

Doktori értekezés

**Lucerna ciklin-függő kináz inhibitor
fehérje jellemzése**

Írta: Pettkó-Szandtner Aladár

**Témavezető: Horváth Gábor
és Dudits Dénes**

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

TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2.	BEVEZETÉS.....	6
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1.	A sejtciklus alapjai	7
3.2.	Ciklin-függő kinázok	9
3.3.	Ciklinek	11
3.4.	Ciklin-függő kinázok foszforilációja	17
3.5.	Ciklin-függő kináz komplexek tisztázatlan szerepű fehérjéi.....	20
3.6.	A növényi sejtciklus	21
3.7.	Élesztő ciklin-függő kináz inhibitorok	22
3.8.	Állati ciklin-függő kináz inhibitorok	23
3.9.	Növényi ciklin-függő kináz inhibitorok	23
3.10.	A hormonok szerepe a növényi sejtciklusban.....	28
3.11.	A Ca^{2+} szerepéről.....	30
4.	CÉLKITŰZÉSEK.....	32
5.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
5.1.	A KRPMt (p27Kip1 related protein) gén klónozása	33
5.2.	Élesztő kettős-hibrid mátrix kísérletek.....	33
5.3.	Szekvencia összehasonlítások, filogenetikai fa, in silico predikciók	34
5.4.	Növények és sejtvonalak, kezelések	35
5.5.	Sejtciklus szinkronizálás.....	35
5.6.	Áramlásos citometria.....	35
5.7.	Mitotikus index meghatározás.....	36
5.8.	Fehérjekivonat készítése.....	36
5.9.	Pull-down vizsgálat és immunoblott analízis.....	37
5.10.	Immunoprecipitálás, p13 ^{SUC1} affinitástisztítás	38

5.11.	Bakteriálisan túltermeltetett fehérjék tisztítása	38
5.12.	In vitro kináz reakció	39
5.13.	RNS tisztítás, c-DNS szintézis, Real-time PCR.....	39
5.14.	A rekombináns KRPMt foszforilálása MsCPK3-mal	40
5.15.	Kétdimenziós foszfopeptid térképezés és foszfo-aminosav vizsgálat cellulóz vékonyrétegen 41	
6.	ELŐZMÉNYEK	42
6.1.	Lucerna CDK homológokkal kölcsönható fehérjék azonosítása élesztő kettős-hibrid rendszerrel.....	42
7.	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	44
7.1.	Teljes hosszúságú lucerna KRP izolálása és in silico jellemzése	44
7.2.	A KRPMt gén kifejeződése.....	48
7.3.	A KRPMt fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata élesztő kettős-hibrid rendszerben	50
7.4.	A rekombináns KRPMt fehérjével együtt tisztíthatók a CDKA és CDKB kinázok is	52
7.5.	A KRPMt fehérje gátló hatása függ a gátolt kinázkomplextől in vitro	53
7.6.	A KRPMt foszforilálása egy kalmodulin-szerű domén fehérje kináz (MsCPK3) által fokozza annak gátló hatását	56
7.7.	A KRPMt foszforilációja.....	57
8.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	62
9.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	73
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	75
11.	THESIS OF PH.D	76
11.1.	Introduction and aims.....	76
11.2.	Results and discussion	78
12.	FELHASZNÁLT IRODALOM.....	HIBA! A KÖNYVJELZŐ NEM LÉTEZIK.

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4-D	2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
ABA	abszcizinsav
APC	M fázisban aktív ubikvitin ligáz komplex
CAK	CDK aktiváló kináz
Cdc13	hasadó élesztő ciklin
Cdc2	hasadó élesztő ciklinfüggő kináz
Cdc25	Tyr15/Thr14 defoszforilációjáért felelős foszfatáz
cdc28	sarjadzó élesztő ciklinfüggő kináz
CDK	ciklinfüggő kináz
Cip/Kip	emlős CDK inhibitor család
CKI	ciklinfüggő kináz inhibitor
Cks	CDK-ciklin komplexek alegysége
Clb	sarjadzó élesztő ciklin
Cln	sarjadzó élesztő ciklin
CTD	C-terminális domén
Cyc	ciklin
DAPI	4,6-diaminido-2-fenilindol (DNS festék)
E2F	sejtosztódásban szerepet játszó transzkripció faktor
GUS	β -glükoronidáz
ICK1	Arabidopsis CDK inhibitor
INK4	emlős CDK inhibitor család
KAP	Thr161 defoszforilációjáért felelős foszfatáz
KRP	CDK inhibitor, Kip related protein
MAT1	CAK komplex összeállítását elősegítő fehérje
MBF	sarjadzó élesztő transzkripció faktor
MO15	CAK komplex kináz alegysége
MPF	M fázist elősegítő faktor
Myt1	Tyr15/Thr14 defoszforilációjáért felelős foszfatáz
R2	rizs CAK
Rb	retinoblasztoma, tumorsuppresszor fehérje

SBF	sarjadzó élesztő transzkripció faktor
SCF	G1/S fázisban aktív ubikvitin ligáz komplex
Sic1	sarjadzó élesztő CDK inhibitor
SPF	sarjadzó élesztő transzkripció faktor
Suc1	hasadó élesztő Cks
Wee1	Tyr15/Thr14 foszforilációjáért felelős kináz

2. BEVEZETÉS

Az élővilág egyik legalapvetőbb eseményének a sejtosztódást tekinthetjük, ez teszi lehetővé az utódok létrehozását, az egyes feladatok teljesítésére képes sejtpopulációk kifejlődését és megújulását, valamint a károsodott szövetek pótlását. Már az XIX. század közepén fénymikroszkópos vizsgálatokkal sikerült a sejtciklust két szakaszra: interfázisra és mitózisra osztani, az alapján, hogy az interfázisban csak a sejtek nagyobbodása figyelhető meg, míg a mitózis során láthatóvá válnak a kromoszómák. Így az egyébként igen rövid mitózist hamar különböző szakaszokra osztották. Azonban csak 1951-ben Howard és Pelc kísérletei óta tudjuk, hogy az interfázis három szakaszból tevődik össze, így a sejtciklust ma G1, S, G2, M fázisokkal írjuk le. A DNS-szintézis és a mitózis közötti szünetek az angol gap szóból eredően a G1, illetve G2 nevet kapták, míg az S és M értelemszerűen a szintézis és a mitózis szavak rövidítései. A sejtciklus molekuláris hátterét azonban az 1980-as évek óta kezdtük el csak megismerni, a 2001 évi orvosi-biológiai Nobel díjat Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt és Paul M. Nurse kapta a sejtosztódás mechanizmusa felderítése terén végzett kutatásaiért. Hármójuk közül azonban senki nem foglalkozott a növényi sejtciklus kutatásával, annak ellenére, hogy a növényi sejtciklust specifikus tulajdonságok jellemzik. Mivel helyhez kötött életmód következtében a növényeknek sajátos stratégiát választottak a fennmaradáshoz, a szélsőséges környezeti hatásokhoz rugalmas egyedfejlődéssel alkalmazkodtak. A növényi egyedfejlődés elsősorban posztembrionális, és a sejtosztódás csak a merisztematikus régiókra korlátozódik. Éppen ezért a növényi sejtciklus sok hasonlósága mellett számos eltérést is mutat - az állati rendszerekkel összehasonlítva - a növényekről elmondható, hogy sokkal rugalmasabban használják ki a sejtek osztódásából, differenciálódásából és redifferenciálódásából adódó lehetőségeket.

A dolgozat további részében ismertetem azokat az eredményeket, amelyek az utóbbi években a közreműködésemmel születtek, a MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológia Intézetének Sejtosztódási és Differenciálódási Csoportjában, és amelyek valamivel közelebb visznek a növényi sejtciklus megismeréséhez.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

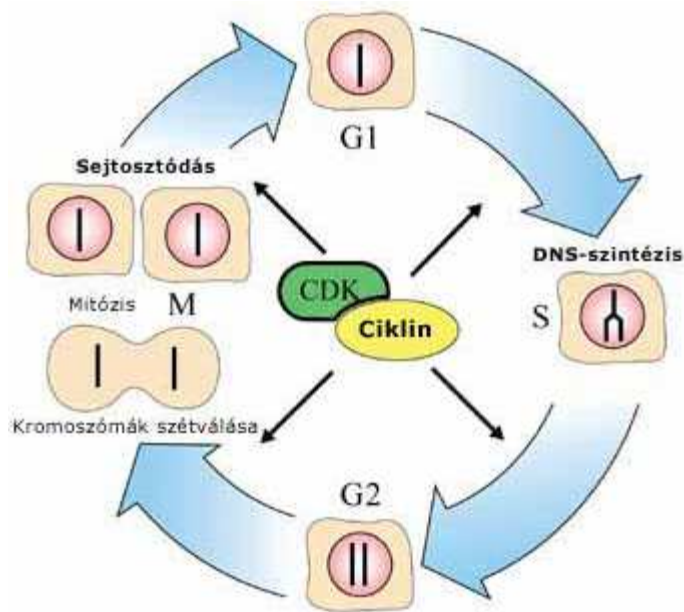
3.1. A sejtciklus alapjai

A sejtciklus négy fázisra történő felosztása után a kutatás iránya a különböző szakaszok közötti átmenet vizsgálata felé fordult. Az első eredmények a sejtciklus különböző szakaszait reprezentáló sejtek fuzionáltatásával születtek. A kísérletek során könnyen kezelhető nyálkagombát a hatalmas szinciciális sejtekkel rendelkező *Physarum polycepalum*-ot használták. A vizsgálatok nyomán kiderült, hogy a késő G2 és M fázisban lévő sejtek tartalmaznak egy faktort, ami képes a korai G2-ben lévő sejtek mitózisba lépését felgyorsítani (Johnson és Rao 1971). Ennek alapján az M phase-promoting factor (MPF) nevet kapta. Ezeknek az élőlényeknek nagyon rövid a G1 és S fázisuk, így ezek az átmenetek nem tanulmányozhatók rajtuk. Emlős sejtenyésztés alkalmazásával az S fázisos sejtekben találtak egy S phase-promoting faktort (SPF), amely G1-ben lévő sejtek S-fázisba lépését gyorsítja fel. Ezen a kísérleti rendszeren végzett munkák a továbbiakban azt is felfedték, hogy az MPF minden sejtciklus fázisban képes kromoszóma kondenzációt előidézni, míg az SPF csak a G1 fázisos sejtekre fejt ki hatását (Rao és Jonson 1971). A munkák során nem tisztították sem az MPF-t, sem az SPF-t, így ezek mibenléte a nyolcvanas évek végéig ismeretlen maradt.

Az MPF biokémiai jellegzetességeit először a karmos békán (*Xenopus laevis*) elemezték. Az már korábban ismert volt, hogy a *Xenopus* meotikus petéinek kivonata az éretlen G2-ben megrekedt petesejtekbe fecskendezve mitózist indukál. A folyamatot olyan szembetűnő változások kísérik, mint a sejtmaghártya lebomlása és a kromoszómák kondenzációja (Masui és Markert 1971). Ezen jellegzetességeket kihasználva oszlop-kromatográfiával elválasztották a változásokért felelős MPF-t tartalmazó frakciókat. A tisztított komplex szerin-treonin kináz aktivitással rendelkezett, és két fő komponense egy 33 kDa és egy 42 kDa tömegű fehérje volt (Lohka és mtsai 1988).

A sejtciklus kutatás egy másik kísérleti állata a tengeri sün volt. Még a karmos béka MPF tisztítását megelőzően végezték el a következő vizsgálatot. A tengeri sün megtermékenyített petéjét radioaktív metionin jelenlétében nevelték, majd

poliakrilamid-gélelektroforézissel elválasztották a fehérjét. A szeparálást követő autoradiográfiával kimutattak egy fehérjét, melynek mennyisége a sejtciklus során fluktuált. A fehérje szintje a mitózisig fokozatosan emelkedett, majd a mitózis végén hirtelen eltűnt. A fehérjét ezen tulajdonsága nyomán ciklinnek nevezték el (Evans és mtsai 1983). A jelenségre ekkor még nem volt magyarázat, és nem feltételezték, hogy ennek a különleges fehérjének központi szerepe lehet az MPF-ben. A biokémiai kutatások a sejtosztódásukban defektust mutató élesztő mutánsokon végzett vizsgálatok eredményeivel együtt kaptak igazi értelmet (Hartwel és mtsai 1974; Nurse és Thuriaux 1980). A sejtosztódásban hibás élesztő mutánsokban meghatározott gének között volt a hasadó élesztő G1-ben és G2-ben egyaránt szerepet játszó, *cdc2* által kódolt kináz (Nurse és Bisset 1985), és ennek sarjadzó élesztő homológja, a *CDC28* is (Reed és mtsai 1985). A *cdc2*-ről több oldalról is bizonyították, hogy a *Xenopus laevis* MPF 33 kDa-os fehérjének a megfelelője (Dunphy és mtsai 1988; Gautier és mtsai 1988), és ismertté vált, hogy az MPF ciklinjének, a *cycB*-nek a hasadó élesztő homológja, a *cdc13* a *cdc2*-vel alkot komplexet (Booher és mtsai 1989). Ezen eredmények alapján már leírhatták a sejtciklus-szabályozás kulcs komplexének működését. Ezek szerint az MPF-ben a *cdc2* kináz-homológ a sejtciklus során változó mennyiségben jelenlévő ciklinnel kapcsolódva aktiválódik a G2/M fázisban. A ciklin lebomlását követően a kináz inaktívvá válik, ezzel biztosítva a komplex működésének megfelelő időzítését. A kináz aktivitás elengedhetetlen feltétele a ciklin alegységgel való kapcsolódás, ennek nyomán a *cdc2* homológokat CDK-nak (cyclin dependent kinase, ciklin-függő kináz) is nevezik. A *cdc2* kinázból és *cycB* alegységből felépülő komplex minden valószínűség szerint a sejtciklus-szabályozás legkonzerváltabb eleme. Ezen gének homológjait élesztőtől kezdve emberig minden eddig vizsgált eukarióta fajban megtalálták (Lee és Nurse 1987). Az ősi egysejtűekben ez a két tagból álló komplex koordinálhatta a teljes sejtciklust (Stern és Nurse 1996). Ez az egyszerű komplex az evolúció során azonban finoman összehangolt, több jelre reagáló hálózattá vált, így az MPF komponenseinek azonosítása csak a sejtciklus kutatások kezdete volt.



1. Ábra A sejtciklus szakaszai

Eukariótáknál a sejtciklus két nagy szakaszra osztható: a sejtosztódás (M-fázis, mitózis) és az interfázis szakaszára. A sejt az interfázis során növekszik, s ekkor kettőzi meg DNS-állományát is. A DNS-megkettőződés szakaszát S-fázisnak nevezzük (szintézis). A sejtosztódás és az S-fázis közötti "rész" (angolul gap) a G1-fázis. A folyamat előrehaladásának központi eleme egy szerin/treonin kináz komplex. Ez a katalitikus CDK (ciklin-függő kináz) és az ezt szabályozó ciklin alegységekből áll.

3.2. Ciklin-függő kinázok

Az elsőként azonosított CDK-nak, a cdc2-nek számos kisebb-nagyobb mértékben eltérő homológját írták le. A szekvencia elemzések nyomán tudjuk, hogy mindegyik rendelkezik a kinázokra jellemző szakaszokkal. Az általános kináz jellegzetességek mellett azonban sajátos aminosav szekvenciákat is azonosítottak, így megtalálható a ciklinkötésben központi szerepet játszó EGVPTAIREISLLKE aminosavmotívum, illetve ennek különféle módosulatai. Elsősorban ez a régió szabja meg, hogy mely ciklinnel képes kapcsolatba lépni az adott kináz, így ez a rész különös jelentőséggel bír a CDK-k funkciójának meghatározásában. A másik, CDK-ra jellemző szekvencia, az úgynevezett "T hurok" szintén a ciklinkötés fontos régiója, és ez is eltéréseket mutat az egyes CDK-kban (Morgan 1997). Élesztőekben számos CDK-t azonosítottak, azonban mindkét vizsgált fajban csak egy-egy vesz részt közvetlenül a sejtciklus szabályozásban. A hasadó élesztőben a cdc2, míg a sarjadzó élesztőben a CDC28 gén által kódolt kináz különböző ciklinekkel alkotott

komplexe felelős a G1/S és a G2/M átmenetekért is (Stern és Nurse 1996, Nasmyth 1996).

A gerincesekben több mint 10 különböző CDK van, és eltérően az élesztőktől itt már többnek van funkciója a sejtciklus-szabályozásában. A bizonyítottan a cdc2/CDC28 funkcionális homológ cdk1 és cdk2 (Nigg 1995) mellett a cdk4 és cdk6 (Sherr 1996) működik közvetlenül a sejtciklus koordinálásában. A cdk2 az S/G2, míg a cdk1 a G2/M fázisban képez aktív komplexet. A cdk4,6 alegységet tartalmazó komplexek a nyugalomban lévő sejtek sejtciklusba lépését, a G0/G1 átmenetet ellenőrzik.

Az első növényi cdc2 homológok meglétére utaló kísérletek óta számos növényi CDK-t azonosítottak (John és mtsai 1989, Hirt és mtsai 1991). A különféle növényfajokból izolált CDK-kat szekvenciájuk alapján legalább öt típusra oszthatjuk (Segers és mtsai 1997). Ezek közül az A és B-típusúaknak van igazolt sejtciklus-szabályozó szerepe, a többi funkciója egyelőre ismeretlen, illetve áttételesen működnek a ciklus szabályozásában (Inzé 2005, Fülöp és mtsai 2005). A cdc2 legközelebbi növényi homológjai, az A-típusú CDK-k ciklinkötő régiójában a klasszikus PSTAIRE aminosav motívumot, míg a B-típusú CDK-k családjában eddig csak növényekben leírt PPTALRE és PPTTLRE ciklinkötő motívumokat találjuk (Magyar és mtsai 1997). Az A-típusú kinázokból felépülő komplexek hasonlóan az élesztőkhöz és emlősökhöz, a G1/S és a G2/M átmenetben is aktívak. Ezzel szemben a G2/M fázisokban sajátos módon mind az A, mind pedig a B-típusú CDK-k aktív formában vannak jelen (Magyar és mtsai 1997, Bögre és mtsai 1997). Állati és élesztő sejteken végzett vizsgálatok eredményeként elmondható, hogy ezekben az élőlényekben a cdc2 mRNS és fehérje a sejtciklus minden fázisában jelen van. A hasadó élesztő esetében sem az mRNS, sem a fehérjeszint nem változik (Wittenberg és Reed 1988). Ettől eltérően az állati sejteknél a cdc2 transzkripciója alacsony G1-ben, majd öt-tízszeresére emelkedik az S és M fázisok között. Érdekes módon azonban a fehérje mennyisége állandó a sejtciklus során, nem követi az mRNS szint változásait (Welch és Wang 1992). Mindezeket figyelembe véve a CDK kináz-aktivitásának ingadozása elsődlegesen nem a cdc2 mennyiségi változásának a következménye. A létrejövő aktív komplexek számát elsődlegesen az elérhető ciklin partnerek mennyisége határozza meg. A növényi

sejtciklus kutatások némileg más képet mutatnak az egyes fázisokban bekövetkező CDK mRNS és fehérjeszint változásokról. Az A-típusú CDK esetében, megegyezően az élesztőknél tapasztaltakkal, a transzkripció szintje és a fehérje mennyisége is azonos a sejtciklus minden fázisában (Magyar és mtsai 1997). Ezzel szemben a B-típusú CDK-k mRNS-einek expressziója a G2/M fázisokra korlátozódik (Magyar és mtsai 1997, Zhiponova és mtsai 2006). A fehérjék a transzkripciót követően jelennek meg, és a vizsgált rendszerekben a mennyiségük a G2/M fázis után is magas marad. Jelenleg még ismeretlen, hogy mi a funkciója ennek a szigorúan G2/M-re korlátozott expresszióknak, de valószínűleg a növényeknél általános, mitózis nélküli DNS megkettőződés, az endoreduplikáció, és a növényi sejtek esetében normális G2-ben történő differenciáció lehet a jelenség hátterében.

3.3. Ciklinek

A ciklineket eredetileg úgy írták le, mint a sejtciklus során oszcilláló mennyiségű fehérjéket (Evans 1983). Miután számos ciklin szekvenciáját meghatározták, és olyanokat is találtak, melyek mennyisége állandó a sejtciklusban, a definíció megváltozott. Ma ciklinek közé soroljuk azokat a fehérjéket, amelyek homológiát mutatnak a mintegy száz aminosavnyi "ciklin elem"-ben (Hunt 1991). A további kutatások nyomán bizonyítást nyert, hogy ez az úgynevezett "ciklin elem" lép kapcsolatba a CDK-k PSTAIRE motívumával, így elengedhetetlen a CDK-ciklin komplex kialakulásánál (Kobayashi és mtsai 1992). A röntgen kristallográfiás vizsgálatok részletesen feltárták azokat a komplex kialakulása során végbemenő térszerkezeti változásokat is, amelyek végül is a CDK-k aktivitásához vezetnek (Morgan 1997).

Az új definíció alapján a ciklinek családjába sok, már aminosav szinten is nagyon eltérő fehérje tartozik. Sarjadzó élesztőben 22 ciklint írtak le, ezekből 9 alkot komplexet a sejtciklus-szabályozásban szerepet kapó CDC28-cal (Andrews és Measday 1998). Az emlősökben azonosított ciklinek száma még magasabb. Ezeket az aminosav szekvenciájuk alapján A-tól J-ig terjedő osztályokba sorolták (Cross 1997). A későbbiekben kiderült, hogy a szekvencia alapján egy osztályba került ciklinek általában funkcionális homológiát is mutatnak, így az osztályozás a ciklinek sejtciklusban betöltött szerepéről is tájékoztatást ad.

Növényekben több, mint 60 ciklint találtak 14 különböző fajban. Az összehasonlító szekvencia-analízist, és az élesztő, állat és ember ciklinekkel való filogenetikai kapcsolatát alapul véve a növényi ciklineket A, B, D, H és T osztályokra bontották (Renaudin és mtsai 1996, Barroco és mtsai 2003, Fülöp és mtsai 2005). A növényi ciklinekben is megtaláljuk az egyes ciklin családokra jellemző aminosav motívumokat. Így a minden ciklinben meglévő "ciklin elem"-ek, és a később ismertető, lebontásban szerepet játszó elemek mellett, néhány mitotikus ciklinben leírták a cdc25 foszfatáz kötésében szerepet játszó 'P elemet' is (Zheng és Ruderman 1993). A D-típusú ciklinek jellegzetes, retinoblasztóma fehérjekötő LXCXE aminosav szekvenciája az eddig azonosított növényi D ciklinekben is általában jelen van (Renaudin és mtsai 1996).

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

A transzkripcionális szabályozás molekuláris mechanizmusa már régebb óta ismert. Az eddig vizsgált sejtciklusgének promóter régióiban több aktiváló és represszáló elemet azonosítottak, és a szabályozásban betöltött szerepüket is ismerjük (Trehin és mtsai 1998).

A proteolízis sejtciklus-szabályozásban betöltött szerepét csak az utóbbi években kezdték intenzíven tanulmányozni. Ennek ellenére, az állatok és élesztők esetében már bizonyított, hogy az SCF és az APC ubiquitin ligáz komplexek elengedhetetlenek számos ciklin és CKI (CDK inhibitor) lebontásánál, és a komplexek felépítése és működése is jól ismert (Peters 1998). Ezen komplexek alegységeinek növényi homológjait már azonosították (Ruegger és mtsai 1998). Igaz, hogy a sejtciklusban betöltött pontos szerepük egyelőre ismeretlen, azonban több kísérlet is arra utal, hogy növényeknél is részt vesznek a sejtciklust kontrolláló fehérjék lebontásában. Az ubiquitináláson keresztül lebomló A és B-típusú ciklinek N-terminálisán elhelyezkedő jellegzetes "destrukciós elem" a növényi homológokban is megtalálható. A dohánysejtekkel végzett kísérletek pedig igazolták, hogy a

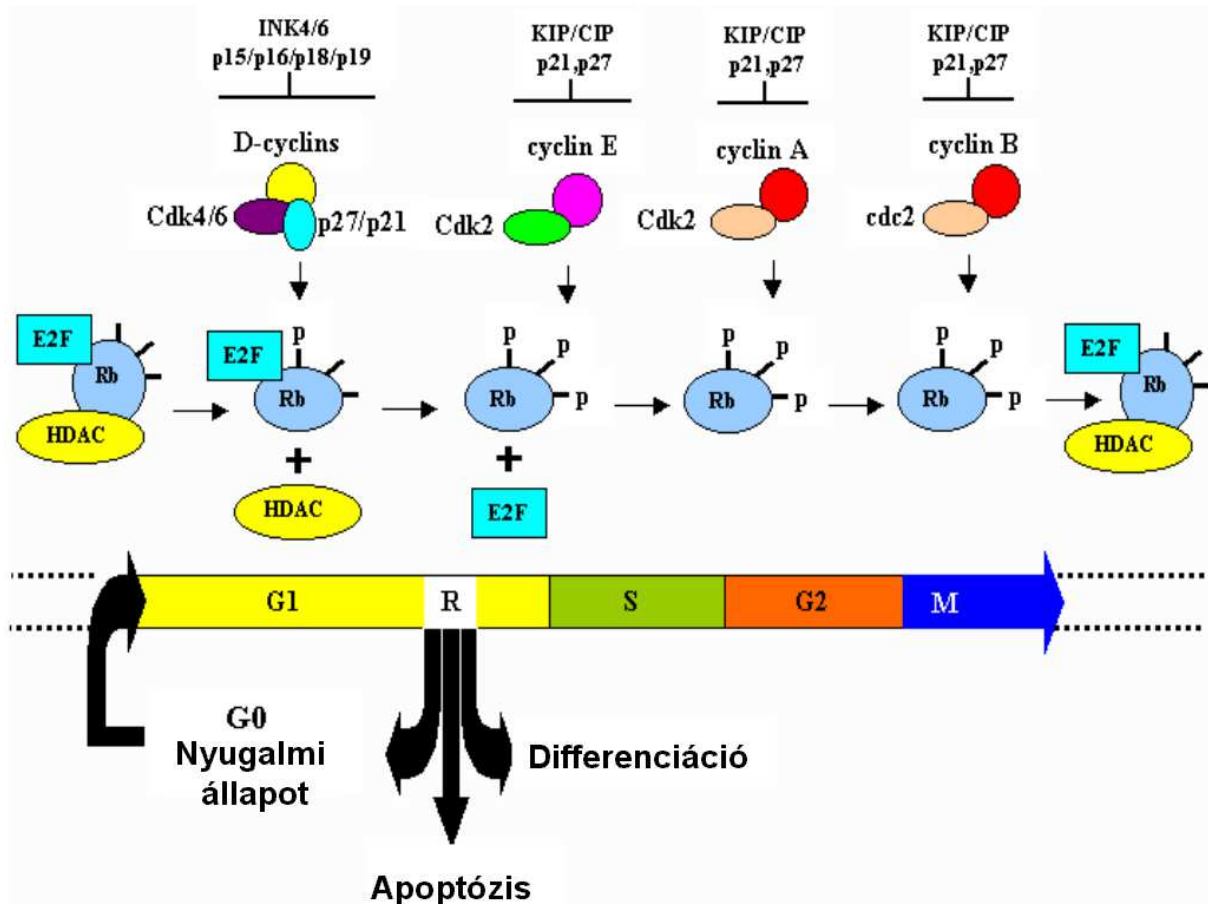
"destrukciós elem" megléte a fehérje sejtciklusfüggő instabilitását eredményezi (Genschik és mtsai 1998). A D és E-típusú ciklinekben nincs "destrukciós elem", degradációs szignálként a "PEST" (prolin, glutaminsav, szerin, treonin aminosavakban gazdag) régiók szolgálnak. Ezeket a "PEST" szekvenciákat a növényi D-típusú ciklinekben is megtaláljuk (Renaudin és mtsai 1996). Mindezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a növényi sejtciklust szabályozó fehérjék lebontása az élesztőknél és állatoknál ismert mechanizmusokhoz hasonlóan valósul meg. A sejtciklus finoman összehangolt szabályozásának alapja a ciklinek és CDK-k mennyiségében, lokalizációjában, transzláció utáni módosításában és kölcsönható partnereiben megnyilvánuló sokszínűsége. A ciklinek nem csak az aktív komplexek kialakulásának idejét, hanem a sejten belüli elhelyezkedését is befolyásolják, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül a komplexek szubsztrátspecifitását is biztosítják.

Az élesztők és állatok CDK-ciklin párpai jól ismertek, és az is tudott, hogy az egyes komplexek mely fázisokban aktívak. A sarjadzó élesztő CDC28 kináz a G1-ben a Cln1-3 alegységekkel való kölcsönhatása nyomán válik működőképesé. A Cln3 ciklin alacsony szinten az egész sejtciklus során jelen van, és amikor a sejt megfelelő méretet ér el, a CDC28-cal komplexet alkotva az SBF/MBF transzkripciósfaktorok közreműködésével beindítja a *CLN1,2* gének átírását. A Cln1,2-CDC28 kináz komplexek foszforilálják a Clb-CDC28 inhibitor Sic1 fehérjét, amely ezáltal az SCF komplexen keresztül ubiquitinálódik. Az ubiquitinált inhibitort a 26S proteoszóma lebontja, ez a Clb-CDC28 komplexek aktiválását eredményezi. A Cln1,2-CDC28 fehérje együttes a saját regulátor alegységét is foszforilálja, megjelölve ezzel az SCF számára, és így saját aktivitását szünteti meg. Az S fázisos *CLB5,6* gének expressziója a G1 végén kezdődik az MBF transzkripciósfaktoron keresztül. Ezek után a CDC28 kináz az S fázis végén kifejeződő CLB3,4, majd a M-ben expresszázó CLB1,2 ciklinekkel alkot komplexet (Andrews és Measday 1998).

