

Doktori értekezés tézisei

**A sejtek osztódásának aktiválásában és szabályozásában
szerepet játszó fehérjék lucernában**

Írta: Miskolczi Pál

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

Növénybiológiai Intézet
MTA, Szegedi Biológiai Központ

Szegedi Tudományegyetem
Biológiai Doktori Iskola

Szeged
2007

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

Csoportunk az utóbbi két évtizedben több sejtciklus szabályozásában fontos szereppel rendelkező gént izolált lucernából és rizsből (CDK-k, ciklinek, CDK inhibitor, RB-homológok és E2F gének), melyek további jellemzésével hozzájárult a növényi sejtciklus szabályozásának mélyrehatóbb feltárásához. A csoportunk kutatómunkájába a lucerna sejtosztódás szabályozásában szerepet játszó fehérjék vizsgálatába kapcsolódtam be. Dolgozatomban az irodalmi áttekintés után, a lucerna D-típusú ciklinekkel és CDK-komplexekkel kapcsolatos kísérleteinket, majd a G1/S fázis átmenetben legfontosabbnak ismert szubsztrát fehérjéjűkre, a retinoblasztóma-homológra koncentrált eredményeinket mutatom be. Vizsgálatainkban, mint kísérleti objektumot elsősorban az A2 sejtuszpenziót (*Medicago sativa* ssp. *varia* A2) használtuk. Hasonlóan az A2 szuszpenziót alkalmaztuk, a kettős blokkolt szinkronizációs kísérleteinkben, a G2/M fázisátmenetben szereplő CDK-ciklin komplexek és a lucerna CDKB2;1 kináz mitotikus funkciójának pontosabb megismeréséhez. Beszámolok még az auxin és citokinin hormonoknak a CDK-ciklin komplexek reaktivációjában szerepet játszó, a G1/S és G2/M fázisátmenetre gyakorolt hatásairól, melyeket a lucerna levélprotoplaszt unicelluláris rendszerében vizsgáltunk.

Kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

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

KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növények és sejt kultúrák

- *Medicago sativa* L. ssp. *varia*; A2 genotípusú, és az ugyanezen genotípusból származó folyadék sejtuszpenziós kultúra.
- *Medicago truncatula* cv. R 108 sejtuszpenzió

Általános rekombináns DNS technikák

- Plazmid tisztítás, PCR, klónozás

Fehérje analízis technikák

- Növényi teljes sejtfehérje kivonat készítése
- SDS poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE)
- Immunoblot
- Kapcsolt *in vitro* transzkripció és transzlációs rendszer (TnT)
- Immunoprecipitálás
- CDK kináz aktivitás meghatározása
- Bakteriálisan túltermeltetett fehérjék tisztítása
- Poliklonális ellenanyag termeltetés és affinitás tisztítása
- Élesztő kettős hibrid kölcsönhatás vizsgálat
- p13suc1 kötés

Sejtbiológiai módszerek

- Lucerna A2 szuszpenziós sejtek szinkronizálása
- Lucerna levélprotoplaszt izolálása
- Immunolokalizáció
- Az S fázis arányának megállapítása BrdU sejtmagi DNS-be történő beépülésével
- Áramlásos citometria
- Mitotikus index meghatározás

Számítógépes szekvencia analízisek

EREDMÉNYEK

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Publikációs lista:

(* Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

Lendvai, Á., A. Pettkó-Szandtner, É. Csordás-Tóth, **P. Miskolczi**, G.V. Horváth, J. Györgyey, and D. Dudits, (2007) Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot*, **58**(7): p. 1663-1675.

*Dudits, D., M. Cserháti, **P. Miskolczi**, and G.V. Horváth, (2007) The growing family of plant cyclin-dependant kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation, in *Cell Cycle Control and Plant Development*, D. Inzé, Editor., Blackwell Publishing: Oxford UK ISBN: 9781405150439: Oxford. p. 1-30.

***Miskolczi, P.**, Á. Lendvai, A. Pettkó-Szandtner, G.V. Horváth, and D. Dudits, (2007) Conserved functions of retinoblastoma proteins: from purple retina to green plant cells. *Plant Science*, **172**: p. 671–683.

