

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**CYKLÍN-DEPENDENTNÉ KINÁZY**  
**ZELENÝCH RIAS**  
***CHLAMYDOMONAS A SCENEDESMUS***

doktorská dizertační práce

**Mária Čížková**

Školitel: RNDr. Vilém Zachleder, CSc.

Školitel-špecialista: Mgr. Kateřina Bišová, PhD.

Mikrobiologický ústav AV ČR, Oddělení autotrofních mikroorganismů

Opatovický mlýn, Třeboň

České Budějovice

2007

## Doktorská dizertačná práca

Čížková, M., 2007: Cyklin-dependentné kinázy zelených rias *Chlamydomonas* a *Scenedesmus*. [Cyclin-dependent kinases of green algae *Chlamydomonas* and *Scenedesmus*. Ph.D. Thesis, in Slovak.] – 85 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, the Czech Republic.

**Anotace:** Several processes of the cell cycle control in green algae *Chlamydomonas* and *Scenedesmus* dividing by multiple fission were studied. In *Chlamydomonas reinhardtii* we followed the capability of its cyclin-dependent kinases to complement yeast temperature-sensitive mutants, the possible role of *UVSXI* and *UVSX2* genes in the cell cycle regulation in response to DNA damage, and the involvement of endogenous circadian clock in the timing of the cell division. In *Scenedesmus quadricauda*, regulation and timing of reproductive processes, changes in cyclin-dependent kinase activity, and mechanism of chloroplast division timing were monitored with regard to the effects of inhibition of DNA replication.

Táto práca je súčasťou riešenia projektov financovaných grantmi GAAV B5020305, GAAV A500200614, GAČR 204/06/0102, GAČR 301/03/0289, APVT-20-002604, VEGA 1/3243/06, VEGA 1/2337/05, SK-CZ-06906, EUREKA OE221.

Prehlasujem, že som túto doktorskú dizertačnú prácu vypracovala samostatne, len s použitím citovanej literatúry.

Prehlasujem, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platnom znení súhlasím so zverejnením svojej dizertačnej práce, a to v úprave vzniknutej vypustením vyznačených častí archivovaných fakultou elektronickou cestou vo verejne prístupnej časti databázy STAG prevádzkovanvej Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jej internetových stránkach.

V Třeboni, 7. 12. 2007

Mária Čížková

## Prehlásenie

Jako korespondenční autor a jako vedoucí Laboratoře buněčných cyklů řas prohlašuji, že publikace a rukopisy uvedené jako součást doktorské dizertační práce Mgr. Márie Čížkové jsou výsledkem kolektivní práce všech členů nebo hostů zmíněné laboratoře bez ohledu na pořadí autorů. Mgr. Mária Čížková se výrazně teoreticky i prakticky podílela na všech experimentech včetně jejich vyhodnocování a na přípravě rukopisů k publikaci. Přispěla zejména svými zkušenostmi v oblasti molekulárních a transformačních technik.

RNDr. Vilém Zachleder, CSc.

Jako spoluautoři a členové výzkumné skupiny potvrzujeme výše uvedené prohlášení:

Mgr. Kateřina Bišová, Ph.D. ....

RNDr. Milada Vítová, Ph.D. ....

Mgr. Jana Hendrychová, Ph.D. ....

Mgr. Monika Hlavová .....

Mgr. Dáša Umysová .....

Jako spoluautoři potvrzujeme výše uvedené prohlášení:

Prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc. ....

Doc. Ing. Alena Pichová, Ph.D. ....

RNDr. Eliška Gálová, Ph.D. ....

RNDr. Barbara Sviežená, Ph.D. ....

RNDr. Andrea Ševčovičová, Ph.D. ....

Mgr. Alena Hamzová .....

## **Pod'akovanie**

Ďakujem RNDr. Vilémovi Zachlederovi, Csc. za priateľský a ľudský prístup pri vedení mojej doktorskej práce a za možnosť stať sa členom Laboratória bunkových cyklov rias. Ďakujem mojej odbornej školiteľke Mgr. Kateřine Bišovej, PhD., za užitočné rady, pomoc pri získavaní odborných skúseností, trpezlivosť a hlavne za dôveru v moje schopnosti.

Veľmi si cením nezištnú pomoc a ochotu všetkých spolupracovníkov laboratória, ktorí vytvárali na pracovisku príjemnú priateľskú atmosféru.

Svojim rodičom a blízkej rodine som vďačná za ich záujem o moju prácu a za ich podporu a všestrannú pomoc počas štúdia.

Venované môjmu manželovi Stanovi a dcérke Katuške.

## Zoznam priložených publikácií a rukopisov

### Publikácia 1

Čížková M., Pichová A., Vítová M., Hlavová M., Hendrychová J., Umysová D., Gálová E., Ševčovičová A., Zachleder V., and Bišová K.: CDKA and CDKB kinases from *Chlamydomonas reinhardtii* are able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma*, v tlači.

### Publikácia 2

Sviežená B., Ševčovičová A., Gálová E., Hamzová A., Hendrychová J., Čížková M., Bišová K., Vítová M., Zachleder V., Vlček D.: The response of novel *Chlamydomonas reinhardtii* *uvsX1* and *uvsX2* mutants to DNA damage and the implications for cell cycle regulation. *Plant Cell Reports*, v 2. recenznom konaní.

### Publikácia 3

Vítová M., Bišová K., Hendrychová J., Čížková M., Hlavová M., Umysová D., Zachleder V.: A circadian clock is not involved in the timing of cell division in the alga *Chlamydomonas reinhardtii*, rukopis.

### Publikácia 4

Hendrychová J., Vítová M., Čížková M., Bišová K., Zachleder V.: Chloroplast fission in the alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) occurs normally in the presence of extremely elevated mitotic cyclin-dependent kinase activity. *Protoplasma*, v recenznom konaní.

# Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | ÚVOD.....  | 1  |
| 2     | LITERÁRNY PREHĽAD .....  | 2  |
| 2.1   | Modelové organizmy <i>Chlamydomonas</i> a <i>Scenedesmus</i> ..... | 2  |
| 2.1.1 | Základná charakteristika.....                                      | 2  |
| 2.1.2 | Bunkový cyklus s násobným delením.....                             | 3  |
| 2.2   | Kontrola bunkového cyklu.....                                      | 5  |
| 2.2.1 | Cyklín-dependentné kinázy.....                                     | 6  |
| 2.2.2 | Cyklíny.....   | 7  |
| 2.3   | Regulácia CDK.....   | 8  |
| 2.3.1 | Väzba cyklínu a fosforylácia.....                                  | 8  |
| 2.3.2 | Inhibítory.....  | 9  |
| 2.3.3 | Degradácia cyklínov.....   | 10 |
| 2.4   | Kontrola bunkového cyklu rastlín.....                              | 10 |
| 2.4.1 | Rastlinné CDK a cyklíny.....                                       | 11 |
| 2.4.2 | Riasové CDK a cyklíny.....   | 13 |
| 2.5   | Substráty komplexov CDK-cyklín.....                                | 15 |
| 3     | ZHRNUTIE VÝSLEDKOV .....   | 17 |
| 3.1   | Komplementačný test.....   | 17 |
| 3.2   | Charakterizácia <i>uvsX1</i> a <i>uvsX2</i> mutantov .....         | 18 |
| 3.3   | Čirkadiálne hodiny a bunkové delenie .....                         | 20 |
| 3.4   | Časovanie chloroplastového delenia .....                           | 21 |
|       | Zoznam citovanej literatúry .....                                  | 23 |
|       | Publikácia 1 .....   | 32 |
|       | Publikácia 2 .....   | 40 |
|       | Publikácia 3 .....   | 42 |
|       | Publikácia 4.....  | 44 |