Amint láthattuk, az élesztők sejtciklus-szabályozásában egy CDK kináz alkot komplexet más és más ciklinekkel az egyes fázisokban. A magasabbrendű többsejtűekben a sejtciklus-szabályozás összetettebbé válik. A CDK-k prototípusa, a *cdc2* mellett más CDK-k is részt vesznek a sejtciklus fázisainak ellenőrzésében. Ráadásul a ciklus koordinálásában szerepet vállaló ciklinek száma is magasabb,

mint az élesztők esetében. Mindezek együttesen egy finomabban szabályozható rendszert eredményeznek.

A többsejtűek sejtciklus-szabályozására példaként vehetjük a humán modellt (2. ábra). Emberben a G1-es ellenőrző pontban a különböző ciklin D és Cdk4, illetve Cdk6 párok aktívak. A D-típusú ciklinek "növekedési faktor érzékelők", a sejten kívüli jeleket továbbítják a sejtciklus felé. Expressziójukat a növekedési faktorok indukálják, mRNS és fehérjemennyiségük változatlan a sejtciklus során (Sherr 1993). A D-típusú ciklinek alkotta komplexek elsődleges feladata a retinoblasztóma (Rb) fehérje foszforilációja. Az Rb tumorszupresszor fehérje foszforilációs szintje a G1 és S fázisokban megnő, „hiperfoszforilálódik”, így leválik az E2F transzkripció faktorokról, ezáltal indulhat számos S fázisban kifejeződő gén átírása. A szabaddá vált E2F hatására az S fázis kezdetén megjelenik a ciklin E, komplexet alkot a Cdk2-vel, és elindítja a DNS-szintézist. Az S fázis későbbi szakaszában a ciklin E az SCF komplex közreműködésével degradálódik. Az SCF komplex számára saját katalitikus alegysége jelöli ki azáltal, hogy foszforilálja. A késő S fázisban Cdk1, az élesztő cdc2 legközelebbi homológja és a ciklin A lép kapcsolatba egymással, és viszi tovább a sejtciklust. A G2/M aktív kináz komplexei a már említett Cdk1-CycA és az MPF-ként ismert Cdk1-CycB (Nigg 1995). Az 2. ábrán az emlős sejtciklus egy vázlatos modelljét mutatjuk be.



2. Ábra Az emlős sejtciklus vázlatos modellje

Az emlősök esetében a feladatok sokrétűségének megfelelően a sejtciklus szabályozása sokkal bonyolultabb. A kulcsenzim itt is szerin/treonin kináz komplex, amely ciklinből és CDK-ból áll, de itt a sejtciklusban legkevesebb négyféle ciklin család és háromféle CDK család vesz közvetlenül részt, annak a meghatározásában, hogy a sejt és a környezete megfelel-e a továbbhaladásra. A tipikus sejtciklus itt is G1, S, G2 és M szakaszra tagolódik. Emlősök esetében a G1 fázisban van egy restriktós pont (R), ahol a sejtek eldöntik, hogy belépnek-e a sejtciklusba, differenciálódnak, várakoznak vagy amennyiben valami helyrehozhatatlan hiba történt, akkor kilépnek a ciklusból és apoptózis következik be. A sejtciklus minden szakaszát különböző CDK-k és ciklinek szabályozzák. A legelső a korai G1-ben a D-típusú ciklinek és a CDK4/6 kinázok. Az S-fázis határán az E-típusú ciklin és CDK2 komplex majd az A-típusú ciklinek CDK2. Végül G2/M-fázis határán a B ciklinek és cdc2 alkot szabályozó komplexet. Ezek a kinázok a retinoblasztóma fehérje foszforilálásán keresztül érik el a hatásukat. (INK és KIP a CDK inhibitorok; CDK és cdc2 a ciklin-függő kinázok; Rb a retinoblasztóma homológ fehérje, HDAC hiszton deacetiláz). Gátlás $\perp$

A növényi sejtciklus szabályozásban szerepet játszó CDK komplexekről még nincs olyan részletes képünk, mint az ember vagy az élesztők esetében. Egyelőre nincs közvetlen biokémiai bizonyíték a sejtciklus szabályozásában közvetlenül résztvevő növényi CDK-ciklin komplexekről. A sejtciklus szabályozásában nem közvetlen módon résztvevő, RNS polimeráz II karboxi-terminális doménjét foszforiláló MedsaCDKC;1 és MedtrCYCT;1-ről azonban éppen csoportunk bizonyított be, hogy együttesen mutatnak aktivitást (Fülöp és mtsai 2005). Számos kísérlet utal a

klasszikus sejtciklus szabályozó CDK és ciklin komplexek létezésére és működésére. Így például a növényi CDK-k ciklin-függő aktivitását bizonyítja, hogy a lucerna fehérjekivonatból tisztított monomer CDK-k nem mutatnak hisztont foszforiláló aktivitást (Bögre és mtsai 1997), ugyanakkor ember ciklin A, illetve lucerna CYCB2;2 ellenanyaggal immunoprecipitált komplexek sejtciklusfüggő kináz aktivitással rendelkeznek (Magyar és mtsai 1993, 1997). A komputeres szerkezeti modellek is azt támasztják alá, hogy monomer formában a növényi CDK inaktív (Dudits és mtsai 1998). Mindezek mellett az élesztő kettős-hibrid rendszer használatával is kimutattunk feltételezhető növényi CDK-ciklin párokat (Mészáros és mtsai 2000). Az emberi sejtek vizsgálatára alapozott modellben bemutatott ciklinek homológjait növényekben is megtaláljuk. Az A és B-típusú növényi ciklinek is az átíródás szintjén szabályozottak (Segers és mtsai 1997), és expressziós mintázatuk jól megegyezik a homológiájuk alapján feltételezettel. Nevezetesen mRNS szintjük az S fázis végén, valamint G2 és M fázisokban a legmagasabb. Érdekes kivétel a lucernából izolált A2 ciklincsaládba tartozó CYCA2;1. Ennek expressziója a D-típusú ciklinekhez hasonlóan közel azonos a teljes sejtciklusban, így a szerzők szerint szerepe lehet a G1 átmenetben is (Meskiene és mtsai 1995). Az emberi D-típusú ciklinek homológjait is megtaláljuk a növényekben. Ezeknek a ciklineknek többsége állatokban és növényekben is állandó szinten expresszálódik a sejtciklus minden fázisában. A növényi D-típusú ciklinek egy része az állatiakkal analóg módon valószínűleg a sejten kívüli jeleket közvetíti a sejtciklus felé. Erre a funkciójára utal, hogy az Arabidopsis D2 és D3-típusú ciklin gének cukorral, illetve a citokinin analóg kinetinnel indukálhatók (Dahl és mtsai 1995; Soni és mtsai 1995). Az állatokban a ciklin D komplexek a G0/G1 fázisban jutnak szerephez, a növényeken végzett kísérletek eredményei ezzel szemben egyes D-típusú ciklinek G2/M fázisos funkcióját feltételezik. Dohány sejt kultúra vizsgálatával kimutatták, hogy a CYCD2;1 és a CYCD3;1 transzkripciója a G2/M átmenetben a legmagasabb (Sorrell és mtsai 1999). A növényi D-típusú ciklinek G2/M fázisos szerepvállalását alátámasztják az élesztő kettős hibrid rendszeren végzett kísérletek is, ugyanis a specifikusan mitotikus MedsaCDKB2;1 kölcsönhatásba lép több D-típusú lucerna ciklinnel (Mészáros és mtsai 2000).

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

3.4. Ciklin-függő kinázok foszforilációja

Amint a fentiekben láttuk, a CDK-k aktivitásának szabályozása elsődlegesen a CDK-ciklin komplexek kialakulásán keresztül valósul meg. A felépült komplexek működését azonban a megfelelő aminosavakon történő foszforiláció, defoszforiláció is befolyásolja. Így például számos CDK kináz aktivitása több százszorosára fokozódhat a hasadó élesztő *cdc2* fehérje 167. pozíciójában található treoninnak megfelelő helyen történő foszforilációt követően. A 'T hurokban' elhelyezkedő treonin foszforilációja nyomán megnő a CDK-ciklin komplex stabilitása és szubsztrátkötő képessége is (Morgan 1997).

A Thr167-nek megfelelő treoninok poszt-transzlációs módosításáért felelős kinázok, a CAK-ok (CDK activating kinase) két osztályba sorolhatók, úgymint Cak1 és MO15. A Cak1 család prototípusát sarjadzó élesztőben azonosították. A 43 kDa-os fehérje monomerként aktív, és egyetlen igazolt *in vivo* szubsztrátja a CDC28 kináz, melyet jobban foszforilál monomerként, mint a CDC28-ciklin komplex tagjaként (Cross és Levine 1998). A másik CAK család képviselőit állatokban és hasadó élesztőben fedezték fel. A MO15 egy katalitikus alegységből ($p40^{MO15}$, amely Cdk7 néven is ismert), egy regulátor alegységből (ciklin H) és egy a komplex felépítését elősegítő faktorból (MAT1) áll. A MO15 típusú CAK-ok azon túl, hogy több alegységből épülnek fel, szubsztrátspecifitásban is eltérnek a Cak1-től. Szemben a Cak1-gyel a monomer Cdk-kat nem, míg a Cdk-ciklin komplexet jól foszforilálják, és szubsztrátként elfogadják az RNS polimeráz II nagy alegységének C terminális doménjét is, így szerepük lehet a transzkripció szabályozásában (Kaldis és mtsai 1998). A sarjadzó élesztőben is megvan a MO15 komplex homológja, ez azonban csak az RNS pol II-CTD-t foszforilálja, tehát nem rendelkezik CAK aktivitással. A CAK-ok fehérjeszintje és *in vitro* kináz aktivitása is állandó a sejtciklus során, így az

még kérdéses, milyen módon biztosítják a CDK-k időzített foszforilálását (Kaldis 1999).

Növényekben még nem ismert hogy a CDK-k aktivitását fokozza-e a foszforiláció, de a CAK-ok két típusát már azonosították. A rizsben leírt CAK, az R2 tulajdonságai alapján a MO15 családba sorolható. Az emlős p40^{MO15}-tel mutat homológiát, monomerként nem aktív, és csak a hasadó élesztőben képes komplementálni a megfelelő mutánsokat. A szubsztrátspecifitását illetően is hasonló a MO15-ös CAK-okhoz; amellett, hogy specifikusan foszforilálja a rizs cdc2 160-as treonin csoportját, elfogadja szubsztrátként az RNS Pol II CTD-t is (Yamaguchi és mtsai 1998). Az *Arabidopsis*-ből izolált CAK1At-t valójában egyik CAK családban sem tudjuk elhelyezni. A p40^{MO15}-tel mutat homológiát, viszont funkcionálisan a Cak1-hez hasonlít, aktivitása ciklintől független, és csak CDK-t foszforilál. További érdekessége, hogy míg az *Arabidopsis* CDK-k (CDKA;1 és CDKB1;1) nem komplementálják a hasadó élesztő CAK hiányos mutánsait, addig a Cak1At mind a sarjadzó élesztőben, mind pedig a hasadó élesztőben pótolja a kiesett CAK gének feladatát (Umeda és mtsai 1998).

A CAK antagonistá KAP foszfatázt emberben azonosították. A foszfatáz a CDK-ciklin komplex megszűnte után a megmaradó monomer CDK-ról távolítja el a foszfát csoportot, így szabályozva a későbbiekben kialakuló CDK-ciklin komplexek aktivitását (Poon és Hunter 1995). Növényekben egyelőre nem találtak KAP homológot.

A fő, sejtciklus szabályozó CDK-k aktivitása foszforilációval nemcsak fokozható, hanem gátolható is. A konzervált Tyr15, és többsejtű eukariótákban a szomszédos Thr14 aminosavak foszforilálása nyomán a kinázok ATP kötő régiójában bekövetkező térszerkezeti változások az aktivitás gátlását eredményezik (Morgan 1997). A Thr14, Tyr15 aminosavak foszforilálásának elsősorban a mitózis megfelelő időzítésében van szerepe. Ezt bizonyítja, hogy amennyiben cdc2 kinázon a 15. tirozint alaninra cseréljük, a hasadó élesztő sejtek DNS-állományuk megkettőzése nélkül is belépnek a mitózisba. Magasabb rendű többsejtűekben normális körülmények között a Tyr15/Thr14 foszforilált Cdc2-ciklin B komplex csak a G2 fázis végén bekövetkező defoszforiláció nyomán válik aktívvá, habár ennek a foszforilációnak nincs akkora jelentősége, mint a hasadó élesztő esetében.

Emlősökben a Tyr15/Thr14 foszforilációja a G2/M mellett a G1/S fázis szabályozásában is szerepet kap (Lew és Kornbluth 1996).

A gátló hatású foszforilálásért felelős enzim hasadó élesztőben a Wee1 kináz, míg emberben az élesztő Wee1 homológ mellett a Myt1 kináz is hasonló funkciót tölt be. A Tyr15 aminosavat a citoplazmában előforduló Wee1, a Thr14-t pedig elsősorban az endoplazmatikus retikulumban membránjában lokalizálódó Myt1 foszforilálja (Liu és mtsai 1997). A CDK-k aktivitását gátló kinázok hatását a kettős specificitású cdc25 foszfatázok a Tyr15/Thr14 aminosavak defoszforilálásával szüntetik meg. A cdc25 foszfatáz családnak emlősökben több tagja van, mindegyiknek a sejtciklus más-más fázisában van szerepe, így a G1/S-ben a cdc25A és cdc25B, a G2/M-ben pedig a cdc25C izoformák aktívak (Draetta és Eckstein 1997).

A CDK-k aktivitását szabályozó kinázok és foszfatázok maguk is sejtciklusfüggő aktivitással rendelkeznek, és aktivitásukat foszforiláltságuk befolyásolja. A mitózisban a Wee1, Myt1 kinázok és a cdc25 foszfatáz is foszforilált állapotban vannak, ennek a poszt-transzlációs módosításnak azonban ellentétes a hatása a kinázokra és a foszfatázokra. A foszforiláció következtében a cdc25 aktivitása emelkedik, míg a kinázoké csökken. Ezeknek a változásoknak eredményeként a CDK-k Tyr15/Thr14 foszforiláltsága csökken, ami végül is a CDK-k aktivitásának emelkedésében jelentkezik. A folyamatot egy pozitív visszacsatolás tovább erősíti, mivel a Cdk1-ciklin B komplex foszforilálni képes mind a Wee1, mind pedig a cdc25 fehérjéket. A G1/S fázisban a cdc25A és a Cdk2-ciklin E komplex kölcsönhatásában hasonló pozitív visszacsatolást figyelhetünk meg (Draetta és Eckstein 1997).

Növényekben a Tyr15/Thr14 foszforilációjában, defoszforilációjában közreműködő gének közül a Wee1 kinázt kódolót és valószínűleg a cdc25 gén homológját is sikerült izolálni (Landrieu és mtsai 2004). A kukoricában és *Arabidopsis*-ban leírt gén hasadó élesztőben túltermeltetve "wee", azaz törpe fenotípust váltott ki, és a baktériumban termeltetett rekombináns ZmWee1 csökkentette a p13^{suc1} affinitás-tisztított CDK komplexek *in vitro* kináz aktivitását (Sun és mtsai 1999; Sorrell és mtsai 2002). A defoszforilációért felelős foszfatázról tudható, hogy egyetlen katalitikus egységet tartalmaz, stimulálja a CDK-k aktivitását,

valamint a kismértékű aminosav homológia ellenére, az NMR vizsgálatok is valószínűsítik, hogy a szerkezete a cdc25 családhoz igen hasonló (Landrieu és mtsai 2004).

3.5. Ciklin-függő kináz komplexek tisztázatlan szerepű fehérjéi

A Cks (CDC28 kinase subunit1) család tagjai az elsőként azonosított sejtciklus-szabályozó fehérjék közé tartoznak. A Cks-ek prototípusát, a suc1-t a defektív cdc2 hatást szupresszáló képessége alapján találták meg hasadó élesztőben (Hayles és mtsai 1986). A gén sarjadzó élesztő homológját a CDC28-cal való kölcsönhatása nyomán izolálták, és ez a tulajdonsága lett a Cks család névadója (Hadwiger és mtsai 1989). A Cks-eknek emberben két képviselője van, egy 9 kDa-os és egy 13 kDa-os fehérje (Richardson és mtsai 1990). A növényekben megtalált Cks-ek nagy homológiát mutatnak a család más élőlényekben azonosított tagjaival (De Veylder és mtsai 1997).

Annak ellenére, hogy a Cks-ek régóta ismert és tanulmányozott fehérjék, a pontos funkciójuk még ma sem ismert. Tudjuk, hogy a legtöbb sejtciklus-szabályozásban érintett CDK komplexet képez ezekkel a 9-13 kDa méretű fehérjékkel, és hogy elengedhetetlenek a CDK komplexek működéséhez. A sejtciklus szabályozásban betöltött központi szerepüket igazolják a következő élesztő és karmos béka kísérletek. Élesztőkben a Cks deficiens sejtek magas ciklinszint mellett késő mitózisban blokkoltak, és érdekes módon a túl nagy mennyiségű Cks is megállítja a sejtciklust (Hadwiger és mtsai 1989). Karmos béka petesejtek sejtmentes kivonatában a magas Cks szint a CDK Tyr15 defoszforilációját gátolja, és így megakadályozza a mitózisba lépést, ugyanakkor a Cks hiánya a mitózisból való kilépést gátolja (Patra és Dunphy 1996). A Cks-ek funkciójára utalhat, hogy élesztőben megfigyelték a SUC1 fehérje és az APC (Anaphase Promoting Complex) asszociációját. Ezek alapján elképzelhető, hogy a Cks-nek szerepe van a CDK komplexek mitotikus degradációs komplexhez való irányításában (Sudakin és mtsai 1997). A Cdk2-Cks komplex szerkezeti vizsgálatai szerint a Cks feladata a megfelelő felületet biztosítása a szubsztrátok és reguláló fehérjék kötéséhez (Bourne és mtsai 1996).

A növényekben leírt Cks gének közül az *Arabidopsis*-ét vizsgálták részletesebben. A *CKS1At* cDNS terméke komplementálja a hasadó élesztő megfelelő mutánsát, míg a túltermeltetése mind a vad típusú, mind pedig a mutáns élesztőben sejtciklus-blokkot eredményez. A *CKS1At* fehérje *in vitro* az *Arabidopsis* A és B-típusú CDK-jával is kölcsönhatásba lép (De Veylder és mtsai 1997). Az *Arabidopsis* Cks fehérje és a sejtciklus-szabályozás kapcsolatát támasztja alá az is, hogy *in situ* hibridizációs kísérletek alapján a gén az aktívan osztódó sejtekben fejeződik ki magas szinten. Emellett a *CKS1At* megtalálható poliploid sejtekben is, ahol az A és B-típusú CDK-k nem, vagy csak alacsony szinten fejeződnek ki. Ezek alapján feltételezik, hogy a *CKS1At* szerepet játszik az endoreduplikációban is.

3.6. A növényi sejtciklus

A magasabbrendű növények életciklusa a petesejt megtermékenyülésétől az utódgeneráció létrehozásáig a sejt osztódása, növekedése és differenciálódása során valósul meg. A sejtciklusnak kiemelkedő szerepe van a fejlődési és növekedési program, valamint a környezeti hatások változásának érzékelésében és a válaszok összehangolásában. Az utóbbi tíz évben rendkívül látványos fejlődésnek lehettünk tanúi a különböző növényi sejtciklus gének és fehérjék megismerésében és funkcióik megértésében (Dewitte és Murray 2003, De Veylder és mtsai. 2003, Inzé 2005). Vitathatatlanul bebizonyosodott, hogy a sejtciklus központi szabályozói a növények esetében is a különböző ciklinek és ciklin-függő kinázok, amelyek feltehetőleg a környezeti változásokra adott megfelelő válaszokért is felelősek. A különböző CDK komplexek aktivitásának és szubsztrátspecifitásának változásait tekinthetjük a kulcsmechanizmusnak a sejtciklus és a különböző jelátviteli rendszerek összekapcsolásában. Növényekben a CDK működés bonyolultsága a különböző génvariánsok eltérő kifejeződéséből, valamint a velük kölcsönható ciklinek nagy számából adódik. Ráadásként a CDK komplexek transzlációt követő módosításai, szerin/treonin, illetve tirozin foszforilációja és defoszforilációja, valamint sejten belüli előfordulása árnyalja tovább a képet (Nakagami és mtsai. 2002, Dewitte és Murray 2003).

Lucerna esetében is különböző CDK és ciklin variánsokat, valamint ezek funkcionálisan különböző komplexeit azonosították és jellemezték (összefoglalóként

lásd Mészáros és mtsai. 2000). A legősibb, legkonzerváltabb PSTAIRE ciklin-kötő motívumot tartalmazó CDK-kon [Medsa;CDKA;1/A;2 (Cdc2MsA/B)] kívül megtalálhatók a növény-specifikus G2/M fázisban kifejeződő és aktív CDK-k is. (Magyar és mtsai. 1997). A mitózis-specifikus Medsa;CDKB2;1 (Cdc2MsF) esetében azt találták, hogy a pre-profázisos sávval, a profázisos gyűrűvel, a mitotikus mikrotubulusokkal és a fragmoplasztal kolokalizált (Mészáros és mtsai. 2000). A különböző ciklin és CDK kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a CDK kinázok aktivitásának változásaiban, ami a sejtciklus különböző szakaszainak szabályozásában és a környezeti hatásokra adott válaszban jelentős (Hirt és mtsai. 1992; Saviouré és mtsai. 1995; Mészáros és mtsai. 2000). A kémiai inhibitorok vizsgálata során mutatkozott meg a szerin/treonin foszfatázok jelentősége a mitotikus kinázok szabályozásában, illetve a mikrotubulus szerveződésében (Ayaydin és mtsai. 2000). Lucerna levélprotoplasztok esetében bebizonyosodott, hogy a Medsa;CDKA;1/A;2 komplex csupán auxin és citokinin együttes jelenlétében volt aktív (Pasternak és mtsai. 2002). Lucerna levélkorongok szintetikus auxinnal (2,4-D) történő kezelése jelentős hiszton H1 kináz aktivitás erősödést okozott a p13^{suc1}-kötött kinázfrakció esetében. Ez az aktivitás nagymértékben gátolható volt az egyidejű abszcizinsav kezeléssel (Mészáros és mtsai. 2000). Mindezek a kísérletek nagyban alátámasztják, hogy szabályozó elemek egész sora játszik szerepet a lucerna CDK-k pillanatnyi aktivitásának kialakításában.

Növényekben a sejtosztódás folyamata képes válaszolni a hormonális és stressz szignálokra, mint amilyen az auxin, az abszcizinsav, vagy ozmotikus stressz, melyekről tudott, hogy Ca²⁺-függő jelátviteli utakat használnak (Xiong és mtsai. 2002).

3.7. Élesztő ciklin-függő kináz inhibitorok

Az általam is vizsgált fehérje megértéséhez a sejtciklus alapjai után a sejtciklus egy másik fontos komponensével, a ciklin-függő kináz inhibitorokkal kell foglalkoznunk.

Az első CDK inhibitort a rum1+-t hasadó élesztőből mutatták ki (Moreno és mtsai 1994). Ez a fehérje felelős a sejtciklus startpontjának időzítéséért, oly módon, hogy nem engedi a sejteket belépni a ciklusba, amíg el nem érték a kritikus tömeget.

A rum1⁺-hiányos sejtek képtelenek a sejtciklus megállítására nitrogén éheztetés során, sőt letális mitózisokba lépnek be anélkül, hogy az S fázisba léptek volna.

Másik hasonló inhibitor a SIC1 (Nugroho és Mendenhall 1994), aminek túltermeltetése megnyúlt, de morfológiailag az alacsony CLB ciklin szintű élesztőkhöz hasonló fenotípust okoz. Mutatva, hogy egy CDC28-Clb komplex gátló faktor. A SIC1-et nem termelő sejtek életképesek, de megnő bennük a kromoszómatorések és kromoszómavesztések gyakorisága.

3.8. Állati ciklin-függő kináz inhibitorok

Állatokban két családja található a CDK inhibitoroknak, a Kip/Cip család és az INK4 család (Sherr és Roberts 1999). A Kip/Cip inhibitorok gátló hatása szélesebb spektrumú, míg az INK4 inhibitorok inkább a G1 CDK-kat, a CDK4-et és CDK6-ot gátolják. A CDK inhibitorok az emlős sejtekben oly módon szabályozzák a G1 CDK-k aktivitását, hogy fizikailag gátolják a CDK működését vagy szubsztrát/ATP hozzáférését (Pavletich 1999). Másrészt az állati CDK inhibitorok szükségesek a CDK-CycD komplex fehérjéinek összekapcsolódásához (Sherr és Roberts 1999). Ezen felül a sejtek mozgásában is szerepet játszanak a Kip/Cip inhibitorok, ez a szerepük független a CDK-ciklin kölcsönhatásoktól (Denicourt és Dowdy 2004).

3.9. Növényi ciklin-függő kináz inhibitorok

A növényi sejtciklus legkésőbb felismert komponensei a CDK inhibitorok. Növényekben csupán egy inhibitor család található, a tagok az aminosav szekvencia alapján igen nagymértékben eltérnek mind az élesztő, mind az állati inhibitor fehérjétől. Épp csak elkezdődött a növényi inhibitorok alapvető tulajdonságainak tisztázása. Először Wang és munkatársai izoláltak növényi CDK inhibitort *Arabidopsis*ből. Élesztő kettős hibrid rendszer segítségével kerestek CDKA (az egyetlen A-típusú *Arabidopsis* CDK), illetve CycD3;1 kölcsönható fehérjét, melyeket ICK-knak (interactors of CDK) nevezték el. A család első két megtalált és jellemzett tagja az ICK1 és ICK2 (Wang és mtsai 1997, 1998; Lui és mtsai 2000), a továbbiakat immár KRP (Kip related protein) néven De Veylder és munkatársai 2001-ben írták le. A hét *Arabidopsis* KRP *in silico* megtalálható aminosav szekvencia motívumait a 5a ábrán mutatjuk be. Amennyiben a növényi KRP-k, illetve az emlős

p27Kip1 aminosav sorrendjét hasonlítjuk össze, az az érdekesség tűnik a szemünkbe, hogy léteznek ugyan homológ régiók a két fehérje között, azonban ezek a szakaszok teljesen másképp helyezkednek el a növényi fehérjékben. Amíg emlősökben ezek a motívumok az amino-terminális végen, addig a növényi fehérjékben a karboxi-terminálison találhatók. Ugyanakkor ismert az a tény, hogy mind a két esetben ez a szakasz felelős a CDK-kkal való kölcsönhatásért. Megemlítendő, hogy a CDK-k, ciklinek, E2F, RBR és egyéb központi sejtciklus szabályozók mindegyike sokkal fölismertetőbb homológiával bír az állati megfelelőjével összehasonlítva. Fölmerül tehát, hogy ez a nagyfokú eltérés fontos lehet a növényi és állati differenciálódás közötti alapvető különbségek molekuláris szintű magyarázatában. Az ICK1/KRP1, illetve ICK2/KRP2-ről mind *in vitro* (Wang és mtsai 1997) mind *in vivo* (De Veylder és mtsai 2001) bebizonyították, hogy képes gátolni a p13^{suc1}, illetve p10CksAt1-kötött kináz komplexeket. Ezenfelül a KRP1 mikroinjektálása *Tradescantia* bibeszőr sejtekbe hatással van a mitózisra, késlelteti a metafázist (Cleary és mtsai 2002).

Ahhoz, hogy megérthessük a CDK inhibitor fehérjék szerepét hasznos tudnunk, hogy mely más, különösen sejtciklus fehérjékkel hatnak kölcsön. A CDKA, illetve CycD3;1 fehérjékkel való direkt kölcsönhatást már a kezdetekben kimutatták. Meghatározták, hogy egy 31 aminosav hosszú szakasz felelős mindkét kölcsönhatásért, és az ezen régió előtti konzervált rész csak a D-típusú ciklin kölcsönhatásért (Wang és mtsai 1998). Erről a szakaszciklusról mutatták ki a p27Kip1 esetében, hogy részt vesz a CDK2 kötésben (Russo és mtsai 1996). A hét *Arabidopsis* KRP mindegyike és a dohány NtKiS1a kölcsönhat a D-típusú, de nem asszociálódik a mitotikus ciklinekkel (De Veylder és mtsai 2001; Jasinski és mtsai 2002a). Az A-típusú CDK-val való KRP kölcsönhatások is bizonyíthatóak, ha nem is minden esetben (KRP6, KRP7) tökéletes bizonyossággal. Ugyanakkor a B-típusú CDK-kkal való kölcsönhatást senki nem tapasztalt (Zhou és mtsai 2002, De Veylder és mtsai 2001), sőt mostanában állapították meg, hogy a rekombináns HA-KRP2-t növényben kifejeztetve, ezzel nem tisztítható a CDKB komplex, csak a CDKA (Verkest és mtsai 2005). Ez alapján az irodalom ma azt állítja, hogy csupán az A-típusú CDK szabályozásában játszanak szerepet a KRP fehérjék. Mint majd a tézis

további részében láthatjuk, az eredményeink alapján, mi az ellenkezőjét gondoljuk (Pettkó-Szandtner és mtsai 2006).

