

Zellproliferation und Genotoxizität

CDK-Phosphorylierung in Zellzyklus und Stress: artspezifische Unterschiede

NICO DISSMEYER

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PFLANZENZÜCHTUNGSFORSCHUNG, KÖLN

Elisabeth-Geffert-Preis 2010 der GfG

Die Deaktivierung Zyklin-abhängiger Kinasen durch Phosphorylierung ist funktionslos bei Zellproliferation, Wachstum und Stressantwort von *Arabidopsis*. In anderen Eukaryoten ist dies zur Gewährleistung genomischer Integrität aber zwingend erforderlich.

In *Arabidopsis*, deactivation of cyclin-dependent kinases via phosphorylation has no function in cell proliferation, growth, and stress response. In other eukaryotes, however, this is mandatorily required for maintaining genomic integrity.

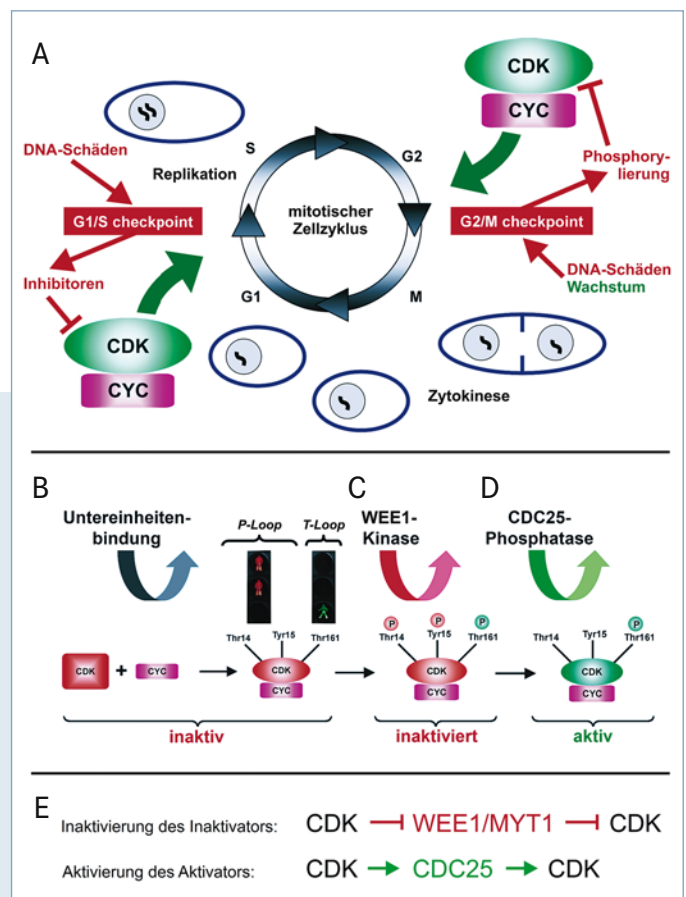
Die strenge Regulation der Zellteilung ist für die Entwicklung und Fortpflanzung aller Lebewesen unabdingbar. Die zugrunde liegende molekulare Maschinerie wird als hochkonserviert angesehen; in fast allen zentralen Zellteilungskomponenten bestehen sehr hohe Sequenz- und Strukturhomologien [1, 2]. Wichtige Bestandteile des Zellteilungsapparats sind Kontrollinstanzen an G2/M- und G1/S-Übergängen im Zellzyklus – die *checkpoints* (Abb. 1A) – die zentralen Prozessen vorangeschaltet sind, an denen über Zellteilung (M-Phase) und DNA-Replikation (S-Phase), abhängig von den aktuellen Bedingungen für die Zelle, entschieden wird. Der Zellzyklus von