# 1 ÚVOD

Dizertačnú prácu som vypracovala na Mikrobiologickom ústave AV ČR, v Laboratóriu bunkových cyklov rias v Třeboni, ktoré sa zaoberá kultiváciou riasových kultúr a štúdiom bunkových cyklov už po dobu vyše 35 rokov. Jednobunkové zelené riasy rodu *Chlamydomonas* a *Scenedesmus* sa rozmnožujú netradičným mnohonásobným delením a vďaka nenáročnej kultivácii a jednoduchej synchronizácii sú výbornými modelovými organizmami pre štúdium bunkového cyklu na fyziologickej, cytologickej a v posledných rokoch aj na molekulárno-biologickej úrovni.

Táto práca je nedielnou súčasťou aktuálneho výzkumneho programu Laboratória a obsahuje publikácie, ktorých obsah síce nie je monotematický, ale napriek rozdielnemu vedeckému prístupu ich spája záujem o podrobnejšie pochopenie princípov a mechanizmov regulácie bunkového cyklu u vyššie spomínaných modelových organizmov *Chlamydomonas* a *Scenedesmus*.

## 2 LITERÁRNY PREHĽAD

### 2.1 Modelové organizmy *Chlamydomonas* a *Scenedesmus*

#### 2.1.1 Základná charakteristika

Riasy druhu *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda* sú výbornými modelovými organizmami pre štúdium regulácie bunkového cyklu, fotosyntézy, fototaxie, biogenézy organel, metabolizmu a gametogenézy a takisto pre rôznorodé toxikologické štúdie. Tiež sú potrebné pre štúdium reparácie DNA eukaryotických fotoautotrofných buniek a sú dostupné pre molekulárnobiologické a biochemické analýzy.

*Chlamydomonas reinhardtii* (kmeň Chlorophyta, trieda Chlorophyceae) (obr.1) je zelená jednobunková riasa, približne 10  $\mu\text{m}$  dlhá a 3  $\mu\text{m}$  široká, s dvoma bičkami na



**Obr. 1**

*Chlamydomonas reinhardtii*

anteriornom konci. V bunkách je prítomné haploidné jadro, chloroplast s 1-2 pyrenoidmi, ktorý zaberá 40 % objemu bunky a niekoľko malých mitochondrií (Hoek et al., 1995). Energiu môže získavať fotoautotrofne (v prítomnosti svetla a  $\text{CO}_2$  ako jediného zdroja C), mixotrofne (v prítomnosti svetla a acetátu ako organického zdroja C) alebo heterotrofne

(využívaním acetátu v tme). Bunkové delenie riasových kultúr môže byť synchronizované striedaním períod svetla a tmy.

Bunky sa vyskytujú prevažne v haploidnom stave a rozmnožujú sa vegetatívne. V podmienkach hladovania na dusík a svetla z modrého spektra sa vegetatívne bunky vyvíjajú na gaméty, ktoré môžu mať párovací typ  $\text{mt}^+$ , alebo  $\text{mt}^-$  (Weissig and Beck, 1991). Kríženie prebieha po zmiešaní gamét opačného párovacieho typu. Za vhodných podmienok vzniká zygota, ktorá môže podstúpiť meiózu a produkovať tetradu haploidných spór. Tetrádová analýza spolu s jednoduchou a rýchlou genetickou analýzou haploidov a s možnosťou stabilnej DNA transformácie všetkých troch genómov poskytuje základ pre dobrý genetický modelový organizmus. Jadro môže byť transformované metódou sklenených guľičiek (Kindle, 1990), alebo elektroporáciou (Brown et al., 1991). Chloroplast a mitochondrie môžu byť transformované špecificky balistickou metódou (Boynton et al., 1988; Randolpherson et al., 1993).

Genetická mapa je zložená zo 148 lokusov zoskupených do 17 väzbových skupín. U druhu *C. reinhardtii* bola zistená odchýlka od univerzálneho genetického kódu (bias kód) u génov so silnou expresiou, ako sú napríklad gény kódujúce proteíny



fotosyntetického a bičíkového aparátu, alebo niektoré heat-shock proteíny (Harris, 1989). Inou charakteristickou črtou jadrových génov riasy *C. reinhardtii* je prítomnosť veľkého počtu intrónov. Napríklad gén pre Hsp70 heat-shock proteín obsahuje 6 intrónov, zatiaľ čo jeho kópia u rastlín neobsahuje žiaden, prípadne 1 intrón (Muller et al., 1992).

V roku 2007 bolo dokončené sekvenovanie jadrového genómu *Chlamydomonas* (Merchant et al., 2007) a jeho veľkosť sa odhaduje na 110 Mb, čo je porovnateľné s genómom rastliny *Arabidopsis thaliana*. Výhodou je však menší počet génových rodín, ktorý uľahčuje genetickú analýzu. Na rozdiel od vyšších rastlín a živočíchov je väčšina génov zodpovedných za reguláciu bunkového cyklu u *Chlamydomonas* prítomná v jednej kópii (Bišová et al., 2005). Chloroplastový a mitochondriálny genóm (GenBank accession U03843) je tiež sekvenovaný.

*Scenedesmus quadricauda* je sladkovodná zelená riasa (obr. 2), ktorá sa už desaťročia využíva ako modelový organizmus. Bunky rodu *Scenedesmus* sú bezbičíkaté a množia sa vegetatívne delením. Dcérske bunky pochádzajúce z delenia jednej materskej bunky sú spojené spoločnou bunkovou stenou a tvoria buď štvor- alebo osem-bunkové cenóbiom, ktorého koncové bunky majú dva ostne. Jednotlivé bunky obsahujú jadro a jednoduchý chloroplast s pyrenoidom. Chloroplastový a mitochondriálny genóm bol sekvenovaný u iného zástupcu rodu *Scenedesmus*, u *S. obliquus*.