A KRP1 fehérje sejten belüli elhelyezkedéséről tudjuk, hogy a sejtmagban található, függetlenül attól, hogy a fehérje tartalmazza-e a nukleáris lokalizációs szignált (Zhou és mtsai 2003). Feltétlenül meg kell említeni, hogy az inhibitor által szabályozott CDKA-ra nem jellemző a kizárólag magi elhelyezkedés, valamint, hogy az eddig kevésbé vizsgált KRP-k között többnek nincs magi lokalizációs szignálja (2. ábra). Ugyanakkor azt is bizonyították, hogy a levélszőrökben kifejezett KRP1 fehérje képes elvándorolni a környező sejtekbe, és ott megváltoztatni a sejtméretet (Weinl és mtsai 2005). Ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a KRP génkifejeződés erőssége „átsugározhat” a szomszédos sejtekre, így összehangolva azok proliferációját és differenciációját.

Az inhibitor fehérje degradációjáról nem sok részlet ismert, de tudott, hogy a magas KRP1, illetve KRP2 mRNS szint a transzformáns növényekben egyáltalán nem jelenik meg magas fehérje mennyiségben (Zhou és mtsai 2003; Verkest és mtsai 2005). Ezek alapján tudható, hogy mindkét fehérje instabil függetlenül a degradációs PEST motívumtól. Ugyanígy tudott, hogy kettős-hibrid vizsgálatokban az N-terminálisan csonkolt inhibitor sokkal erősebb kölcsönható partner minden partnerfehérjéjével. Ráadásul a N-terminálisan csonkolt KRP1 fehérjeszintje növényben is jelentősen magasabb. Ennek ellenére azonban nem gátolja nagyobb mértékben a CDK aktivitást (Zhou és mtsai 2003).

Verkest és munkatársai 2005-ben írták, le, hogy a fehérje stabilitásában szerepet játszhat a foszforiláció, ugyanis a KRP2 *in vitro* degradációja mind a 26S proteoszóma gátló MG132-vel, mind pedig a CDK gátló olomucinnal gátolható.

A *KRP* gének expressziójáról általánosságban elmondható, hogy merisztematikus szövetekben viszonylag alacsony és az osztódó részekről távolodva emelkedik (Ormenese és mtsai 2004). A *KRP1* inkább levélben expresszálódik magasan, míg a *KRP2* inkább a szárban, azonban általánosan igaz, hogy a *KRP*-k kifejeződésére nem jellemző a szövetspecifitás (Ormenese és mtsai 2004). A sejtciklus során a ciklusba való belépéskor csökken a *KRP*-k mRNS szintje a cukoréheztetési blokkhoz képest (Menges és mtsai 2005). A *KRP1/ICK1* inhibitor gén

a stressz hormon, abszcizinsav (ABA) hatására jelentős mértékű génkifejeződés növekedést mutatott, miközben a CDK aktivitás csökkent (Wang és mtsai. 1998).

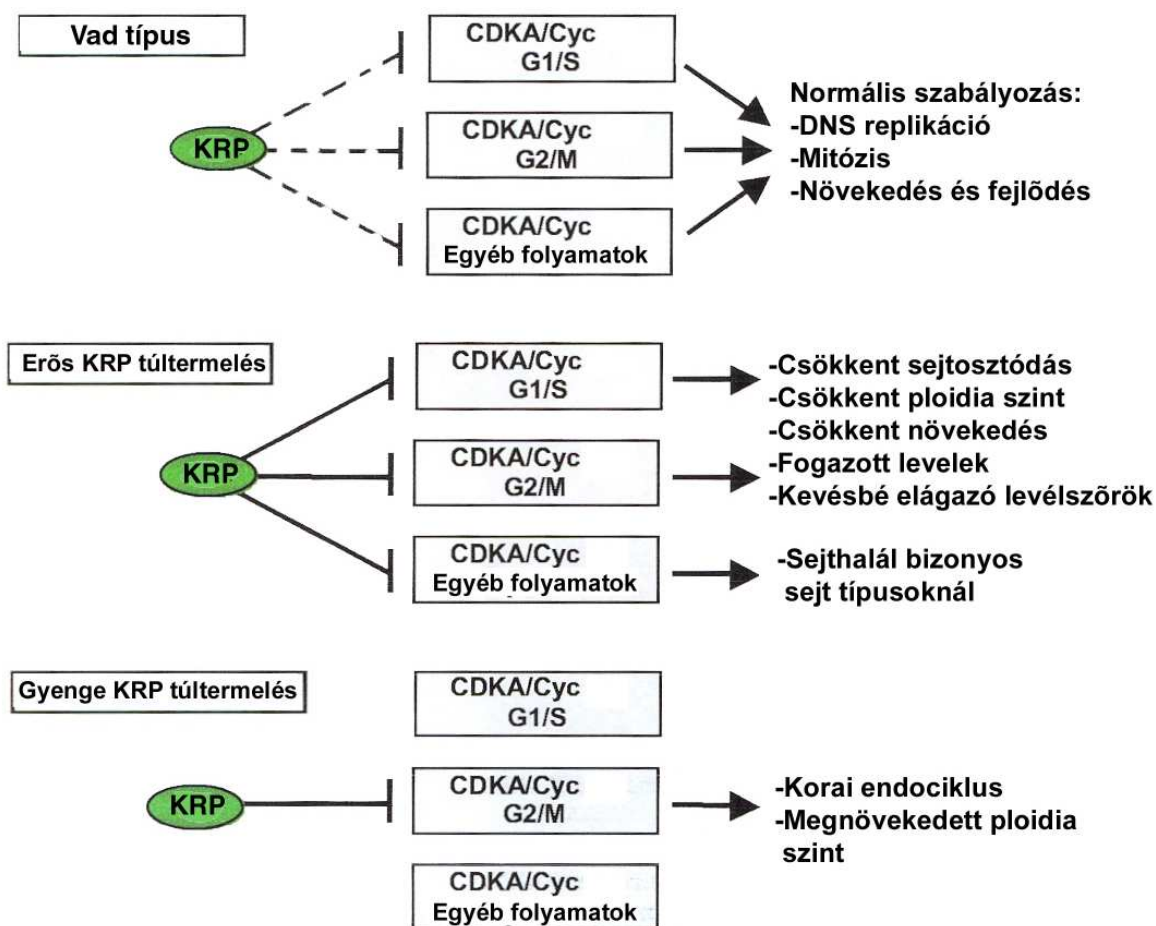
Alapvető kérdés a CDK inhibitorok szerepe a növények növekedésében és fejlődésében, külön-külön, illetve együttesen. Különösen érdekes a növényekben található *KRP* gének magas száma (*Arabidopsis thaliana*-ban hét azonosítható). A *KRP*-k szerepének megismerésében segíthetnek a kettős-hibrid és expressziós adatokon kívül a fehérje túltermeltetési kísérletek is.

Annyit biztosan állíthatunk, hogy az *Arabidopsis* *KRP1*, *KRP2*, *KRP4*, illetve a *NtKIS1a* (dohány *KRP*) *CDKICr* (*Chenopodium* *KRP*), növényi CDK inhibitorok, hasonló fenotípust okoztak. Akkor, ha a karfiol mozaik vírus, növényekben erős konstitutív génkifejeződést biztosító, 35S promóterével fejeztették ki azokat. Az inhibitor fehérje túltermeltetése a növényekben jelentős változásokat okozott a sejtek számában és méretében, valamint a különböző szövetek, illetve levélszőrök sejtjeinek DNS tartalmában azáltal, hogy az endoreduplikációt gátolta (Wang és mtsai. 2000; De Veylder és mtsai. 2001; Jasinski és mtsai. 2002b; Zhou és mtsai. 2003; Schnittger és mtsai. 2003). A sejtsztódás ezen változásai komoly következményekkel jártak a növények levél- és virágfelépítésében és a növény növekedésében (Wang és mtsai. 2000; De Veylder és mtsai. 2001; Jasinski és mtsai. 2002b).

A legjobban vizsgált *KRP1* levélszőr-specifikus expressziója esetén a levélszőr kevésbé elágazó lesz, sőt a levélszőröket határoló sejtek is megnövekednek, föltehetőleg a fehérje sejt-sejt közötti vándorlása révén (Weinl és mtsai 2005). A pollenspecifikus túltermeltetés esetén a pollen életképessége, a sejtmagszám és a fertilitási képesség is csökkent (Zhou és mtsai 2002).

Nem sokat tudunk a CDK-k ciklinnek *KRP*-k kölcsönhatásairól, illetve ezek dinamikájáról növényekben, mindenesetre azt megfigyelték, hogy a 35S:*KRP1* fuziót hordozó transzgénikus növényekben a *CycD3;1* és *CycD2;1* transzkripció szint megemelkedett, jelezve, hogy egy visszacsatolási mechanizmus működhet ellensúlyozva ezzel a *KRP* génkifejeződés hatását. Ugyanígy a *CycD3;1* egyidejű túltermeltetése képes menekíteni a *KRP1* túltermelő fenotípust (Jasinski és mtsai 2002b). Ezek a megfigyelések is bizonyítják, hogy a D ciklinek és *KRP*-k kölcsönhatása fontos biológiai hatással bírhat.

Az endoreduplikáció, azaz a sejtek DNS tartalmának osztódás nélküli megkettőződése általános növényi jelenség, ami a differenciáció során a sejtmegegyezés és a megegyezkedett metabolikus aktivitás velejárója (Traas és mtsai 1998). A sejtmegegyezés kialakulásában is fontos tényező a DNS tartalom (összefoglalva Kondorosi és mtsai 2000). Megfigyelték, hogy a kukorica endospermiumban, ahol az egymást követő endoreduplikációk sora játszódik le, az S-fázissal kapcsolatba hozható kinázok aktivitása megegyez, míg az M-fázisosaké lecsökkent (Grafi és Larkins 1995). Az endoreduplikálódó endospermiumból nyert fehérjekivonat képes gátolni az M-fázisú kinázokat, utalva valamely inhibitor jelenlétére. A legtöbb differenciálódott *Arabidopsis* sejt poliploid (Galbraith 1990). Több független kísérlet során bebizonyosodott, hogy a KRP túltermelés levélben gátolja az endoreduplikációt. (De Veylder és mtsai 2001; Jasinski és mtsai 2002a; Zhou és mtsai 2002). Hasonlóképpen a levélszörökben specifikusan kifejeződő KRP is gátolja az endoreduplikációt (Schnittger és mtsai 2003). Ezen kísérletek alapján fontos szerepet tulajdonítanak a KRP-knek az endoreduplikációban, valamint sejtmegegyez, hogy ezt a szerepet elsősorban a CDKA, valamint a D-típusú ciklineken keresztül éri el. Érdekes jelenség a már említett levélször határoló, KRP-t nem túltermelő sejtek megegyezésének megegyezkedése, ami egyértelműen az endoreduplikációnak tudható be (Weinl és mtsai 2005). Ehhez hasonló megfigyelés, hogy a KRP2-t erősen túltermelő növények leveleiben gátolt, míg a gyengén túltermelőben serkentett a az endoreduplikáció (Verkest és mtsai 2005). Mindkét esetnek az lehet a magyarázata, hogy a mitotikus sejtciklus a vad típusnál korábbi állapotnál gátlódott, miközben a DNS replikáció zavartalanul folyt, ily módon a sejtek idő előtt beléptek az endociklusba (Weinl és mtsai 2005; Verkest és mtsai 2005). Mint korábban utaltam rá a mikroinjektált *Tradescantia* bibeszörök mitózisára is hatással volt a KRP1. (Cleary és mtsai 2002). Ezeket az eredményeket összefoglalva láthatjuk az 3. ábrán.



3. Ábra A transzgenikus kísérletek alapján a CDK inhibitorok szerepe a sejtciklus, és a differenciáció szabályozásában

A KRP elengedhetetlen a növények normális fejlődéséhez. Különböző fenotípust okoz azonban az erős, illetve gyenge KRP túltermeltetés növényekben. A vad típusú növényben tapasztalható KRP-k általi szabályozást a különböző CDK komplexek gátlása által szaggatott vonallal jelöltük. A különböző mennyiségű KRP-t túltermelő növényeknél tapasztalható CDK gátlást folyamatos vonallal jelöltük.

3.10. A hormonok szerepe a növényi sejtciklusban

A növényi növekedés és fejlődés szabályozásának fontos belső tényezői a növényi hormonok. Két klasszikus növényi hormonról, az auxinról és a citokininről már az ötvenes évek óta tudjuk, hogy elengedhetetlenek a növényi sejtosztódáshoz és DNS-szintézishez. Ennek ellenére rengeteg ellentmondó eredmény került nyilvánosságra a pontos funkciójukra vonatkozóan. Beszámoltak olyan kísérletről, ahol a sejt kultúra auxin megvonásra nem blokkolódott kitüntetett sejt ciklus fázisban, ahol a sejtek G2 fázisban rekedtek meg, és olyanról is, ahol a sejtek az auxinhiány

hatására a G1-blokk következett be. A citokinin éheztetéses vizsgálatok szintén különböző eredményeket adtak. A hormonkezelésekre adott eltérő válaszok valószínűleg a felhasznált sejtek különböző eredetének, fiziológiás sajátosságának és tartási körülményének köszönhetőek.

Az auxinok és citokininek sejtosztódásra gyakorolt pontos hatását csak a növényi sejtciklus szabályozás kutatások eredményeinek alkalmazásával deríthetjük ki. A sejtciklus egyik kulcsmolekulája az A-típusú CDK és a hormonok közötti kapcsolatot vizsgálták *Arabidopsisban* a *cdc2aAth* promóter - és az általánosan használt, kék színreakciót adó riporter gén - a β -glükoronidáz (GUS) konstrukció felhasználásával. A kísérlet során az auxin indukálta a promótert, citokinin hatására a GUS aktivitásnövekedés kisebb mértékű volt, míg a két hormon együttesen magasabb aktivitást eredményezett (Hemerley és mtsai 1993). Lucerna leveleken a hormonkezelés nyomán a CDK komplexek kináz aktivitásában bekövetkező változások mérése hasonló eredményeket adott. A 2,4-D (szintetikus auxin) kezelés a hormonmentes kontrollhoz viszonyítva megemelte a kináz aktivitást, kinetin (egy citokinin) önmagában alig okozott változást, míg a két hormon együttes alkalmazása szinergisztikus hatást fejtett ki a tisztított CDK komplexek *in vitro* aktivitására (Mészáros és mtsai 2000). A dohány parenchima sejteken végzett vizsgálatok egyfajta magyarázattal szolgálnak az auxin és citokinin szinergisztikus hatására. A dohánysejtekben a 2,4-D kezelés eredményeként megnőtt a *cdc2* fehérjeszintje, a kináz aktivitás növekedéshez azonban kinetin is szükséges volt. A CDK tirozin foszforiláltságát ellenőrizve azt tapasztalták, hogy a kinetin hozzáadására bekövetkező kináz aktivitás emelkedéssel párhuzamosan csökkent a foszfortirozin jel erőssége. Ha a tisztított CDK komplexet, a Tyr15 foszfort eltávolítandó heterológ *cdc25* foszfatázzal kezelték, és így szintén kináz aktivitás emelkedést értek el (Zhang és mtsai 1996). Lucerna levél protoplasztok esetében is bebizonyosodott, hogy a Medsa;CDKA;1/A;2 komplex csupán auxin és citokinin együttes jelenlétében volt aktív (Pasternak és mtsai. 2002).

A gibberelinsavat a rizs növekedését stimuláló hatása alapján fedezték fel a 30-as években. A napjainkban végzett vizsgálatok már magyarázatot tudnak adni erre a régóta ismert jelenségre. A gibberelinsavval kezelt rizs interkaláris merisztémájában több sejtciklus-szabályozásban szerepet játszó fehérje mRNS

szintje megnőtt. Így emelkedett az expressziója *cdc2Os-2*-nek, a *cycOs1*-nek, *cycOs2*-nek és a rizs *Cak* homológoknak, az *R2*-nek is. A sejtciklus-szabályozó gének indukciója a G1/S és G2/M fázisok lerövidüléséhez vezetett, és ez végülis gyorsabb növekedést eredményezhet (Sauter 1997).

Az abszizinsav (ABA), ellentétben az eddig ismertetett hormonokkal, gátolja a sejtosztódást és a DNS-szintézist. Alma- és borsóembriók ABA jelenlétében nem lépnek ki a nyugalmi állapotból, a G0 fázisból (Levi és mtsai 1993). Az ABA sejtosztódást gátló tulajdonságának a hátterében a CDK komplexre kifejtett hatása állhat, ugyanis a lucerna leveleken kivitelezett kísérletekben az auxin és citokinin okozta *p13^{suc1}*-kötött kinázok aktivitás növekedését az ABA megakadályozta (Mészáros és mtsai 2000). Ez a gátlás következhet a növényi KRP expresszió növekedéséből, mert az *Arabidopsiban* ABA kezelés nyomán az KRP1 mRNS emelt szinten volt jelen, és a KRP1 gátolta a *p13^{suc1}* tisztított CDK komplexek *in vitro* kináz aktivitását (Wang és mtsai 1998). Ezen eredmények alapján elképzelhető, hogy az ABA okozta G1-es blokk a növényi *KRP* gének indukcióján keresztül valósul meg.

3.11. A Ca^{2+} szerepéről

Mint láttuk, a növényekben a sejtciklus folyamata képes válaszolni az olyan hormonális és stressz szignálokra, mint amilyen az auxin, az abszizinsav vagy ozmotikus sokk, melyekről tudott, hogy Ca^{2+} -függő jelátviteli utakat használnak (Xiong és mtsai. 2002.). A Ca^{2+} szerepéről a növényi sejtek osztódása során meglehetősen kevés vizsgálati eredmény áll rendelkezésre (Hepler és Callahan 1987; Lino és mtsai. 1989). A Ca^{2+} -kötő érzékelő fehérjék, a kalcium-függő fehérje kinázok (CDPK-k) különlegesen érdekesek, mivel ezek a kalmodulin-szerű domén fehérje kinázok (CPK-k) szerepet játszanak a hormon és stressz válaszok átvitelében (összefoglalásként lásd Cheng és mtsai. 2002). Az *Arabidopsis* genom 34 CPK-t kódoló gént tartalmaz, kináz katalitikus alegységgel, autoinhibitor "összekötő" alegységgel, amit egy kalmodulin-szerű Ca^{2+} -kötő szabályozó alegység követ (Hrabak és mtsai. 2003). A Ca^{2+} hatásán túl reverzibilis foszforiláció, beleértve az autofoszforilációt is, foszfolipidek és az úgynevezett 14-3-3 fehérjék is szabályozhatják a CPK kináz aktivitást (Cheng és mtsai 2002).

Az első lucerna CPK fehérje biokémiai jellemzése során bebizonyosodott, hogy a fehérje autofoszforilációja fokozza a kináz aktivitását (Bögre és mtsai 1988). Megemlítendő, hogy a lucerna CPK képes foszforilálni a protein kináz C (PKC) szintetikusan előállított szubsztrát peptidjeit (Oláh és mtsai. 1989). Csoportunk a későbbiek során egy lucerna CPK gént (*MsCPK3*) klónozott (Davletova és mtsai. 2001). Ez a gén hősokk és magas auxin (2,4-D) koncentráció hatására aktiválódik. A rekombináns fehérje Ca^{2+} -függő aktivitást mutatott és gátolható volt W7 kalmodulin inhibitorral. A növényekre jellemző CPK-k szubsztrátspecificitása és foszfatidil-szerin általi aktiválhatósága alapján feltételezhető, hogy PKC-szerű szerepet tölthetnek be a növényi sejtekben (Oláh és mtsai. 1989, Farmer és Choi 1999). Black 2000-es összefoglaló cikkéből ismert, hogy a PKC aktivitás hatására a különböző emlős sejtípusokban megemelkedik a p27Kip1 szint. A ciklin-függő kináz inhibitorok elismerten kulcsfontosságúak a PKC-indukált CDK aktivitás gátlásban, valamint a sejtek ezzel összefüggő G1 fázisban történő megakadásában.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A csoporthoz történt csatlakozásomkor már hat különböző lucerna CDK és három ciklin gént izoláltak laboratóriumunkban (Magyar és mtsai 1997). Szakdolgozatom témáját a csoportban az MSV vírus replikációs fehérjéjének élesztő kettős-hibrid rendszerben történő vizsgálata volt (Horváth és mtsai 1998). Így PhD hallgatóként a különböző lucerna CDK-k kölcsönható partnereinek élesztő kettős-hibrid rendszer felhasználásával történő azonosítása lett a feladatom.

Dolgozatomban azokról a munkákról számolok be, amelyekkel a következő kérdésekre kerestünk választ:

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

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A KRPMt (*p27Kip1 related protein*) gén klónozása

Élesztő kettős-hibrid szűrés során a *KRPMt* gén egy cDNS darabját sikerült izolálnunk egy *Medicago truncatula* λ HybriZAP cDNS könyvtárból (Györgyey és mtsai 2000.). A kísérlet során csaliként a Medsa;CDKA;1 lucerna PSTAIRE kinázt használtuk. *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A élesztő törzset (James és mtsai, 1996) transzformáltuk a pGBT9/Medsa;CDKA;1 plazmiddal. A sikeresen transzformált élesztő sejteket triptofán mentes minimál táptalajon növesztettük. A felnőtt élesztő telepről triptofánmentes minimál tápoldatban 16 órán keresztül növesztettük, majd 500 ml komplett YPAD táp oldatban (20 g l⁻¹ Difco pepton, 10 g l⁻¹ élesztő kivonat, 20 g l⁻¹ glükóz, 40 mg l⁻¹ adenin-szulfát) növesztettük a sejteket, amíg elérték a 2 x 10⁷ sejt ml⁻¹ koncentrációt. Ekkor a sejteket 20 μ g *Medicago truncatula* cDNS-könyvtár DNS-sel transzformáltuk Gietz és Woods (1998) által leírt módon PEG/litium-acetát módszerrel. A transzformálásokat addig ismételtük, amíg a független transzformálási események száma elérte az 5x10⁶ -t. A transzformánsokat -Trp, -Leu, -His, -Ade minimál táptalajon növesztettük, ahol a triptofán és leucin prototrófia a két plazmid együttes jelenlétét, míg az adenin és hisztidin prototrófia a „csali” és a „zsákmány” fehérje kölcsönhatását jelzi.

A teljes hosszúságú fehérjét kódoló DNS-t λ -fág könyvtárból izoláltuk, oly módon, hogy a kettős-hibrid szűrés során kapott inhibitor fehérje C-terminális részét kódoló cDNS-t használtuk föl a hibridizálásra. A Church, G. M. és Gilbert, W által leírt módszert követtük, a fág-plakk izolálások során, a mosást 0.5 x SSC oldattal végeztük 68 C^o-on (Church és Gilbert 1984). Az így kapott cDNS nukleotidsorrendjét meghatároztuk, ez a GenBank adatbázisban a DQ093069 hivatkozási számot kapta.

5.2. Élesztő kettős-hibrid mátrix kísérletek

Az élesztő kettős-hibrid mátrix vizsgálatokhoz a következő vektor konstrukciókat használtuk „csaliként”: pGBT9/KRPMt, pGBT9/KRPMt(97-224). A következőket „zsákmányként”: pGAD424/Medsa;CDKA1;1, pGAD424/Medsa;CDKA;2, pGAD424/Medsa;CDKC1, pGAD424/Medsa;CDKB1;1, pGAD424/

Medsa;CDKE;1, pGAD424/ Medsa;CDKB2;1, pGAD424/Medsa;CYCA2;1, pGAD424/Medsa;CYCB2;2, pGAD424/Medsa;CYCB2;3, pGAD424/Medsa;CYCD3, pAD-GAL4 2.1/Medtr;CYCD4, pAD-GAL4 2.1/Medtr;CYCD5, pAD-GAL4 2.1/Medtr;CYCT;1 (Fülöp és mtsai 2005). A pAD-GAL4 2.1, pGBT9 és pGAD424 vektorok a Stratagene-től, illetve a Clontech-től származnak. *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a élesztő törzset (James et al., 1996) transzformáltuk a megfelelő konstrukciókkal Gietz és Woods által leírt módon. A transzformánsokat -Trp, -Leu, -His, -Ade minimál táptalajon növesztettük. A fehérje kölcsönhatások kvantifikálására ONPG-ot (orto-nitrofenil-galaktozid) használtunk, mint színreakciót adó vegyületet. A relatív β -galaktozid egység meghatározása Horváth és munkatársai által leírt módon történt (Horváth és mtsai 1998).

5.3. Szekvencia összehasonlítások, filogenetikai fa, in silico predikciók

BLASTP (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) keresést végeztünk a GenBank adatbázison a KRPMt fehérje szekvenciájának fölhasználásával. Minden olyan növényi gént, ami szignifikáns homológiát mutatott kiválasztottunk. A következő hivatkozási számmal ellátott géneket találtuk: AAP54233 (*KRP1Os*), NP_918370 (*KRP2Os*), XP_467930 (*KRP3Os*), BAD38526 (*KRP4Os*), AAX85449 (*KRP1Zm*), AAV76001 (*KRP4Ee*), CAD29648 (*KRP1Le*), CAD29649 (*KRP2Le*), CAA05215 (*CDKICr*), BAB20860 (*CDKIPs*), AAS13374 (*CDKI1;1Gm*), AAS13376 (*CDKI2;1Gm*). Majd ezt követően a T-Coffee multiple sequence alignment package használatával aminosav szekvencia illesztést végeztünk (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) (Notredame és mtsai 2000). A foszforilációs helyek meghatározására a NetphosK 1.0 szervert használtuk (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) (Blom és mtsai 2004). A PEST motívumokat a PESTFIND programmal kerestük meg. (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/pestfind.html>)

5.4. Növények és sejtvonalak, kezelések

Kísérleteink során *Medicago sativa* ssp. *varia* A2 sejtuszuspenziót használtunk. A kultúrát MS tápoldaton (Murashige and Skoog 1962) 1 mg l^{-1} 2,4-D és 0.2 mg l^{-1} kinetin jelenlétében, hetenkénti passzállással tartottuk fenn, 20-22 °C hőmérsékleten 140rpm rázatás mellett. A szövetek ugyanezen lucerna vonal sterilen, illetve üvegházban tartott növényeiről származtak.

Három nappal az A2 sejtuszuspenziók passzálása után a sejteket $100 \text{ }\mu\text{M}$ ABA-val kezeltük és mintákat vettünk 0.5, 1, 2, 24, 48 óra időpontokban vettünk. Ugyanilyen idős A2 sejtuszuspenziót használtunk a sókezelésre is, 50-300 mM NaCl-dal kezeltük a sejteket 2 órán keresztül.

5.5. Sejtciklus szinkronizálás

A szuszpenziót passzállás után egy héttel tápoldattal négyszeresre hígítottuk, ezzel $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ sejtszámot állítottunk be. A sejtek számolhatósága érdekében az áramlásos citometriánál leírtak szerint protoplasztáltuk. A hígítás után hat órával a sejtciklust 10 mM végkoncentrációjú hidroxürea hozzáadásával blokkoltuk. 36 óra múlva a sejteket ülepítettük, és háromszor 15 percig mostuk az eredeti térfogattal azonos mennyiségű friss tápoldattal, a hidroxürea eltávolítása érdekében. A mosást követően a sejteket az eredeti térfogattal megegyező, hidroxürea mentes tápoldatban szuszpendáltuk, és közepes (140 rpm) rázatás mellett a szuszpenziós sejtek megkezdték szinkronizált osztódásukat. A további vizsgálatokhoz kétóránként mintát vettünk.

5.6. Áramlásos citometria

$2 \times 300 \text{ }\mu\text{l}$ szuszpenziót 800 rpm-mel 2 percig centrifugáltunk eppendorf centrifugában. A sejtekről leszívtuk a felülúszót, majd $300 \text{ }\mu\text{l}$ protoplasztáló oldatban (3 mM MES pH 5.7, 5 mM CaCl_2 , 0.3 M mannitol, 2 % celluláz R-10, 1 % pektináz) 1 órán-át 28 °C-on lassú rázatással emésztettük őket. Ezt 2 perc 800 rpm-en történő centrifugálás követte. A felülúszó eltávolítása után a protoplasztokat 1ml MS (Murashige and Skoog 1962). oldattal mostuk, és azonos körülmények között centrifugáltuk. A protoplasztokhoz végül 1ml Galbraith puffert (20 mM MOPS pH 7.0,

30 mM Nátrium-citrát, 45 mM MgCl_2 , 0.1 % Triton-X100) adtunk. Ezt követően a protoplasztok 10 percet jégen álltak, majd óvatos szuszpendálással kiszabadítottuk a sejtmagokat. Az izolált sejtmagok 54 μl 37 %-os formaldehid hozzáadásával 4 $^\circ\text{C}$ -on egy hétig tárolhatók anélkül, hogy kárt szenvednének. Az áramlásos citometriás mérés előtt 5 perccel 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ etidium-bromid hozzáadásával festettük a sejtmagokat. Az áramlásos citometriás mérést Becton-Dickinson, FACSCalibur berendezésen végeztük.

