

Záró jelentés

A sejtsztódás az élőlények legjellemzőbb tulajdonsága. Az eukariótákban a DNS megkettőződését (S fázist) és a sejtsztódást (M fázist) a G1 és G2 fázisok választják el egymástól, sorrendben G1-S-G2-M. A sejtciklus szabályozásban a ciklin függő kinázok (CDK-k) komplexet alkotva a megfelelő ciklinekkel meghatározó szerepet töltenek be a G1-S és a G2-M fázis-átmenetekben, a megfelelő fehérjék foszforilezésével biztosítják a sejtciklus eseményeinek szabályozott, periódikus lezajlását [1]. Általában az A típusú ciklin függő kinázok (CDKA) állandóan termelődnek a ciklus folyamán, működésüket a ciklus-specifikusan megjelenő ciklinek szabályozzák. Azonban növényekben léteznek sejtciklus-specifikusan termelődő CDK-k. A G2/M fázisban expresszáldó ciklin függő kinázokat az újabb nevezéktan szerint B típusú CDK-nak hívják.

A sejtciklus-specifikus gének transzkripciójának szabályozása még alig ismert. Eddig alaposan csak a hiszton, és a ciklin promotereket tanulmányozták [2, 3, 4], azonban hiányzik egy mitózisban aktív promoter jellemzése. Az eddig közölt B típusú ciklin promoterek csak gyenge transzkripciót biztosítottak [2,4]. 1997-ben közölték le a lucerna CDKB kinázok (előző néven: *Cdc2MsD* és *F*) cDNS szekvenciáit [5]. Mivel az előzetes megfigyelések szerint a *Medsa;CDKB2;1* kináz (*Cdc2MsF*) később expresszáldik, mint a *Medsa;CDKB1* (*Cdc2MsD*), ezért ezt választottuk modellül.

A transzkripció szabályzásnak két lehetséges mechanizmusa van, az egyik esetben egy aktivátor transzkripció faktor(ok) megjelenése szükséges a transzkripció elkezdéséhez, mint pl. E2F-DP [6]. Az E2F transzkripció faktorokkal szabályozott gének általában G1/S1 fázisban expresszáldnak, újabban azonban bebizonyosodott, hogy szerepük lehet a kései G2/M szakaszban történő szabályzásban is [7, 8].

A másik szabályzási mechanizmus szerint egy represszor gátolja meg a transzkripciót [4], mint pl. a human *Cdc2*, *Cdc25* esetében, ahol a represszor eltávolítása a ciklus függő. A két szabályzási mechanizmus tökéletes komplementere egymásnak. Az első esetben egy szabályozó elem megjelenése szükséges a transzkripció elindításához, a másik esetben egy konstitutív represszor eltávolítása kell a gén átírásához.

A növényi, M fázisos B típusú ciklin szabályzásánál leírtak egy 9 bázisos transzkripció faktor kötőhelyet, amit egy MSA-nak elnevezett transzkripció faktor ismer fel. Ez a hely általánosan előfordul a G2/M-ben szabályozódó ciklineknél [2] és egy Myb családba tartozó elemmel azonosították a transzkripció faktort.

1. *Medsa;CDKB2;1* kináz promoter klónozása.

Első lépésként polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával izoláltuk a *CDKB2;1* promoter régióját. A *Medicago sativa* A2 genomiális DNS-ét megemésztjük különböző enzimek kombinációjával: *Bam*HI-*Xho*I, *Bam*HI-*Xba*I, úgy, hogy az átlagos fragmenthosszúság kb. 3000 bázis legyen, majd hozzá ligálunk egy *Bam*HI ragadós (sticky) véget tartalmazó adaptert (1.ábra). A gén cDNS-ének ismeretében terveztünk egy, a gén startkodonjától kifelé irányuló, antiszensz, az 5' végén *Hind*III restrikciós helyet tartalmazó PCR primert. A várható PCR termék *Bam*HI (*Eco*RI) és *Hind*III enzimekkel emészthető, és klónozható.