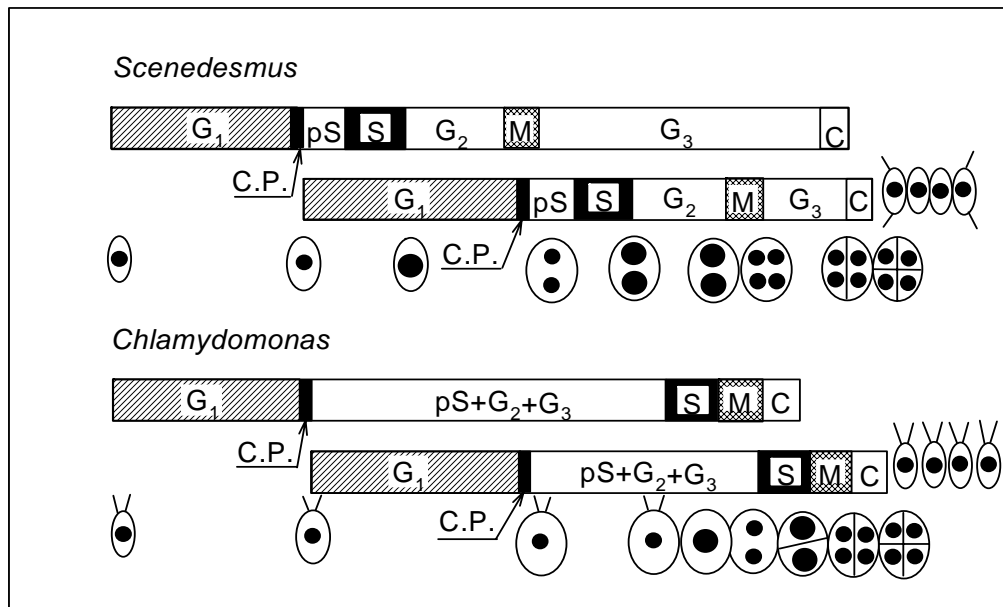
**Obr. 2**  
*Scenedesmus quadricauda*

Riasy môžu slúžiť nielen ako model regulácie bunkového cyklu vyšších rastlín, ale môžu byť užitočné aj v oblasti štúdia vzťahu medzi bunkovým a organelovým delením, prípadne pri štúdiu samotného delenia organel.

### **2.1.2 Bunkový cyklus s násobným delením**

Riasový bunkový cyklus začína podobne ako u ostatných organizmov rastovou fázou G1, ktorá je nasledovaná zdvojením DNA, rozdelením jadra a cytokínézou. U rias sa vyskytujú dva základné typy bunkového cyklu. Ide o bunkový cyklus typu C1, pri ktorom sa materská bunka rozdelí na 2 dcérske bunky. Častejšie sa vyskytuje bunkový cyklus typu Cn, ktorého výsledkom môže byť rôzny počet dcérskych buniek. Bunky rias *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda* sa množia spôsobom zvaným násobné delenie (Šetlík and Zachleder, 1984).

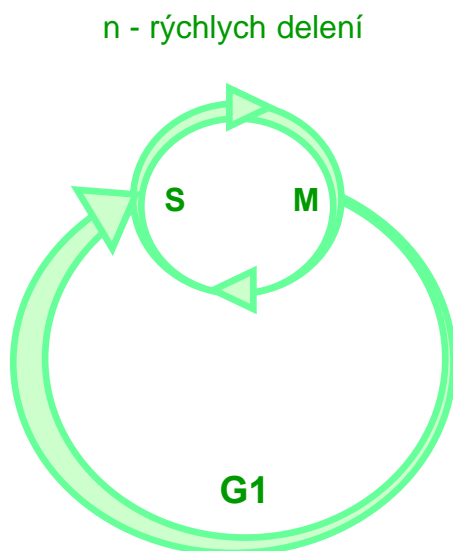
Bunkový cyklus s násobným delením prebieha dvoma odlišnými spôsobmi. Buď ako zoskupený (clustered) (typický pre *C. reinhardtii* a väčšinu z radu Volvocales), alebo postupný (consecutive) s mnohojadrovým štádiom (typický pre *S. quadricauda* a rod *Hydrodictyon*) (obr. 3).



**Obr. 3** Schéma bunkového cyklu rias *Scenedesmus* a *Chlamydomonas*.

Počas jedného cyklu typu Cn prebehnú n-krát pochody charakteristické pre fázy G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> a M. Cytokinéza môže byť niekedy časovo oddelená od mitózy a tento časový úsek je možné označiť ako fázu G<sub>3</sub> (obr. 3) (Zachleder et al., 1997). Pre tento typ bunkového cyklu platí, že v čase, keď v riasovej bunke prebiehajú reprodukčné procesy (DNA replikácia a mitóza), bunka stále rastie a následne môže byť zahájené ďalšie delenie. V rámci jedného bunkového cyklu sa postupne spúšťa niekoľko radov reprodukčných procesov, ktoré sa navzájom prekrývajú (Šetlík et al., 1972; Zachleder and Šetlík, 1990; Zachleder and van den Ende, 1992; Zachleder, 1995).

U riasy *Chlamydomonas* je bunkový cyklus charakteristický predĺženou fázou G<sub>1</sub>, počas ktorej môžu bunky niekoľkonásobne (2<sup>n</sup>) zväčšiť svoj objem. Po rastovej fáze prebehne (n-krát) rýchla séria striedania fáz S (DNA syntéza) a M (mitóza) (obr. 4).



**Obr. 4** Schéma bunkového cyklu s násobným delením u *Chlamydomonas*

Jedna materská bunka takto produkuje  $2^n$  dcérskych buniek, kde „n“ je celé číslo udávajúce počet delení, tj. počet radov reprodukčných procesov, ktoré prebiehajú počas jedného bunkového cyklu. Každý z týchto radov je spustený v pomyselnom bode bunkového cyklu, tzv. bode rozhodnutia (CP; „commitment point“), ktorý je obdobou bodu ŠTART u kvasiniek a Restričného bodu v cicavčích bunkách (John, 1984; John, 1987). Tento veľkosťou riadený kontrolný bod (CP) dosiahnu bunky s každým zdvojením objemu. To, či konkrétna bunka (resp. populácia synchronných buniek) prešla v určitom

okamihu bodom rozhodnutia, je možné určiť spätne. O dosiahnutí CP totiž vypovedá schopnosť bunky rozdeliť sa, teda absolvovať všetky reprodukčné procesy bez ďalšieho dodania energie, ktorú u fotoautotrofných organizmov predstavuje svetlo (Šetlík et al., 1972; Zachleder and Šetlík, 1990; Zachleder and van den Ende, 1992; Zachleder, 1995). V podmienkach striedania periódy svetla a tmy je možné riasové bunky jednoducho synchronizovať, pričom rastová fáza prebieha za svetla a fázy S a M prebiehajú v krátkom intervale za tmy.

Z uvedeného popisu je zrejmé, že priebeh násobného delenia riasových buniek musí byť starostlivo regulovaný. Táto regulácia je založená na obdobných molekulárnych princípoch (John et al., 1989; Zachleder et al., 1997; Bišová et al., 2000) ako pri delení na 2 dcérske bunky, ktoré je preštudované napr. u kvasiniek alebo cicavčích buniek.

## 2.2 Kontrola bunkového cyklu

U jednobunkových aj u mnohobunkových eukaryotov je bunkové rozmnožovanie cyklický proces rastu, ktorý zahŕňa mitózu (karyokinézu) a bunkové delenie (cytokinézu). Život bunky ohraničený dvoma deleniami je označovaný ako bunkový cyklus, ktorý predstavuje sekvenciu na sebe závislých dejov. Iniciácia neskoršej udalosti nastane iba po úspešnom ukončení predchádzajúcej udalosti.