5.7. Mitotikus index meghatározás

200 μl sejtsuszpenziót 2 percig 1000 g-vel centrifugáltunk. A felülúszót leszívtuk, majd a sejteket 1ml PBS (150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , és 2 mM KH_2PO_4)/4 % formaldehiddel egy órán át szobahőn fixáltuk. A rögzített sejtek 4 $^\circ\text{C}$ -on két napig tárolhatók, károsodás nélkül. A sejteket festés előtt háromszor PBS-sel mostuk. Tárgylemezre 30 μl 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációjú DAPI-t (4,6-diamino-2-fenilindol) cseppentettünk, majd ehhez egy csepp 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, károsodás nélkül. A sejteket UV fényben DAPI filter készlettel fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A mitotikus sejtek százalékát 500 sejt vizsgálatával adtuk meg.

5.8. Fehérjekivonat készítése

A szuszpenziós sejteket, illetve a leveleket kétszeres térfogatnyi feltáró pufferben (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 75 mM NaCl, 15 mM MgCl_2 , 15 mM EGTA, 15 mM p-nitrofenilfoszfát, 60 mM β -glycerofoszfát, 1 mM DTT (ditio-treitol), 0.1 % Nonidet P-40, 0.1 mM Na_3VO_4 , 0.5 mM NaF, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ leupeptin, aprotinin, és antipain, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pepstatin és chymostatin) kvarchomok jelenlétében eldörzsöltük, majd 4 $^\circ\text{C}$ -on 13000 rpm fordulattal 15 percig centrifugáltuk, eppendorf centrifugában. A felülúszókat kináz reakciókra azonnal

felhasználtuk. Az immunoblott analízisre szánt mintákhoz megfelelő mennyiségű 5xSDS-minta puffert (10 mM DTT, 15 % SDS, 1.5 % brómfenolkék, 50 % glicerol) adtunk, és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

5.9. Pull-down vizsgálat és immunoblott analízis

A pull-down vizsgálat során körülbelül 100 μg bakteriálisan termeltet His₆-KRPMt kötöttünk 200 μl Ni-NTA-Sepharose (Nikkel-nitrilotriacetát) ágyhoz. Ezt inkubáltuk 1 mg A2 sejtszuspenzióból származó teljes fehérjekivonattal 5 órán át 4°C -on. Ezután az ágyat ötször 5 ml „egyszerűsített” feltárával (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 75 mM NaCl, 15 mM MgCl, 15 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 % Nonidet P-40, 0.1, 0.5 mM NaF) mostuk. Az ágyat 500 μl 2xSDS minta pufferben vettük föl. Forraltuk 10 percig, ebből 50 μl -t használtunk a Western-blot vizsgálatokhoz. Negatív kontrollnak Ni-NTA-Sepharose ágyat inkubáltunk 5 ml 10 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ teljes élesztő fehérjekivonattal 2 óráig 4°C -on, majd 10 mM imidazolt tartalmazó 1xTBS-sel (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) mostuk. Ezután ugyanúgy használtuk, mint a His₆-KRPMt-t tartalmazó Ni-NTA ágyat.

A fehérjemintákból 50 μl , illetve az A2 fehérjekivonatból 50 μg -ot futtattunk 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen. Az ily módon elválasztott fehérjéket transzfer pufferben (50 mM Tris bázis, 50 mM bórsav) polivinilidén-difluorid membránra (Millipore) transzferáltuk 10 V feszültséggel egy éjszakán át.

A membránt 2 órán át szobahőn 5 % tejpor-0.05 % Tween 20 TBS-ben pufferral telítettük. Az első ellenanyaggal 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációban telítő pufferben 2 órán át szobahőn inkubáltuk, majd háromszor mostuk TBST-vel (TBS puffer, 0.2 % Tween 20). A második ellenanyagot (Anti-Rabbit whole IgG-POD, Sigma) a gyártó ajánlása szerint hígítottuk a telítő pufferben, és ezzel 1 órán át kezeltük a membránt szobahőn. Ezután a fent vázolt módon ismét mostuk a membránt. TBS-sel történő öblítés után a gyártó protokollja szerint kiviteleztük az ECL [Megnövelt Kemilumineszcencia (Enhanced Chemiluminescence)] (Pierce, SuperSignal West Pico) reakciót.

5.10. Immunoprecipitálás, p13^{suc1} affinitástisztítás

Immunoprecipitáláskor 50 µg A2 fehérjekivonathoz 1 µg, a kísérletben megjelölt, poliklonális ellenanyagot adtunk, és 1 órán át jégen inkubáltuk. Ezután 25 µl ProteinA-Sepharose-zal kevertettük 1 órán át 4 C° -on. Az ágyhoz nem specifikusan kötődött fehérjéket háromszori RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 2 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0,1 % NP-40) és egyszeri ATP mentes kináz puffer (50 mM Tris pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) mosással távolítottuk el.

p13^{suc1} affinitáskötéshez a p13^{suc1} ágyat Brizuela és munkatársai nyomán készítettük (Brizuela és mtsai 1987). Az affinitástisztításhoz 50 µg fehérjekivonatot 1 órán át 4 C° -on kevertettünk 20 µl ággal. A kötést háromszori mosó pufferrel, és egyszeri kináz pufferrel történő mosás követte.

5.11. Bakteriálisan túltermeltetett fehérjék tisztítása

A KRPMt, KRPMt(88-223), KRPMt(93-223), valamint a 91. szerin mutációkat tartalmazó KRPMt fehérjéket az Invitrogen által leírt rendszer segítségével tisztítottuk. A megfelelő klónokat tartalmazó pET28a vektort BL21De3 *Escherichia coli* törzsbe transzformáltuk, majd 400 ml kultúrát növesztettünk 50 µg ml⁻¹ kanamycin tartalmú TB-ben [Terrific Broth (12 g l⁻¹ tripton, 24 g l⁻¹ élesztő kivonat, 4 g l⁻¹ glicerol, 2.31 g l⁻¹ KH₂PO₄, 12.54 g l⁻¹ K₂HPO₄)] 37 C°-on, amíg az OD₆₀₀ 0.5 körüli értéket ért el. Ezután a sejteket 0.5 mM IPTG-vel 2 órán át 37 C°-on indukáltuk, majd Sorvall GSA rotorban 5000 rpm-mel 30 percig 4 C°-on centrifugáltuk. A sejteket 15 ml 1 % Tritonix100-at és 10mg ml⁻¹ lizozimot tartalmazó TBS pufferben 1 órán át szobahőn kevertettük. A feltárást centrifugálás követte Sorvall SS-34 rotorban 19000 rpm-mel 20 percig 4 C°-on. A felülúszóhoz annyi imidazolt adtunk, hogy a végkoncentrációja 1 mM legyen, majd Ni-NTA-Sepharose 0.2 ml (Qiagen) ágyhoz kötöttük 1 óra szobahőn történő kevertetéssel. A kötést követően négyszer mostuk az ágyat 20 ml 1 % Tritonix100 TBS pufferrel. A kötött fehérjéket az imidazol koncentráció lépcsőzetes emelésével TBS pufferben lemostuk. Későbbiekben ATP mentes kináz pufferrel szemben dializáltuk.

5.12. *In vitro* kináz reakció

Az affinitás tisztított, illetve immunoprecipitált komplexet 10 µl a jelölt mennyiségű és minőségű rekombináns inhibitor fehérjét tartalmazó ATP mentes kináz pufferrel inkubáltuk 30 percig 4°C-on. Majd 30 µl kináz pufferben (50 mM Trisz-HCl pH 7.6, 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 µM ATP) és 0.25 MBq γ³²P-ATP jelenlétében 30 percig szobahőn tartottuk. A kinázreakciót 7.5 µl 5 x SDS-minta puffer hozzáadásával állítottuk le. A fehérjemintákat SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk, és szárítás után autoradiogramot készítettünk. A kvantitatív analízishez a Molecular Dynamics Phosphorimager 445 SI berendezését és szoftverét használtuk. A szubsztrátspecifitás vizsgálatánál hiszton helyett a megadott fehérjéket - 2 µg p107Rb (SantaCruz), illetve 2 µg rekombináns MsRRB C-terminálisát - használtuk szubsztrátként.

5.13. *RNS tisztítás, c-DNS szintézis, Real-time PCR*

A különböző szöveteket két-hetes csíranövényekből, üvegházi lucerna növényekről gyűjtöttük, illetve *Medicago* A2 sejtszuszenziót használtunk. A szövetek azonnal folyékony nitrogénbe kerültek, majd -80°C-on tároltuk őket az RNS extrakcióig. Trizol reagenssel össz RNS-t izoláltunk (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Az RNS-t DN-áz kezelésnek vetettük alá, majd oszlopon tisztítottuk (Chromaspin 400; Clontech). Az RNS mintákat -80°C-on tároltuk a c-DNS szintézisig. Az egyes szálú cDNS szintézist Superscript RT II kittet (Gibco BRL), valamint 3 µg totál RNS-t használtunk, oligo (dT)-18 primerrel a gyártó instrukcióit követve. A cDNS-t 1:3.5 arányban hígítottuk nukleáz-mentes vízzel. Minden PCR primer párhoz ugyaból a cDNS mintából használtunk azonos mennyiségeket a real-time PCR vizsgálatokhoz. A következő génspecifikus primereket terveztük és használtuk:

KRPMt RT Fw (5'-gcccaattaccaggcgtactttt-3');

KRPMt RT Rev (5'-aattcgcggtgaaattgggatag-3');

MsCPK3 (X96723) RT Fw (5'-ctaggaaaaggtttggaagatgtgaa);

MsCPK3 RT Rev (5'-cctaattctttacctagtgtgtagaattgttt-3');

MsTCTP (translationally controlled tumor protein X98681) Fw (5'-agcttctgtcagactcttaccataca-3');

MsTCTP Rev (5'-caactcccttagtaaccactttcc-3')

20 µl-es reakció térfogatot 300 nM primer koncentrációt, 7 µl cDNS-t (ami 40 ng totál RNS-nek felel meg) és 10 µl 2x SYBR Green PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) használtunk. A Real-time PCR-t ABI Prism 7000 Sequence Detection System-mel (Applied Biosystems) 96-lyukú reakciós lemezen végeztük a gyártó instrukciói alapján (10 perc 95°C, és 45 ciklus 95°C 15 más odperc és 60°C 1 perc). Minden reakciót hármas ismételtsben, templátmentes kontrollal végeztünk. Az amplifikáció eredményességét az ABI Prism Dissociation Curve Analysis Software-rel (Applied Biosystems) ellenőriztük. Két független kísérletet végeztünk minden esetben, az RNS-izolálástól kezdődően. A $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert alkalmaztuk az eredmények kiértékeléséhez (Livak and Schmittgen, 2001). Az expresszió belső kontroljának a konstitutív *Medicago sativa* TCTP gént használtuk. Az összehasonlíthatóság kedvéért a szerveknél a kapott eredményeket a legkisebb expressziójú szervvel, a szárral, normalizáltuk. Az ABA és NaCl kísérletek esetében a kezeletlen 3 napos sejtszuspenzióban mért ΔC_t eredményekkel normalizáltunk.

5.14. A rekombináns KRPMt foszforilálása MsCPK3-mal

Az *in vitro* foszforiláláshoz 30 µl reakcióelegyet használtunk, ami 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 0.5 mM CaCl₂, 5 µg KRPMt szubsztrátként, 10 µM ATP, 0.25 MBq γ -³²P-ATP és 0.4 µg tisztított GST-MsCPK3 fúziós fehérjét tartalmazott (Davletova és mtsai 2001). A Ca²⁺-mentes reakcióelegy esetében 5 mM EGTA-t használtunk a CaCl₂ helyett. A reakciókat az MsCPK3 hozzáadásával indítottuk és egy órán át, illetve a jelzett időpontig inkubáltuk szobahőn. A reakcióelegyből 5 µl-t használtunk foszforilált KRPMt -ként. A kisebb mennyiségek használatakor, illetve a foszforilálatlan KRPMt esetén az adott oldatokat CPK pufferrel (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 0.5 mM CaCl₂, 10 µM ATP, 0.25 MBq γ -³²P-ATP) egészítettük ki 5 µl-re. A foszforilált KRPMt fehérje arányát az 5 µl reakcióelegy, illetve az SDS-poliakrilamid gélből izolált foszforilált KRPMt Cserenkov sugárzásának arányából számítottuk ki.

5.15. Kétdimenziós foszfopeptid térképezés és foszfo-aminosav vizsgálat cellulóz vékonyrétegen

A rekombináns inhibitor fehérjét MsCPK3-mal, illetve immunoprecipitált MedsaCDKA;1/A;2 kinázkomplexszel foszforiláltuk 3 órán keresztül. A radioaktívan jelölt 26 kDa proteint 12 % SDS-poliakrilamid-gélből kivágtuk. A gélből izolált fehérjét tripszinnel emésztetük, majd fölvittük a cellulóz vékonyrétegre. Az első dimenzióban elektroforézissel, majd a második dimenzióban vékonyréteg kromatográfiával választottuk el a peptideket a Boyle és munkatársai által leírt módon. (Boyle, W.J. és mtsai 1991). A Molecular Dynamics Phosphorimager 445 SI berendezését használtunk a foszforilált peptidek kimutatásához.

A jelölt peptideket kinyertük a vékonyrétegből, majd sósavval hidrolizálva a Jelinek és Weber által leírt módon vékonyréteg elektroforézist végeztünk P-Ser, P-Thr, P-Tyr kontrollok használata mellett (Jelinek, T. and Weber, M.J. 1993).

6. ELŐZMÉNYEK

6.1. *Lucerna CDK homológokkal kölcsönható fehérjék azonosítása élesztő kettős-hibrid rendszerrel*

Munkám kezdetekor a csoportunkban rendelkezésre álló sejtciklus géneket (hat *cdc2* homológ, valamint négy ciklin gén) klónoztuk élesztő kettős-hibrid vektorokba. Kezdetben a rendelkezésre álló gének kölcsönhatási mátrix vizsgálatával kívántunk többet megtudni a sejtciklusban betöltött szerepükről. Sajnos azonban semmiféle egyértelmű kölcsönhatást nem sikerült kimutatnunk. A ciklinek és *cdc2* homológok közül a *cdc2* homológok csaliként történő fölhasználása volt egyszerűbb és kivitelezhetőbb, mivel némely ciklin fehérjék élesztő kettős-hibrid rendszerben jelentős transzaktiváló hatást mutattak.

Valamennyi lucerna *cdc2* homológgal végeztem élesztő kettős-hibrid szűrést. Minden esetben $2-3 \times 10^6$ -os transzformációs gyakoriság eléréséig kerestük a kölcsönható partnereket.

A *MedsaCDKA;1* gén csaliként való fölhasználásával izoláltunk két új delta ciklint, melyeket szabadalmaztattunk. Ezen kívül egy kukorica cDNS könyvtárból a *ZmCKS* gént, amely egy erősen konzervált fehérjét kódol, mely megtalálható az élesztőktől a növényeken át az emlősökig. Élesztőben ez a gén a *p13^{SUC1}*, ami a kinázkomplex összerendezésében játszik központi szerepet. Erről a génről bebizonyítottuk, hogy a várakozásoknak megfelelően képes kölcsönhatni mind az A, mind a B-típusú CDK fehérjékkel. Ezen kívül ekkor izoláltuk a máig egyetlen lucerna ciklin-függő kináz gátló fehérjét, a KRP-t.

A *MedsaCDKC;1* segítségével egy teljesen új típusú ciklint sikerült azonosítanunk, amely szerepet játszik az RNS-polimeráz II karboxi-terminális doménjének (CTD) foszforilációjában. ezáltal a transzkripció elongáció stabilizálásában. (Fülöp és mtsai 2005).

A *MedsaCDKB1;1* segítségével egy sötűrésben szerepet játszó, *HAL3* névre keresztelt gént, valamint kukoricából ismételten a *ZmCKS*-t sikerült azonosítanunk. A *cdc2MsE* segítségével a COP9 szignaloszóma egy komponensét, a *c-Jab*-ot izoláltuk. A *c-Jab*-ot, bár nagyon érdekes irányba vihetne el bennünket a sejtciklus

megértésében, nem vizsgáltuk, mert ismertén nagyon gyakori (aspecifikus) kölcsönható partner, mely számos alkalommal megjelent a kettős-hibrid szűrések során.

A MedsaCDKB2;1 megismert kölcsönható partnerei egy miozin típusú fehérje (Mészáros és mtsai 2000), egy chalcone-flavon-izomeráz és egyéb, eddig ismeretlen funkciójú fehérjék. Itt érdemes megemlíteni, hogy csoportunk egy korábbi munkájából ismert, hogy a MedsaCDKB2;1 a mitózis során a mikrotubulusok mentén lokalizálódik, ami megmagyarázza az erős kölcsönhatást a miozinnal (Ayaydin és mtsai 2000).

A kutatócsoport központi érdeklődésébe került a lucerna retinoblasztóma homológ fehérje általam izolált kölcsönható partnerei közül egy kettes típusú foszfatáz regulátor alegység (MsPP2AregB"). A fehérje kiemelkedő fontossága abban áll, hogy emlősök esetében ismert az a tény, hogy a különböző retinoblasztóma fehérjéket különböző típusú foszfatázok defoszforilálják (Tamrakar és mtsai 2000). A p130 Rb-t PP1 típusú, míg a p107 Rb-t PP2A típusú foszfatázok defoszforilálják. Szintén említést érdemel az a tény, hogy a kétszikűekkel szemben az egyszikűekben két különböző retinoblasztóma homológ fehérje található, és ezek közül az általunk részletesen tanulmányozott rizs RBR1 hat kölcsön az MsPP2AregB"-vel, azonban a rizs RBR2 nem. Ezen fontos információ birtokában lehetővé válik transzgenikus rizs növényekben a retinoblasztóma homológ fehérjék foszforiláltsági állapotának, így aktivitásuknak differenciált módosítása.

7. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

7.1. Teljes hosszúságú lucerna KRP izolálása és in silico jellemzése

A *MedsaCDKA;1* gén „csaliként” történő felhasználása az élesztő kettős-hibrid rendszerben a lucerna könyvtár szűrésekor egy olyan részleges cDNS klónt eredményezett, mely predikcióink szerint egy CDK inhibitor fehérje C-terminális részét kódolta. Ezt a klónt egy λ -fág cDNS könyvtár szűréséhez felhasználva kaptuk meg a teljes hosszúságú kódoló régiót tartalmazó cDNS-t. A 970 bp hosszú klón (GenBank hozzáférési kód: DQ093069) egy 672 bp hosszúságú olvasási keretet tartalmaz, és egy 224 aminosav hosszú 25.3 kDa tömegű, 9.30 izoelektromos pontú fehérjét kódol. (4. ábra).

aaaccactcttcaaatacaaacactttcttacataagattcctctgtttttctgtgtgcttc
 ttcaaattcttccccctgtttttcaacttcaatggggaagtacatgaagaaactcaaactc
 M G K Y M K K L K S
 aaatcagaatctccttcacccaattcaacaccaacaccatcaccatcaccatcaccaaca
 K S E S P S P N S T P T P S P S P S P T
 ccaatcaccaccaattcaccaccaccaacaacacccaattcctctgatgggtgttcgaact
 P I T T N S P P P T T P N S S D G V R T
 cgtgctagaaccctagctttggagaattccaacaatcagaatcagaatctttctgtttct
 R A R T L A L E N S N N Q N Q N L S V S
 tctgattcttaccttcagctgaggaaccgtcgccttaagagacccttaattagggaacat
 S D S Y L Q L R N R R L K R P L I R Q H
 tccgctaagaggaataaggggcatgatggaaaccctaaatccccaattggggattcaatt
 S A K R N K C H D G N P K S P I G D S I
 gctgaagagaaaaactgttcagaagagtcctgagcctgaaaatgctgaattcaaggagaat
 A E E K T V Q K S P E P E N A E F K E N
 gctgaggatactgagagaagcgctagggaaactacacccgtccatttgataatgcgagca
 A E D T E R S A R E T T P V H L I M R A
 gacgttctcaggcctcctaggccaattaccaggcgtacttttccaactgaagctaattccc
 D V L R P P R P I T R R T F P T E A N P
 aaaacggagcagccaactatcccaatttcacgcgaatttgaggaattctgtgctaacat
 K T E Q P T I P I S R E F E E F C A K H
 gaagccgagcagcaaagggttcattggagaagtacaactttgatcctgtgacagagcag
 E A E Q Q R E F M E K Y N F D P V T E Q
 ccactcccaggcggttacgaatgggaaaaagtgtcgcctagaaggcaggctagtattaa
 P L P G R Y E W E K V S P -
 gtgttccatcaatacatcttttaaagtagcagcaggggttagaatttgttgaaaagggtggt
 ggtgctattttccattttccatcactttctatttacttgtaaagaaagtaggactttcaac
 atatgtagactaatgatctgtaactttacagaggtgttgattacacaacaatacaaaagtc
 ctttgtctagcagatcattaaagaagggtttgaggaataagggtctctagttgtaggggt
 ttaggggtataaaatcaaagtaggggtatgtaagagaggttttacaagaatttccttttgtt
 cttgtgttttactcttgttttgtctataacttgtactcatggaacttcaaaaactcttaa
 gaaataaagaaccagatctccctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

4. Ábra A KRPMt (DQ093069) DNS és aminosav sorrendje.

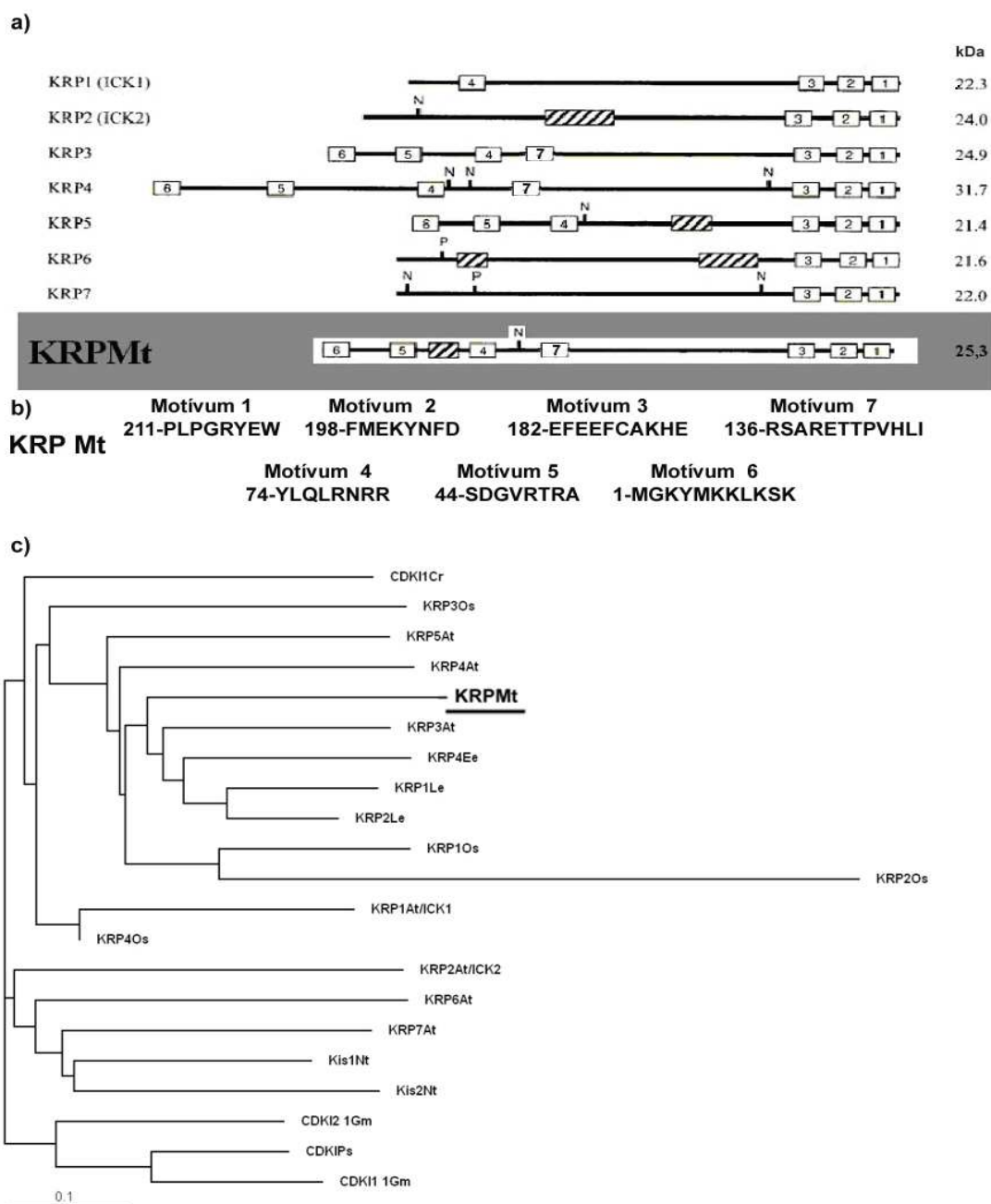
A más CDK inhibitorok egy részében is föllelhető motívumokat kiemeltem. Az utolsó három ilyen régió minden növényi KRP-ben megtalálható. Az C-terminális két szakasz valószínűsíthetően a CDK kötésben játszik szerepet, a harmadik motívum szerepe nem világos, de potenciális SUMO-ilációs helyet tartalmaz. Pirossal kiemelt aminosav: a kettős-hibrid szűrés során kapott részleges klón kezdőpontja.

A GenBank adatbázisban keresve viszonylag alacsony homológiájú géneket találhatunk, melyekben csupán egy C-terminális KYNFD....GRYEW aminosav motívum közös. Erről a motívumról azonban ismert, hogy az állati ciklin-függő kináz inhibitorok (p27 Kip1) esetében a CDK megkötéséért felelősek (Russo és mtsai 1998). Megjegyzendő azonban, hogy az emlős homológok esetében ez a régió a fehérje N-terminálisán helyezkedik el. A hét *Arabidopsis* KRP fehérje felépítésének hasonlóságai alapján 6 konzervált motívumot írtak le De Veylder és munkatársai, melyek mindegyike megtalálható a KRPMt fehérjében is (De Veylder és mtsai, 2001).

A GenBank adatbázis alapján a KRPMt leginkább az *Arabidopsis* KRP4 fehérjéhez hasonlít (51% hasonló, 36% azonos aminosav). Az adatbázisokban föllelhető növényi KRP-k mélyebb vizsgálata során egy további, hetedik motívumra lettünk figyelmesek, ami az *Arabidopsis* KRP3 és KRP4, valamint a rizs KRP1, KRP3, *Lycopersicon esculentum* KRP 1, KRP 2, és az *Euphorbia esula* KRP 4 fehérjékben található meg. Ez a motívum is kizárólag a növényi CDK inhibitorokban fordul elő, a lucerna KRP fehérje esetében a szekvenciája a következő: RSARETTPVHLI. (5b. ábra). A növényi homológok alapján a következő általánosított szekvenciát azonosítottuk: RT/ST/SRET/STPCSLI.

Mint azt a filogenetikai törzsfa alapján láthatjuk (5c ábra), a lucerna KRP fehérjéhez az *Arabidopsis* KRP3 és KRP4, *Lycopersicon* és *Euphorbia* inhibitorok mutatják a legnagyobb hasonlóságot. A homológia ellenére különbséggént értékelendő, hogy a lucerna fehérje erős PEST degradációs szignált tartalmaz (Pestfind érték +24.12), míg ilyen nem található meg az *Arabidopsis* KRP3 és KRP4-ben. Ezen kívül sejtmagi transzport szignált is tartalmaz a lucerna fehérje, ami szintén hiányzik az *Arabidopsis* homológokban. Ezen fontos különbségek alapján állíthatjuk, hogy a *Medicago truncatula* inhibitor egy új típusú KRP fehérjecsalád tagja, az *Arabidopsis* variánsokkal összehasonlítva. A *Medicago truncatula* adatbázisban két feltételezhető KRP fehérje található, az egyik igen homológ az általunk vizsgálttal, bár csak 92 % a hasonlóság és 89 % az azonos aminosavak aránya. Feltételezhető, hogy ezek allélikus variánsok, mivel a „normál” azonosság két különböző fajból származó KRP esetében 30% körüli, illetve az *Arabidopsis* KRP-k egymással való azonossága sem több, mint 40%. Az adatbázisban található másik lucerna KRP csupán az első három, minden KRP-ben megtalálható, konzervált

szakaszt, igen rövid és gyenge PEST motívumot (Pestfid érték +6.25) tartalmaz. A legközelebbi *Arabidopsis* homológja a KRP1/ICK1.



5. Ábra Az ismert növényi KRP fehérjék szerkezeti fölépítése és törzsfája

a) A KRP fehérjék doménszerkezete *in silico* homológiák alapján. A KRPMt összehasonlítása *Arabidopsis* inhibitorokkal. A konzervált szekvenciaregionokat számított téglalapokkal (1-től 7-ig), a PEST domént csíkozott téglalapokkal jelöltem. A további szimbólumok jelentése: N: sejtmagi lokalizációs szignál; P: CDK konszenzus foszforilációs hely. A számított molekulatömeg (kDa) a jobb oldalon található.

b) Bár a ciklin-függő kináz inhibitorok hasonlósága alacsony szintű, alapos *in silico* analízissel néhány konzervált régió azonosítható bennük. Ilyen régióknak a lucerna inhibitor fehérjében föllelhető aminosav motívumait tartalmazza a panel.

c). Az ismert növényi ciklin-függő kináz inhibitorok törzsfája, ClustalW analízis segítségével.