1.ábra BamHI adapter és a *Medsa;CDKB2;1* antiszensz primerek szekvenciája

*Bam*HI
5' GATCCGC GGC CGC GAA TTC C A
GCG CCG GCG CTT AAG G TA

*Hind*III
5' CCCAAGCTT CTC CAT* GAT TGA ATC GAT TGA G

A *Bam*HI és a *Hind*III helyet aláhúzással jelöltük. Az antiszensz primernél a startkodont * jelzi.

Az amplifikált, potenciális promoter régiót *Bam*HI- *Hind*III restrikciós enzim emésztés után ugyan ezekkel az enzimekkel emésztett Bluescript (BS) vektorba (Stratagene) ligáljuk. A fragment szekvencia analízise után egy újabb, most már az azonosított kromoszómális fragment 5' végéhez tervezett komplement primerrel a reakció addig ismételhető, amíg nem kapunk egy megfelelő méretű, működő promotert.

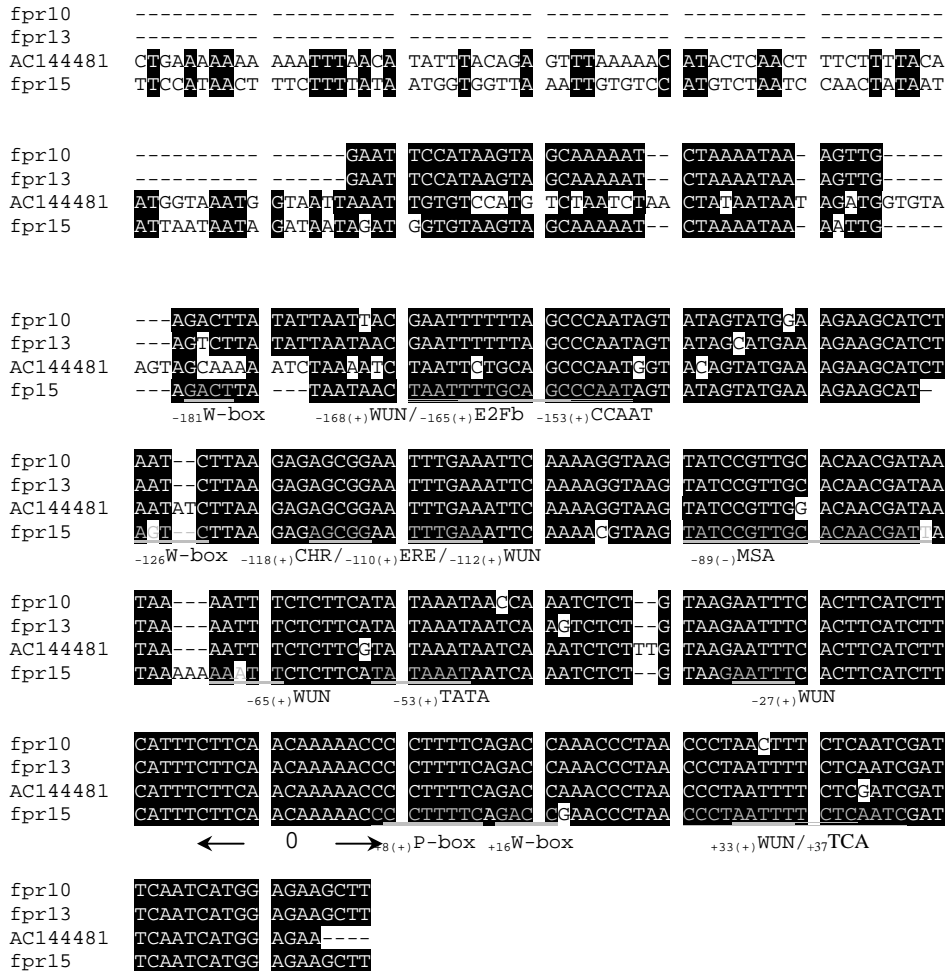
2. A *Medsa;CDKB2;1* promoter bioinformatikai analízise.