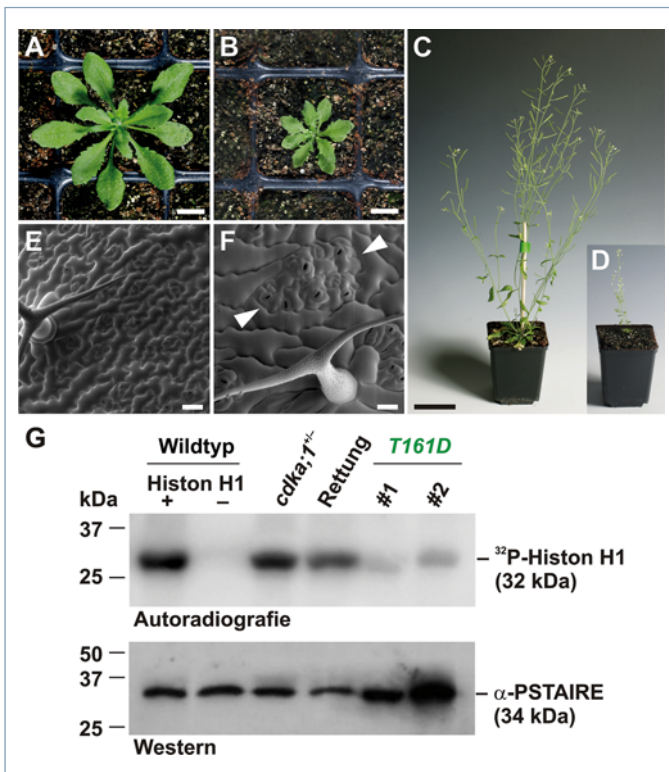
Hefe und Metazoen wird durch oszillierende Aktivität einer Familie von Zyklin-abhängigen Proteinkinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs; Abb. 1A) moduliert, die an aktivierende Zyklinuntereinheiten binden (Abb. 1B). Die G2/M-Transition wird posttranslational durch Phosphorylierung und G1/S durch Inhibitorbindung kontrolliert, beides reduziert die CDK-Akti-

vität [1, 2]. Der Phosphorylierung von CDKs an hochkonservierten Stellen kommt eine zentrale Bedeutung in Mitose und molekularer Stressantwort nach DNA-Schäden zu.

Wie in anderen Eukaryoten wird auch in *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) der Zellzyklus durch CDKs vorangetrieben. CDKA;1 ist das einzige *Arabidopsis*-Homolog der eukaryotischen CDKs, und unter Gewächshausbedingungen sind homozygote *cdka;1*-Mutanten letal [3–5]. CDK-modifizierende Enzyme (Kinase WEE1, Phosphatase CDC25; Abb. 1C, D), Zyklone und CDK-Inhibitoren wurden auch in Pflanzen beschrieben. Daher hat sich in der pflanzlichen Zellteilungsforschung das Bild konsolidiert, welches dem in Lehrbüchern und der aktuellen Übersichtsliteratur zu findenden tierischen „Zellzyklus-Dogma“ entspricht (Abb. 1B). Der pflanzliche Zellzyklus wäre somit genauso –

► **Abb. 1:** Zellzyklus und kanonische Regulation von tierischen CDKs. **A**, mitotischer Zellzyklus mit vier Phasen (S: DNA-Synthese-Phase, M: Mitose, G: Wachstumsphase) und zwei *checkpoints*, durch CDK/Zyklin-Aktivität kontrolliert. CDK-Aktivität unterliegt strikter Kontrolle durch Phosphorylierung (G2/M) und Inhibitorbindung (G1/S). Signale aus Entwicklung, Wachstum und Stress haben Einfluss auf die Aktivierung und Ausführung dieser *checkpoints*. **B**, CDK funktioniert als katalytische Untereinheit in multimeren Komplexen. Nach Bindung einer substratspezifisierenden Zyklinuntereinheit (CYC) an CDK findet eine Konformationsänderung statt, die Seitenketten regulatorischer Aminosäuren exponiert: zwei inhibitorische (rote Ampel, Thr-14 und Tyr-15) und eine aktivatorische (grüne Ampel, Thr-161). Dies erlaubt die aktivatorische Phosphorylierung durch CDK-aktivierende Kinasen (CAKs, hier nicht gezeigt) im T-Loop als Teil des Aktivierungssegments. **C**, Inhibitorische Kinasen des WEE1-Typs phosphorylieren und inaktivieren CDK im P-Loop. **D**, Bei Eintritt in die Mitose wird dies durch CDC25-Phosphatasen umgekehrt und volle Aktivität erhalten. **E**, Geringe CDK-Aktivität führt zur Inaktivierung von WEE1 und zur Aktivitätssteigerung von CDC25.





