

Zárójelentés

Bevezetés

A sejt osztódás az élet egyik legalapvetőbb jelensége, így nem meglepő, hogy ezen folyamat ellenőrzése az evolúció során meglehetősen konzerválódott. Az általános sejtciklus modell a növényekre is érvényes, a sejtciklus szabályozás középpontjában a CDK-ciklin komplexek állnak, és az ezek aktivitását befolyásoló kinázok, foszfatázok, inhibitorok képviselőit is megtaláljuk a növényekben.

A növényi sejtciklus legkésőbb megismert komponensei a CDK inhibitorok. Növényekben csupán egy inhibitor család található, a tagok az aminosav szekvencia alapján igen nagy mértékben eltérnek mind az élesztő, mind az állati inhibitor fehérjéktől, mind egymástól. Az első lucerna CDK inhibitor, a KRPMt gént mi izoláltuk és jellemeztük. Elsőként mutattuk be, hogy a KRP-k nem csak a korábban már megismert A-típusú CDK-at gátolják, de képesek a CDKB2;1 inhibíciójára is. Igazoltuk, hogy a lucerna KRPMt foszforilálható, és egy kalcium-függő kináz inhibitor általi foszforilációja jelentősen fokozza a gátló képességét (Pettkó-Szandtner és munkatársai. 2006). Az Arabidopsis KRP2 CDK általi foszforilációja szerepet játszhat a fehérje lebontásában (Verkest és munkatársai 2005). Az emlős KIP-típusú inhibitorok esetében ismert mindkét jelenség, de a gyakorlatilag 15 aminosavra korlátozódó aminosav hasonlóság miatt az emlős rendszerek nem nyújtanak semmiféle támpontot a potenciális foszforilációs helyek megtalálására.

Bár sikerrel mutattunk ki egy aktiváló foszforilációt, azonban továbbra is rejtve maradt, mind az MsCPK3 (kalcium-függő fehérje kináz), mind a CDK-k foszforilációjának pontos helye és különböző hatása, annak ellenére, hogy bizonyítottan tekinthetjük, hogy mind az A-típusú mind a B-típusú CDK-k képesek megfoszforilálni az inhibitor fehérjét.

Célkitűzések

A korábbi munka logikus folytatásaként a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Melyik aminosav a MsCPK3 foszforiláció helye?
2. Különbözik-e ettől A-típusú illetve B-típusú CDK foszforiláció?
3. Mik a hatásai ezen poszttranszlációs módosításoknak?
4. Szerepet játszik-e a 26S proteoszóma a KRPMt lebontásában?

5. A megszerzett ismeretek alapján elkészített foszforilálhatatlan, illetve foszforilációt mimikáló mutánsok, mutatnak-e aktivitásbeli változást in vitro kináz reakciókban?

6. Okoznak-e ezek a mutánsok fenotípus változást transzgenikus növényekben?

Összefoglalás:

Megállapítottuk, hogy az MsCPK3 a KRPMt 91. szerin aminosavát foszforilálja. Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy az A-típusú CDK-k ugyanezen az aminosavon foszforilálják a lucerna CDK inhibitor fehérjét. A B-típusú CDK foszforiláció különbözőségét vagy azonosságát technikai problémák nem tették lehetővé, lévén ezen kinázokkal nem tudtunk megfelelően erős kináz aktivitást detektálni a KRPMt foszforilációja esetén. Többszöri kísérletek ellenére sem sikerült ubiqitinálást kimutatni sem a vad típusú sem a foszforilációt mimikáló rekombináns fehérjék esetében. Elkészítettük a 91. szerin aminosav foszforilációt mimikáló glutamát valamint aszpartát mutánsait. Valamint a nem foszforilálható alanin mutánst is. Ezen rekombináns fehérjék egyike sem volt foszforilálható sem az MsCPK rekombináns fehérjével, sem az A-típusú CDK-kal.

Kináz gátlási kísérleteink során a foszforilációt mimikáló szerin aszpartát csere jelentős mértékben (kétszeresére) fokozta az inhibitor fehérje gátló képességét.