A lucerna *CDKB2;1* génelőtti szakaszt, klónoztuk, és a kapott klónokat összehasonlítottuk egymással és az időközben a génkönyvtárban elérhetővé vált *Medicago truncatula* homológ szakaszával. Lévéen a *Medicago sativa* tetraploid ezért egységes szekvenciát nem várhatunk (növényekben nincs homológ rekombináció). A klónokat, DNS szekvenciájuk ismeretében három csoportba oszthattuk: fpr10, fpr13, fpr15. Mivel néhány nukleotidos deléció és/ vagy inszerció található a DNS szekvenciákban, ami nem magyarázható a PCR-nél használt *TaqI* polimeráz átírási hűségével, ezért indokolt a csoportosítás.

Mivel az fpr15 volt a leghosszabb a vizsgált potenciális promoter-szekvenciák közül, ezért a továbbiakban az fpr15 vizsgálatával foglalkoztunk. Általában a növényi promoterek rövidebbek a nem-növényi eukarióta promotereknél. Az ismert növényi promoterek általában 200-400 bp hosszúak.

A szekvencia bioinformatikai analíziséhez két online elérhető programot használtunk: a PLACE (japán) és a PLANTCARE (európai) programokat. A feltételezett, fontosabbnak ítélt cis-elemeket a 2. ábrán jeleztük. A TATA motívumot a transzkripció starttól kb. 50 nukleotid távolságban találtuk. A CAAT enhancer elem 5 különböző helyen található meg. -89 pozícióban egy MSA szerű elemet azonosítottak be a programok, egy majdnem tökéletes palindrom elrendezésben. Egy E2Fb kötőhely is található a szekvenciában, ami nem meglepő, mert a CDKB1 kináznál bizonyították szerepét. Meglepő módon a szekvenciában a fény regulált elemek dominálnak, több mint 10 különböző kötőhellyel. Továbbá az fpr15 tartalmazott a sebzéssel indukálható szekvencia elemeket is, úgy mint etilén responzív elem (ERE: ₋₁₁₀ATTTGAAA), TCA-boxot (₊₃₇TTTTCTC), 3 WRKY kötőhelyet (W-box: _{-181/-126/+16}GATC/T) és 5 WUN motívumot (AATTT). A programok felfedeztek egy gibberelin kötő helyet (P-box: ₊₈CCTTTTC) az 5' nem-transzlált régióban.

2. ábra Az *fpr* klónok szekvenciáinak összehasonlítása:



A 0 (két nyíl között) jelzi a transzkripció startot. A potenciális TATA kötő hely kb. 50 nucleotidra van. A W-box a WRKY (wound response) aktiváló transzkripció factor család, a WUN, és TCA motívum a sebzés válaszában szerepet játszó transzkripció faktorok kötő helyei. Az etilén kötő hely (ERE) átfedésben van egy feltételezett sejtciklus szabályozó represszor elemmel (CHR). Az E2Fb, CCAAT motívum, és az MSA szabályozó elemek a sejtciklustól függő módon történő regulálásban lehet szerepük. A P-box a gibberellin kötő hely.

A génkönyvtárban elérhető az Arabidopsis teljes genomi szekvenciája. Egy összehasonlítást végeztünk az Arabidopsis CDKB kinázok előtti régiójai, és az általunk izolált lucerna promoter szekvencia között. Megállapítottuk, hogy az elemek azonos sorrendben követték egymást E2Fb, WUN, ERE MSA, TATA, TCA sorrendben, noha egy rövid szakasz kivételével (3. ábra) nem volt hasonlóság a DNS nukleotid sorrendjében.

3. ábra Az azonos nukleotid szekvencia a lucerna, és Arabidopsis CDKB kináz promoter régiójában.