◀ **Abb. 2:** Thr-161-Substitution zu Aspartat (T161D) ergibt hypomorphes Allel. **A, C**, drei (A) und sechs Wochen alte (C) wildtypische *Arabidopsis*-Pflanzen. **B, D**, T161D-Pflanzen unter gleichen Bedingungen gewachsen. **E, F**, kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen der Epidermis von Wildtyp (E) und T161D (F) mit weniger und stark vergrößerten Zellen und Entwicklungsanomalien der Spaltöffnungen (Pfeilspitzen). **G**, *in vitro*-Histon-H1-Kinaseassay (oben) von aus Pflanzenmaterial aufgereinigten CDK/Zyclin-Komplexen des Wildtyps, eines Rettungskonstrukts (wildtypisches *CDKA;1*-Transgen in homozygoter *cdka;1*-Mutante) sowie T161D. Ladekontrolle durch CDK-spezifischen Antikörper (Anti-PSTAIRE, unten). Maßstab: A, B: 1 cm; C, D: 5 cm E, F: 50 μ m. A, B und E–G modifiziert nach [6] (Bild: www.plantcell.org, Copyright: American Society of Plant Biologists).

oder zumindest sehr ähnlich – reguliert wie in Hefe und tierischen Systemen [1].

Dieser Artikel gibt eine kurze Übersicht über die Überprüfung fundamentaler Prinzipien der pflanzlichen Zellzykluskontrolle und soll unterstreichen, dass das „Zellzyklus-Dogma“ für Pflanzen revidiert werden muss; die Zellteilung wird in *Arabidopsis* signifikant anders reguliert als in Hefe oder Metazoen.

Differenzielle Rolle aktivatorischer Thr-Phosphorylierung in der pflanzlichen Entwicklung

In Hefe und tierischen Systemen führt die Phosphorylierung an einem kanonischen Threoninrest im T-Loop des Aktivierungssegments der CDKs zu maximaler Kinase-Aktivität. Dieser Phosphotransfer führt zu einer Konformationsänderung und ermöglicht die Substratbindung [1]. Aktive *Arabidopsis*-CDKA;1 trägt ebenfalls diese Modifikation an Thr-161 und wird für die Funktion benötigt [6, 7]. In anderen Organismen hat ein Austausch dieses Threoninrestes inaktive Enzyme und letale Phänotypen zur Folge [8]. In *cdka;1*-Mutanten fehlt dem männlichen Gametophyt (mehrkerniges Pollenkorn) eine der normalerweise zwei darin enthaltenen Spermazellen, und homozygote *cdka;1*-Embryonen sterben in den Samen ab [3–5]. Ein *CDKA;1*-Transgen mit einem die aktivierende Phosphorylierung mimikrierenden T161D-Aminosäureaus-

tausch kann die Fehler der Spermazellteilung im Pollen überraschenderweise teilweise wiederherstellen, resultiert aber in herabgesetzter Substratbindung und Kinase-Aktivität (**Abb. 2G**, [6, 9]). Die Zellen der T161D-Pflanzen können sich zwar teilen und der Organismus wachsen, aber sie sind in ihrer Zellteilung und Entwicklung stark beeinträchtigt und durch Teilungsdefekte in den Keimzellen vollkommen steril (**Abb. 2A–F**). Dennoch ermöglicht die verbleibende Aktivität dieses hypomorphen Allels, dass – erstmals in der Zellzykluskontrolle – homozygote *cdk*-Mutanten durch eine phosphomimetische CDK-Variante gerettet werden können. Da in homozygoten *cdka;1*-Individuen ein Zellzyklus mit diesem schwachen Allel vorangetrieben werden kann, werden generelle regulatorische Kontexte der pflanzlichen postembryonalen Entwicklung infrage gestellt; für eine erfolgreiche Meiose ist außerdem eine höhere Aktivität von CDKA;1 notwendig als für das Durchlaufen des mitotischen Zellzyklus [6].