Bunkový cyklus je starostlivo kontrolovaný prechodom cez regulačné body. V týchto bodoch sa rozhoduje, či je bunka schopná pokračovať v bunkovom cykle. Kontrolné body sú označované ako „checkpoints“ alebo „restriction points“. Hoci je kontrolných bodov v priebehu bunkového cyklu mnoho, dva z nich sa považujú za kľúčové. Jeden sa nachádza

v druhej polovici fázy G1 a spúšťa reprodukčné procesy. U kvasiniek sa tento bod označuje ako „ŠTART“. U ostatných organizmov, vrátane rias, je označovaný termínom „commitment point“ (CP). V prípade nedostatočnej veľkosti bunky alebo poškodenia DNA je daná bunka zadržaná vo fáze G1, lebo nie je schopná vstúpiť do fázy S. V druhom kľúčovom bode vo fáze G2 sa spúšťajú procesy vedúce k jadrovému deleniu. Ak sa DNA nereplikuje, prípadne bunka nie je dost' veľká a je v nepriaznivom prostredí, tak nie je schopná vstúpiť do fázy M. Avšak nie všetky kontrolné body upozorňujú na DNA poškodenia, či replikačné chyby. Genómová stabilita vyžaduje tiež presné rozdelenie chromozómov v mitóze. V tomto prípade je dôležitý kontrolný bod, ktorý sa vyskytuje vo fáze M a kontroluje správnosť pripojenia chromozómov k mitotickému vretienku.

Prechod týmito kontrolnými bodmi bunkového cyklu regulujú heterodimerické kinázy. Enzýmy tvorí katalytická podjednotka cyklín-dependentná kináza (CDK) a regulačná podjednotka cyklín, ktorá umožňuje periodickú aktiváciu CDK. CDK kontrolujú prechod medzi fázami G1/S i G2/M (zahájenie replikácie DNA a vstup do mitózy) u organizmov vo všetkých troch ríšach: v kvasinkách (Lörincz and Reed, 1984; Hindley et al., 1987), v živočíšnych bunkách (Fang and Newport, 1991; Murray, 2004) aj v rastlinných bunkách (Doonan and Fobert, 1997; Dewitte and Murray, 2003).

### 2.2.1 Cyklín-dependentné kinázy

Cyklín-dependentné kinázy patria do rodiny proteínových kináz fosforylujúcich serínové a treonínové zvyšky (Ser/Thr) (Hindley and Phear, 1984). Úlohou cyklín-dependentných kináz je fosforylovať a tým regulovať množstvo proteínov potrebných pre DNA replikáciu a mitózu (Murray, 2004). Medzi cieľové proteíny patria napr. transkripčné faktory, Rb proteín, proteíny jadrovej membrány a cytoskeletu a mnohé ďalšie.

Kľúčová funkcia CDK bola najskôr popísaná v regulácii mitotických procesov u živočíšnych a kvasinkových buniek ako tzv. MPF („mitosis promoting factor“). Na základe prvotnej identifikácie génu získala táto mitotická kináza označenie cdc2 (cell division cycle mutant) (Nurse, 1980) a podľa molekulovej hmotnosti 34 kDa nesie názov p34 (Simanis et al., 1986).

Za reguláciu celého bunkového cyklu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* zodpovedá jediná CDK s PSTAIRE motívom (CDC28/cdc2) (Nurse and Bissett, 1981; Mendenhall and Hodge, 1998), hoci sekvenácia kvasinkového genómu odhalila prítomnosť 5 CDK medzi 113 proteínovými kinázami (Hunter and Plowman, 1997; Andrews and Measday, 1998). Kináza Cdc28 (Cdc2) vytvára komplexy

s rôznymi cyklínovými podjednotkami a v závislosti na zmene cyklínovej podjednotky sa mení aj substrátová špecificita danej kinázovej aktivity. Cdc28 (Cdc2) svojou aktivitou reguluje deje v G1 aj G2 checkpointe.

Na rozdiel od kvasiniek, sú v regulácii bunkového cyklu u vyšších eukaryotov zahrnuté viaceré kinázy. Napr. u človeka sa na regulácii BC podieľajú tri PSTAIRE kinázy (CDK1, CDK2 a CDK3) a dve ďalšie CDK4/6 kinázy s P(I/L)ST(V/I)RE motívom (Meyerson et al., 1992; Reed, 1997; Lee and Yang, 2003). Každá z týchto kináz môže asociovať s rôznymi cyklínmi, ktoré určujú substrátovú špecificitu a vzniknuté komplexy vykazujú aktivitu v odlišných štádiách bunkového cyklu, čo svedčí o komplexnejšej a špecializovanejšej kontrole bunkového cyklu vyšších eukaryot.

## 2.2.2 Cyklíny

Cyklíny sú proteíny s krátkym polčasom rozpadu, ktoré sa v priebehu bunkového cyklu rýchlo obnovujú. Dostali názov podľa toho, že ich koncentrácia kolíše v pravidelných intervaloch počas bunkového cyklu následkom rýchlych zmien syntézy (transkripcie) a proteolýzy (ubiquitínom-riadenej degradácie) týchto proteínov (Morgan, 1995). Väzba cyklínu na CDK a následné vytvorenie heterodiméru cyklín-CDK je nevyhnutnou podmienkou pre kinázovú aktivitu.

V rôznych fázach bunkového cyklu asociujú s CDK rôzne typy cyklínov. U *Saccharomyces cerevisiae* rozlišujeme cyklíny fázy G1 (Cln1, Cln2 a Cln3), ďalej cyklíny fázy S (Clb5 a Clb6) a nakoniec cyklíny fázy M (Clb1, Clb2, Clb3 a Clb4), ktoré pôsobia pri prechode z G2 do fázy M (Nasmyth, 1995, 1996). U rastlín a živočíchov existujú tri hlavné triedy cyklínov, regulujúcich bunkový cyklus. Cyklíny typu D pôsobia vo fáze G1, cyklíny typu A pôsobia vo fáze S a cyklíny typu B vykonávajú funkciu v mitóze. Zatiaľ čo rastlinné cyklíny A a B majú homológy u živočíchov, cyklíny typu D sa u rastlín a živočíchov odlišujú (Renaudin et al., 1996; Murray, 2004). U živočíchov cyklíny typu D asociujú s CDK4/6, avšak u rastlín asociujú s CDKA (Xiong et al., 1992; Bates et al., 1994). U cicavčích buniek sú v priebehu fázy G1 aktívne komplexy CDK s cyklínmi D (Cdk2, Cdk4, Cdk5) a s cyklínmi E (Cdk2), počas fázy S je Cdk2 asociovaná s cyklínom A a v priebehu fázy G2, ako aj na prechode G2/M sú aktívne komplexy Cdk1 s cyklínmi B a A (Sherr, 1993; Sherr, 1996).

## 2.3 Regulácia CDK

Eukaryotické serín-treonínové kinázy obsahujú 300 aminokyselinové katalytické jadro (Hanks and Hunter, 1995). Štruktúra katalytického jadra ľudskej monomérskej Cdk2 pozostáva z malej N-terminálnej časti bohatej na  $\beta$ -listy a z väčšej C-terminálnej časti bohatej na  $\alpha$ -helixy. Na rozhraní N- a C-terminálnej časti sa nachádza hlboký žliabok, ktorý obsahuje T-slučku a väzobné miesto pre ATP fosfát a substrát. V štruktúre monomérskej Cdk2 slúžia dve oblasti ako regulačné prvky (De Bondt et al., 1993). Jednou z nich je  $\alpha$ -helix s unikátnou sekvenciou PSTAIRE, ktorá sa vyskytuje iba u cyklín-dependentných kináz. Druhú tvorí T-slučka s aktivačným regulačným miestom.