MedsaCDKB2;1	-170	GCGGAATTGAAATTCAAAA
ArathCDKB2;1	-177	CTCCAGTTTGAATTTCAAAA
ArathCDKB1;1	-458	GTACATTTTGAAGTTCAAAA
emlős CDE-CHR		GGCGG_TTTGAA

3. Növényi vektorok kialakítása

Az fpr15-t, kb. 400 bp.-os fragmentet az eredeti pBlueScript vektorból átklónoztuk egy pCambia 3301 növényi bináris vektor *EcoRI-HindIII* helyére, majd eltávolítottuk a riportergén előtti konstitutív, virális CaMV35S promotert egy *HindIII-NcoI* adapter segítségével. A tesztelés összetettségéből következően több riportergén konstrukció is készítettünk: fpr15pC3301, beta-glukoronidáz (GUS), az fpr15pCambia3305 luciferázzal, ill. az fpr15pCambia3315 plazmidban a luciferáz után beépítettük a 35S-GUS inszertet, ezzel lehetővé téve egy egyidejű kvantitatív mérést, az indukálható fpr15-luciferáz aktivitását a konstitutív termelődő GUS-hoz hasonlíthatjuk. A GUS reakció viszonylag egyszerűen mérhető, a luciferázos mérés *in vivo* kivitelezhető, és jól kvantitálható.

4. A *Medsa;CDKB2;1* promoter funkcionális jellemzése

Első lépésben igazolni kellett, hogy a klónozott fragment tartalmazza azon elemeket, amelyek szükségesek a korrekt promoter működéshez. Ha a riportergének kifejeződnek a transzgenikus növényekben, akkor el lehet kezdeni a szinkronizációs kísérleteket. A transzformált kalluszokat megfestettük GUS-ra, illetve a luciferint adtunk hozzá. Ez alapján látható volt, hogy a fragment promoterként működik (4. ábra). Teljes növényt neveltünk a kalluszokból, így lucernából 4 fpr15:GUS, és 5 fpr15:luciferáz vonalat izoláltunk.

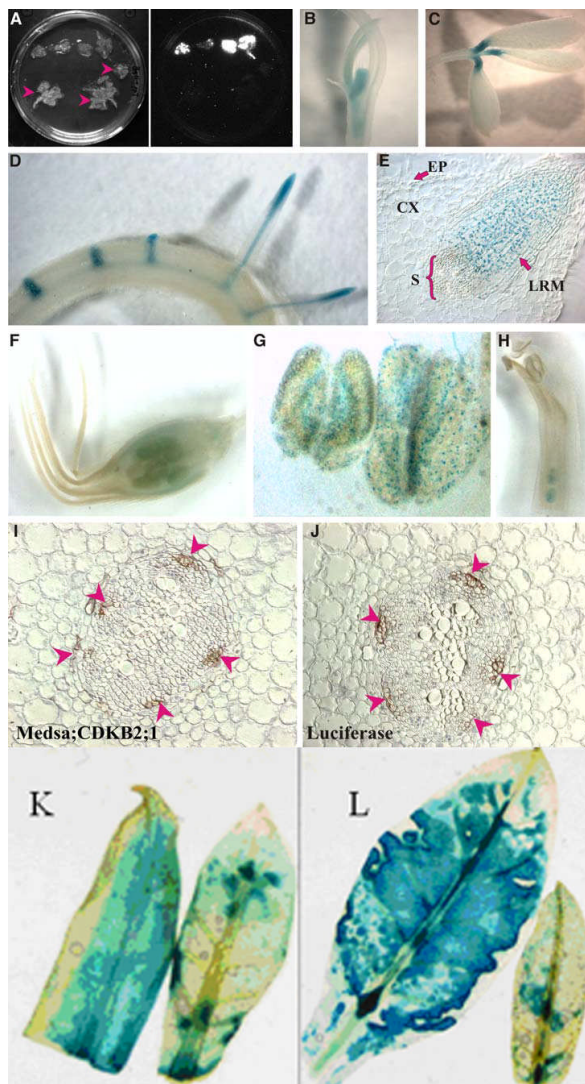
A sejtciklus függő szabályozást immunhisztokémiai módszerrel bizonyítottuk. Gyökérből készített konzekutív metszeteket megfestettük CDKB2;1-re és a riportergénekre (GUS-ra, vagy luciferázra) (4.ábra). Mind a két riportergén az osztódó szövetekben fejeződött ki a lucerna esetében. Azonban a sejtciklus specifikitást igazolni kell, ehhez a szinkronizált sejtekben kell vizsgálni az izolált promoter által vezérelt riportergének megjelenését, ill. azok aktivitását. 1 vonal fpr15:GUS, és 3 vonal fpr15:luciferáz transzgen növényből sejtszuszpenziót generáltunk. A sejt kultúra szinkronizálását követően Northern hibridizációval igazoltuk, hogy a riportergének a CDKB2;1-el szinkronban íródnak át.