Phosphorylierungsstellen der ATP-Bindetasche sind funktionslos

Kinasen können durch negative Phosphorylierung im Bereich der ATP-Bindestelle, dem P-Loop, inhibiert werden. Zentrales Regulationselement der CDKs in Metazoen und Spaltheife ist deren umkehrbare Phosphorylierung im P-Loop an Tyrosin (Tyr-15) durch WEE1, oft zusätzlich an Threonin (Thr-14) durch MYT1/MIK1. Diese Phosphoakzeptorstellen und WEE1 sind hochkonserviert und existieren in Pflanzen. Mehrfach phosphorylierte CDK (**Abb. 1C**) stellt einen inaktivierten Lagerzustand dar, der durch Dephosphory-

lierung via CDC25 in einer positiven und einer doppelt-negativen Rückkopplung aktiviert werden kann (**Abb. 1D, E**). Dieser Prozess basiert somit zwingend auf einer inhibitorischen Phosphorylierung des P-Loops [1, 2].

Wir konnten zeigen, dass im Gegensatz zu anderen bis heute untersuchten Modellorganismen die Zellzykluskontrolle in *Arabidopsis* unabhängig von dieser Modifikation ist. Ein Aminosäureaustausch im P-Loop zu nicht phosphorylierbarem Valin und Phenylalanin (T14V; Y15F, kurz *VF*) kann die *cdka;1*-Mutante vollkommen retten. *VF*-Pflanzen haben einen wildtypischen Phänotyp (**Abb. 3A, B**), und die daraus aufgereinigte Kinase CDKA;1-*VF* zeigt Wildtyp-Aktivität (**Abb. 3C**, [8, 10]). Beides steht vollkommen im Gegensatz zum tierischen „Zellzyklus-Dogma“ [1, 2].

In Tieren wird die Phosphorylierung des P-Loops und das Zusammenspiel von WEE1 und CDC25 sowohl im Rahmen des mitotischen Zellzyklus als unumgänglich angesehen als auch, um infolge von Schädigungen der DNA Sicherheitsfunktionen ausführen zu können [11]. Zu den Stressantworten gehören die Aktivierung der *checkpoints* und das Stoppen des Zellzyklus, um dem Reparaturapparat der Zelle Zeit einzuräumen, die entstandenen Schäden zu reparieren. In transgenen Pflanzen, die nur die CDKA;1-Variante *VF* enthalten, kann sogar der durch DNA-Schäden induzierte *checkpoint* unabhängig von diesem phosphoregulatorischen Mechanismus arbeiten. Eine *wee1*-Mutante ist hypersensitiv für den replikationstoxischen Hydroxyharnstoff [12], allerdings zeigt *VF* keinerlei Anzeichen für erhöhten Stress (**Abb. 3D, E**) [10], obwohl *VF* nach der klassischen Ansicht denselben Effekt wie *wee1*, also eine dramatische Reaktion, zeigen müsste. Darüber hinaus haben wir nachgewiesen, dass WEE1 zwar eine wichtige Rolle in der DNA-Stressantwort spielt, der einzige Kandidat für eine „CDC25-ähnliche“ Phosphatase in *Arabidopsis* aber keinerlei Funk-

tion im Zellzyklus besitzt. Somit kommt der P-Loop-Phosphorylierung nicht die kanonisch essenzielle Funktion in der Proliferations- und Wachstumskontrolle sowie der Stressantwort zu, und der *checkpoint* für DNA-Schäden funktioniert in *Arabidopsis* unabhängig von ihr [10, 13].