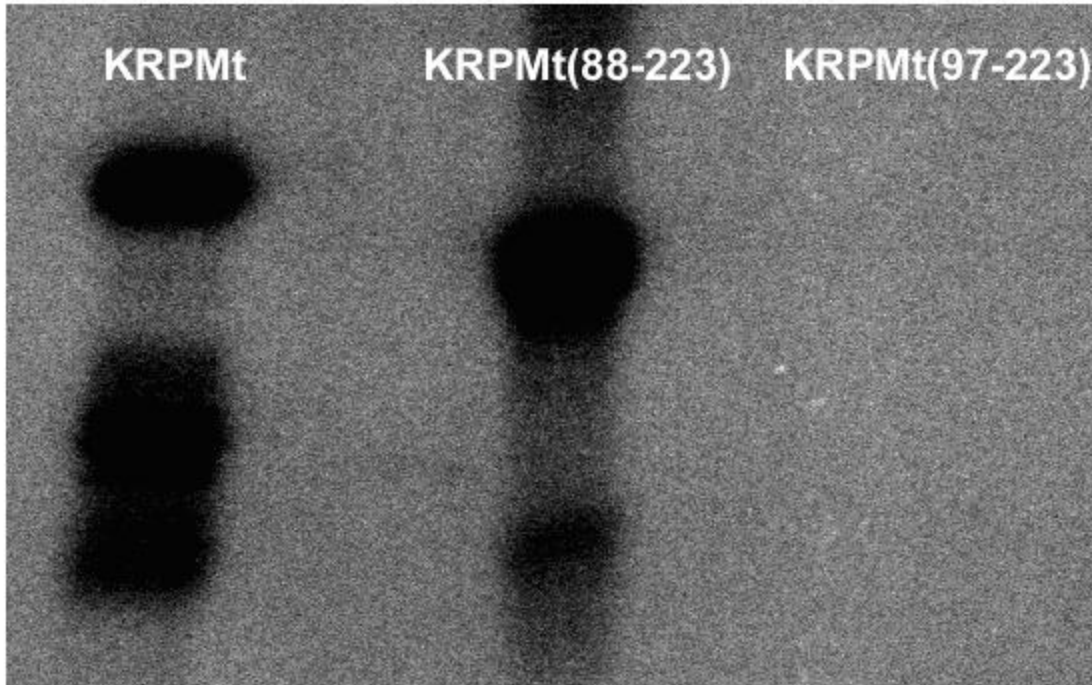
Elkészítettük a mutáns fehérjék növényi expressziójához szükséges vektorokat, melyekkel dohány levélkorongokat transzformáltunk. A GUS pozitív kalluszok regenerációja folyamatban van, azonban sajnálatos módon a legígéretesebb, legerősebb expressziót mutató kalluszok esetében jelentős degenerációt tapasztaltunk nem képesek gyökeret létrehozni.

A kutatás idő előtt lezárásra kerül, mert külföldre távoztam és a halasztási kérelmemet nem támogatta a zsűri elnöke.

Az eredmények részletes ismertetése időrendben:

1. Az MsCPK3 foszforilációjának meghatározására a korábbiakban már tettünk próbálkozást, foszfo-peptid, valamint foszfo-aminosav térképezést végeztünk és bebizonyítottuk, hogy a foszforilációban egy vagy több szerin aminosav játszhat szerepet. A kalcium-függő kináz esetében jó eséllyel sejthetjük, hogy a 91. szerin a megfelelő aminosav, mivel tudjuk azt, hogy a növényi kalcium-függő fehérje kinázok képesek fölismerni a PKC (Protein Kinase C) konszenzus szekvenciáit (Oláh és munkatársai 1989.). Erre vonatkozóan további kísérleteket is végeztünk, így

elkészítettük a KRPMt olyan N-terminálisan csonkolt változatait, melyek tartalmazzák (KRPMt88-223), illetve nem tartalmazzák (KRPMt97-223) a 91. pozícióban lévő szerint. Kísérletileg bizonyítottuk, hogy az inhibitor fehérjének csak azok a szakaszai foszforilálhatók az MsCPK3-mal, melyek tartalmazzák a fent említett szerin aminosavat (1. ábra).