7.2. A *KRPMt* gén kifejeződése

A következőkben megvizsgáltuk Real-time PCR-rel a *KRPMt* gén kifejeződésének szövetspecifitását, valamint meghatároztuk azt, hogy különböző kezelések milyen hatással vannak a gén expressziójára. Megállapítottuk, hogy minden vizsgált szövetben, illetve sejtszuszpenzióban kimutatható a transzkriptum, jelenléte az intenzíven osztódó szövetekben valamelyest fokozódik (1a. táblázat). Megemlítendő, hogy a sejtszuszpenzióban ennek öregedésével párhuzamosan is emelkedik a *KRPMt* gén kifejeződése. Karakterisztikus választ tapasztaltunk az ABA stresszhormon kezelésre, mivel 100 μ M ABA hatására a génexpresszió két óra múlva az alapszint 8.6-szorosára emelkedik. Ez a magasabb mRNS szint még 1-2 nappal később is megmutatkozik, ha csökkenő intenzitással is (1b táblázat). A NaCl (50-300mM) kezelés szintén jelentősen növeli a *KRPMt* génkifejeződését. 14.9-szeres átíródnási növekedést figyeltünk meg az alacsony (50mM) só koncentrációnál (1c táblázat).

Hasonló, bár kevésbé jelentős indukció figyelhető meg az *MsCPK3* gén esetében is, az ABA hormon hatására 3.1-szeres növekedés, a NaCl kezelésnél 6.5-szörös növekedés tapasztalható (1b-c táblázat).

a)

Minták	Relatív mRNS szint	Standard deviáció
Csíranövény	6.5	0.31
Sziklevél	8.6	0.24
Szár	1	0.03
Levél	7.5	0.17
Virág	5.3	0.13
Gyökér	4.0	0.18
N-éheztetés	7.5	0.32
4 napos noduláció	2.0	0.02
14 napos noduláció	4.6	0.13
3 napos sejtszuszpenzió	5.3	0.11
10 napos sejtszuszpenzió	6.5	0.29

b)

Idő (óra)	Relatív mRNS szint	
	<i>KRPMt</i> (stdev)	<i>MsCPK3</i> (stdev)
0.5	1.5 (0.08)	1.1 (0.06)
1	1.3 (0.03)	1.2 (0.22)
2	8.6 (0.36)	2.5 (0.52)
24	6.4 (0.31)	2.7 (0.48)
48	4.3 (0.12)	3.1 (0.15)

c)

NaCl konc.	Relatív mRNS szint	
	<i>KRPMt</i> (stdev)	<i>MsCPK3</i> (stdev)
50 mM	14.9 (1.31)	6.5 (0.56)
100 mM	9.8 (0.18)	4.0 (0.39)
200 mM	4.9 (0.38)	4.0 (0.49)
300 mM	4.6 (0.08)	2.8 (0.29)

1. Táblázat *KRPMt* gén kifejeződésének vizsgálata

A vizsgált gén mRNS szintjét real-time PCR analízissel állapítottuk meg, és az így mért értéket hasonlítottuk a konstitutív *MstCTP* (X98681) gén adott mintában mért expressziójához.

a) A *KRPMt* gén kifejeződése különböző szövetekben és különböző korú sejtszuszpenziókban. Az mRNS szint a legkisebb génkifejeződést mutató szár értékeivel normált.

b) A *KRPMt* és az *MsCPK3* gén átíródása aktiválódik abszcizinsav kezelés hatására.

Három nappal a lucerna A2 sejtszuszpenzió passzálása után a sejteket 100 μ M ABA-val kezeltük, a jelzett időpontokban mintákat vettünk. A különböző mintákban a vizsgált gének mRNS szintjét a kezeletlen 3 napos kontroll sejtszuszpenzióval normáltuk.

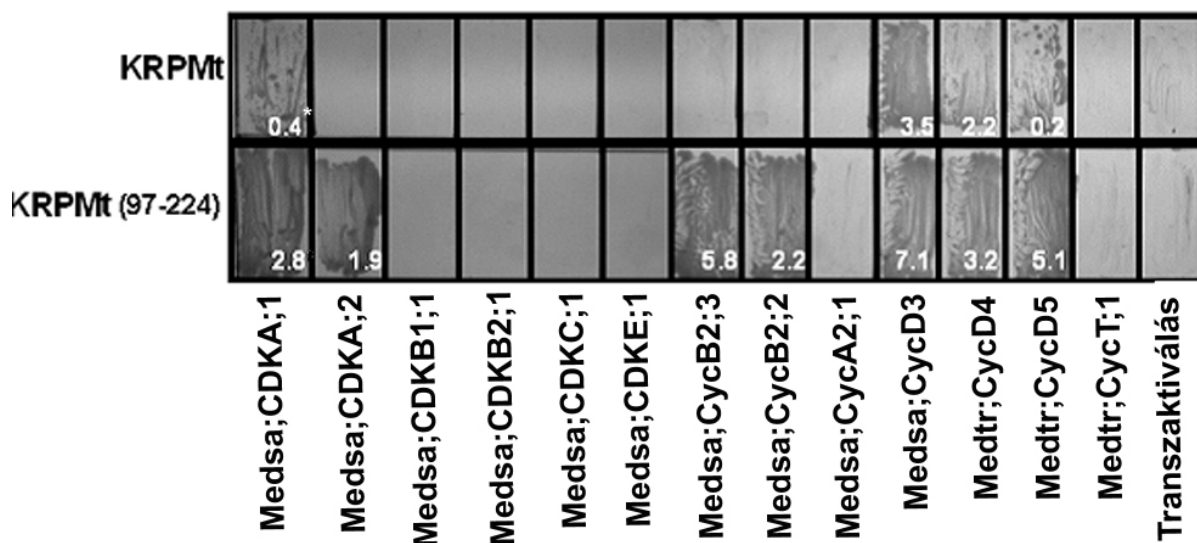
c) A *KRPMt* és *MsCPK3* gének aktiválódása só stressz hatására.

Három nappal a lucerna A2 sejtszuszpenzió passzálása után a sejteket különböző koncentrációjú NaCl-dal (50-300 mM) kezeltük 2 órán keresztül. A különböző mintákban a vizsgált gének mRNS szintjét a kezeletlen 3 napos kontroll sejtszuszpenzióval normáltuk.

7.3. A *KRPMt* fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata élesztő kettős-hibrid rendszerben

A CDK inhibitor fehérje valószínű kölcsönható partnereinek azonosítása céljából élesztő kettős-hibrid tesztelést végeztünk. Ez azért bír jelentőséggel, mivel tudott, hogy a CDK-k nem önmagukban aktívak, hanem a különböző ciklin partnerek aktiválják őket, illetve a ciklinek a CDK-k szubsztrátspecifitására is hatással vannak (John és mtsai. 2001). Ily módon a megismert kölcsönható fehérjék alapján közelebb kerülhetünk az inhibitor teljes funkciójának megismeréséhez. Ismert, hogy az *Arabidopsis* KRP fehérjék a PSTAIRE kinázzal (CDKA;1) és a D-típusú ciklinekkel kölcsönhatnak, viszont a PTTLRE kinázokkal (CDKB) nem (Lui és mtsai 2000; De Veylder és mtsai 2001).

A kísérlet során a *KRPMt*-t a kettős-hibrid konstrukciók közül a GAL4 DNS kötő alegységét kódoló vektorba klónoztuk, így kerültük el a ciklinek és más fehérjék esetleges zavaró transzaktiváló hatását, ami lehetetlenné tenné a kölcsönhatások vizsgálatát. A 6. ábrán a 6 ismert lucerna CDK-val (MedsaCDKA;1- MedsaCDKB2;1), illetve a hét eddig ismert ciklinnel való kölcsönhatási mátrixot láthatjuk. A fehérjék asszociációját a PJ69 4A nevű törzsben vizsgáltuk, ahol három egymástól független riportergén segítségével ellenőrizhetjük a kölcsönhatást. A telepek adenint és hisztidint nem tartalmazó táptalajon is nőnek, ha kapcsolat alakul ki a két fehérje között. A módszer lehetőséget nyújt a kölcsönhatások erősségének relatív meghatározására: erre a β -galaktozidáz enzim mérése szolgál. A telepeken látható számok ennek aktivitását mutatják, relatív β -galaktozidáz egységben kifejezve.



6. Ábra A KRPMT élesztő kettős-hibrid mátrix vizsgálata

Az élesztő telepek tiptofánt, leucint, hisztidint és adenint nem tartalmazó táptalajon nőnek, jelezve a teljes hosszúságú, illetve az első 96 aminosavat nem tartalmazó KRP fehérje kölcsönhatását a MedsaCDKA;1-gyel, a D-típusú ciklinekkel, B-típusú ciklinekkel és a MedsaCDKA;2-vel a csonka KRP(97-224) esetében. A számok a relatív β -galaktozidáz egységben mért kölcsönhatási erősségeket jelzik.

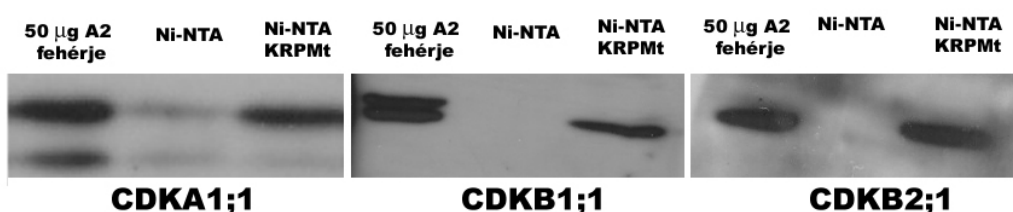
Mint a 6. ábra szemlélteti két D-típusú ciklin (MedsaCycD3 és MedtrCycD4) tekinthető a KRPMT fehérje erősen kölcsönható partnereinek, míg a kölcsönhatás gyenge a MedsaCDKA;1 kináz és a harmadik D-típusú ciklin (MedtrCycD5) esetében. Érdekes módon KRPMT fehérje csonka változata képes volt kölcsönhatásba lépni olyan partnerekkel is, melyekkel a teljes hosszúságú fehérje nem asszociálódott [Medsa;CDKA;2 kináz és két mitotikus ciklin (Medsa;CYCB2;3 és Medsa;CYCB2;2)] (6. ábra). A Medsa;CDKA;2 kinázzal való kölcsönhatás nagyon egyszerűen a kölcsönhatás erősödésével magyarázható. Bár igen érdekes a mitotikus ciklinek kölcsönhatása a csonka KRPMT-vel, nem tudunk rá igazán meggyőző magyarázattal szolgálni. Megállapíthatjuk, hogy a csonka KRP sokkal (7-, illetve 2-szer) erősebb kölcsönható partnere a MedsaCDKA;1-nek, illetve a D-típusú ciklineknek, mint a teljes hosszúságú fehérje. Hasonló kölcsönhatást tapasztaltak az *Arabidopsis* KRP-k esetében is (Wang és mtsai 1998). Ennek az oka minden bizonnyal abban keresendő, hogy a KRP N-terminálisának hiánya fokozza a fehérje stabilitását, más szóval valamilyen fehérje lebontást jelző szignál kell legyen az első 96 aminosavon (Zhou és mtsai 2002). Ez lehet egy ubiquitinációs hely, vagy olyan foszforilációs hely, melynek módosítása ubiquitinálódást vagy egyéb fehérjelebontási utat indukál. Ennek az eldöntése további kísérleteket igényelne. Annak ellenére,

hogy az ubiquitinálás valószínűsíthető, ennek a bizonyítása eddig egyetlen laboratóriumban sem valósult meg kétséget kizáró módon. Azonban ha *Arabidopsis* fehérjekivonattal a rekombináns *Arabidopsis* KRP2 fehérjét kezeljük, akkor lebomlik, és ez a folyamat az MG132 nevű specifikus 26S proteasóma inhibitorral, vagy a CDK inhibitor olomucinnal gátolható (Verkest és mtsai 2005). Ezek a kísérletek sok érdekes következtetés levonását teszik lehetővé. Az egyik ezek közül az, hogy az *in silico* doménkereséssel nem minden esetben jutunk közelebb a célhoz, hiszen a KRP1 esetében, ahol *in planta* bizonyított az N-terminális régió szerepe a fehérje lebontásában, ez sem PEST motívumot, sem CDK foszforilációs konszenzus helyet nem tartalmaz. A KRP 2 esetében, ahol legalább *in vitro* bizonyított, hogy a lebontásban mind az ubiquitinálódásnak, mind a foszforilációnak szerepe lehet, találhatunk ugyan PEST motívumot, de nem azonosítható CDK foszforilációs konszenzus szekvencia, ami megmagyarázhatná a CDK kináz szerepét ebben a folyamatban. A KRPMt fehérjében szintén nem prediktálható CDK konszenzus foszforilációs hely. Azonban, mint majd a későbbiek során láthatjuk, bár az N-terminális 96 aminosav hiánya nincs hatással az inhibitor hatásra. Ez a régió tartalmaz „*in vitro*” foszforilációs helyet, amit kísérleteinkben mind a CDKA;1/A;2, mind a CDKB1;1 és CDKB2;1 kinázok fölismertek, és ugyancsak képes foszforilálni az CPK3Ms kalcium-függő fehérje kináz.

7.4. A rekombináns KRPMt fehérjével együtt tisztíthatók a CDKA és CDKB kinázok is

A különböző CDK-ciklin kölcsönhatásokat elemezve korábban megállapítottuk, hogy a Medsa;CYCD4 erős kölcsönható partnere mindkét B-típusú CDK-nak (Mészáros és mtsai 2000). Az előző fejezetben ismertetettek alapján megállapítható, hogy a D-típusú ciklinek mindegyike kölcsönhat a KRPMt-vel, azaz logikus volt valamiféle indirekt kölcsönhatást feltételeznünk a B-típusú CDK-k és az inhibitor fehérje között. Ennek eldöntésére egy pull-down vizsgálatot végeztünk, melynek segítségével azt elemeztük, hogy az amino-terminálisan taggelt His₆-KRPMt ágyhoz kötve milyen CDK típusokat képes megkötni. A kísérlet azzal az eredménnyel szolgált, hogy minden vizsgált CDK KRPMt-hez való kötődését képesek voltunk kimutatni (7. ábra). Érdekességgént megemlítendő, hogy a Medsa;CDKB2;1, ami a

Medsa;CYCD4 legerősebb kölcsönható partnere, gyakorlatilag kvantitatívan tisztítható a teljes A2 szuszpenzióból. A Medsa;CDKB1;1 esetében olyan poliklonális ellenanyag állt rendelkezésünkre, ami két hasonló méretű fehérjét is felismer a teljes extraktumban. Ebben az esetben a kísérlet azzal az eredménnyel is járt, hogy sikerült bebizonyítani: az eredeti predikció szerint is a kisebb molekulatömegű fehérje lehet a valódi Medsa;CDKB1;1 kináz, mivel az KRP ágyon már csak ez marad kötve a mosásokot követően. Szintén említést érdemel a Medsa;CDKA;1/A;2 esetében megfigyelt háttér az előzőleg teljes élesztő sejtkivonattal telített ágyon, melynek jelenléte arra is utalhat, hogy a kettős-hibrid kölcsönhatás nem szükségszerűen közvetlenül jön létre, hanem egy élesztő saját ciklinén keresztül. Megvizsgáltuk, hogy vajon az ily módon izolált CDK-k aktívak-e, és valóban képesek voltak gyenge hiszton H1 foszforilációt kimutatni az ágyhoz kötött fehérjefrakcióval.



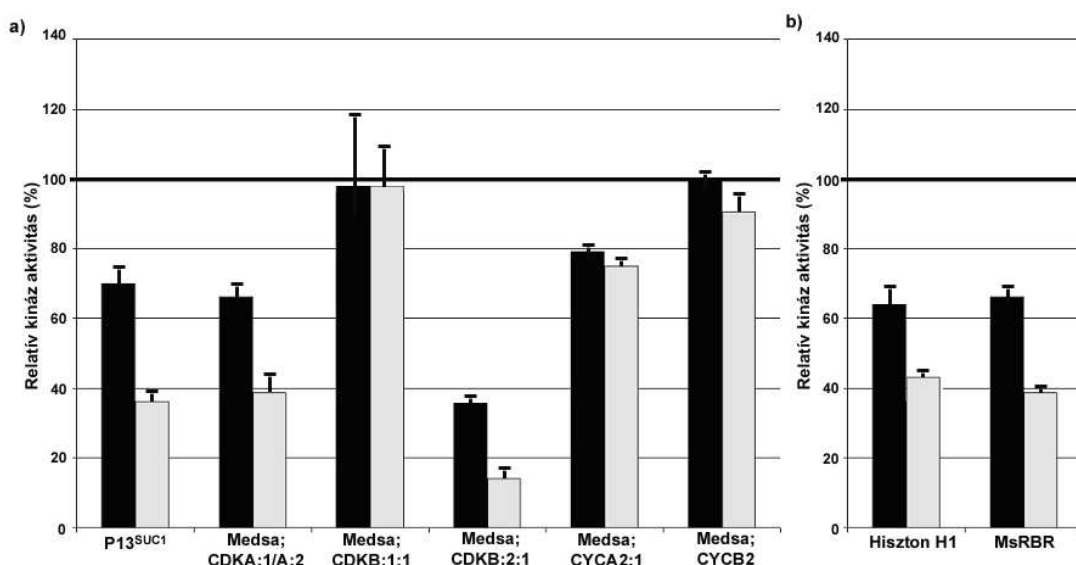
7. Ábra A KRP Mt fehérjével kölcsönható CDK-k immunoblott vizsgálata

KRP Mt pull-down kísérlettel kimutatható, hogy a rekombináns KRP Mt fehérje kölcsönhat mind az A, mind a B-típusú Medicago CDK komplexekkel. (Ni-NTA= Ni-NTA-Sepharose teljes élesztő fehérje kivonattal telítve; KRP Mt Ni-NTA = Ni-NTA-Sepharose-hoz kötött KRP Mt)

7.5. A KRP Mt fehérje gátló hatása függ a gátolt kinázkomplextől in vitro

Sok különböző kísérletben bizonyították korábban, hogy a KRP fehérje képes gátolni a p13^{SUC1} vagy p10^{CKS1At}-kötött kinázok hiszton H1 foszforiláló aktivitását (Wang és mtsai 1997; Lui és mtsai 2000; De Veylder és mtsai 2001). Ezeknek a kísérleteknek minden szépségük ellenére jelentős hátrányuk, hogy a SUC1, illetve a CKS1 által tisztított komplexek feltehetőleg tartalmazzák mind a PSTAIRE, mind pedig a PTTLRE kinázokat, sőt egyéb kinázok jelenléte sem kizárt. Ezért mi azt a megközelítést alkalmaztuk, hogy különböző CDK és ciklin ellenanyagok segítségével immunoprecipitáltuk az egyes kináz komplexeket A2 lucerna szuszpenzióból és vizsgáltuk a KRP Mt fehérje ezekre gyakorolt hatását. Amint ez a 8. ábrán is látható a

p13^{SUC1}-kötött frakció és a PSTAIRE kináz pár (Medsa;CDKA;1/A1;2) gátlása nagyon hasonló volt mind a két alkalmazott inhibitor koncentrációban.



8. Ábra A rekombináns KRPMt fehérjének eltérő hatása van az egyes kináz komplexekre

a) A KRPMt képes gátolni, vagy esetenként aktiválni a különböző kináz komplexeket az *in vitro* kináz vizsgálatokban. A hiszton H1 foszforilációs aktivitásokat 10 pmol (fekete oszlopok), illetve 50 pmol (szürke oszlopok) KRPMt jelenlétében vizsgáltuk és az eredeti, KRPMt inhibitorral nem kezelt kináz aktivitások százalékában ábrázoltuk. A vizsgált komplexeket p13^{SUC1}-Sepharose ágy, illetve az x tengelyen föltüntetett CDK, illetve ciklinek ellen termeltetett ellenanyagok segítségével tisztítottuk.

b) A *Medicago* retinoblasztóma-homológ-fehérje (MSRBR) szubsztrátként történő foszforilációja a Medsa;CDKA1;1/A1;2 kináz komplex felhasználásával hasonló mértékben gátolható a rekombináns KRPMt fehérjével, mint a hiszton H1 foszforilációja

A meglepő és továbbgondolást igénylő eredmény az volt, hogy a Medsa;CDKB1;1 komplexet nem gátolta, sőt bizonyos kísérletekben aktiválta a KRPMt fehérje jelenléte. A Medsa;CDKB2;1 mitotikus kináz volt a legérzékenyebb az inhibitor fehérje jelenlétére, 50 pmol inhibitor elegendő volt ahhoz, hogy a hiszton H1 foszforilációs képesség 90%-át megszüntesse.

A ciklin ellenanyagokkal precipitált komplexek közül az anti-Medsa;CYCB2-vel tisztítható aktivitásra nem volt hatással, az anti-Medsa;CYCA2,1-vel tisztuló kináz aktivitást pedig viszonylag kis mértékben csökkentette az inhibitor fehérje. Ráadásul megfigyelhetjük, hogy a gátlás független az alkalmazott inhibitor koncentrációjától.

Megvizsgáltuk azt is, hogy hogyan viselkednek a különböző kinázok a sejtciklus különböző szakaszaiban, oly módon, hogy S-fázisban, illetve G2/M-fázisban lévő sejtekből tisztított kináz komplexeket gátoltunk KRPMt-vel (2 táblázat). Hiszton H1-et használva foszforilációs szubsztrátként, a G2/M-fázisú sejtekből anti-Medsa;CYCA2 ellenanyaggal immunoprecipitált kináz komplexet jelentősen gátolta a rekombináns KRPMt fehérje. Erről a ciklinről tudott, hogy a Medsa;CDKA;1

kölcsönható partnere (Roudier és mtsai 2000). Ezzel szemben az S-fázisú sejtekből tisztított komplex nem reagált az inhibitor fehérje jelenlétére. Az anti-Medsa;CDKA;1/A;2 esetében is a G2/M fázisú sejtekből izolált fehérjék bizonyultak érzékenyebbnek, ugyanakkor 24%-os gátlás volt megfigyelhető az S-fázisú sejtekből izolált komplex esetében is. Hasonló eltérések figyelhetők meg a p107 RB C-terminális doménjének foszforilációja során is. Látható, hogy a humán retinoblasztóma fehérje foszforilációja minden esetben érzékenyebb volt a gátlásra, kivéve az anti-Medsa;CYCA2 ellenanyaggal G2/M-fázisú sejtekből tisztított kináz aktivitását (2. táblázat).

Mivel a retinoblasztóma-homológ fehérjék (RBRk) elsődleges foszforilációs célmolekulái a CDK-knak, megvizsgáltuk a rekombináns MsRBR foszforilációjának változását KRPMt jelenlétében. Mint a 8b ábra mutatja, hogy a lucerna RBR fehérjét a hiszton H1 szubsztráthoz hasonlóan foszforilálja a vizsgált Medsa;CDKA;1/A;2 kináz, és a KRPMt gátló hatása sem tér el a hiszton H1 esetében tapasztalttól.

Ezek az eredmények mutatják, hogy *in vitro* a KRPMt inhibitor fehérje különbözőképpen módosítja az egyes kinázok, illetve kináz komplexek aktivitását. Ez azt jelezheti, hogy az inhibitornak összetett szerepe van, és képes a különböző szerepű sejtciklus regulátorokat különböző módon szabályozni.

Az immunoprecipitált kinázkomplexek gátlása	Relatív hiszton H1 foszforiláció 50 pmol KRPMt jelenlétében	Relatív p107 Rb foszforiláció 50 pmol KRPMt jelenlétében
Medsa;CycA;2-kötött kinázok. S-fázis (G1=21%; S=74%; G2=5%)*	95%	78%
Medsa;CycA;2-kötött kinázok. G2/M-fázis (G1=10%; S=10%; G2=80%; M=24%)*	48%	87%
Medsa;CDKA;1/A;2 S-fázis (G1=21%; S=74%; G2=5%)*	76%	48%
Medsa;CDKA;1/A;2 G2/M-fázis (G1=10%; S=10%; G2=80%; M=24%)*	36%	23%

2. Táblázat A KRPMt gátló hatása a sejtciklus különböző szakaszaiban

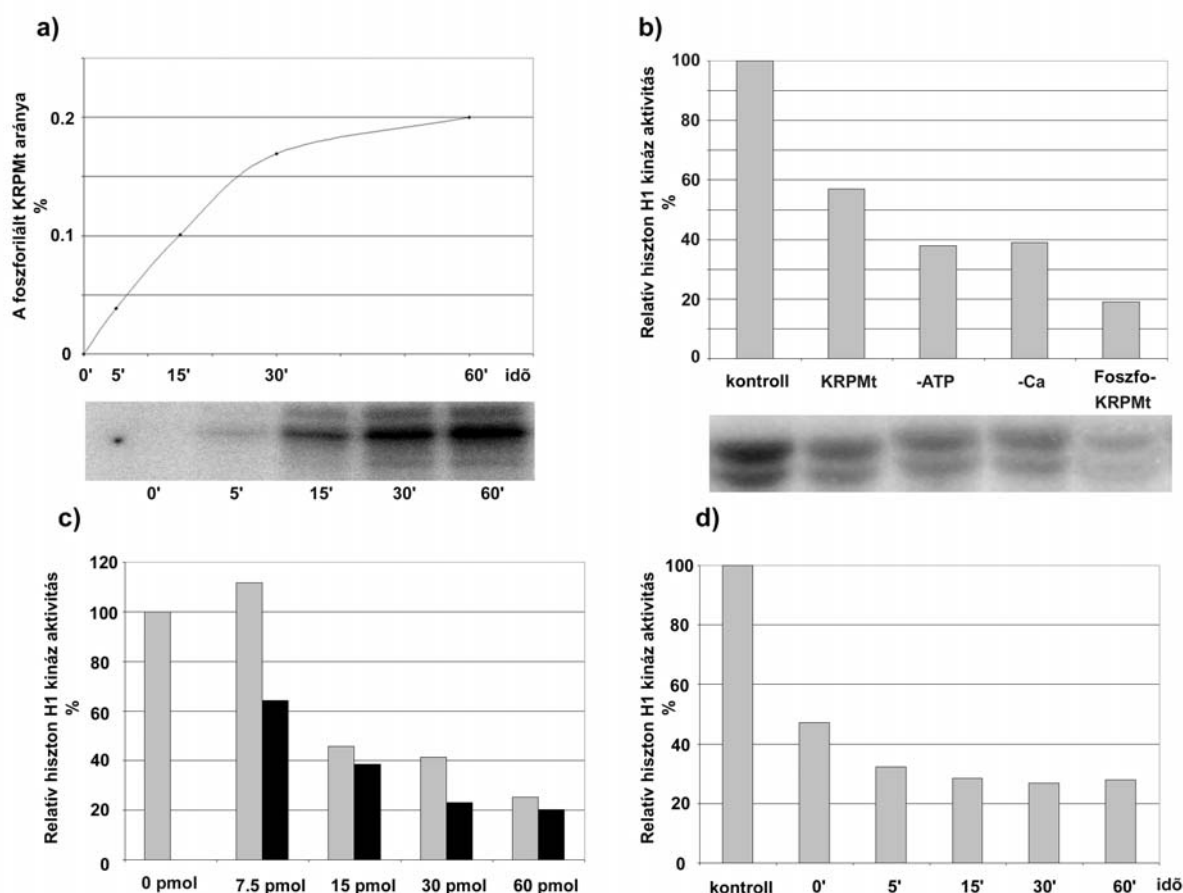
A rekombináns KRPMt fehérjének erősebb hatása van a G2/M-fázisú sejtekből izolált kináz komplexekre, mint az S-fázisú sejtekből tisztítottakra. A hiszton H1 és p107Rb foszforilációs kísérletek során különböző kinázokat tisztítottunk anti-Medsa;CYCA2;1 és anti-Medsa;CDKA;1/A;2 ellenanyagokkal, szinkronizált Medicago A2 sejtekből.

*A különböző sejtfázisokban lévő sejtek arányát áramlások citometriával, illetve mitotikus index számításával határoztuk meg.

7.6. A KRPMt foszforilálása egy kalmodulin-szerű domén fehérje kináz (MsCPK3) által fokozza annak gátló hatását

Az aminosav sorrend információk alapján több *Arabidopsis* (KRP5, 6) és *Chenopodium* KRP variáns esetében De Veylder és mtsai (2001) CDK konszenzus foszforilációs helyeket mutattak ki a fehérjék N-terminális szakaszán. A közelmúltban ugyanez a csoport bizonyította be, hogy a p10^{CKS1At} által tisztított CDK komplexek képesek foszforilálni az *Arabidopsis* KRP2 inhibítort (Verkest és mtsai 2005). CDK konszenzus foszforilációs szekvencia *in silico* nem található a *Medicago* inhibitorban, csakúgy, mint a KRP2At-ben sem. Ezen adatok, illetve a kinázreakciók „másodlagos” eredményei alapján azonban tudtuk, hogy a konszenzus szekvencia hiánya dacára, a lucerna CDK-k *in vitro* foszforilálják a KRPMt-t.