Molekulare Mechanismen der Zellzykluskontrolle sind nur partiell konserviert

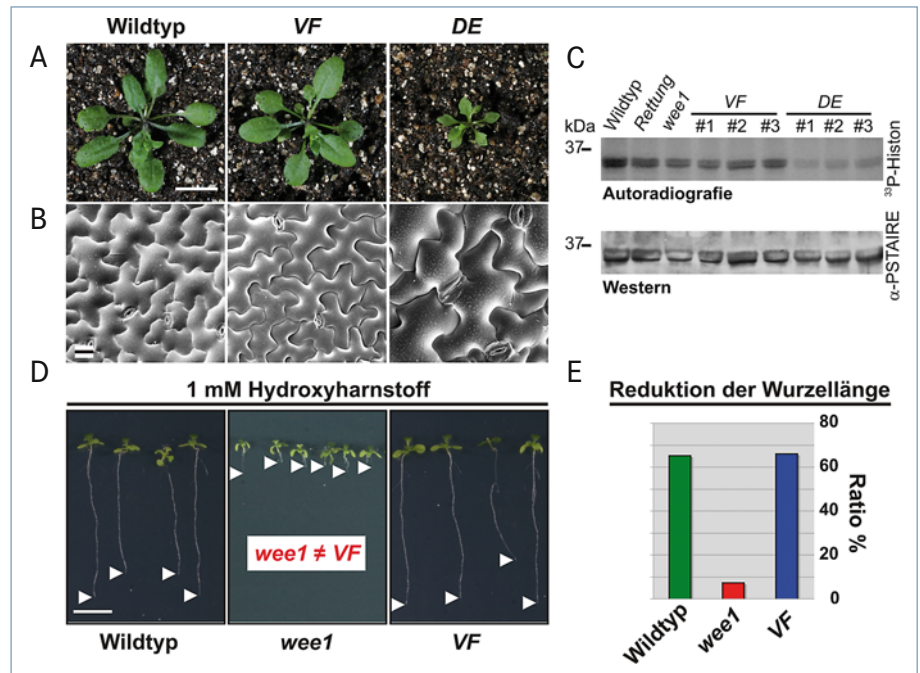
In *Arabidopsis* sind die molekularen Verschaltungen der CDKs und anderer Kernkomponenten, in denen in anderen Organismen aktivierende und inhibitorische Phosphorylierungen eingesetzt werden, fundamental unterschiedlich verglichen mit bisher beschriebenen Systemen. *Arabidopsis* bietet andere entweder bereits bestätigte oder theoretisch mögliche Regelmechanismen, die so oder ähnlich in anderen Eukaryoten noch nicht gezeigt worden sind, beispielsweise durch eine größere Anzahl von Zyklinen, Inhibitoren und weiteren pflanzenspezifischen CDKs [2]. Der pflanzliche Zellzyklus rückt in ein mehr angewandtes Sichtfeld, beispielsweise bei der Modulierung von Pflanzenwachstum zur Erhöhung von Biomasse für erneuerbare Energien und Nahrungsquellen. Auch im medizinischen Kontext sind neue Mechanismen der Zellteilung als auch der molekularen Verschaltung der Stressresistenz und -antwort von großem Interesse. Unter Berücksichtigung dieser Wege könnten alternative Strategien aufgedeckt werden, fehlerhafte Zellteilung zu stoppen.

Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt Annika K. Weimer, ohne Ihre Beiträge wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Ähnliches gilt für meinen Betreuer Arp Schnittger, der stets offen und fördernd war. Vielen Dank an Karsten Niefind, Martin Hülkamp und Rita Groß-Hardt für ihre Unterstützung. Für Rainer Hanke, Holger Wunram, Alois Schwarz und Kurt-Eberhard Nehring: Herzlichen Dank für das Ermöglichen meiner frühen Projekte!