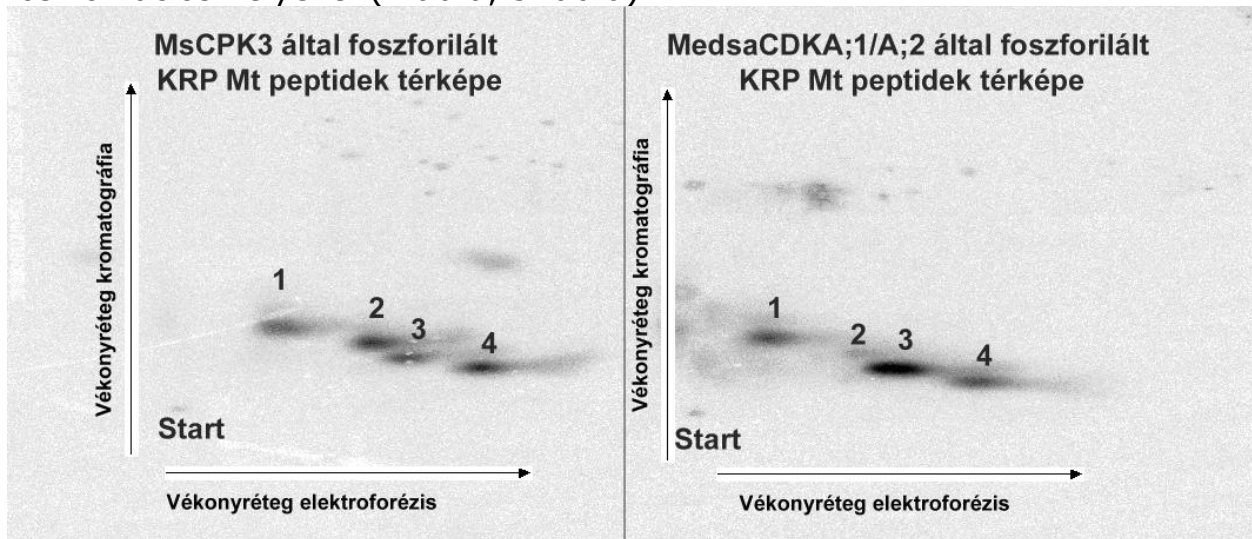


1. ábra A MsCPK3 foszforilálja a teljes hosszúságú és a 88-223 aminosavat tartalmazó KRPMt fehérjét, de nem a KRPMt(97-223) deléciós változatot.

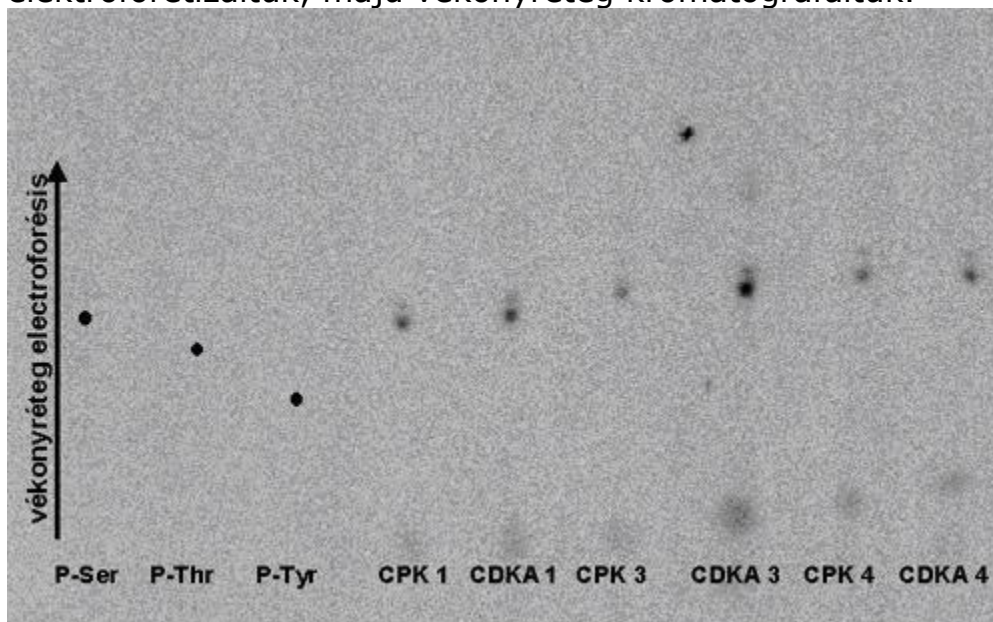
Első lépésként ismételten megpróbálkoztunk az MTA SzBK tömegspektrometriai laboratóriumának lehetőségeit kihasználva MALDI-TOF készülékkel megkapni a pontos foszforilációs helyet mind az MsCDPK, mind a CDKA és a CDKB2.1 által történő foszforiláció esetén. Első alkalommal a bakteriálisan termeltetett rekombináns KRPMt fehérjét foszforiláltuk a különböző kinázokkal, majd az izolált fehérjéken kerestük a foszforilált peptideket. Sajnálatos módon hol a fehérje minősége, hol a fehérje mennyisége tette lehetetlenné, hogy kétséget kizáróan megállapítsuk a foszforiláció helyét.