### 2.3.1 Väzba cyklínu a fosforylácia

Kľúčovým krokom aktivácie kináz je naviazanie cyklínovej podjednotky na  $\alpha$ -helix s PSTAIRE motívom. Väzba cyklínu udelí kináze čiastočnú aktivitu. Hladina cyklínov je prísne kontrolovaná na úrovni transkripcie a ubiquitínom-sprostredkovej degradácie (Morgan, 1995). Aktivácia kinázy nastane v dôsledku konformačnej zmeny po väzbe cyklínu, ktorá indukuje rotáciu  $\alpha$ -helixu do katalytického žliabku. Zmena konformácie sprístupní okrem iného aj fosforylačné miesto (Thr 160) na T-slučke, čo umožní následnú celkovú aktiváciu kinázy.

Aktivita komplexov CDK-cyklín je ďalej regulovaná pozitívne i negatívne, a to buď fosforyláciou, väzbou s inhibítormi, alebo odstránením cyklínu a jeho degradáciou.

Ďalším krokom je teda fosforylácia komplexu CDK-cyklín prostredníctvom CDK-aktivujúcej kinázy (CAK) (Fisher and Morgan, 1994), ktorá zvyšuje kinázovú aktivitu až 100-násobne. Po fosforylácii Thr160 na T-slučke dochádza ku konformačnej zmene samotnej T-slučky a C-terminálnej časti ľudskej Cdk2 a je ukončená reorganizácia väzobného miesta pre substrát, ktorá začala väzbou cyklínu (Russo et al., 1996).

Naopak, fosforylácia Thr14 a Tyr15 má na Cdk2 aktivitu inhibičný vplyv. Vedľajší reťazec Tyr15 je zasunutý hlbšie do katalytického žliabku, tým je inhibovaná ATP fixácia a zablokovaná väzba substrátu. Aktivita komplexu CDK-cyklín je regulovaná negatívne kinázou Wee1, ktorá fosforyluje Thr14 a Tyr15 a pozitívne prostredníctvom fosfatázy Cdc25, ktorá odstráni inhibičné fosfátové skupiny (Morgan, 1995).

Homológ kvasinkového Wee1 proteínu bol charakterizovaný u kukurice a *Arabidopsis* (Sun et al., 1999; Sorrell et al., 2002). Nadexpresia rastlinných *WEE1* génov u *S. cerevisiae* inhibovala bunkové delenie. Inhibícia mitotickej CDK aktivity kinázou

Wee1 je pravdepodobne jedným z mechanizmov, ktoré blokujú G2/M prechod a aktiváciu endocyklov (Sun et al., 1999). Duálne špecifická fosfatáza Cdc25 defosforyluje Thr14 a Tyr15, čím znovu aktivuje komplex CDK-cyklín a umožní vstup bunky do fázy M. V genóme *Arabidopsis* nebol zatiaľ identifikovaný žiaden homológ génu *CDC25*. Avšak prítomnosť antagonistickej kinázy Wee1 svedčí o pravdepodobnej existencii Cdc25-podobnej regulácie rastlinných CDK (Zhang et al., 1996).

### 2.3.2 Inhibítory

Aktivita kináz v živočíšných bunkách môže byť zablokovaná inhibítormi bunkového cyklu, ktoré radíme do troch rodín (p21, KIP/CIP a INK4). Väzbou s proteínovými inhibítormi je regulovaná aktivita komplexov CDK-cyklín vo fáze G1. Inhibítory p21 a zástupcovia rodiny KIP/CIP môžu buď brániť fosforylácii CDK (Cdk2, Cdk4) kinázou CAK a zamedziť tak aktivácii CDK, alebo sa môžu viazať na aktívne komplexy CDK-cyklín, čím ich inhibujú (Sherr and Roberts, 1995; Pavletich, 1999). Inhibítory patriace do rodiny INK4 pôsobia nepriamo. Väzbou na samotnú CDK bránia jej spojeniu s cyklínom, ktorý by ju aktivoval a tiež zamedzujú väzbe ATP (Russo et al., 1998). INK4 inhibítory sa však môžu naviazať aj na vytvorený komplex, čo svedčí o ich viacnásobnom mechanizme účinku (prehľad (Serrano, 1997; Pavletich, 1999).

Inhibítory p27 z rodiny KIP/CIP sa viaže na fosforylovaný komplex, pričom interaguje s CDK aj s cyklínom. Dovnútra katalytického žliabku začleňuje malý  $3_{10}$ -helix, ktorý priamo blokuje väzbu ATP. Kináza môže byť naďalej inhibovaná aj v neprítomnosti  $3_{10}$ -helixu, pretože v dôsledku väzby inhibítora sa zmení tvar katalytického žliabku (Polyak et al., 1994).

Inhibítory p16 z rodiny INK4 sa viaže vedľa katalytického žliabku a interaguje s N- aj s C- terminálnou časťou Cdk6 (Russo et al., 1998; Brotherton et al., 1998). Zablokovanie väzby cyklínu je nepriame a to prostredníctvom alosterickej zmeny CDK, ktorá má za následok zmenu cyklín väzobného miesta. Interakcia inhibítora p16 s CDK je podmienená rotáciou N- a C- terminálnej časti zhruba o  $15^\circ$  pozdĺž vertikálnej osi. Podobne ako cyklín, aj inhibítory p16 vyžaduje pre svoju aktivitu interakciu s CDK terminálnymi časťami, ale každý v odlišnej relatívnej orientácii. Inhibítory rodiny INK4 sú schopné súťažiť s cyklínmi rodiny D vo väzbe na Cdk4 a Cdk6 a znemožniť vznik komplexu pri prechode z G1 do fázy S (Sherr and Roberts, 1995; Zavitz and Zipursky, 1997). Väzobné miesta pre inhibítory a cyklín sa však neprekrývajú, takže INK4 proteíny sa môžu viazať aj na komplex CDK-cyklín.

### 2.3.3 Degradácia cyklínov

K odstráneniu cyklínu z komplexu s CDK a k jeho následnej degradácii dochádza na prechode z fázy G1 do fázy S a v mitóze. Degradácia jednotlivých cyklínov je nevyhnutná pre vstup bunky do fázy S, pre dokončenie mitózy a následný vstup do ďalšej fázy G1. Cyklíny sú degradované proteolýzou závislou na proteíne ubiquitín (King et al., 1996). Ubiquitín je malý vysoko konzervovaný proteín, ktorý slúži ako značka pre zničenie proteínu v proteazóme 26S (Ciechanover and Schwartz, 1998).

U *Saccharomyces cerevisiae* je pre deštrukciu cyklínu na prechode G1/S nutná prítomnosť proteínu Cdc34 („ubiquitin conjugating enzyme“) z rodiny E2 (Goebl et al., 1988). Pre prechod bunky do fázy S nie je však odstránenie G1 cyklínov z komplexu CDK-cyklín kľúčové. Omnoho dôležitejšia je degradácia kvasinkového proteínu Sic1, ktorý je funkčný homológ cicavčieho inhibítora p27 z rodiny KIP/CIP (Barberis et al., 2005). Sic1 sa viaže na komplex CDK-cyklín fázy S (Cdc28/Clb5,6), čím blokuje jeho aktivitu potrebnú pre iniciáciu DNA replikácie (Schwob et al., 1994). Komplex CDK-cyklín fázy S je vytvorený už počas fázy G1, ale až po degradácii proteínu Sic1 sa daný komplex stáva aktívny (Mendenhall, 1993). Signálom pre proteolýzu cyklínov fázy G1 a inhibítora Sic1 je ich fosforylácia. Cyklíny fázy G1 sa autokatalyticky fosforylujú kinázou Cdc28 (Cdk1) a sú preto konštitutívne nestabilné. Inhibitor Sic1 je fosforylovaný až komplexom kinázy Cdc28 s cyklínmi fázy G1 v neskorom štádiu G1 a následne je destabilizovaný pri vstupe do fázy S (Wittenberg and Reed, 2005).