A kifejlesztett sejtszuszpenziót felhasználtuk más kísérletekben is. Dr. Fehér Attila irányításával a nitrogén-monoxid (NO) hatását nézték osztódó sejteken. Megállapították, hogy az NO-nak csak az osztódás aktiválásában van

szerepe, a sejtciklus előrehaladására nem hat. A sejtciklus aktiválása, és gátlása összefüggésben volt a CDKA1;2 kináz aktivitásával [9].

Megvizsgáltuk az izolált promoter szakasz aktivitását heterológ rendszerekben is. Transzgenikus növényeket hoztunk létre az fpr15:GUS, ill. fpr15:luciferáz konstrukciókkal Arabidopsisban, és dohány növényben. Arabidopsis esetén 10 fpr15:GUS és 2 fpr15:luciferáz, és dohányból 6 fpr15:GUS, 8 fpr15:luciferáz vonalat izoláltunk. Arabidopsisban hasonlóan a lucernához a promoter irányította riporterek az osztódó szövetek: a levélnyel, a hajtáscsúcs, és a gyökércsúcs sejtjeiben fejeződtek ki. A dohánynál azonban teljesen más képet kaptunk. A riporterek konstitutív expresszáldtak, és az fpr15 promoter szabályozta expresszió RT-PCR technikával mérve kb. 5-7-szer volt erősebb a vírus eredetű 35S promoternél. A vizsgált eredmények konzekvesek voltak, mind a 14 vonal analízisénel. A transzformációt még kétszer megismételtük, illetve a T2 generáció jellemzése is azt mutatta, hogy az izolált lucerna promoter fragment dohányban nem szabályozódik a sejtciklusnak megfelelően, hanem egy nagyon erős konstitutív promoterként működik.

4.ábra Az fpr15 szabályozta riporterek jellemzése transzgen növényekben.



A) fpr15:luciferázos transzgen lucerna kalluszok *in vivo* világítanak, míg a nem expresszáldók nem. B, C, D, E, F, G, H GUS festés az fpr15:GUS növény részein: B) hajtáscsúcs, C) levél, D) gyökér, E) gyökér metszet gyökér kezdeményekkel, F) virág bimbó, G) pollen tok, H) magkezdemény. CDKB2;1 kináz és luciferáz kimutatása immunhisztokémiával konzekutív metszeteken (I-J). (LRM: oldalgyökér merisztéma, EP: bórszövet, CX: cortex, S: stele).

A piros nyilak egymást követő metszeteken jelzik az anti CDKB2;1 kináz és anti luciferáz festett régiókat.

K) Dohány levél CaM35S:GUS transzformálva, L) fpr15:GUS konstrukciót kifejezve.