Csoportunk korábbi eredményei alátámasztották azt a feltételezést, hogy a CPK-k (kalcium-függő fehérje kinázok) lehetnének az összekötők a Ca²⁺-jelátvitel és a sejtosztódás szabályozása között (összefoglalva: Dudits és mtsai 1998). A lucerna inhibítort kódoló cDNS izolálását és rekombináns fehérje tisztítását követően lehetővé vált a következő hipotézis tesztelése: a CPK képes-e foszforilálni a KRPMt-t, és ez vajon módosítja-e az inhibitor aktivitását? Amint ezt a 9. ábrán láthatjuk, a kalmodulin-szerű domén fehérje kináz (MsCPK3) foszforilálja a rekombináns KRPMt-t. Az 1 órás kináz reakció során a CPK körülbelül a teljes fehérjemennyiség 0.2%-át foszforilálta (9a ábra). A MsCPK3 ATP és Ca²⁺-függő KRPMt foszforilációja jelentősen csökkenti az immunoprecipitált Medsa;CDKA;1/A;2 komplex hiszton H1 szubsztráton mutatott kináz aktivitását (9b ábra). A foszforilálatlan és foszforilált KRPMt inhibíciós képességének összehasonlításából világosan kitűnik, hogy ez a poszttranszlációs módosítás drasztikusan emeli a KRPMt gátló hatását. Természetesen a nem foszforilált rekombináns fehérje is aktív a kinázreakciók során, de a foszforiláció már kis koncentrációk esetén is biztosítja a maximális gátlást (9c ábra). Ugyanígy elmondható, hogy a viszonylag kis mennyiségű foszforilált KRPMt is képes erre (9d ábra).



9. Ábra A Ca^{2+} -függő fehérje kináz (MsCPK3) foszforilálja, ezzel aktiválja a KRPMT-t

Az aktiváció hatása az immunoprecipitált Medsa;CDKA;1/A;2 komplex csökkent hiszton H1 foszforilációs képességében mutatkozik meg.

a) A beépült radioaktivitás kvantifikálása és autoradiogramm.

A KRPMT fehérjét foszforilálja az MsCPK3 kináz. Egyórányi inkubálás során a rekombináns fehérje 0.2 %-a foszforilálódott.

b) Az előfoszforiláció okozta aktiválás autoradiogrammon.

Az MsCPK3 Ca^{2+} -függő fehérje kináz ATP és Ca^{2+} -függő módon foszforilálja a KRPMT (40 pmol), ez a poszt-transzlációs módosítás jelentősen növeli a fehérje gátló képességét.

c) A KRPMT koncentráció és foszforiláció függő gátló hatása.

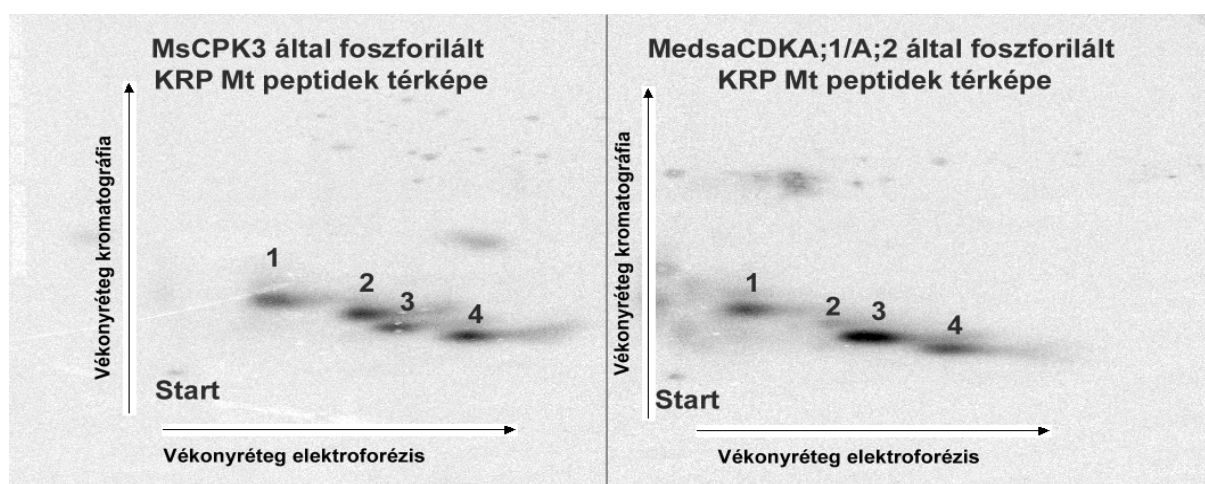
Az előfoszforilált KRPMT erősebb gátló hatást mutat már kis mennyiségek esetében is (fekete oszlopok). A szürke oszlopok a különböző mennyiségű nem előfoszforilált KRPMT hatását mutatja.

d) Az MsCPK3 általi foszforiláció gyorsan aktiválja a KRPMT (40 pmol) inhibitor funkcióját, amely már 5 perc után eléri a maximális értékét.

7.7. A KRPMT foszforilációja

Mind az A, mind a B-típusú CDK-k képesek foszforilálni a rekombináns KRPMT fehérjét, annak ellenére, hogy *in silico* nem jelölhető meg benne egyértelmű CDK konszenzus szekvencia. Az *in silico* predikció és a gyakorlat ellentmondásos voltát *Arabidopsis* KRP-k esetében is kimutattam már, és hasonló kettősség jellemző a sejtmagi lokalizációs szignál jelenlétére, illetve hiányára is, mint ezt az irodalmi

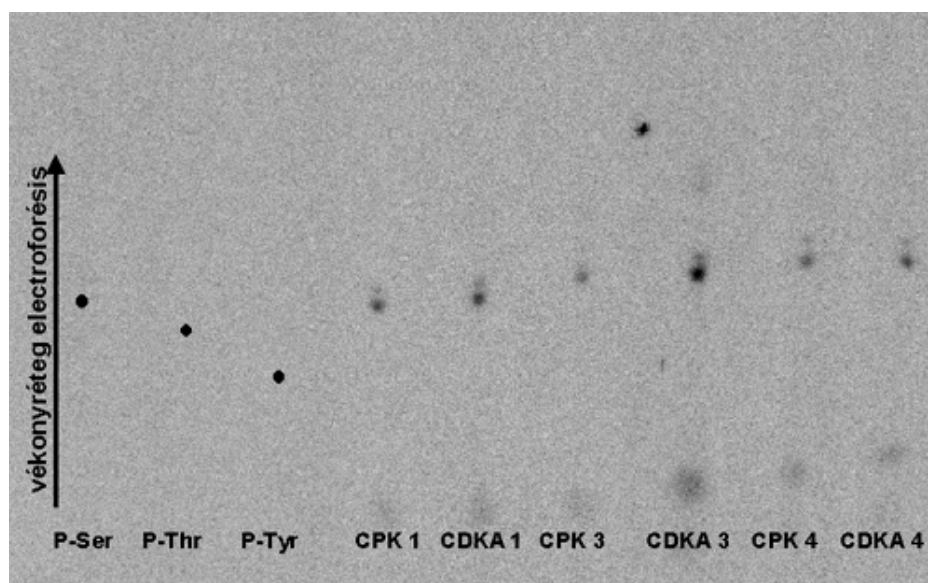
áttekintésben is említettem. Kísérleteink egy nagyon jelentős részét fordítottuk, kezdetben csekély sikerrel, a KRPMt foszforilációs helyének meghatározására. Először a CPK általi foszforiláció helyét próbáltuk MALDI tömegpektrometriás analízissel meghatározni. Sajnos ez a kétdimenziós gél-elektroforézissel tisztított foszfo-fehérje esetében nem sikerült. Ezek után foszfo-peptid térképezést alkalmaztunk, annak reményében, hogy ily módon legalább azt sikerül bebizonyítanunk, hogy a CDK-k, illetve a CPK a várakozásoknak megfelelően két különböző helyen módosítja a fehérjénket. A rekombináns KRPMt fehérjét inkubáltuk a két különböző kinázzal, majd a foszforilált fehérjét gélből izolálva, tripszinnel emésztettük és vékonyréteg elektroforézist, valamint vékonyréteg kromatográfiát végeztünk vele. (10. ábra)



10. Ábra A két különböző kinázzal (MsCPK3 ill. MedsaCDKA;1/A;2) foszforilált KRPMt foszfo-peptid térképe

A rekombináns foszforilált fehérjét gélből izolálva tripszinnel hasítottuk, majd cellulóz vékonyrétegen először elektroforetizáltuk, majd vékonyréteg kromatografáltuk.

Ez a térképezési eljárás azonos képet mutatott a két kináz esetében, ami arra enged következtetni, hogy két közeli aminosavon történik a foszforiláció. Ennek eldöntésére a foszforilált „foltokat” izoláltuk, és sósavval hidrolizálva foszfo-aminosav térképezést végeztünk. A 11. ábrán látható, hogy bár ebben sem sikerült különbséget kimutatni, az azonban egyértelműen megállapítható, hogy minden foszforilált aminosav szerin. Következésként levonható, hogy mind az A-típusú CDK, mind a CPK egy, vagy esetleg több szerinen foszforilálja a KRPMt-t.



11. Ábra A KRPMt foszforilációja során kapott foszfo-peptidek foszfo-aminosav térképe

Az előző ábrán látható foszfo-peptideket izoláltuk, majd sósavval hidrolizáltuk. A foszfo-peptidek aminosavainak vékonyréteg kromatográfiás elválasztása alapján megállapítható, hogy minden peptid szerin foszforilációt tartalmaz.

Előzetes kinázreakciók eredménye azt mutatta, hogy míg a teljes hosszúságú KRPMt fehérje jól, addig az, élesztő kettős-hibrid kísérletből származó csonka KRPMt(97-223) fehérje egyáltalán nem foszforilálható a két kinázzal. Ez az információ adott lehetőséget a további *in silico* analízisre.

Mivel tudtuk azt, hogy a CPK képes fölismerni a PKC konszenzus szekvenciákat, ezért megvizsgáltuk az esetleges PKC konszenzus motívumok jelenlétét a fehérjénkben. A keresés három ilyen szekvenciát eredményezett:

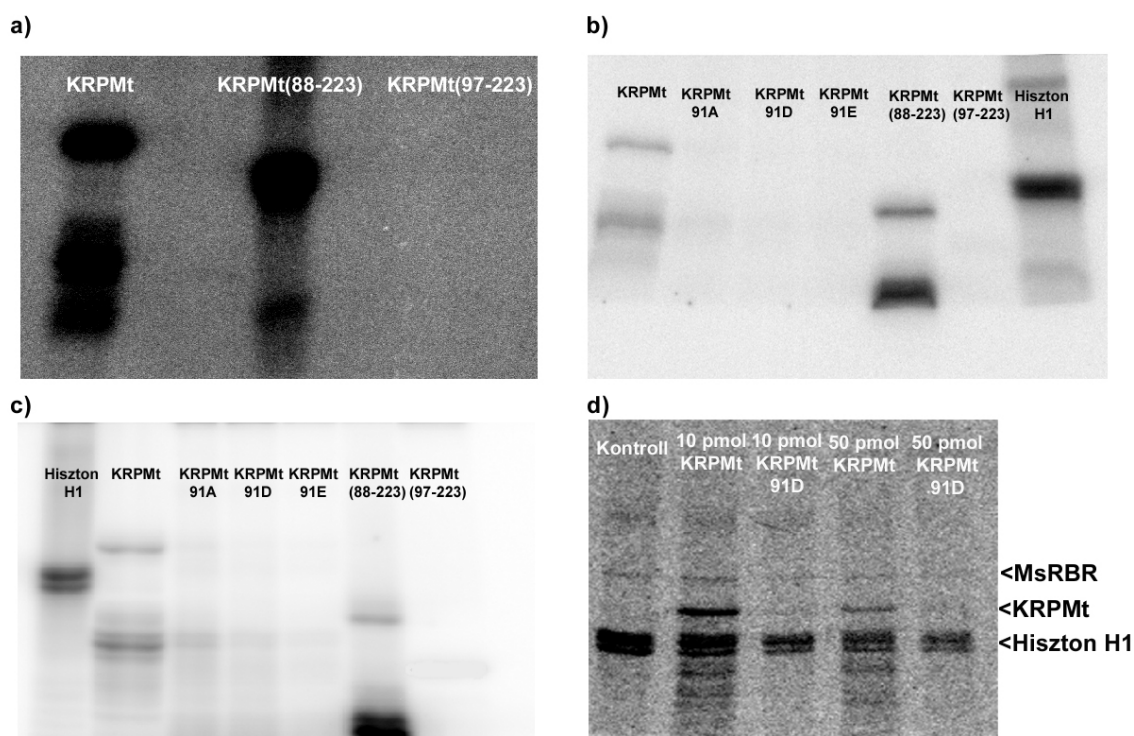
S-91 RQHSAKR

T-134 AEDIERS

T-160 RPIIRRRT

Ezek alapján kijelenthető, hogy egyetlen olyan foszforilációs hely van, ami szerin (tehát megfelel a foszfo-aminosav elemzés eredményének) és a 97. aminosav előtt található (így nem található meg a nem foszforilálható, N-terminális csonka fehérjében). Annak a bizonyítására, hogy ez a szerin a foszforiláció helye elkészítettük a KRPMt(88-223) rekombináns fehérjét és a 12a ábrán bemutatott foszforilációt kaptuk. Megállapítottuk tehát, hogy a RQHSAKR motívum szerinjét az A-típusú CDK, illetve az MsCPK3 is képes foszforilálni. Ezek után Kunkel mutagenézissel a 91. pozícióban lévő szerint mutációt hordozó primereket

felhasználó PCR és Dnpl restrikciós enzim segítségével aszparaginsavra, glutaminsavra, illetve alaninra cseréltük. A 12a-b ábrán láthatjuk, hogy a CDKA;1/A;2 illetve MSCP3 is csupán a teljes hosszúságú, illetve 88-223 aminosavat tartalmazó KRP fehérjét képes foszforilálni, de a pontmutációt tartalmazó fehérjéket, illetve a 91. szerint nem tartalmazó KRPMt(97-223) nem.



12. Ábra A különböző hosszúságú KRPMt fehérjék, illetve a mutánsok foszforilációjának vizsgálata

a) A MedsaCDKA;1/A;2 foszforilálja a teljes hosszúságú és a 88-223 aminosavat tartalmazó KRPMt fehérjét, de nem a KRPMt(97-223) deléciós változatot.

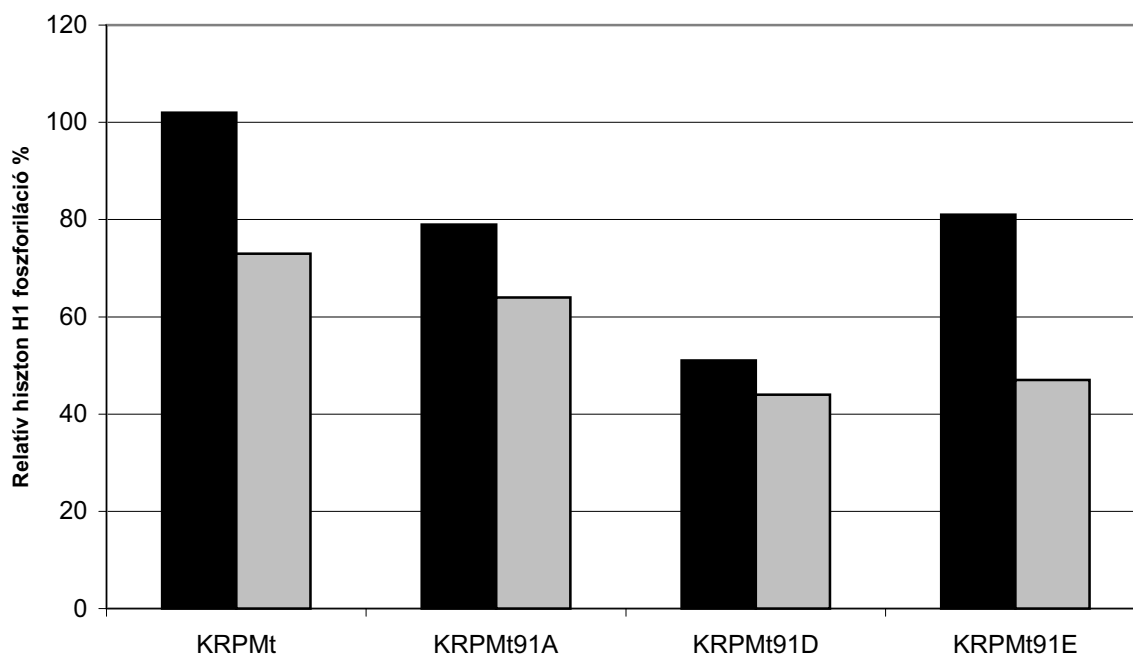
b) A MedsaCDKA;1/A;2 nem foszforilálja a 91. szerin helyett alanint, aszparaginsavat, illetve glutaminsavat tartalmazó mutáns KRPMt fehérjéket.

c) A MSCP3 nem foszforilálja a 91. szerin helyett alanint, aszpartátot, illetve glutamátot tartalmazó mutáns KRPMt fehérjéket, valamint a KRPMt(97-223) fehérje szakaszt, azonban szubsztrátja a teljes hosszúságú és a 88-223 aminosavat tartalmazó KRPMt fehérje.

d) A MedsaCDKA;1/A;2 kináz Hiszton H1 és MsRBR foszforilációs aktivitásának gátlása.

A KRPMt 91. szerinjének aszparaginsavra történő cseréje már kis koncentrációnál is jelentősen fokozza a fehérje aktivitását. Az ábrán látható hiszton H1 foszforiláció kvantitálása után megállapítható az, hogy a kontrollhoz képest milyen mértékben csökken a kináz aktivitás (10pmol KRPMt: nincs változás (100%), 10pmol KRPMt (91D): 55 %. 50pmol KRPMt: 58%, 50pmol KRPMt(91D): 46%). Hasonló, bár kisebb erősségű az RBR fehérje foszforilációjára gyakorolt gátlás is.

Az először elkészített 91. aszparaginsavat tartalmazó mutánsról sikeresen bebizonyítottuk, hogy a várakozásoknak megfelelően foszforilációt mimikáló mutánsként viselkedik, azaz erősebben gátolja a MedsaCDKA;1/A;2 komplexet, mint az eredeti 91. pozícióban szerint tartalmazó fehérje (12d ábra).



13. Ábra A vad típusú illetve a különböző mutáns KRPMt-k MedsaCDKA;1/A;2 komplexet gátló hatása

10 pmol (fekete oszlopok), illetve 50 pmol (szürke oszlopok) rekombináns fehérje használata esetén.

A 13. ábrán jól látható, hogy a várakozással ellentétben a 91. szerin alaninra való cseréje is fokozta a gátlást, holott ennek elvileg egy „domináns negatív” mutációnak kellene lennie. Ezek alapján sajnos nem lehetünk egészen biztosak abban, hogy nem a bakteriálisan expresszált fehérjék szerkezeti és tisztítási különbségeiből adódik az a változás, amit mi a foszforiláció mimikálásának vélünk. Megemlítendő, hogy a leginkább oldható, legkönnyebben termeltethető és tisztítható fehérje éppen a 91. pozícióban glutaminsavat tartalmazó KRPMt variáns. Ennek ellenére kijelenthető, hogy a 91. szerin egy kiemelkedően fontos szereppel rendelkező, és mindkét vizsgált kináz által foszforilálható aminosav a molekulában.

8. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az előzőekben bemutatott kísérleti eredmények bizonyos, a továbbiakban részletezendő előkísérletek, valamint az irodalmi áttekintésben is említett ismeretek alapján következtetéseket vonhattuk le a KRPMt fehérjével, illetve általánosságban a növényi sejtciklussal kapcsolatban.

Mai tudásunk alapján biztosan állíthatjuk, hogy a CDK inhibitorok központi szerepet játszanak a sejtciklus szabályozásában, a sejtméret kialakulásában, az endoreduplikációban, a programozott sejthalálban, és a különböző szervek, mint a levél a virág kialakulásában (Wang és mtsai. 2000; De Veylder és mtsai 2001, Schnittger és mtsai 2003). Ugyanígy ismert az a tény is, hogy a D-típusú ciklinekkel nem csak kölcsönhat a fehérje, de képes revertálni a D-típusú ciklint túltermelő növények fenotípusát (Jasinski és mtsai 2002b). A fentiekben bemutatunk egy *Medicago* CDK inhibitor fehérje izolálását és részletes jellemzését. Összehasonlítva a leginkább jellemzett *Arabidopsis* KRP-kkel, sok hasonlóságot, illetve néhány különbséget, vagy újdonságot állapíthatunk meg. Az aminosav homológiák alacsony szintje, illetve az, hogy feltételezhetően a KRP-k igen fontos szerepet játszanak a növények differenciálódásában (ami alapján könnyen elképzelhető, hogy a különböző struktúrák mögött valódi növényfejlődési stratégiák közti különbségek vannak) nagyon megnehezítik azt, hogy egyes KRP-ket megfeleltessünk egymásnak. Megállapítható azonban, hogy a KRPMt egy olyan új inhibitor fehérje, amely leginkább a KRP4At-hez hasonlít strukturálisan, de olyan fontos motívum, mint a degradációban szerepet játszó PEST motívum hiányzik az *Arabidopsis* megfelelőjéből. Ez a különbség azért is fontosnak tekinthető, mert más *Arabidopsis* KRP-kben, mint például a KRP5At, megtalálható ez a motívum. A KRP5At azonban sok más szempontból tér el: lényegesen rövidebb, a konzervált motívumok elhelyezkedése is távolabb áll a KRPMt-től, valamint hiányzik belőle az általunk újonnan azonosított hetedik aminosav motívum (5a ábra). A filogenetikai fa alapján (5c ábra) azt mondhatjuk, hogy az általunk vizsgált fehérje, az *Arabidopsis* KRP-k kevésbé jellemzett fehérjeihez közeli szeparált ágon helyezkedik el. Valószínűleg ennél a fehérje családnál még a megszokottnál is nagyobb óvatossággal kell kezelnünk a számítógépes predikciókat, mert, mint láttuk az Eredmények és az Irodalmi áttekintés

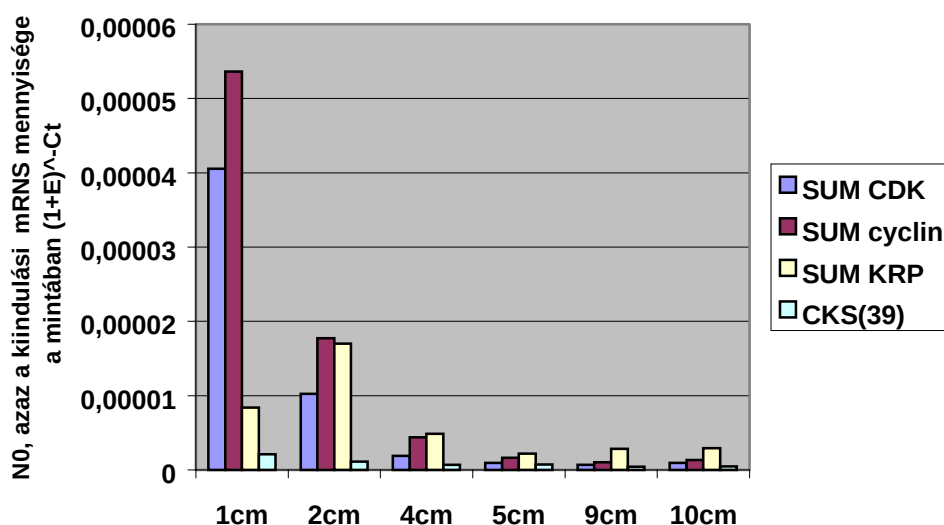
fejezetekben is, számtalan azonosított motívumról kiderült azok nem esszenciális volta, illetve a foszforiláció esetében is megállapítható, hogy a CDK konszenzus szekvencia hiányából nem következik, hogy a KRP-k ne lennének kitűnő szubsztrátjai a növényi CDK-knak.

A gének expressziójának vizsgálata gyakorta közelebb visz a funkciójuk megértéséhez. Így például régről tudott, hogy az *Arath;KRP1/ICK1* gén az ABA stresszhormon hatására megnövekedett mRNS szintet mutat (Wang és mtsai 1998).

Hasonló eredményeket kaptunk mi is a *Medicago* inhibitor gén esetében (1b táblázat). Azt tapasztaltuk, hogy 3 napos A2 sejtszuspenziót 100 μ M abszcizinsavval kezelve a második órában már csaknem nyolcszorosára emelkedett az mRNS szint. Nem meglepő az sem, hogy a só-stresszre is jelentősen emelkedett a *KRPMt* expressziós szintje, mintegy tizenötszörös mértékben. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy az ozmotikus stresszt mimikáló PEG kezelésre csak alig emelkedett a *KRPMt* expressziós szintje.

Tudjuk, hogy az abszcizinsav (ABA) sokféle stressz szignál közvetítésében részt vesz, többek között az ozmotikus- és só-stresszében is (Chinnusamy 2004). A mi csoportunkban került bebizonyításra, hogy míg a szintetikus auxin és kinetin kezelés képes volt a levélkorongokban a CDK aktivitás igen jelentős mértékű növelésére, addig ezt a hatást 50 μ M ABA gyakorlatilag teljesen megszüntette (Mészáros és mtsai 2000). A *KRPMt* expressziós növekedése a stresszhormon hatására, illetve az ABA kináz aktivitásra gyakorolt hatása közötti összefüggés alapján önként adódik a föltételezés, hogy a sok egyéb faktor közül, melyek alkalmasak lehetnek arra, hogy a kináz aktivitást csökkentsék talán, a KRP az egyik legmegfelelőbb. A különböző szövetekben mérhető *KRPMt* mRNS szintekből messzemenő következtetésekre nem juthatunk. Azt mindenesetre a lucerna inhibitor esetében is megállapíthatjuk, hogy a differenciált szövetekben is viszonylag jelentős mennyiségben termelődik különösebben erős szövetspecificitás nélkül. Ehhez kapcsolódóan egy érdekes expressziós vizsgálat eredményeit említeném meg, melyek véleményem szerint jelentősen hozzájárulhatnak a jövőben a KRP-k szerepének pontosabb megértéséhez. Gentben, Dirk Inzé professzor intézetében végzett kutatómunkám egyik fő feladata volt a rizs újonan azonosított, alapvető sejtciklus génjeinek vizsgálata, kvantitatív PCR segítségével. Az egyik

legérdekesebb eredmény számomra az volt, hogy míg a szinkronizált rizs szuszpenzióban gyakorlatilag semmi igazán érdekes adat nem született a rizs KRP-kkel kapcsolatosan, addig ettől teljesen eltérő eredményt kaptunk a levél differenciálódást modellező kísérletünkben. Ilyen vizsgálatokhoz a rizs levél egészen kiváló modell, mivel egy 10 cm-es levél esetében az első centiméter teljesen merisztematikus, gyorsan osztódó sejtek halmaza, a második keverten tartalmazza a már differenciálódott és még osztódó sejteket, majd a későbbiekben az egyre régebben differenciálódott sejtek találhatók. A klasszikus sejtciklus gének, mint a CDK-k, ciklinek és a CKS mindegyike igen magas génkifejeződést mutat a merisztematikus zónában, és ez az expresszió innen távolodva exponenciálisan csökken. A KRP-k esetében viszont azt találtuk, hogy a merisztémában is jelentős a kifejeződésük: ennek magyarázata az lehet, hogy a jelentős osztódási kapacitás esetén minden, ebben szerepet játszó fehérjét viszonylag nagy mennyiségben kell termelni, vagy azért, hogy a sejtciklus progresszióját biztosítsa, vagy azért, hogy ezeket a nagy mennyiségben jelenlévő „pozitív” regulátorokat kordában tartsa. A második centiméteres szegmensben, ahol a sejtek differenciációja megindul, a KRP-k expressziója legalább háromszorosára nő (KRPA3). Ez az eredmény teljesen összhangban van azzal, hogy itt a vizsgált CDK-k és ciklinek szintje ötödére-tizedére csökken. Ha a rizs sejtciklus gének különböző családjainak össz-mRNS szintjét hasonlítjuk össze, akkor megállapítható, hogy míg merisztematikus levélsejtekben és a rizs sejtuszuszpenzióban a CDK-k és ciklinek expressziója 5-6-szor magasabb, mint a KRP-é, addig a második centimétertől a KRP-k mRNS szintje már magasabb a többi sejtciklus génénél (14. ábra).



14. Ábra A rizs központi sejtciklusgénjeinek transzkripciója fiatal rizs levél egy centiméteres szakaszaiban

Az eredményeket real-time PCR módszerrel, 10 cm hosszú levélből izolált szegmensek vizsgálatával kaptuk.

A sejtciklus kutatás egyik fontos dogmája, miszerint a CDK-k aktivitását és szubsztrátspecifitását is a velük kölcsönható ciklinek határozzák meg. A ciklinek mellett azonban bátran megemlíthetjük a KRP-ket is, mint olyan fehérjét, melyek legalább az aktivitást képesek befolyásolni. A kölcsönhatások föltérképezésére az élesztő kettős-hibrid, valamint a pull-down kísérleteket használtuk. Már az első KRP izolálása során világossá vált, hogy a fehérje a CDKA, valamint a D-típusú ciklinek kölcsönható partnere (Wang és mtsai 1998). Ehhez hasonlóan a teljes hosszúságú lucerna inhibitor fehérje is képes kölcsönhatni a MedsaCDKA;1-gyel, valamint a három általunk korábban izolált D-típusú ciklinnel. Kettős hibrid rendszerben a teljes hosszúságú KRPMt nem mutat mérhető asszociációt sem a lucernában található másik PSTAIRE kinázzal (a MedsaCDKA;2-vel), sem a B-típusú CDK-kal vagy több vizsgált ciklinnel (A-, B-, T típus). Ezek az eredmények nem meglepőek, ha összehasonlítjuk az egyéb növényi KRP-kkel kapott eredményekkel. A KRPMt(97-223) N-terminálisan csonkolt, az eredeti kettős-hibrid szűrésből származó fehérje jelentősen erősebb kölcsönhatást mutat a MedsaCDKA;1-el, illetve a D-típusú ciklinekkel is (7-szer , illetve 2-10-szer) (6. ábra). A teljes hosszúságú fehérje kölcsönhatási erőssége ezekben az esetekben épp az érzékenység határán lehet. Ez az oka annak is, hogy a másik PSTAIRE kinázzal (a MedsaCDKA;2-vel) csak a

KRPMt(97-223) fehérje adott detektálható kölcsönhatást. Bár a CDKB-kkel, valamint az A- és T-típusú ciklinekkel a csonka KRPMt sem hatott kölcsön, a B-típusú mitotikus ciklinekkel erős asszociációt detektáltunk. Ennek az eredménynek az értékelése, bár a jelenség fontosnak tűnik, sajnos meghaladja a tudásunkat. Mindenesetre itt megemlítem, a csonka, illetve teljes hosszúságú KRPMt gátló hatása között nem találtunk különbséget egyetlen kinázkomplex esetében sem, kivéve a ciklin ellenanyaggal (anti-Medsa;CYCB2-vel) tisztítható aktivitás esetét. Itt a teljes hosszúságú inhibitor nem mutatott mérhető effektust, míg a KRPMt(97-223) rekombináns fehérje, ha kis mértékben is (65% maradék aktivitás), de gátolta azt.