Mitotické procesy sú závislé na aktívnom komplexe CDK s cyklínmi fázy S, ktorý bol označovaný ako MPF („maturation promoting factor“) (Minshull, 1989). Po určitej dobe aktivity navodí MPF svoje zrušenie spustením proteolýzy mitotických cyklínov, ktoré je potrebné pre dokončenie telofázy (cyklín B). Proteolytická degradácia sa uskutoční v prípade, že cyklíny obsahujú aminokyselinový motív označovaný ako deštrukčný box (D-box) (Sudakin et al., 1995). Za degradáciu cyklínov fázy M je zodpovedný komplex E3 („ubiquitin protein ligase“) označovaný tiež ako APC („anaphase promoting complex“) (King et al., 1995).

## 2.4 Kontrola bunkového cyklu rastlín

Objav konzervovanej skupiny génov kontrolujúcich eukaryotický bunkový cyklus významne prispel k molekulárnemu rozlúšteniu rastlinného bunkového cyklu (Mironov et al., 1999). Gény pre CDK a mitotické cyklíny boli prvé gény bunkového cyklu



charakterizované u rastlín (Colasanti et al., 1991; Ferreira et al., 1991; Hirt et al., 1991). Rastlinný homológ p34/cdc2 bol ako prvý identifikovaný u jednobunkovej zelenej riasy *Chlamydomonas* (John et al., 1989; John et al., 1991). Cyklín dependentné kinázy a im odpovedajúca kinázová aktivita bola popísaná aj v ďalších riasách (John et al., 1989; Bišová et al., 2000; Bišová et al., 2005; Corellou et al., 2000; Corellou et al., 2005).

V súčasnosti predstavujú CDK asi 50 odlišných sekvencií u viac ako dvadsiatich druhov nižších i vyšších rastlín (Joubes et al., 2000). Rastlinné CDK vykazujú vysoký stupeň homológie, ale aj určité štruktúrne a funkčné rozdiely v porovnaní s kvasinkovými a živočíšnymi CDK (Jacobs, 1995; Mironov et al., 1999; Umeda et al., 1999).

### 2.4.1 Rastlinné CDK a cyklíny

Vyššie rastliny kódujú 5 evolučne konzervovaných tried génov pre cyklín-dependentné kinázy, označované písmenami A-E (CDKA-E) (Joubes et al., 2000).

Do najpočetnejšej skupiny CDKA sa radia gény kódujúce CDK s konzervovaným PSTAIRE motívom. Rastlinná CDKA je schopná funkčne komplementovať kvasinkovú cdc2/Cdc28 (Colasanti et al., 1991; Ferreira et al., 1991; Hirt et al., 1991) a patrí do rovnakej skupiny ako ľudské CDK1, 2 a 3. Rastlinné CDKA sú príbuznejšie s kvasinkovými (Sc;CDC28, Sp;CDC2) a ľudskými (CDK1, 2 a 3) kinázami ako s rastlinnými kinázami z iných tried (B-E) u tých istých druhov (Bursens et al., 1998; Mironov et al., 1999). Rastlinné CDC2 homológy, ktoré sú schopné komplementovať kvasinkové mutanty, sú radené do tejto triedy aj napriek malej modifikácii PSTAIRE motívu (Colasanti et al., 1991; Hirt et al., 1993). Na transkripčnej a proteínovej úrovni rastlinné CDKA vykazujú konštitutívnu expresiu počas celého bunkového cyklu a v nízkej koncentrácii boli detekované aj v nedeliacich sa tkanivách (Martinez et al., 1992; Hemerly et al., 1993). Hladina proteínu CDKA behom bunkového cyklu vyšších rastlín nekolíše, to však neplatí o jeho aktivite (Bögge et al., 1997; Mironov et al., 1999). Kinázová aktivita prislúchajúca CDKA je zvýšená od fázy S až po mitózu (Mironov et al., 1999). Regulácia jeho kinázovej aktivity je založená na rovnakých princípoch, ako sú popísane v živočíšnej ríši. Hoci u kukurice a lucerny boli identifikované 2 gény CDKA, ktorých produkty môžu regulovať buď G1/S alebo G2/M prechod (Colasanti et al., 1991; Hirt et al., 1993), niektoré druhy rastlín majú len jednu CDKA (Joubes et al., 2000). Na rozdiel od situácie vo vyšších rastlinách, hladina p34/cdc2 v jednobunkovej riasе *Chlamydomonas* osciluje podľa priebehu bunkového cyklu (John et al., 1989).

Rastliny majú aj ďalšie gény podobné *cdc2*, nemožno ich však považovať za jej homológy, pretože nemajú konzervovanú sekvenciu PSTAIRE a zároveň nie sú schopné komplementovať funkciu *cdc2* v kvasinkách. Tieto CDK sú podľa modifikácie motívu PSTAIRE rozdelené do tried B-F.

CDKB je špecifický rastlinný typ cyklín-dependentných kináz, ktoré boli nájdené u všetkých rastlín. Konzervovaný sekvenčný motív (PSTAIRE) je modifikovaný na PPTALRE (CDKB1) alebo PPTTLRE (CDKB2). Na rozdiel od CDKA, CDK typu B sú exprimované iba medzi fázami S a M, kde pravdepodobne spĺňajú svoju funkciu (Mironov et al., 1999; Porceddu et al., 2001; Boudolf et al., 2004). Presná funkcia tohto typu nie je ešte do detailu objasnená, ale na základe intracelulárnej lokalizácie a účinkov ektoptickej nadexpresie sa predpokladá, že CDKB zohráva úlohu v kontrole G2/M prechodu pri vstupe bunky do mitózy. Rastlinné CDKB nie sú schopné komplementovať kvasinkové *cdc2/cdc28* mutanty (Mironov et al., 1999; Boudolf et al., 2004). V súčasnej dobe však bolo zistené, že CDKB z morskej jednobunkovej riasy *Ostreococcus tauri* (Corellou et al., 2005) a podobne aj CDKB z riasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Čížková et al., *in press*) sú schopné komplementovať kvasinkovú *CDC28* mutáciu.

Trieda CDKC je malá skupina rastlinných CDK s PITAIRE motívom, ktorý je prítomný aj v ľudskej CDK-príbuznej CHED kináze (Lapidotlieson et al., 1992) a v CDK9-príbuznej kináze u červa *Caenorhabditis elegans*. Kinázy z tejto triedy boli identifikované v hrachu, lucerne a rastline *Arabidopsis* (Bursens et al., 1998). CDK typu C majú podobne ako živočíšne CDK8 a CDK9 pravdepodobnú úlohu v kontrole transkripcie (Barroco et al., 2003).