Ezek után megpróbálkoztunk a nem foszforilált fehérjék koncentrációjának csökkentésével, oly módon, hogy két dimenziós gélelektroforézist végeztünk. Csak a radioaktív jelölés segítségével tudtunk megbizonyosodni arról, hogy a módszerrel képesek vagyunk elválasztani a foszforilált fehérjéket a foszforilálatlanoktól, de képtelenek voltunk a tömegspektrometriához elegendő mennyiségű fehérje tisztítására.

Ezért, remélve, hogy legalább azt sikerül bebizonyítanunk, hogy az MsCDPK és az MsCDKA foszforilációja eltér egymástól foszfo-peptid térképezést végeztünk. Legnagyobb meglepetésünkre a két foszfopeptid térkép azonosnak bizonyult. Remélve, hogy a két foszforilációs hely nem azonos, csupán rendkívül közeli egymáshoz, a peptideket izoláltuk és foszfopeptid térképezést végeztünk. Az eredmény azt bizonyítja, hogy minden valószínűség szerint az MsCDKA foszforilációs helye megegyezik az MsCDPK foszforilációs helyével.(2.ábra, 3. ábra)



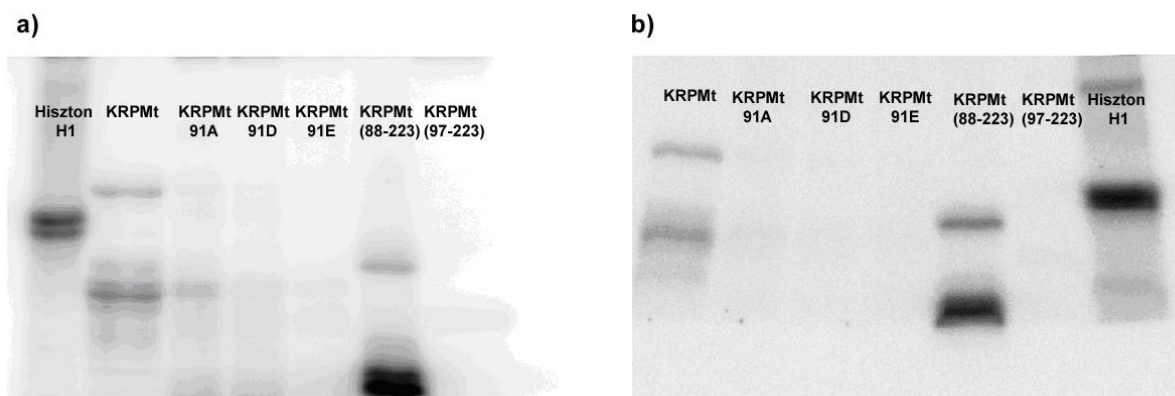
2. Ábra A két különböző kinázzal (MsCPK3 ill. MedsaCDKA;1/A;2) foszforilált KRPMt foszfo-peptid térképe. A rekombináns foszforilált fehérjét gélből izolálva tripszinnel hasítottuk, majd cellulóz vékonyrétegen először elektroforetizáltuk, majd vékonyréteg kromatografáltuk.



3. 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.

Ezen információk ismeretében kezdtünk neki az irányított mutagenézishez, ahol is a Pfu/DpnI általánosan alkalmazott módszert használtuk. Sokszori próbálkozások után is csupán a 91D KRPMt azaz a glutamát foszforilációt mimikáló mutánst sikerült elkészítenünk. A többi mutáció készítése során minden esetben egyéb mutációk illetve bizonyos esetekben primer beépüléseket tapasztaltunk. A mutánsok készítését folytattuk, új primerekkel, illetve a Kunkel mutagenézissel, remélve, hogy a T4 polimeráz nagyobb pontossága segít a nem kívánt mutációk elkerülésében. Sikeresen előállítottuk a 91A, 91E mutánsokat is. Az elkészített 91D, 91A, 91E KRPMt-bakteriálisan túltermeltettük és kísérleteket végeztünk vele. Megállapítottuk, hogy az MsCPK3 számára nem szubsztrát egyik 91S mutáns KRPMt változat sem. A foszfortérképezés alapján talán nem meglepő, hogy az MsCDKA sem képes foszforilálni a mutáns fehérjét, illetve nagyon gyengén. (4. ábra)