Összefoglalásul megállapíthatjuk, hogy az általunk izolált promoter (*fpr15*) gazda növénytől függő módon szabályozza a riporter géneket. Az a tény, hogy a dohányban erős, konstitutív, viszont a lucernában, és az Arabidopsisban sejtciklus-, és sebzés- indukálható promoterként funkcionál, ez egy represszoron keresztüli szabályozás lehetőségére utal. A munkánk kezdetén felvetettük ennek a szabályozásnak a lehetőségét, amit egy esetlegesen meglévő, az állati rendszerek szabályzásában résztvevő cis-elem hasonlóságára alapoztunk. Ennek a bizonyítására a jövőben deléciós mutációkat szertnénk végezni.

6. A *CDKB2;1* promoter sebzés indukálható

A bioinformatikai analízis feltárt számos sebzésre bekapcsoló elemet. Ezt teszteltük transzgenikus, és nem-kezelt lucerna levélen is. Pengével meghasogattuk a leveleket, és néztük a reakciókat. A sebzést követő 12-24. órában már gyenge GUS festés volt detektálható. Ezt alátámasztottuk az endogén *CDKB2;1* kináz Western technikával történő kimutatásával, ami egyidejű megjelenését mutatta ki az indukált endogén kináznak és a luciferáz fehérjének. Tehát nem artefactot vizsgáltunk, mert üvegházi, nem-transzgenikus lucerna levelében is a sebzést követően kb. 12-24. órától detektálható volt az endogén kináz.

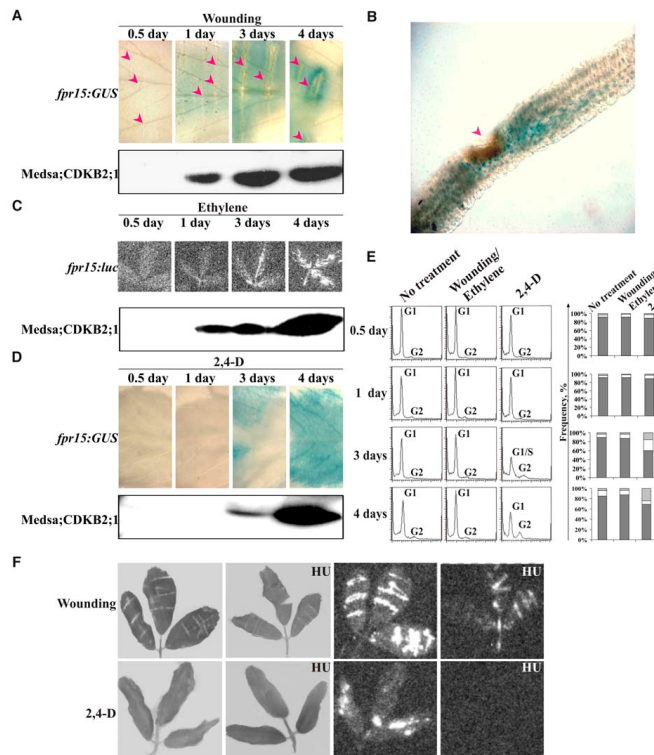
Azonban a sebzés indukálhat sejtosztódást is, ami szintén a promoter bekapcsolását eredményezi, mint azt bizonyítottuk az 5. fejezetben, habár a tapasztalat szerint sejtosztódás nem indukálható a levelek nyugvó sejtjeiben 4 napon belül. Ennek tisztázására a sebzett *fpr15:luciferáz* leveleket ráhelyeztük egy hidroxü-ureát (sejtciklus gátlót) tartalmazó táptalaj felszínére is. Kontroll kísérletként auxint adtunk egy másik levélhez. 4. nap után mind az auxinnal kezelt, mind a sebzett levélben bekapcsolt a promoter, azonban a hidroxü-ureás mediumon az auxin kezelt nem, de a sebzett növényenél a promoter bekapcsolt, jelezve, hogy a sebzésre történő aktiválódás a sejtciklustól független szabályozás következménye (5. ábra).