Megemlítendő furcsaság az is, hogy a szakirodalomban közölt KRP-k izolálása során nagy gyakorisággal kaptak hasonló, „csonka” változatot, ami utalhat arra is, hogy ezek létező „splicing” variánsok. Ez utóbbi mellett szól az, hogy rizs adatbázisokban 5 független EST található egy olyan KRP-re, ami csupán 86 aminosav hosszú, és ezek mindegyike szárazság-indukált cDNS könyvtárakból került izolálásra. Elképzelhetőnek tartom ezek alapján, hogy létezzen a KRP-knek egy „vérszék” szerepe, ami minden CDK-t a ciklin partnertől függetlenül gátol. Oly módon, hogy egyrészt hiányzik róla a hatását csökkenteni képes gyors degradációt biztosító amino-terminális szakasz, valamint nem csak a D-típusú ciklinek és különböző CDK-k komplexeit, de a mitotikus ciklinek komplexeit is gátolja. Az általunk izolált KRPMt(93-223) esetében ugyan hiányzik az aktivitást jelentősen fokozó 91. szerin, aminek a jelentőségét később részletezem, de a fent említett 86 aminosav hosszúságú rizs KRP tartalmaz két PKC foszforilációs konszenzus szekvenciát is az első 20 aminosavnyi szakaszában, melyek foszforilációja potenciálisan képes lehet a fehérje aktivitásának fokozására.

A kettős-hibrid eredmények megerősítésre és kiegészítésre szorulnak, ha azon eredményeinkre gondolunk, miszerint az egyik B-típusú CDK a legérzékenyebb a KRPMt jelenlétére, és ismert, hogy az egyik D-típusú ciklin (a Medtr;CYCD4), ami a KRPMt egyik legerősebb kölcsönhatója, szintén kimutatottan asszociál a MedsaCDKB2;1-gyel (Mészáros és mtsai 2000). A Medtr;CYCD4-ről még azt is tudjuk, hogy szemben a D-típusú ciklinektől várt G1-es expresszióval, ennek a ciklinnek G2/M-ben erősödik a kifejeződése, ami összhangban van a B-típusú CDK – val való kölcsönhatással. Mivel a kettős-hibrid rendszer nem alkalmas arra, hogy

három fehérje asszociációját kimutassuk, főként, ha a harmadik fehérjének nincs élesztő ortológja, ezért egy *in vitro* kimutatási módszert, a pull-down vizsgálatot alkalmaztuk. Ennek során a rekombináns His₆-KRPMt-t Ni-NTA-Sepharose ágyhoz kötöttük, majd ezt az ágyat inkubáltuk lucerna A2 sejtszuszpenzióból készült teljes fehérjekivonattal. A feltételezhető kölcsönhatások kialakulása után az ágyat alaposan mostuk és az ágyon maradó fehérjét Western-blott analízissel vizsgáltuk. A kapott eredményeink a várakozásainknak megfeleleltek, és igen fontos új információkat hordoztak. Elvártuk ugyanis, hogy a Medtr;CYCD4 való kölcsönhatáson keresztül a KRPMt a B-típusú CDK-kat is képes legyen kitisztítani a növényi fehérjék közül. Ezt nem sikerült ez idáig kimutatni az *Arabidopsis* KRP-k egyikéről sem. Az 7. ábrán jól látható, hogy a MedsaCDKB2;1 gyakorlatilag kvantitatívan visszanyerhető a His₆-KRPMt-t Ni-NTA-sepharose ágyról. Fontos a kölcsönhatás magas specificitása is: bár az anti- MedsaCDKB2;1 ellenanyag a teljes lucerna extraktumban két fehérjét ismer fel közel azonos affinitással, a KRPMt-vel tisztított komplexben a másik “szennyezőnek” nyomai sem mutathatók ki.

Ezek alapján a kölcsönhatási vizsgálatok alapján egy meglehetősen bonyolult szabályozási rendszer körvonalazódott előttünk. Annak eldöntésére, hogy mely kináz komplexekre milyen hatást gyakorol a lucerna inhibitor, *in vitro* kináz reakciókat végeztünk rekombináns KRPMt, illetve KRPMt(97-223) jelenlétében. A kísérleteink során használtuk a p13^{SUC1}-kötött kinázfrakciót, mint az irodalom alapján KRP-k vizsgálata során eddig kizárólagosan használt tisztítási megoldást. Ennek a módszernek az általános elfogadottságából származó előnye mellett, sajnos megvan az a hátránya, hogy a kináz aktivitás tisztítására használt SUC1 nem specifikusan köti a különböző típusú CDK-kat, illetve kicsi az affinitása a B-típusú CDK-khoz (De Veylder és mtsai. 1997), így az sem tökéletesen biztos, hogy a kapott komplexben nincsenek-e egyéb kinázok is. Ezen problémák elkerülésére és azért, hogy a különböző CDK-k, illetve a különböző CDK-k különböző ciklinekkel alkotott komplexei közötti esetleges eltéréseket megismerhessük, immunoprecipitálással tisztítottuk a különböző komplexeket, majd ezek hiszton H1 foszforiláló képességét vizsgáltuk meg. A 6. ábrán bemutatott kísérletek eredményeiből kitűnik, hogy a KRPMt különböző mértékben gátolja a különböző módokon tisztított komplexek aktivitását. Két kináz komplexre (az anti-Medsa;CDKB1;1 és az anti-Medsa;CYCB2

ellenanyagokkal tisztítható fehérjeegyüttesekre) nem volt gátló hatással, sőt a Medsa;CDKB1;1 bizonyos esetekben még aktiválódott is. Az aktiválódás kérdésének eldöntése többek között azért marad nyitott, mert ez a kináz a hiszton H1-et kevésbé fogadja el szubsztrátnak, és ez a CDK is képes foszforilálni a hisztonhoz hasonló méretű KRPMt-t. A bizonytalanságok ellenére megállapíthatjuk azt, hogy a KRPMt képes kölcsönhatni a Medsa;CDKB1;1 komplexszel, feltehetően a CYCD4-en keresztül, és ez a kölcsönhatás elsősorban nem gátlást okoz. Ez az eredmény annál is érdekesebb, mivel a p27Kip1-ről, a KRP-k egyik névadó homológjáról tudott, hogy az emlős rendszerekben a CDK4/ciklinD által alkotott komplexet képes stabilizálni (Sherr és Roberts, 1999). Elképzelhető tehát valamely hasonló jelenség növényekben is. A kísérletekben szereplő többi kinázkomplex esetében megfigyelhető volt a gátlás. Jól látható, hogy a p13^{suc1}-kötött kinázfrakció, valamint az immunoprecipitált MedsaCDKA;1/A;2 kinázkomplex nagyon hasonlóan viselkedik, ami ismerve a CDK-k sejten belüli mennyiségét és a p13^{suc1} kötési preferenciáját nem meglepő, hisz az A-típusú CDK-k tekinthetők mennyiségi szempontból egyértelműen a fő frakciónak. A legerősebb gátlást - némileg meglepő módon - a CDKB2;1 esetében kaptuk (90% gátlás). Ez az eredmény azonban csupán az irodalmi adatok miatt tűnik meglepetésnek. Ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy a pull-down kísérlet során ez a CDK tisztul a legjobban a KRPMt-vel, valamint, hogy ennek a CDK-nak nem sikerült a CYCD4-en kívül más ciklin partnert találnunk élesztő kettős-hibrid vizsgálatok során, akkor már inkább természetes jelenségnek tűnik. A MedsaCYCA2;1 ciklin elleni ellenanyaggal tisztítható kináz aktivitást is gátolta a rekombináns inhibitor fehérje, bár kisebb mértékben, mint az CDKA kinázt. Erről a ciklinről tudjuk, hogy képes kölcsönhatásba lépni a lucerna A-típusú CDK-kkal (Roudier és mtsai 2000). Ez alapján a gátlás nem meglepő, erre a kinázfrakcióra úgy tekinthetünk, mint a lucerna CDKA kinázfrakció egy alcsoportjára.

Ismert az, hogy az eukarióta sejtekben a sejtciklus szabályozása során a ciklin-függő kinázok sok különböző szubsztrátot foszforilálnak. Az állati és növényi sejtek esetében az egyik legfontosabb ilyen szubsztrát a retinoblasztóma tumorsuppresszor fehérje, illetve ennek növényi homológjai. A retinoblasztóma homológ fehérjék központi szerepe leginkább a G1/S átmenet során ismert. Ekkor az addig alacsony foszforilációs szintű és ezért E2F transzkripciós faktort kötő Rb-t a a

CDK-k hiperfoszforilálják. Ennek eredménye a kötött E2F szabaddá válása, így a DNS szintézisért felelős fehérjék génjeinek átíródása megkezdődhet. Az E2F transzkripciós faktor növényi homológja is ismert, valamint a növényi retinoblasztóma fehérjével való kapcsolata is bizonyított (Nakagami és mtsai. 1999, 2002, Boniotti és Gutierrez 2001). A retinoblasztóma homológok szabályozásában fontos szerepet játszanak a D-típusú ciklinek, melyek LXCXE-motívumokkal (klasszikus Rb-kötő konszenzus szekvencia) képesek kölcsönhatni velük. Ezen ismeretek alapján várható, hogy a D-típusú ciklinekkel kapcsolódó KRP-k a CDK-k hisztontól eltérő szubsztrátjainak foszforilációjára is hatással vannak.

Szerettünk volna többet megtudni a KRPMt-nek a CDK kinázok szubsztrátspecifitására gyakorolt hatásáról. Ennek érdekében több kísérletet végeztünk különböző retinoblasztóma homológ fehérjék fölhasználásával. A Kísérleti eredmények szakaszban a 8b ábrán azt mutattuk be, hogy akár lucerna retinoblasztóma homológ fehérje, akár a hiszton H1 a szubsztrát, a foszforilációt hasonló mértékben gátolja az adott vizsgálati körülmények között a rekombináns KRPMt.

Annak eldöntésére, hogy a sejtciklus különböző szakaszaiban lévő CDK-ciklin komplexekre hogyan hat a lucerna inhibitor fehérje, S-fázisú és G2/M-fázisban lévő sejtekből izolált MedsaCDKA;1/A;2 komplexet, illetve a Medsa;CYCA2;1-gyel asszociált kinázkomplexet tisztítottunk. A 2. táblázat tanúsága alapján a G2/M-ben lévő sejtekre jellemző kináz aktivitás érzékenyebb a KRPMt gátló hatására, mint az S-fázisú sejtek komplexei. Abban az esetben, ha az A-típusú ciklinnel együtt tisztítható kináz aktivitás változásokat nézzük, megállapítható, hogy az S-fázisú sejtek kináz aktivitása hiszton foszforiláció esetén nem gátolt jelentősen, a G2/M-fázisú sejtekben azonban a megnövekedett kináz aktivitáshoz megnövekedett gátolhatóság társult. A CDKA esetében is hasonló jelenséget látunk, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben az S-fázisú kináz aktivitása is jelentősen csökkenthető a KRPMt-vel, mintegy 50%-os mértékben. Ezekben a kísérletekben még a humán p107 Rb-t használtuk szubsztrátként. Elmondható, hogy ezen kísérleti körülmények között a retinoblasztóma homológ foszforilációja jelentősen érzékenyebb volt a gátlásra, mint a hiszton H1 módosítása. Érdekes azonban, hogy az A-típusú ciklinnel tisztítható kináz aktivitás G2/M-ben kevésbé volt gátolható, ha

hiszton H1 helyett retinoblasztómát használtunk szubsztrátként. Ennek a jelenségnek az oka talán abban lehet, meg, hogy ebben a sejtfázisban az A ciklinek szerepe lecsökken, vagy itt már más, újonnan megjelenő CDK-kal is kapcsolatba lép.

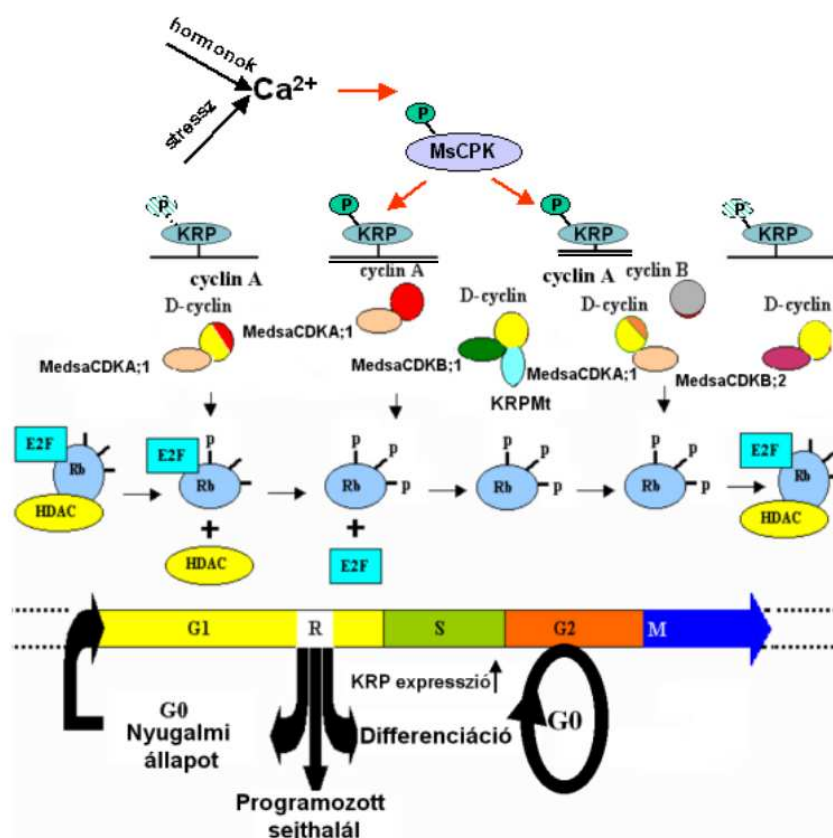
Ismert, hogy a kalcium egy fontos sejten belüli másodlagos jelátvivő, mely mind a G1/S, mind pedig a G2/M fázisok közötti átmenetben és a mitózisból való kilépésben is szerepet játszik (Khal és Means 2003)

A növényekben a Ca^{2+} -függő utakat és a sejtciklust összekapcsoló jelátviteli molekulák még nem ismertek. Sok lehetséges átviteli út közül a fent ismertetett kísérletek alapján azt valószínűsíthetjük, hogy a lucerna kalcium-függő, kalmodulin-független kináz, az úgynevezett kalmodulin-szerű domén fehérje kináz (MsCPK3) képes fokozni a KRPMt gátló képességét. *In silico* vizsgálatok, valamint kísérletes eredményeink is bizonyították, hogy a KRP-k tartalmaznak foszforilációs helyeket. Az *Arabidopsis* KRP2 *in vitro* foszforilációja a $\text{p10}^{\text{CKS1At}}$ fehérjével tisztítható kinázok által szerepet játszhat a KRP2 proteoszóma-függő lebontásában (Verkest és mtsai 2005). Erről a fehérje átíródást követő módosításról feltételezik, hogy a mitózisból az endociklusba való belépésben, a CDK funkciójának megváltoztatásán keresztül játszik szerepet (Verkest és mtsai 2005). Ezzel szemben a *Medicago* inhibitor Ca^{2+} -függő MsCPK3 kinázzal való foszforilációja fokozza a fehérje CDK gátló képességét, feltételezhetően így gátolva meg a sejtek sejtciklusban való előrehaladását. Csoportunk már korábban is feltételezte, hogy az állati PKC (fehérje kináz C) és a növényi Ca^{2+} -függő fehérje kinázok között jelentős hasonlóságok vannak. Az MsCPK3 CDK inhibitor foszforilációja, illetve ennek gátlást erősítő hatása szintén az állati és a növényi kinázok közötti funkcionális hasonlóságokra utal. Ahogy Black összefoglaló cikkében is olvasható, a PKC általi CDK inhibitor foszforiláció csökkenti a CDK aktivitást, és így módon a sejtciklus G1 fázisban történő blokkolódását okozza (Black 2000). Sajnálatos módon kísérleteink egyelőre nem bizonyítják egyértelműen, hogy a kalcium jelátvitelben szerepet játszó MsCPK3 valóban képes a sejtciklus megakasztására. Mindenesetre a CDKA;1 kinázzal közösnek tűnő foszforilációs hely ellenére sem valószínűtlen, hogy a KRP fehérje egyrésről a gátolt kináz által is szabályozott, de ez a gátlóképesség fokozódás stressz, illetve egyéb kalcium jelátviteli úthoz kapcsolódó hatások esetén tovább fokozódik és a sejtciklus leállításához vezet.

A KRPMt foszforilációját igen részletesen tanulmányoztuk, és a továbbiakban is kívánunk még ezzel a kérdéssel foglalkozni. Bizonyítottuk, hogy egy Ca^{2+} -függő fehérje kináz *in vitro* képes a KRPMt funkcióját jelentősen érintő foszforilálásra. A kísérleti eredményeink azt bizonyítják, hogy ez a 91-es szerinen történő foszforiláció, meglepő módon nem csak az MsCPK3, de a MedsaCDKA;1 kinázt használva is bekövetkezik. Azonban a CDKA általi inhibitor foszforiláció esetére nehéz teljesen tiszta kísérleti rendszert fölállítani, mivel, mint láttuk a KRP nem csak szubsztrát, de egy kölcsönható fehérje is, mely gátolja a CDK-t. Azt mindenképpen elmondhatjuk, hogy ha a KRPMt és a kinázkomplex előinkubálását ATP tartalmú reakciópufferben végezzük, akkor általában erősebb gátlást kapunk. Azt is megállapíthatjuk egy szinkronizált dohány BY2 sejtszuszpenzió végzett kísérlet eredményeiből, hogy a dohány CDKA kináz annál inkább gátolható, minél nagyobb a kiindulási aktivitása. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a CDKA képes aktiválni a saját inhibitor fehérjéjét. Ez a jelenség csöppet sem meglepő, különösen akkor nem, ha figyelembe vesszük az irodalmi áttekintésben a ciklin-függő kinázok foszforilációjánál leírt rendkívül bonyolult pozitív és negatív visszacsatolásokkal tarkított szabályozást. A leginkább valószínűsíthető szabályozás talán az, hogy a KRP normál esetben képes a CDK-k "finomhangolására", azonban stressz esetén ez a gátló képesség tovább erősítve képes a sejtek kináz aktivitását a sejtciklus megállásáig csökkenteni.

Az elkészített KRPMt mutánsok vizsgálata során sikerült bebizonyítanunk, hogy a 91. szerin minden kétséget kizáróan foszforilálható, mind az MsCPK3-mal, mind a MedsaCDKA;1/A;2 kinázokkal. A domináns pozitív mutációk esetében mind az aszparaginsav, mind a glutaminsav alkalmazása képes volt fokozni a KRPMt gátló képességét (ezek az aminosavak negatív töltésükkel és méretükkel a szerinen bekövetkező foszforilációt mimikálják), azonban az alanin-szerin csere esetén, melyet egy kevésbé aktív, nem foszforilálható mutánsnak gondolunk, is jelentősebb gátlást kaptunk, mint a vad típusú fehérjénél. Ezen eredmények, valamint a bakteriális fehérjetermeltetésből adódó bizonytalanságok miatt nem állíthatjuk minden kétséget kizáróan, hogy a 91. szerin foszforiláció szerepe kizárólag a fehérje aktiválása. Ismét megemlíteném, azt, hogy a csonka KRPMt, illetve a csonka *Arabidopsis* KRP-k is képesek a CDK gátlására, tehát azt biztosan kijelenthetjük, hogy a KRPMt poszt-transzlációs módosítás nélkül is képes gátolni a CDK aktivitást. További vizsgálatokat

igényel még az az egyelőre csak előkísérletként értékelhető eredményünk, hogy a MedsaCDKB1;1 nem foszforilálja sem a KRPMt(93-223), sem a KRPMt(88-223) rekombináns fehérjét. Ez arra utal, hogy Verkest és munkatársai által nemrégiben *Arabidopsis* KRP2 esetében leírt degradációt okozó foszforilációt feltételezzünk a KRPMt esetében is, mely azonban nem az A-típusú CDK, hanem B-típusú kinázok által szabályzott. Az eddigi kísérleteinket összefoglaló modellt mutatjuk be a 15. ábrán.



15. Ábra A lucerna sejtciklus vázlatos modellje

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

Aktiválás: $\rightarrow$ gátlás: $\dashv$ fokozott gátlás: $\dashv$

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során több alapvető sejtciklus gént izoláltunk lucernából elsőként, melyek közül jelen dolgozatban elsősorban a lucerna ciklin-függő kináz inhibitor, a KRPMt jellemzését mutattuk be. A disszertáció fent leírt eredményei a következő fontosabb újdonságokat tartalmazzák:

1. A KRPMt egy új növényi CDK inhibitor fehérje, mely a aminosav sorrend hasonlóság alapján nem sorolható be egyértelműen egyetlen eddig jellemzett *Arabidopsis* KRP ortológjaként sem. A legjelentősebb aminosav azonosságot (30%) a KRP4-gyel és KRP3-mal mutatja, megtalálható benne a korábban azonosított hat konzervált aminosav szakasz. Az *in silico* vizsgálatok alapján képesek voltunk egy hetedik konzervált motívumot is föltérképezni a 3. és 4. motívum között. A KRPMt sejtmagi lokalizációs szignált és a degradációért felelős PEST motívumot is tartalmaz.

2. A *KRPMt* gén kifejeződéséről megállapítottuk, hogy minden vizsgált lucerna szövetben, illetve sejtuszupenzióban kimutatható. A *KRP*-kről általánosságban is elmondható, hogy differenciálódott szövetekben a merisztematikus régiótól távolodva fokozott génkifejeződést mutatnak. A génkifejeződés jelentősen erősödik sóstressz, valamint a stressz válaszokban szerepet játszó hormon, az abszcizinsav hatására is.

3. Az inhibitor fehérjéről élesztő kettős-hibrid vizsgálattal bizonyítottuk, hogy képes kölcsönhatni a lucerna CDKA₁-gyel, illetve a D-típusú ciklinekkel. Az N-terminális 96 aminosavat nem tartalmazó fehérje jelentősen erősebb kölcsönhatója mind a CDKA-knak, mind a D-típusú ciklineknek, mint a teljes hosszúságú. Ezenkívül képes kölcsönhatásba lépni a mitotikus B-típusú ciklinekkel is. Pull-down kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a B-típusú CDK-k is együtt tisztíthatóak a rekombináns KRPMt-vel, feltehetően a ciklin D4, mint közös kölcsönható fehérjén keresztül. Ezekkel a tisztítási kísérletekkel először bizonyítottuk, hogy egy KRP képes kölcsönhatni B-típusú CDK-kal is.

4. A KRPMt különböző mértékben képes gátolni a lucerna ciklin-függő kináz komplexeket, valamint a sejtciklus különböző szakaszaiban lévő sejtekből tisztított kináz együttesekre is differenciáltan hat. A KRPMt gátlására legérzékenyebb CDK a

MedsaCDKB2;1. Elsőként bizonyítottuk be, hogy B-típusú CDK-t gátolhat KRP. A MedsaCDKB1;1-et és a mitotikus ciklinekkel (a MedsaCYCB-vel) nyerhető kináz frakciót a KRPMt nem gátolja. A MedsaCDKA kinázkomplexet, a p13^{Suc1}-kötött kinázokat, valamint az A-típusú ciklinekkel együttes kinázokat hasonló képpen gátolja az inhibitor fehérje. Megállapítottuk továbbá, hogy a KRPMt erősebb inhibitora a G2/M-fázisban lévő CDKA aktivitásnak, mint az S-fázisú sejtekből izoláltnak. A kinázok különböző szubsztrátainak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy nincs jelentős eltérés a gátlás erősségében akkor, ha hiszton H1 helyett lucerna retinoblasztóma homológ fehérjét használunk szubsztrátként. Ugyanakkor a humán p107 retinoblasztóma homológ fehérje foszforilációja a sejtciklus S és G2/M-fázisaiban is érzékenyebb volt a KRPMt-vel történő gátlásra, mint a hiszton H1.

5. A KRPMt foszforilálható, mind a növényi CDK-k, mind pedig a kalmodulin-szerű domén fehérje kináz, az MsCPK3 által. Foszfopeptid és foszfoaminosav térképezési kísérleteink alapján valószínűsíthető, hogy a CDKA és az MSCPK3 hasonló helyen és hasonló szereppel foszforilál. Ugyanakkor feltételezzük, hogy a CDKB1;1 foszforilációja más helyen következik be, és szerepe nem a fehérje aktivitásának növelése, hanem a proteoszómán keresztüli lebontás elindítása.

6. A kalmodulin-szerű domén fehérje kináz, az MsCPK3, okozta foszforilációról bizonyítottuk, hogy jelentősen növeli az inhibitor fehérje gátlóképességét, már a fehérje kis mértékű foszforilációja esetén, illetve kis mennyiségű inhibitor fehérje alkalmazása esetén is. Ez a jelenség felveti a KRP-k, Ca²⁺-függő jelátviteli utak és a sejtciklus szabályozás közötti összekötő szerepét.

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

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dudits Dénesnek és Horváth Gábornak a munkámban nyújtott sokféle segítségért. Bakó Lászlónak, Mészáros Tamásnak a biokémiai ismereteim bővítésében elengedhetetlen közreműködésért. Blastyák Andrásnak és Bihari Zoltánnak az általános, bio- és laborfilozófiai kérdések megvitatásáért. Miroslava Zhiponovának segítőkészségéért. Cserhádi Mátyásnak az angol nyelvvel kapcsolatos problémáim megoldásáért. Az egész Sejtciklus és Stresszadaptációs Csoport valamennyi tagjának munkájáért és a türelméért.

11. THESIS OF PH.D

11.1. Introduction and aims

We have long been fascinated by the beauty and intricacy of cell division. Only during the last two decades have the building blocks of a molecular system and the machinery that regulates the cell cycle been revealed. The central component of the molecular machinery for regulating the cell cycle is the cyclin-dependent kinase (CDK). The CDK itself is subject to multiple layers of control. Specific CDKs are activated by forming complexes with their cyclin (Cyc) partners, and are required at different phases of the cell cycle. In addition to cyclin binding, the activity of CDKs is also regulated by CDK inhibitors, the status of phosphorylation in CDKs and ubiquitin-mediated proteolysis of these proteins. It is now clear that plants use the same CDK-based machinery as animals and yeast to control the cell division cycle. Cell cycle regulators sharing sequence and functional similarities with the animal counterparts have been identified in plants. Despite the similarity at the fundamental level, plants have many obvious differences from animals in terms of the regulation of cell proliferation during growth and development.

In order to cope with their sessile life style, plants display developmental characteristics permitting a flexible response to environmental factors. Plant development is mainly postembryonic, and cell division is restricted to meristematic regions. Endoreduplication resulting from DNA replication without subsequent mitotic cell divisions is widespread in differentiated cells. Most plant cells are totipotent and are able to change their fate at any moment in response to external signals. Due to the rigid cell wall, cell migration does not play any role in development in contrast to the development of many animal tissues and organs.

In plants, cell cycle progression can respond to hormonal and stress factors such as auxins, abscisic acid and osmotic shock which are all known to induce Ca^{2+} -dependent signalling pathways. The role of the Ca^{2+} -status in the division of plant cells has been studied in a limited number of experimental systems. Among the Ca^{2+} -binding sensory proteins, the calcium-dependent protein kinases (CDPKs)

are of particular interest because these calmodulin like domain protein kinases (CPKs) play a role in the transmission of stress and hormonal signals.

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

Which are the interacting partners of the different alfalfa CDKs in yeast two-hybrid system?

1. Which of the known cell cycle components are able to interact with the newly identified proteins?
2. Which factors can influence the expression of the CDK inhibitor gene?
3. Is the KRPMt a potent inhibitor of the *Medicago* CDKs?
4. What are the functional consequences of the phosphorylation of the CDK inhibitor protein?
5. What can be the role of the Ca^{2+} -dependent kinases and the inhibitor protein in the crosstalk between the Ca^{2+} -dependent signal pathways and the control of the cell cycle?
6. On which amino acid residue is the KRPMt phosphorylated, and what does it cause?