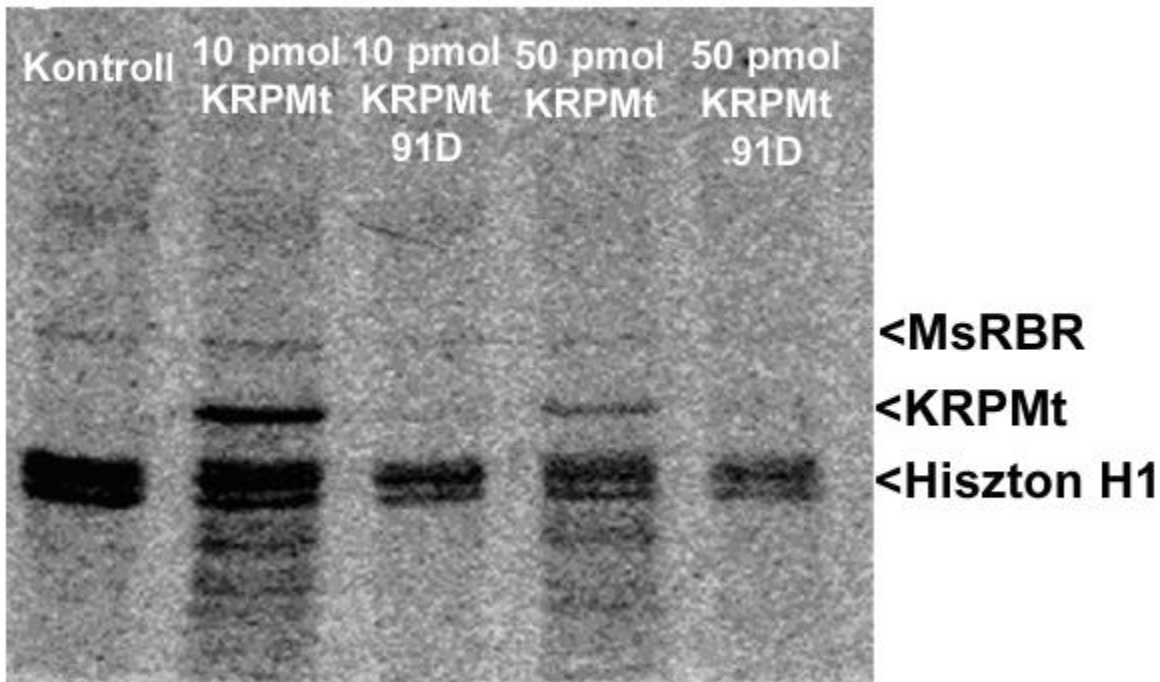


4. Ábra

a) A MedsaCDKA;1/A;2 nem foszforilálja a 91. szerin helyett alanint, aszparaginsavat, illetve glutaminsavat tartalmazó mutáns KRPMt fehérjéket.
 b) A MsCPK3 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.

Megvizsgáltuk a KRPMt és a 91DKRPMt CDKA gátló hatását és azt tapasztaltuk, hogy a mutáns fehérje 1,8-szor aktívabb gátlást mutat, mint a vad típusú, ezenkívül az is látható a kísérleteinkből, hogy nem csupán a

CDKA gátlására, de a szubsztrát specificitására is hatással, van a foszforiláció. (5.ábra)