Literatur

- [1] Morgan DO (2007) The cell cycle: principles of control. New Science Press Ltd, London
- [2] Dissmeyer N, Schnittger A (2010) Posttranslational regulation by phosphorylation of CDKs in yeast, animals and plants. EMBO Rep (in Vorbereitung)
- [3] Iwakawa H, Shinmyo A, Sekine M (2006) *Arabidopsis* CDKA₁;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. Plant J 45:819–831
- [4] Nowack MK, Grini PE, Jakoby MJ et al. (2006) A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm



▲ **Abb. 3:** Phosphorylierung des P-Loops ohne Funktion in Entwicklung, Wachstum und Antwort auf DNA-Schäden. **A**, drei Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen: Wildtyp, VF und DE. Der in Hefe dominant-negativ wirkende phosphomimetische Austausch (T14D; Y15E, kurz DE) kann die *cdk*;1-Mutante partiell retten. **B**, kryoelektronenmikroskopische Aufnahme der Epidermis mit Spaltöffnungen. **C**, Kinaseassay von *wee1*-Mutanten, VF und DE. **D**, **E**, Wurzelwachstum unter Stressbedingungen (1 mM Hydroxyharnstoff, HU-Medium). **D**, zehn Tage alte Pflanzen auf Agarmedium, die Wurzellänge der *wee1*-Mutante (Pfeilspitzen) ist gegenüber dem Wildtyp und auch VF stark reduziert. **E**, Ratio der gemittelten Wachstumsraten von HU-Medium versus Kontrolle. Maßstab: A, D: 1 cm; B: 20 µm. Modifiziert nach [10] (Bild: www.plantcell.org, Copyright: American Society of Plant Biologists).

proliferation in angiosperm embryogenesis. Nat Genet 38:63–67

- [5] Nowack MK, Shirzadi R, Dissmeyer N et al. (2007) Bypassing genomic imprinting allows seed development. Nature 447:312–315
- [6] Dissmeyer N, Nowack MK, Pusch S et al. (2007) T-loop phosphorylation of *Arabidopsis* CDKA₁ is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue. Plant Cell 19:972–985
- [7] Harashima H, Shinmyo A, Sekine M (2007) Phosphorylation of threonine 161 in plant cyclin-dependent kinase A is required for cell division by activation of its associated kinase. Plant J 52:435–448
- [8] Dissmeyer N, Schnittger A (2010) Use of phospho-site substitutions to analyze the biological relevance of phosphorylation events in regulatory networks. Methods Mol Biol (im Druck)
- [9] Pusch S, Dissmeyer N, Schnittger A (2010) Bimolecular-fluorescence complementation assay to monitor kinase-substrate interactions in vivo. Methods Mol Biol (im Druck)
- [10] Dissmeyer N, Weimer AK, Pusch S et al. (2009) Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA₁. Plant Cell 21:3641–3654

[11] Yata K, Esashi F (2009) Dual role of CDKs in DNA repair: to be, or not to be. DNA Repair (Amst) 8:6–18

- [12] De Schutter K, Joubes J, Cools T et al. (2007) *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. Plant Cell 19:211–225
- [13] Dissmeyer N, Weimer AK, Novak B et al. (2010) The regulatory network of cell-cycle progression is fundamentally different in plants versus yeast or metazoans. Plant Signal Behav (im Druck)

Korrespondenzadresse:

Dr. Nico Dissmeyer
 Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP)
 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
 12, rue du Général Zimmer
 F-67000 Strasbourg
 Tel. : +33-(0)388-4172-71
 diss@mpipz.mpg.de
 nico.dissmeyer@ibmp-cnrs.unistra.fr

AUTOR



Nico Dissmeyer

Jahrgang 1979. 1999–2002 Studium der Biochemie und Philosophie an der Universität Tübingen. 2002–2004 Studium der Biochemie und Biophysik an der Oregon State University, Corvallis, USA und der FU Berlin. 2004–2005 Diplomarbeit am MPI für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln. Dort 2005–2009 Dissertation in Biochemie bei PD Dr. A. Schnittger mit einem Stipendium der International Max Planck Research School (IMPRS). 2009 Postdoktorand am Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) des CNRS in Straßburg.