells. *Acta Horti*, **560**: p. 293-298.
- Davletova, S., T. Mészáros, **P. Miskolczi**, A. Oberschall, K. Török, Z. Magyar, D. Dudits, and M. Deák, (2001) Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *J Exp Bot*, **52**(355): p. 215-21.

- ***Miskolczi, P.**, A. Pettkó-Szandtner, G.V. Horváth, D. Dudits, A. Fehér, and J. Györgyey, (2000) A novel plant cyclin /Medicago cyclin D. Patent EP 00870133.6 (16 jun 2000) PCT/EP01/06771
- Ayaydin, F., E. Vissi, T. Mészáros, **P. Miskolczi**, I. Kovács, A. Fehér, V. Dombradi, F. Erdödi, P. Gergely, and D. Dudits, (2000) Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant J*, **23**(1): p. 85-96.
- *Mészáros, T., **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*, **43**(5-6): p. 595-605.
- *Pasternak, T.P., **P. Miskolczi**, F. Ayaydin, T. Mészáros, D. Dudits, and A. Fehér, (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regulation*, **32**: p. 129-141.
- Fehér, A., T. Pasternak, F. Ayaydin, T. Mészáros, and **P. Miskolczi**, Zs. Kelemen, L. Bögre, F. Laureys, H. Van Onckelen, and D. Dudits, (1999) Hormones and stress in the induction and regulation of cell division in cultured alfalfa cells. *Biologia Plantarum*, **42**: p. 63.
- Dudits, D., Z. Magyar, M. Deák, T. Mészáros, **P. Miskolczi**, A. Fehér, S. Brown, E. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, L. Bakó, C. Koncz, and J. Györgyey, (1998) Cyclin-dependent and calcium-dependent kinase families: response of cell division cycle to hormone and stress signals. *PLANT CELL DIVISION: MOLECULAR AND DEVELOPMENTAL CONTROL*, ed. D. Dudits and D. Inzé. London: Portland Press. 21-46.
- Magyar, Z., T. Mészáros, **P. Miskolczi**, M. Deák, A. Fehér, S. Brown, E. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, M. Bilgin, L. Bakó, C. Koncz, and D. Dudits, (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*, **9**(2): p. 223-35.

7.3. Ph.D. thesis

Key proteins involved in the reactivation and control of the cell division checkpoints in alfalfa

INTRODUCTION AND AIMS

The power of the cell to hand on their nature their descendents is a fundamental aspect of the life of the cellular built organisms in our world. Not surprisingly the cell division cycle is one of the most intensively studied biological processes yet, particularly given its importance for many human cancers. The significance of cell cycle research was confirmed by Nobel Prize awarded by Leland H. Hartwell, R. Timothy (Tim) Hunt and Sir Paul M. Nurse for their discoveries of key regulators of the cell cycle in 2001.

The fundamental processes of the cell division and the molecules that take part in regulation are rather conservative, and operate in a similar way in all eukaryotic organisms. One of the determinant factors of plant adaptiveness is the continuous division of cells, and formation of new organs, the flexibility of their organogenesis has to be in conformity with the environment because of their immovable nature. CDK activating cyclins have been identified in surprisingly high numbers in plants, and the participation of two CDK types at G2/M phase of cell cycle process, one of which is a plant specific CDK kinase, can participate to this plasticity.

In the past two decades our research group has contributed significantly to plant cell cycle research by cloning and analysing several key regulatory genes (CDK-s, cyclins, CDK inhibitors, RB-related genes, E2F genes) from alfalfa and rice. I joined the research work of our group by examination of proteins taking part in alfalfa cell division regulation. To achieve this we applied for two plant experimental approaches. We used the A2 cell suspension synchronization system to study the cell cycle regulation of alfalfa. We examined the reactivation of CDKs in dedifferentiated cells to certain hormone effects, and the first steps of the reactivation of cell division by the established alfalfa leaf protoplast culturing system.

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

- Which D-type cyclins interact with alfalfa CDK kinases, and in which cell division phase regulation do they have a role?
- Can A- and plant specific B-type kinase complexes phosphorylate the alfalfa retinoblastoma-related protein?
- How does the quantity of MsRBR1 protein change during the process of cell division in alfalfa?
- How do the plant hormones influence the level of alfalfa RBR protein in A2 cell suspension, and in *Medicago truncatula* R-108 callus capable of direct regeneration?
- In which hormonal conditions do regulating activation of alfalfa CDK-cyclin complexes at G1/S and G2/M transition?
- How can we determine the exact expression and activation of CDK kinases at G2/M transition and mitosis?

SUMMARY

The accurate process of cell division is the base of life and reproduction of both unicellular and more complex organisms. The detailed cognition of the cell division is important from the aspect of the human genetics and plant biology, because there is a basic need for growing adequate quantity and appropriate quality of plant nutrition. The importance of the plant molecular biology is confirmed by the investigation focusing on discovering the complete plant genome. Due to the continuously broadening instrumental development of molecular biology in the past two decades it became possible to collect considerable amount of knowledge on plant cell cycle regulation.