A sebzésre adott válasz jázminsav, szalicilsav, vagy etilén indukált úton történhet. Sem a jázminsavas, sem a szalicilsavas indukció nem kapcsolta be az *fpr15* vezérelt riporteret, de a bioinformatikai elemzéssel prediktált etilén igen. Etaphon (etilén prekursor) hozzáadásra a promoter aktiválható volt, Westernnel is kimutatható volt az endogén kináz termelődése. Tehát valószínűsíthetjük, hogy az *fpr15* az etilén útvonalon indukálódik sebzésre. Ez felvet egy paradoxont, tudniillik az **etilént M fázis gátlónak** jellemezték. Vagyis, a **G2/M** fázis specifikus **kináz termelődik a mitózis gátló etilén** jelenlétében. Ez felveti a *CDKB2;1* esetleges szerepét az endoreduplikációban, azaz a mitózis kihagyásával történő DNS duplikáció folyamatában.

7. Jövőbeli tervek

A promoternek a dohányban való konstitutív szabályozása felveti a represszoron keresztüli szabályozás lehetőségét, hasonlóan a humán *Cdc2*, *Cdc25* szabályozásához. Deléciós mutációkkal esetleg lehetne találni olyan szakaszt, ami a sejtciklus-függés, vagy/és a sebzésindukálhatóság elvesztését eredményezi. A lucerna, a dohány, és az Arabidopsis összevetésével a sejtciklus szabályozás lényegét lehet feltárni.

5. ábra CDK2;1 promoter indukciója sebzés hatására.



A) Sebzés indukálta *fpr15:GUS* lucerna levélben a sebzést követő 0,5 nap, 1 nap, 3 nap, és 4 nap múlva. A GUS festett levelek alatti képen egy hasonlóan sebzett, nem transzgén lucernából izolált CDK2;1 kináz Western blotja látható. B) Egy sebzés környezetének kereszt metszete. A GUS aktivitás a levél közepén terül szét. C) Ethephon kezelt levélen is bekapcsolódott a promoter, alatta az ethephon kezelt, nem transzgén lucernában az endogén kináz változása Western-blotton. D) Lucerna levél 2,4-D-vel kezelve később kapcsolja be a promotert, alatta nem transzgén lucerna endogén kináz szintje Western-blotton. E) Flow-cytometriás vizsgálat, amely megerősíti, hogy a 2,4-D kezelt levélben osztódás kezdődik, míg az etilén hatására nem. F) Sebzett, és 2,4-D-vel kezelt 3 napos levelek

sejtciklus gátló hidroxü-ureás táptalajon: csak a sebzett sejtek környezete termeli az *fpr15:luciferázt*.

V.6. Hivatkozások.

1. Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants – the nexus. *Plant Cell* **11**, 509-521.
2. Ito, M, Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y and Watanabe, A. (1998) A Novel cis-Acting Element in Promoters of Plant B-Type Cyclin Genes Activates M Phase-Specific Transcription. *Plant Cell* **10**, 331-341.
3. Robertson AJ, Kapros T, Waterborg JH (1997). A cell cycle-regulated histone H3 gene of alfalfa with an atypical promoter structure. *DNA Seq.* **7**, 209-16.
4. Shaul, O., Mironov, V., Bursens, S., Van Montagu, M. And Inzé, D. (1996) Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4868-72.
5. Magyar Z., Mészáros T., Miskolczi P., Deák M., Fehér A., Brown S., Kondorosi É., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bakó, Koncz C és Dudits D., (1997) Cell Cycle Phase Specificity of Putative Cyclin-dependent Kinase Variants in Synchronized Alfalfa Cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.
6. La Trangué, N.B. (1994) DP and E2F Proteins: Components of a Heterodimeric Transcription Factor Implicated in Cell Cycle Control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 443-450 (1994).

- 7. Boudolf V, Vlieghe K, Beemster G, Magyar Z, Acosta JAT, Maes S, Van Der Schueren E, Inzé D, De Veylder L** (2004b) The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2683-2692.
- 8. Magyar Z, De Veylder L, Atanassova A, Bako L, Inze D, Bogre L.** (2005) The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell*. **17**:2527-41.
- 9. Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szűcs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A.** (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**:849-60.