CDKD a CDKF sú CDK-aktivačné kinázy (CAK) a slúžia k aktivácii CDKA (Umeda et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998; Yamaguchi et al., 2000; Shimotohno et al., 2003). CDKD potrebuje na vytvorenie aktívneho CAK komplexu väzbu s cyklínom H (Yamaguchi et al., 2000), zatiaľ čo CDKF, ktorá bola nájdená len u *Arabidopsis*, je schopná fungovať aj bez väzobného partnera.

Do triedy CDKE sa zaraďuje ojedinelá sekvencia *cdc2MsE* lucerny, ktorá obsahuje SPTAIRE motív. Funkcia rastlinných CDK typu E nebola doposiaľ zistená.

Po identifikácii rastlinných CDK boli rýchlo izolované cyklíny z rôznych druhov rastlín (Hata et al., 1991; Hemerly et al., 1992; Hirt et al., 1992; Renaudin et al., 1994). Expresia rastlinných cyklínov je obmedzená iba na deliace sa bunky (Hirt et al., 1992; Ferreira et al., 1994; Szarka et al., 1995). V rastlinnej ríši došlo k výraznej amplifikácii cyklínov, napr. *Arabidopsis thaliana* obsahuje 30 cyklínových génov rozdelených do

štyroch tried (A, B, D a H) (Vandepoele et al., 2002). V rastlinách pravdepodobne chýbajú cyklíny typu E (Vandepoele et al., 2002).

Cyklíny typu A majú funkciu vo fáze S a cyklíny typu B hrajú úlohu pri vstupe do mitózy. Hladina cyklínov typu A podobne ako cyklínov typu B je kontrolovaná proteolytickou degradáciou, za ktorú zodpovedá N-terminálny deštrukčný box (Genschik et al., 1998). Cyklíny typu A sú exprimované pred cyklínmi typu B, a to na začiatku fázy S (Fuerst et al., 1996; Ito et al., 1997). Mitotický cyklín B2 interaguje špecificky s CDKB a tento komplex je v bunkách tabaku pravdepodobne dôležitý pre udržanie chromozómov v metafáznom postavení. Po metafáze je cyklín B2 degradovaný a dokončenie delenia riadi CDKB v komplexe s iným cyklínom (Lee et al., 2003).

Cyklíny typu D pôsobia v G1 fáze. Väčšina cyklínov typu D obsahuje typický motív LXCXE pre väzbu proteínu Rb (Huntley et al., 1998; Vandepoele et al., 2002). Za charakteristickú funkciu cyklínov D je považované spustenie replikácie DNA, ale cyklín D3 je schopný indukovať aj mitózu (Schnittger et al., 2002).

Gény kódujúce cyklíny typu H boli objavené u rastliny *Arabidopsis*, ryže a topoľa (Vandepoele et al., 2002; Yamaguchi et al., 2000). Cyklín H u ryže špecificky interaguje s CAK R2, ale nie s ostatnými CDK, čo naznačuje, že je regulačnou podjednotkou CAK (Yamaguchi et al., 2000).

## 2.4.2 Riasové CDK a cyklíny

Zelená riasa *Chlamydomonas* kóduje homológy všetkých typov rastlinných CDK (CDKA1, B1, C1, D1 a E1) okrem CDKF. Navyše však kóduje štyri nové členy CDK rodiny, ktoré nie sú homológy žiadnej známej CDK u rastlín ani CDK z iných databáz (tab. 1) (Bišová et al., 2005).

Gény pre CDKG1 a CDKG2 sú navzájom veľmi podobné, ale výrazne sa odlišujú v cyklín väzobnej doméne (SDSTIRE a AASTLRE). Gén CDKH1 kóduje proteín s PVSTIRE motívom. Štvrtá CDK kódovaná génom CDKI1 je veľmi podobná kináze CDKF u rastliny *Arabidopsis*, ale napriek tomu zjavne nebude CDKF homológom, pretože neobsahuje N-terminálnu inzerciu typickú pre CDKF.

| Rodina              |               | <i>S. cerevisiae</i> | ľidské | <i>Arabidopsis</i> | <i>Chlamy</i> |   |
|---------------------|---------------|----------------------|--------|--------------------|---------------|---|
| <b>CDK</b>          | CDKA          | 1                    | 3 (6)  | 1                  | 1             |   |
|                     | CDKB          | 0                    | 0      | 4                  | 1             |   |
|                     | CDKC          | 1                    | 1      | 2                  | 1             |   |
|                     | CDKD          | 1                    | 1      | 3                  | 1             |   |
|                     | CDKE          | 1                    | 1      | 1                  | 1             |   |
|                     | CDKF          | 0                    | 0      | 1                  | 0             |   |
|                     | CDKG          | 0                    | 0      | 0                  | 2             |   |
|                     | CDKH          | 0                    | 0      | 0                  | 1             |   |
|                     | <b>Cyklín</b> | cyclin A             | 3      | 1                  | 10            | 1 |
|                     |               | cyclin B             | 3      | 2                  | 9             | 1 |
| cyclin D            |               | 3                    | 3      | 10                 | 3             |   |
| cyclin E            |               | 0                    | 1      | 0                  | 0             |   |
| cyclin AB           |               | 0                    | 0      | 0                  | 1             |   |
| <b>Wee1</b>         | Wee1          | 1                    | 2      | 1                  | 1             |   |
| <b>Cdc25/ -like</b> | Cdc25         | 1                    | 3      | 1                  | 3             |   |

**Tab. 1** Porovnanie regulátorov bunkového cyklu Bišová et al., Plant. Physiol. 2005

Expresné profily cyklín dependentných kináz u riasy *Chlamydomonas* sú podobné ako u rastlín. Mediátorová RNA (mRNA) kinázy CDKA1 je prítomná konštitutívne počas celého bunkového cyklu, ale jej expresia je zvýšená na začiatku rastovej fázy a následne počas fázy S/M. CDKB1 vykazuje 2 píky expresie, jeden počas prechodu CP (commitment point) a druhý veľmi ostrý počas fázy S/M. CDKC1 a E1 sú exprimované konštitutívne počas celého bunkového cyklu. Rovnako aj cyklín dependentné kinázy CDKG1 a H1 špecifické pre *Chlamydomonas* sú exprimované konštitutívne, ale na nízkej úrovni. Expresiu CDKD1, G2 a I1 nebolo možné z rôznych dôvodov určiť (Bišová et al., 2005).

U riasy *Chlamydomonas* boli identifikované homológy cyklínov typu A a B, označené CYCA1 a CYCB1 a tri cyklíny typu D, CYCD1, CYCD2, CYCD3. Pre cyklíny typu A a B je charakteristická prítomnosť deštrukčného boxu (D-box) v N-terminálnej doméne, ktorý je zodpovedný za ich degradáciu proteolýzou závislou na ubiquitíne (Glotzer et al., 1991). Rovnako ako rastlinné a živočíšne D-cyklíny aj CYCD2 a CYCD3 majú v ich N-terminálnej doméne LXCXE motív, ktorý je zodpovedný za väzbu RBR proteínu. *Chlamydomonas* kóduje dva nové typy cyklínov. Prvý je označený CYCAB1 a s cyklínmi A1 a B1 má podobný iba D-box motív v N-terminálnej doméne. Druhý CYCM1 je veľmi odlišný cyklín, ktorý nevykazuje podobnosť s ostatnými charakterizovanými skupinami cyklínov (Bišová et al., 2005). Cyklín H, ktorý po väzbe na CDKD tvorí CAK komplex (Fisher and Morgan, 1994; Makela et al., 1994; Yamaguchi et al., 2000), u riasy

*Chlamydomonas* chýba. Jeho funkciu pravdepodobne plní buď CYCC1 z veľmi príbuznej vetvy, alebo nový typ CYCM1 (Bišová et al., 2005).