Compared to molecular regulation processes of the animal model organisms, the complex plasticity of morphology, cell division and differentiation of higher plants, and their immovable nature allows to conclude significant differences. Based on the previous results it can be stated that the main participant molecules of the cell cycle regulation show considerable sequential and functional homology

between plants and animals, but unquestionable the component of the plant specific processes.

In our group we managed to isolate proteins known and found the most important in animal cell cycle regulation (cyclin dependent kinases, cyclins, inhibitors) and other important proteins such as homologues of the retinoblastoma tumour suppressor and E2F transcriptional factors from the economically important, nitrogen-binding alfalfa. During our research work we focused on the more detailed cognition of the function of the above mentioned proteins in the alfalfa cell cycle regulation, and we found the following important results:

We investigated the role of the new type alfalfa Medtr;CYCD1;1 and Medtr;CYCD6;1 cyclins isolated by yeast two-hybrid technique in the cell cycle regulation and we searched which CDK kinases they can form active complexes with. We managed to confirm the interaction between the alfalfa D-type cyclin and the CDK protein by the yeast two-hybrid assays. Medtr;CYCD1;1 showed stronger interaction with B-type CDK-s, whereas Medtr;CYCD6;1, a cyclin that does not contain an LxCxE RB-binding motif, showed clear interaction with CDKA in the yeast two-hybrid tests.

The Medsa;CYCD3;1 cyclin translated by reticulocyte cell lysate system was able to bind to and activate alfalfa CDKA kinase. According to its expression data CYCD3;1 may have a role in activation of CDKA in G1/S phase, it is confirmed by GST-CYCD3;1 fusion protein bound kinase activity in our cell culture synchronizing experiments. Generally D-type cyclins similarly to Medtr;CYCD6;1 cyclin accumulate mainly in the dividing cell, which reflects to their role in the cell cycle regulation. Although interestingly, the quantity of protein similarly to a few other plant D-type cyclins remains nearly equal during the cell cycle phases.

We confirmed by the *in vitro* phosphorylation assays that immunoprecipitated CDKA from whole protein extract of alfalfa cell suspension, and the mitotic CDKB2;1 complexes are able to phosphorylate the alfalfa retinoblastoma-homologue (MsRBR1) protein.

RBR analysis gained particular attention in plant molecular research recently. We confirmed by our experiments, that the retinoblastoma-homologue has a role in the regulation of plant cell cycle. The appropriate polyclonal anti-body made it

possible to study the role of the alfalfa RBR protein in the cell cycle. Observing the quantity of the alfalfa retinoblastoma homologue (MsRBR1) in synchronized cell cultures, we observed that the quantity of protein is slowly increasing until the S and G2/M phases of the cell cycle, and possibly there is a decrease again from M-phase. Results from both hydroxyurea and double blocked synchronized assays confirm that the presumed hyperphosphorylation form of MsRBR1 changes depending on the cell cycle. The quantity of this MsRBR1 form is getting stronger from the S-phase remains until the next cycle after the late G2/M phase, out of accordance with the normal size, decreasing quantity of MsRBR1 protein. Accordingly we presume that the retinoblastoma-homologue phosphorylation plays a similar role in regulation of the plant G1/S cell cycle transition, as it has been confirmed in the case of pRB.

We examined the effect of certain plant hormones on quantity of MsRBR1 protein. Since the amount of alfalfa retinoblastoma-homologue proved to be sufficient only in cell suspension samples, we decided to use this as experimental object. According to the results we can confirm, that discrepant RBR protein can be detected in hormone free and auxin containing medium, which show correspondence with the cell cycle activities of the suspensions.

Alfalfa RBR protein allows to conclude an interesting modification in the microcallus cell culture of *Medicago truncatula* R-108 after plated on hormone free medium for around a week. While it is also observable that the protein level of RBR decreased below the detectable amount after a few days in the same experiments. The observed possible modification of alfalfa RBR protein at higher molecular weight range supposedly refers to the role of the RBR protein in the chromosome remodelling occurring in the process of differentiation in the Mt-108 microcallus population. Further research work is needed to identify the type of this presumed RBR modification. However a heat shock protein was found in the separated complex of anti-RBR immunoprecipitated samples that homologue known to interact and stabilizes the pRB protein.

We examined what kind of molecular processes play role in hormone induced cell cycle reactivation in case of alfalfa leaf protoplast cells, more precisely, how and when the CDK-related protein complexes activate within the first division of

cells, and what kind of role the examined auxin and cytokinin hormones have in this process. According to our experiments we stated that auxin is essential to the synthesis of alfalfa CDKA kinase, whereas cytokinin addition was essential in every case to promote the entry of the reactivated protoplast cells into mitosis.

We confirmed using the double blocked combined synchronized technique of alfalfa cell suspension, that cells need the active CDKA/cyclin complex in the transition at G2/M checkpoint. Expression of CDKB2;1 plant specific kinase occurs right after the transition at G2/M checkpoint, and it also gains considerable kinase activity, which supports the mitotic function of this B-type CDK kinase.