Pettkó-Szandtner, A., T. Mészáros, G.V. Horvath, L. Bakó, E. Csordás-Tóth, A. Blastyak, M. Zhiponova, **P. Miskolczi**, and D. Dudits, (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J*, **46**(1): p. 111-23.

Fülöp, K., A. Pettko-Szandtner, Z. Magyar, **P. Miskolczi**, E. Kondorosi, D. Dudits, and L. Bakó, (2005) The Medicago CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J*, **42**(6): p. 810-20.

Ötvös, K., T.P. Pasternak, **P. Miskolczi**, M. Domoki, D. Dorjgotov, A. Szűcs, S. Bottka, D. Dudits, and A. Fehér, (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J*, **43**(6): p. 849-60.

Espinosa-Ruiz, A., S. Saxena, J. Schmidt, E. Mellerowicz, **P. Miskolczi**, L. Bakó, and R.P. Bhalerao, (2004) Differential stage-specific regulation of cyclin-dependent kinases during cambial dormancy in hybrid aspen. *Plant J*, **38**(4): p. 603-15.

Fehér, A., T. Pasternak, K. Ötvös, **P. Miskolczi**, and D. Dudits, (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia*, **57**: p. 5-12.

Pasternak, T., E. Prinsen, F. Ayaydin, **P. Miskolczi**, G. Potters, H. Asard, H.A. Van Onckelen, D. Dudits, and A. Fehér, (2002) The Role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol*, **129**(4): p. 1807-19.

Fehér A., T. Pasternak, **P. Miskolczi**, F. Ayaydin, D. Dudits, (2001) Induction of the embryogenic pathway in somatic plant cells. *Acta Horti*, **560**: p. 293-298.

Davletova, S., T. Mészáros, **P. Miskolczi**, A. Oberschall, K. Török, Z. Magyar, D. Dudits, and M. Deák, (2001) Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *J Exp Bot*, **52**(355): p. 215-21.

***Miskolczi, P.**, A. Pettkó-Szandtner, G.V. Horváth, D. Dudits, A. Fehér, and J. Györgyey, (2000) A novel plant cyclin /Medicago cyclin D. Patent EP 00870133.6 (16 jun 2000) PCT/EP01/06771

Ayaydin, F., E. Vissi, T. Mészáros, **P. Miskolczi**, I. Kovács, A. Fehér, V. Dombradi, F. Erdödi, P. Gergely, and D. Dudits, (2000) Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant J*, **23**(1): p. 85-96.

*Mészáros, T., **P. Miskolczi**, F. Ayaydin, A. Pettkó-Szandtner, A. Peres, Z. Magyar, G.V. Horváth, L. Bakó, A. Fehér, and D. Dudits, (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol Biol*, **43**(5-6): p. 595-605.

*Pasternak, T.P., **P. Miskolczi**, F. Ayaydin, T. Mészáros, D. Dudits, and A. Fehér, (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regulation*, **32**: p. 129-141.

Fehér, A., T. Pasternak, F. Ayaydin, T. Mészáros, and **P. Miskolczi**, Zs. Kelemen, L. Bögre, F. Laureys, H. Van Onckelen, and D. Dudits, (1999) Hormones and stress in the induction and regulation of cell division in cultured alfalfa cells. *Biologia Plantarum*, **42**: p. 63.

Dudits, D., Z. Magyar, M. Deák, T. Mészáros, **P. Miskolczi**, A. Fehér, S. Brown, E. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, L. Bakó, C. Koncz, and J. Györgyey, (1998) Cyclin-dependent and calcium-dependent kinase families: response of cell division cycle to hormone and stress signals. *PLANT CELL DIVISION: MOLECULAR AND DEVELOPMENTAL CONTROL*, ed. D. Dudits and D. Inzé. London: Portland Press. 21-46.

Magyar, Z., T. Mészáros, **P. Miskolczi**, M. Deák, A. Fehér, S. Brown, E. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, M. Bilgin, L. Bakó, C. Koncz, and D. Dudits, (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*, **9**(2): p. 223-35.