5. Ábra

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

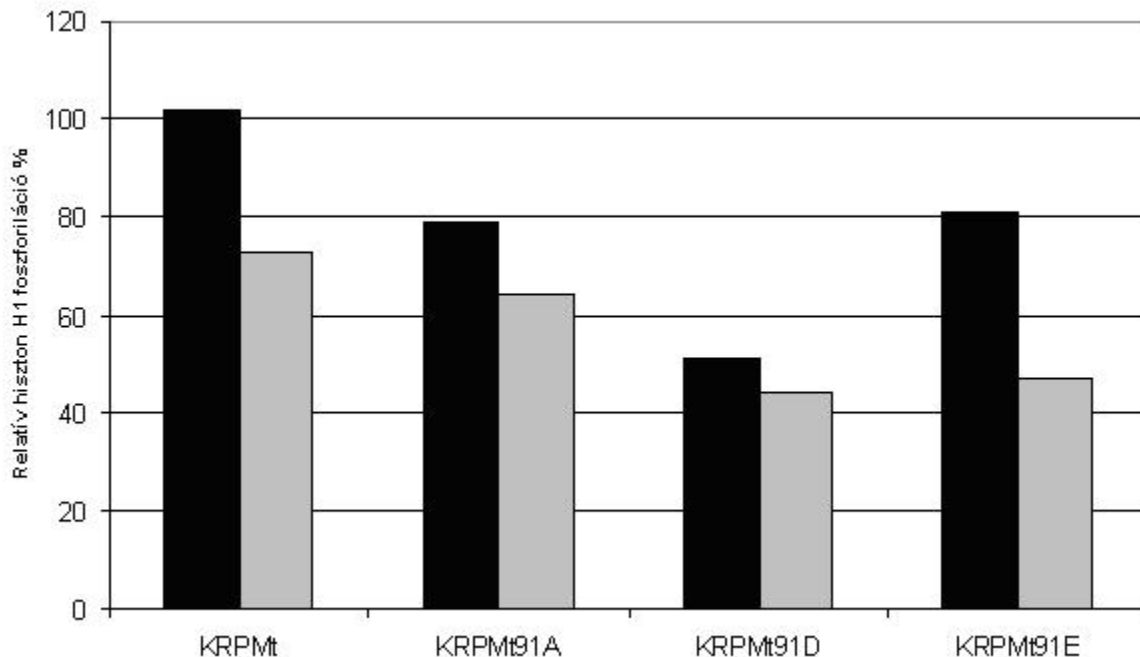
A KRPMt 91. szerinjének aszparaginsavra történő cseréje már kis koncentrációnál is jelentősen fokozza a fehérje aktivitását. Az ábrán látható hiszton H1 foszforiláció kvantitálása után megállapítható az, hogy a kontrollhoz képest milyen mértékben csökken a kináz aktivitás (10pmol KRPMt: nincs változás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

Lucerna sejtkivonat és rekombináns ubiquitin segítségével vizsgáltuk, a mutáns és a vad típusú inhibitor fehérje ubiuitinálását, de ez nem volt kimutatható. Ez a tény annak tükrében, hogy eredetileg is két különböző foszforilációt föltételezünk (egyét az aktiválásra, egyet degradációs szignálként), nem meglepő.

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, mit az eredeti 91. pozícióban szerint tartalmazó fehérje. A várakozással ellentétben a 91. szerin alaninra való cseréje is fokozta, ha

jelentősen kisebb mértékben is 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.

Ennek ellenére kijelenthető, hogy a 91. szerin egy kiemelkedően fontos szereppel rendelkező, és mindkét vizsgált kináz által foszforilálható aminosav a molekulában.



6. 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 transzgenikus növények előállítását megkezdjük. Első próbálkozásként dohány SR1 levélkorongokat transzformáltunk. LBA 4404 Agrobaktérium törzsel. A KRPMt vad típusú illetve foszforilációs fehérjéket aminoterminális Hemaglutinin-taggal láttuk el. Növényi expressziós vektornak a pCAMBIA3301-et használtuk. Már rendelkezünk GUS pozitív kalluszokkal (transzformánsoként 10-15 független kallusz) mind a vad mind a 3 mutáns KRPMt-t tartalmazó vektorok esetében.

A GUS pozitív kalluszok regenerációja folyamatban van, azonban sajnálatos módon a legígéretesebb, legerősebb expressziót mutató kalluszok esetében jelentős degenerációt tapasztaltunk, nem képesek gyökeret létrehozni. A lucerna transzformánsok előállítása jelenleg bizonytalan.

A kutatás idő előtt lezárásra kerül, mert külföldre távoztam és a halasztási kérelmemet nem támogatta az OTKA Bizottság Elnöke. Annak ellenére, hogy a célkitűzéseink döntő többségét elértük, a publikáció lehetősége, de legalább a színvonala nagy mértékben függ a transzgenikus növények előállításának sikerétől és az esetlegesen tapasztalható fenotípustól. Sajnos a téma folytatása, ebben a pillanatban mind anyagi mind személyi okok miatt bizonytalan.

Hivatkozott irodalom

Oláh, Z., Bögre, L., Lehel, Cs., Faragó, A., Seprödi, J. and Dudits, D. (1989) The phosphorylation site of CA2 β -dependent protein kinase from alfalfa. *Plant Mol. Biol.* 12, 453–461.

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

Verkest A, Manes CL, Vercruyssen 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.