11.2. Results and discussion

In this thesis I report the cloning of an alfalfa CDK inhibitor (*KRPMt*) cDNA that encodes an active inhibitor protein with a differential effect on various kinase complexes. Phosphorylation of the *KRPMt* protein by an alfalfa MsCPK3 recombinant kinase results in the increase of KRP function *in vitro*. This finding supports a hypothesis that modulation of CDK activities by inhibitor protein as a substrate of the Ca^{2+} -dependent kinase provides a molecular mechanism for crosstalk between Ca^{2+} -signalling and cell cycle control.

1. We used the yeast two-hybrid system to identify genes encoding proteins able to interact with the PSTAIRE-type Medsa;CDKA;1 alfalfa kinase. Among such clones we identified a cDNA clone that encoded an alfalfa protein with characteristic peptide motifs previously found in cyclin-dependent kinase inhibitors from *A. thaliana*. The conceptual translation of the longest open reading frame predicted a polypeptide of 224 amino acids with a molecular weight of 25.3 kDa. Based on similarities in structural organization of *KRPMt* to the *Arabidopsis* KRP protein family, and the 6 conserved motifs previously described, this alfalfa protein could be identified as the Kip-related protein of *Medicago truncatula* (*KRPMt*). Searching the GenBank database revealed that *KRPMt* shows the highest amino acid similarity (51%) and identity (36%) to the *Arabidopsis* protein KRP4. During the in-depth analysis of KRP and KRP-like sequences available in the public databases, we found an additional motif, which is present in the *Arabidopsis* KRP3 and KRP 4 as well as the rice KRP 1, KRP 3, *Lycopersicum* KRP 1, KRP 2 and Euphorbia KRP 4 sequences. This motif is unique to *KRP* genes and in the case of *Medicago* includes the following amino acids: RSARETTPVHLI.
2. The expression of the *Medicago* inhibitor gene was analysed in various plant organs and cell suspension cultures. This gene was active in all analysed tissues including cultured alfalfa cells where the gene expression showed a gradual increase during the ageing of the suspension culture. The *KRPMt* gene exhibited a characteristic response to ABA resulting in considerable transcript accumulation. Exposure of cell culture to 100 μM ABA resulted in an

8.6-fold increase in *KRPMt* transcript accumulation at 2 hours after hormone treatment. These high mRNA levels were detected in the treated cells after 1 or 2 days to the lower extent. The NaCl treatments also activated the *KRPMt* gene significantly. A 14.9-fold increase in transcript accumulation could be observed after moderate salt stress.

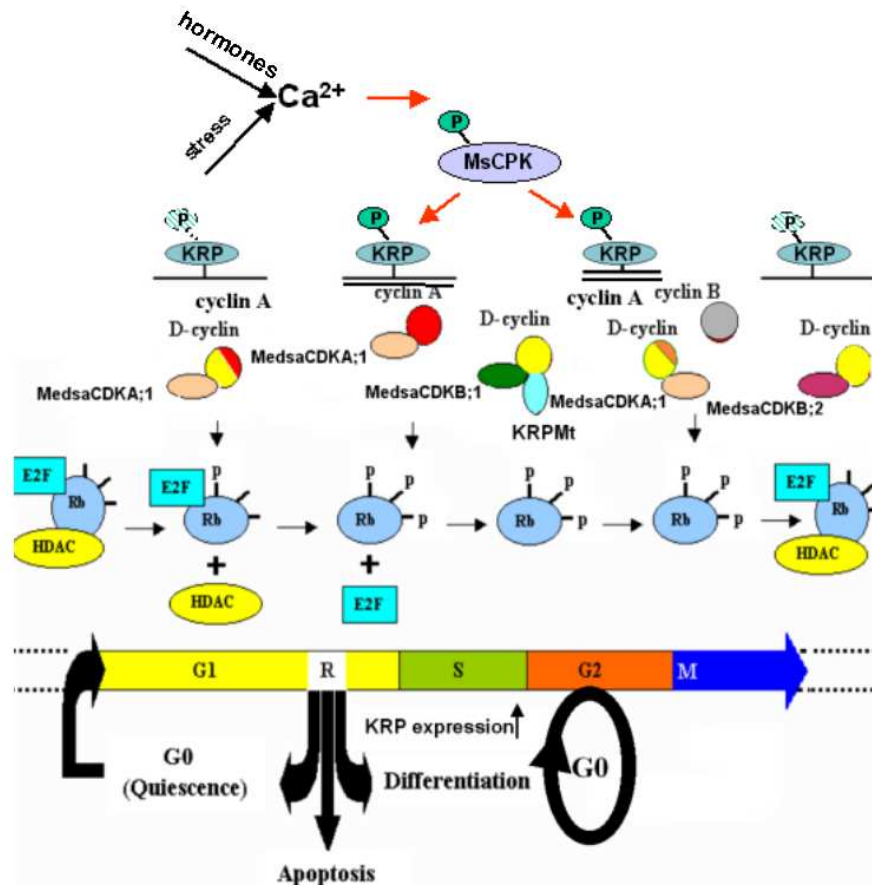
3. We tested the binding specificity of the alfalfa inhibitor with several *Medicago* CDKs and cyclins. The full length *KRPMt* protein was shown to interact with a variant of PSTAIRE kinases, namely Medsa;CDKA;1 and various D-type cyclins. The strongest interaction was detected between the inhibitor and the Medsa;CycD3 proteins. Interestingly, we found that the spectrum of interaction partners was significantly altered when the truncated inhibitor protein lacking the N-terminal region of 96 amino acids was analysed in the yeast two-hybrid system. This alteration of the *KRPMt* protein extended its capability to interact with additional partners such as the Medsa;CDKA;2 kinase and two mitotic cyclins (Medsa;CycB2;3 and Medsa;CycB2;2). As we knew previously, the Medsa;CycD4, which is a strong interacting partner with the *KRPMt* protein can interact with both alfalfa B-type CDKs. Therefore we checked with a pull-down assay whether the recombinant *KRPMt* can interact with the A and B type CDK complexes. Our results clearly show that the recombinant *KRPMt* is able to pull-down both type of CDKs, moreover the Medsa;CDKB2;1 which is the strongest interacting partner of the Medsa;CycD4 can be quantitatively purified with His₆-*KRPMt*.
4. We tested the response of specific kinase complexes immunoprecipitated from extracts of cultured alfalfa cells. The degree of inhibition of kinase activity in the p13^{suc1} fraction and complex of PSTAIRE kinase pair (Medsa;CDKA;1 /A1;2) was similar to the concentrations used with the recombinant *KRPMt* protein. It is an unexpected finding that the Medsa;CDKB1;1 complex was not inhibited, but even activated in some cases in the histone H1 kinase activity assay. The Medsa;CDKB2;1 mitotic kinase turned out to be the most sensitive target. In the presence of 50 pmol of inhibitor protein, only 10% of the histone H1 phosphorylation activity was retained. In addition to differences among the sensitivity of various CDK kinase complexes, the inhibitory function was

different in complexes that were isolated from S-phase or G2/M phase cells. Using histone H1 as a phosphorylation substrate, the kinase complex immunoprecipitated by anti-Medsa;CycA2 was significantly inhibited when the G2/M cells were analysed. This cyclin is known to interact with Medsa;CDKA;1. In contrast, the complex isolated from partially synchronized S phase cells failed to respond to the inhibitor protein *in vitro*. In the case of the Medsa;CDKA;1/A;2 complex, the G2/M phase extracts were also found to be more sensitive; however, 24% inhibition could be seen in the protein fraction immunoprecipitated from S-phase cells. Since the retinoblastoma-related proteins (RBRs) are primary targets for CDKs, we tested the phosphorylation of the recombinant MsRBR in the presence of the KRPMt protein. The alfalfa RBR protein can be phosphorylated by this kinase and there was no difference in inhibitory function of KRPMt when histone H1 or MsRBR C-terminal protein fragment were used as a substrate in the Medsa;CDKA;1/A;2 kinase reaction *in vitro*. These studies demonstrate the differential influence of KRPMt protein on activities of various CDKs, emphasizing a multiple role of the inhibitor protein with functional selectivity towards the cell cycle regulatory complexes.

5. The calmodulin-like domain protein kinase (MsCPK3) phosphorylates the full length recombinant KRPMt protein. After 1 hour kinase reaction approximately 0.2% of the total recombinant protein was phosphorylated by the CPK protein. The ATP and Ca^{2+} -dependent phosphorylation of KRPMt inhibitor significantly reduced the histone H1 phosphorylation function of the immunoprecipitated Medsa;CDKA;1/A;2 complex. Comparison of the effectiveness between the non-phosphorylated and phosphorylated KRPMt indicated an essential increase in inhibitory function as the result of this protein modification. The non-phosphorylated recombinant protein was also found to be active in these assays. The increased inhibitory effect of the phosphorylated KRPMt can be observed in small concentrations of the post-translationally modified protein. A relatively small proportion of the phosphorylated protein was able to reach maximum inhibition.

6. Phosphopeptide mapping of the KRPMt protein by 2D separation on a thin-layer cellulose plate was performed and the isolated peptides were subsequently hydrolysed. From these experiments we were able to conclude that MsCPK3 and MedsaCDKA;1 phosphorylates the KRPMt protein on one or more N-terminal serines. Phosphorylation by both types of CDK proteins occurs, despite the fact that *in silico* predictions were not able to find any CDK phosphorylation site motifs. However, the phosphorylation of CDKB1;1 is likely to be a possible degradation signal.
7. We were able to prove that the 91st serine residue of KRPMt is phosphorylated. The MsCPK3 kinase was able to phosphorylate the full length KRPMt and the inhibitor protein fragment which contains amino acids 88-223. The KRPMt fragment which lacks the first 96 amino acids was not a potent substrate of the calmodulin-like domain protein kinase. We produced the site directed mutant variants of the 91st serine (alanine, aspartate, glutamate). Whith these mutants we assume that the phosphorylation of this serine residue plays an inportant role in the activation of the KRPMt protein; however, the unphosphorylated form is also active.

We propose a hypothetical model based on results of interaction studies between different *Medicago* CDKs, cyclins and KRP in yeast two-hybrid and pull-down assays, as well as *in vitro* phosphorylation and inhibitor studies.



The cell cycle model of alfalfa. Different kinases and cyclins are expressed and interact in different phases of the cell cycle. Although the D-type cyclins can associate with the KRPMt inhibitor, the activity of Medsa;CDKB1;1, which is also able to interact with Medtr;CycD4, is not reduced in the presence of the KRPMt protein. In contrast, both the Medsa;CDKA;1/A;2 and the Medsa;CDKB2;1 kinase complexes are strongly inhibited by KRPMt. As a consequence, phosphorylation of the alfalfa RBR protein can also be affected by the inhibitor. According to our model, Ca²⁺-dependent protein kinase (MsCPK3) and the CDK inhibitor (KRPMt) could link Ca²⁺-signalling and cell cycle control in plants. This scheme illustrates the role of CDK inhibitors and calmodulin-like domain protein kinases in crosstalk between Ca²⁺ signalling and regulation of cell cycle progression in plants. Symbols: activation; $\rightarrow$ inhibition; $\dashv$ enhanced inhibition. $\equiv$

12. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Andrews B. and Measday V.** (1998) The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* **14**, 66-72.
- Ayaydin F, Vissi E, Mészáros T, Miskolczi P, Kovács I, Fehér A, Dombrádi V, Erdődi F, Gergely P, Dudits D.** (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**, 85-96.
- Barroco RM, De Veylder L, Magyar Z, Engler G, Inze D, Mironov V.** (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**, 401-12.
- Black JD.** (2000) Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci.* **5**, 406-423.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S.** (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence *Proteomics.* **6**, 1633-49.
- Booher R. N., Alfa C. E., Hymans J. S. and Beach D. H.** (1989) The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* **58**, 485-97.
- Boniotti MB, Gutierrez C.** (2001) A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J.* **28**, 341-350.
- Boyle,W.J., Van Der Geer,P. and Hunter,T (1991) *Methods in Enzymology* 201, 110-133.
- Bourne Y., Watson M. H., Hickey M. J., Holmes W. and Rocque W.** (1996) Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* **84**, 863-74.
- Bögre L, Oláh Z, Dudits D.** (1988) Ca²⁺-dependent protein kinase from alfalfa (*Medicago varia*): partial purification and autophosphorylation. *Plant Science*, **58**, 135-144.
- Bögre L., Zwerger K., Meskiene I., Binarova P., Csizmadia V., Planck C., Wagner E., Hirt H. and Heberle-Bors E. (1997) The cdc2Ms kinase is differently regulated in the cytoplasm and the nucleus. *Plant Physiol.* **113**, 841-52
- Brizuela L., Draetta G. and Beach D.,** (1987)p13suc1 acts in fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 kinase. *EMBO J.* **6**, 3507-14.
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J.** (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* **129**, 469-485.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK.** (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot.* **55**(395), 225-236.
- Church GM, Gilbert W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**,1991-5.
- Cleary, A.L., Fowke, I.C., Wang, H. and John, P.C.L.** (2002) The effect of ICK1, a plant cyclin-dependent kinase inhibitor, on mitosis in living plant cells. *Plant Cell Rep* **20**, 814-820.

- Corpet F.**, (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 10881-10890.
- Cross F. R.** (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, Starting the cell cycle: What's the point? 790-797.
- Cross FR, Levine K.** (1998) Molecular evolution allows bypass of the requirement for activation loop phosphorylation of the Cdc28 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol.* **5**, 2923-31.
- Dahl M., Meskiene I., Bögre L., Cam D. T. H., Swoboda I., Hubmann R., Hirt H. and Heberle-Bors E.** (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**, 1847-57.
- Davletova S, Mészáros T, Miskolczi P, Oberschall A, Török K, Magyar Z, Dudits D, Deák M.** (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**, 215-221.
- Denicourt C, Dowdy SF.** (2004) Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev.* **2004** **18**, 851-5.
- De Veylder L., Segers G., Glab N., Casteels P., Van Montagu M. and Inzé D.** (1997) The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Let.* **412**, 446-52
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, van der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inzé D. (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1653-68.
- De Veylder L, Joubes J, Inzé D.** (2003) Plant cell cycle transitions. *Curr Opin Plant Biol.* **6**, 536-543.
- Dewitte W, Murray JA.** (2003) The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol.* **54**, 235-264.
- Draetta G. and Eckstein J.** (1997) Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Bioch. Biophys. Acta* **1332**, 53-63.
- Dudits D, Magyar Z, Deák M, Mészáros T, Miskolczi P, Fehér A, Brown S, Kondorosi É, Athanasiadis A, Pongor S, Bakó L, Koncz C, Györgyey J. (1998) Cyclin-dependent and calcium-dependent kinase families: response of cell division cycle to hormone and stress signals. In: Francis D, Dudits D, Inzé D, eds. 1998 *Plant cell division: molecular and developmental control*. London: Portland Press, 21–46.
- Dunphy W. G., Brizuela L., Beach D. and Newport J.** (1988) The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* **54**, 423-31.
- Evans T., Rosenthal E.T., Youngbloom J., Diestel D. and Hunt T.** (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-96
- Farmer PK, Choi JH.** (1999) Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota* L.). *Biochim Biophys Acta.* **1434**, 6-17.
- Felsenstein J.** (1997) An alternating least squares approach to inferring phylogenies from pairwise distances. *Syst Biol.* **46**, 101-111.

- Fülöp K, Pettkó-Szandtner A, Magyar Z, Miskolczi P, Kondorosi É, Dudits D, Bakó L.** (2005) The Medicago CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J.* **42**, 810-820.
- Galbraith DW.** (1990) Flow cytometric analysis of plant genomes. *Methods Cell Biol.* **33**, 549-62.
- Gautier J., Norbury C., Lohka M., Nurse P. and Maller J.** (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* **54**, 433-39.
- Genschik P., Criqui M. C., Parmentier Y., Derevier A. and Fleck J.** (1998) Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* **10**, 2063-75
- Gietz, R.D. and R.A Woods** (1998) Transformation of yeast by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/PEG method. *Methods in Microbiology* **26**.
- Grafi G, Larkins BA.** (1995) Activity of single-stranded DNA endonucleases in mung bean is associated with cell division. *Plant Mol Biol.* **4**, 703-10.
- Györgyey J, Vaubert D, Jimenez-Zurdo JI, Charon C, Troussard L, Kondorosi A, Kondorosi É.** (2000) Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**, 62-71.
- Hadwiger J. A., Wittenberg C., Mendenhall M. D. and Reed S. I.** (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2034-41.
- Hartwel L., Culotti J., Pringle J. R. and Reid B. J.** (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* **183**, 46-51.
- Hayles J., Beach D., Durkacz B. and Nurse P.** (1986) The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 291-293.
- Hepler PK, Callahan DA.** (1987) Free calcium increases during anaphase in stamen hair cells of *Tradescantia*. *J Cell Biol.* **105**, 2137-43.
- Hemerley A. S., Ferreira P., de Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G. and Inzé D.** (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**, 1711-23.
- Hirt H., Páy A., Györgyey J., Bakó L., Németh K., Bögre L., Schweyen R. J., Heberle-Bors E. and Dudits D.** (1991) Complementation of yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1636-40
- Hirt H, Mink M, Pfosser M, Bögre L, Györgyey J, Jonak C, Gartner A, Dudits D, Heberle-Bors E.** (1992) Alfalfa cyclins: differential expression during the cell cycle and in plant organs. *Plant Cell*, **4**, 1531-8.
- Horváth GV, Pettkó-Szandtner A, Nikovics K, Bilgin M, Boulton M, Davies JW, Gutierrez C, Dudits D.** (1998) Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis. *Plant Mol Biol.* **38**, 699-712.
- Howard A. and Pelc S. R.,** (1951) Synthesis of nucleoproteins in bean root cells. *Nature* **167**, 599-600

- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC. (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* **132**, 666-680.
- Hunt T.** (1991) Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell Biol.* **2**, 213-22
- Inzé D.** (2005) Green light for the cell cycle *EMBO J.* **24**, 657-662.
- James P, Halladay J, Craig EA.** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-36.
- Jasinski S, Perennes C, Bergounioux C, Glab N.** (2002a) Comparative molecular and functional analyses of the tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor NtKIS1a and its spliced variant NtKIS1b. *Plant Physiol.* **130**, 1871-82.
- Jasinski S, Riou-Khamlichi C, Roche O, Perennes C, Bergounioux C, Glab N.** (2002b) The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants. *J Cell Sci.* **1**, 973-82.
- Jelinek,T. and Weber,M.J.**(1993) *BioTechniques* **15**, 629-630.
- John P. C. L., Sek F. J.and Lee M. G.** (1989) A homolog of the cell cycle control protein p34cdc2 participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* **1**, 1185-1193
- John PC, Mews M, Moore R.** (2001) Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma.*;**216**, 119-42.
- Johnson R. T. and Rao P. N.** (1971) Nucleocytoplasmic interactions in the achievement of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **46**, 97-155
- Joubès, J., Chevalier, C., Dudits, D., Herberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M. and Renaudin, J.-P.** (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* **43**, 607-620.
- Kaldis P.** (1999) The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 284-96.
- Kaldis P, Russo AA, Chou HS, Pavletich NP, Solomon MJ.** (1998) Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell.* **9**, 2545-60.
- Kahl CR, Means AR.** (2003) Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev.* **6**, 719-36.
- Kobayashi H., Stewart E., Poon R., Admczewski P. J., Gannon J. and Hunt T.** (1992) Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits.*Mol. Biol. Cell* **3**, 1279-94.
- Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E.** (2000) Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol.* **6**, 488-92.
- Landrieu I, da Costa M, De Veylder L, Dewitte F, Vandepoele K, Hassan S, Wieruszeski JM, Corellou F, Faure JD, Van Montagu M, Inze D, Lippens G. (2004) A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 13380-5.

- Lee M. G. and Nurse P.** (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* **327**, 31-35.
- Levi M., Brusa P., Chiatante D. and Sparvoli E.** (1993) Cell cycle reactivation in cultured pea embryo axes, effect of abscisic acid. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29**, 47-50.
- Lew D. J. and Kornbluth S.** (1996) Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 795-804
- Lino B, Baizabal-Aguirre VM, Gonzalez de la Vara LE.** (1998) The plasma-membrane H(+)-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta*, **204**, 352-359.
- Liu F., Stanton J. J., Wu Z. and Piwnicka-Worms H.** (1997) The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell Biol.* **17**, 571-583
- Livak KJ, Schmittgen TD.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**(4), 402-408.
- Lohka M. J., Hayes M. K. and Maller J. L** (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 3009-13
- Lui H, Wang H, Delong C, Fowke LC, Crosby WL, Fobert PR.** (2000) The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant J.* **21**, 379-385.
- M.O. Dayhoff, R.M. Schwartz and B.C. Orcutt,** (1979) *Atlas of Protein and Sequence Structure* , Ed M.O. Dayhoff, National Biomedical Research Foundation Washington D.C.
- Magyar, Z., Bakó, L., Bögre, L., Dedeoglu, D., Kapros, T., and Dudits, D.** (1993). Active *cdc2* genes and cell cycle phase-specific *cdc2*-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J.* **4**, 151-161.
- Magyar Z, Mészáros T, Miskolczi P, Deák M, Fehér A, Brown S, Kondorosi É, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bakó L, Koncz C, Dudits D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*, **9**, 223-235.
- Masui Y. and Markert C.** (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**, 129-45
- Means AR.** (1994) Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. *FEBS Lett.* **347**, 1-4.
- Menges M, de Jager SM, GUISSEM W, Murray JA.** (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**, 546-66.
- Meskiene I., Bögre L., Dahl M., Pirck M., Cam D. T. H., Swoboda I, Heberle-Bors E., Ammerer G. and Hirt H.** (1995) *cycMs3*, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G0-to-G1 transition of the cell cycle. *Plant Cell* **7**, 759-71.
- Mészáros T, Miskolczi P, Ayaydin F, Pettkó-Szandtner A, Peres A, Magyar Z, Horváth GV, Bakó L, Fehér A, Dudits D.** (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol Biol.* **43**, 595-605.

- Miskolczi P., Pettkó-Szandtner A., Horváth G.V., Dudits D., Fehér A., Györgyey J.** (2000) A novel plant cyclin /Medicago cyclin D patent; EP 00870133.6 (16 June) PCT/EP01/06771
- Moreno S, Labib K, Correa J, Nurse P.** (1994) Regulation of the cell cycle timing of Start in fission yeast by the rum1+ gene. *Cell Sci Suppl.*, **18**, 63-8.
- Morgan D. O.** (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261-91
- Nasmyth K.** (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* **12**, 405-12
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A.** (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**, 1847-57.
- Nigg E. A.** (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* **17**, 471-80
- Notredame C., Higgins D., Heringa J.** (2000)T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology*, Vol **302**, 205-217.
- Nugroho TT, Mendenhall MD.** (1994) An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells *Mol Cell Biol.* **14**, 3320-8.
- Nurse P. and Thuriaux P.** (1980) Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **96**, 627-37.
- Nurse P. and Bisset Y.** (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292**, 558-60.
- Ormenese S, de Almeida Engler J, De Groodt R, De Veylder L, Inze D** (2004) Jacquemard A. Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot (Lond).* **5**, 575-80.
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A.** (2002) The Role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* 2002 **129**, 1807-19.
- Patel R, Holt M, Philipova R, Moss S, Schulman H, Hidaka H, Whitaker M.** (1999) Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells. *J Biol Chem.* **274**, 7958-68.
- Patra D. and Dunphy W. G.** (1996) Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev.* **10**, 1503-15.
- Pavletich NP** (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* **287**, 821-8.
- Peters J. M.** (1998) SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 759-768.
- Poon R. Y. C. and Hunter T.** (1995) Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* **270**, 90-93.
- Rao P. N. and Johnson R. T.** (1971) Mammalian cell fusion: studies on the DNA synthesis and mitosis. *Nature* **225**, 159-64

- Reed S. I., Hadwigwer J. A. and Lörincz A. T.** (1985) Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell cycle gene CDC28. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4055-4059
- Renaudin J. P., Doonan J. H., Freeman D., Hashimoto J., Hirt H., Inzé D., Jacobs T., Kouchi H., Rouzé P., Sauter M., Savouré A, D. Sorrell A., Sundaresan V. and Murray J. A. H.** (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1003-18.
- Richardson H. E., Stueland C. S., Thomas J., Russell P. and Reed S. I.** (1990) Human cDNAs encoding the homologs of the small p34 cdc2/cdc28-associated proteins of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schyzosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* **4**, 1332-1344.
- Roudier F, Fedorova E, Györgyey J, Fehér A, Brown S, Kondorosi A, Kondorosi E.** (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**, 73-83.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W. M., Hobbie L., Turner J. and Estelle M.** (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev.* **12**, 198-207.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J., Pavletich, N.P.** (1996) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclinA-CDK2 complex . *Nature*, **382**, 325 331.
- Santella L, Kyozyuka K, De Riso L, Carafoli E.** (1998) Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium* **23**, 123-130.
- Sauter M.** (1997) Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and cdc2 genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant J.* **11**, 181-90.
- Savoure A, Fehér A, Kalo P, Petrovics G, Csanadi G, Szecsi J, Kiss G, Brown S, Kondorosi A, Kondorosi É.** (1995) Isolation of a full-length mitotic cyclin cDNA clone CyclIIIMs from *Medicago sativa*: chromosomal mapping and expression. *Plant Mol Biol.* **27**, 1059-70.
- Schiestl RH, Gietz RD.** (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet.* **16**, 339-346.
- Schnittger A, Weinl C, Bouyer D, Schobinger U, Hulskamp M.** (2003) Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1 in single-celled *Arabidopsis* trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell*, **15**, 303-315.
- Segers G., Gadisseur I, Bergounioux C., Engler J. de Almeida, Jacqmard A., Van Montagu M and Inzé D.** (1997) *Plant Cell Proliferation and Its Regulation in Growth and Development*, J. A. Bryant and D. Chiatante, eds 1-19
- Sherr C. J.** (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**, 1059-65.
- Sherr C. J.** (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-77
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M.** (1999) CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501–1512.

- Shimotohno A, Umeda-Hara C, Bisova K, Uchimiya H, Umeda M.** (2004) The plant-specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation of cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis. *Plant Cell*. **11**, 2954-66.
- Soni R., Carmichael J. P., Shah Z. H. and Murray J. A. H.** (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**, 85-103.
- Sorrell D. A., Combettes B., Chaubet-Gigot N., Gigot C. and Murray J. A. H.** (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol* **119**, 343-51
- Sorrell, D. A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, J. R., Rogers, H. J. & Francis, D. (2002) *Planta* **215**, 518-522.
- Stern B. and Nurse P.** (1996) A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* **12**, 345-50.
- Sudakin V., Shteinberg M., Ganoth D., Hershko J., Hershko A.** (1997) Binding of activated cyclosome to p13(suc1). Use for affinity purification. *J. Biol. Chem.* **272**, 18051-18059.
- Sun Y., Dilkes B. P., Zhang C., Dante R. A., Carneiro N. P, Lowe K. S., Jung R., Gordon-Kamm W.J. and Larkins B. A.** (1999) Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4180-85.
- Takuwa N, Zhou W, Takuwa Y.** (1995) Calcium, calmodulin and cell cycle progression. *Cell Signal*. **7**, 93-104.
- Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW** (2000) Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci.* **5**, 121-37.
- Traas J, Hulskamp M, Gendreau E, Hofte H** (1998) Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr Opin Plant Biol.* **6**, 498-503.
- Trehin C., Glab N., Perennes C., Planchais S. and Bergounioux C.** (1998) M phase-specific activation of the *Nicotiana sylvestris* Cyclin B1 promoter involves multiple regulatory elements. *Plant J.* **17**, 263-73.
- Umeda M., Bhale Rao R. P., Schell J., Uchimiya H. and Koncz Cs.** (1998) A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 5021-26.
- Verkest A, Manes CL, Vercruysse S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inzé D, De Veylder L.** (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**, 1723-36. (Epub 2005 Apr 29.)
- Wang H, Fowke LC, Crosby WL.** (1997) A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature*, **386**, 451-452.
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC.** (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**, 501-510.

- Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Cleary A, John P, Whitwill S, Fowke LC** (2003) Modifying plant growth and development using the CDK inhibitor ICK1. *Cell Biol Int.* **27**, 297-9.
- Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC.**(2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* **24**, 613-623.
- Weinl C, Marquardt S, Kuijt SJ, Nowack MK, Jakoby MJ, Hulskamp M, Schnittger A.** (2005) Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell.* **6**, 1704-22.
- Welch P. J. and Wang J. Y. J.** (1992) Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3093-97.
- Whitaker M, Larman MG.** (2001) Calcium and mitosis. *Semin Cell Dev Biol.* **12**, 53-8.
- Wittenberg C. and Reed S. I.** (1988) Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex. *Cell* **54**, 1061-72.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK.**(2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, **14** Suppl, S165-83.
- Yamaguchi M., Umeda M. and Uchimiya H.** (1998) A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II *Plant J.* **16**, 613-19.
- Zheng W.-F. and Ruderman J. V.** (1993) Functional analysis of the P box, a domain in cyclin B required for the activation of Cdc25. *Cell* **75**, 155-64.
- Zhiponova M. K., Pettkó-Szandtner A., Stelkovics É., Neer Z., Bottka S., Krenács T., Fehér A., Dudits D. and Szilák L.** (2006) Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (Medsa;CDKB2;1) is activated by wounding, and ethylene, in a non-cell division dependent manner *Plant Physiology* (in press)
- Zhou Y, Wang H, Gilmer S, Whitwill S, Keller W, Fowke LC.** (2002) Control of petal and pollen development by the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 in transgenic Brassica plants. *Planta*, **216**, 604-613.
- Zhou Y, Wang H, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC.** (2003) Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. **216**, 604-13.