Komplexy CDK-cyklín sú negatívne regulované Wee1 kinázami, ktoré fosforylujú konzervovaný Tyr zvyšok CDK podjednotky. Táto negatívna regulácia je dôležitá pre presné načasovanie mitózy (Gould and Nurse, 1989). Riasa *Chlamydomonas* má len jeden Wee1 homológ, kódovaný génom *WEE1*. Jeho expresia je zvýšená počas fázy S/M (Bišová et al., 2005).

Duálne-špecifická fosfatáza, kódovaná *CDC25* génom, pôsobí na CDK aktivačne tak, že odstráni inhibičné fosfátové skupiny (Russell and Nurse, 1986). Gény kódujúce funkčnú Cdc25 fosfatázu boli objavené u morskej riasy *Ostreococcus tauri* (Khadaroo et al., 2004), ale nie sú prítomné v genóme riasy *Chlamydomonas* ani rastliny *Arabidopsis*. V súčasnej dobe bola u *Arabidopsis* nájdená malá fosfatáza podobná CDC25, s funkčnou fosfatázovou doménou s rodanínom, ale bez N-terminálnej regulačnej domény, ktorá je typická pre CDC25 (Landrieu et al., 2004). Avšak tri proteíny v genóme *Chlamydomonas*, označené RPD1-3 (Bišová et al., 2005), vykazujú homológiu s doménami z CDC25 rodiny a majú katalytický motív nevyhnutný pre fosfatázovú aktivitu (Denu and Dixon, 1995; Fauman and Saper, 1996).

## 2.5 Substráty komplexov CDK-cyklín

CDK regulujú prechod bunkovým cyklom prostredníctvom fosforylácie svojich substrátov, pričom špecificita je daná cyklínovou podjednotkou. CKS (cyclin-dependent kinase subunit) proteíny sú homológy kvasinkového proteínu  $\text{suc1}^{\text{P13}}$ , ktorý sprostredkováva väzbu CDK so substrátmi, alebo s regulačnými proteínmi (Endicott and Nurse, 1995). Riasa *Chlamydomonas* má jediný CKS homológ, kódovaný génom *CKS1*, ktorého expresia je konštitutívna v priebehu celého BC (Bišová et al., 2005). Prítomnosť tohto proteínu u *Chlamydomonas* bola predvídaná už skôr na základe jeho reakcie so špecifickými protilátkami proti  $\text{suc1}^{\text{P13}}$  (John et al., 1991).

Mechanizmus regulácie prechodu G1/S sa zdá byť konzervovaný medzi cicavcami a rastlinami. U cicavcov je vstup do fázy S iniciovaný syntézou cyklínov typu D, ktoré tvoria komplex s CDK (Cdk4 alebo Cdk6). Substrátom daného komplexu CDK-cycD vo fáze G1 je retinoblastomový tumor supresorový proteín Rb.

RBR (Rb-related) proteíny a E2F/DP transkripčné faktory sú dôležitou súčasťou regulácie DNA replikácie u živočíchov a pravdepodobne hrajú podobnú úlohu aj v rastlinách (Weinberg, 1995; Gutierrez, 1998). Živočíchy a rastliny kódujú jeden alebo

viac RBR a niekoľko členov E2F/DP rodiny (Gutierrez, 1998; De Veylder et al., 2002; Dewitte and Murray, 2003). E2F a DP tvoria heterodimérický transkripčný faktor, ktorý nasadá na promotory génov potrebných pre spustenie a priebeh fázy S, ako je napr. tymidín kináza, DNA polymeráza  $\alpha$ , Cdk1 a niektoré cyklíny. Hypofosforylovaná forma RB proteínu sa viaže na komplex E2F/DP a bráni transkripcii. Na prechode G1/S je RB hyperfosforylovaný CDK, uvoľní z komplexu transkripčný faktor a tým umožní aktiváciu cieľových génov.

Prítomnosť Rb dráhy v regulácii bunkového cyklu rastlín bola dokázaná identifikáciou cyklínov typu D s LXCXE motívom, ktorý sprostredkováva väzbu s Rb proteínom. RBR gény boli ako prvé objavené u kukurice a neskôr aj u iných rastlinných druhov. RBR proteín je fosforylovaný CDKA kinázou asociovanou s cyklínom typu D. U riasy *Chlamydomonas reinhardtii* bol identifikovaný RBR proteín kódovaný *MAT3* génom, ktorého mutácia, prípadne strata vedie k chybnnej regulácii bunkovej veľkosti (Umen and Goodenough, 2001). V dôsledku toho sa malé mutantné bunky rozhodujú vo fáze G1 pre delenie a podstupujú viac radov fázy S a mitózy ako normálne bunky. Na rozdiel od RB mutantov, *mat3* mutanty nemajú skrátenú fázu G1 a nevstupujú do fázy S predčasne, z čoho vyplýva, že RB dráha u riasy *Chlamydomonas* má odlišnú úlohu ako u živočíchov.

E2F/DP podobné proteíny sú označované ako DEL (DP-E2F-like) proteíny u rastlín (Kosugi and Ohashi, 2002; Vandepoele et al., 2002) a ako E2F7 proteíny u živočíchov (de Bruin et al., 2003; Di Stefano et al., 2003; Logan et al., 2004). V genóme *Chlamydomonas* sa našli gény kódujúce proteíny s DNA väzobnými doménami podobné E2F/DP rodine. *E2F1* kóduje E2F homológ a *DPI* kóduje DP homológ. Ani jeden z nich nevykazuje značnú sekvenčnú homológiu s konzervovanou C-terminálnou RBR-väzobnou doménou ani s transkripčnou aktivačnou doménou v rastlinných a živočíšnych E2F. Tretí gén *E2FRI* kóduje proteín čiastočne podobný E2F/DP rodine transkripčných faktorov. Pravdepodobne pôsobí ako nový typ E2F represoru u riasy *Chlamydomonas* (Bišová et al., 2005).

Substrátom mitotického komplexu CDK-cyklín v mitóze je proteín lamín, ktorý je zložkou jadrovej membrány. Jeho fosforylácia vedie k rozpadu membrány, ktorý je pre mitózu nevyhnutný. Známe sú aj interakcie komplexu CDK-cyklín s cytoskeletovými proteínmi, ktoré sa podieľajú na mitotickom delení, ako napr. s aktínom a tubulínom. Histón H1 je špecifickým substrátom mitotického komplexu CDK-cyklín, ale nie je fosforylovaný ostatnými serín/treonínovými kinázami. Po fosforylácii histónu H1 dochádza ku kondenzácii chromozómov.

### 3 ZHRNUTIE VÝSLEDKOV

Súčasťou dizertačnej práce sú 4 priložené publikácie, z ktorých každá obsahuje literárny úvod, podrobné metódy, výsledky a diskusiu, prislúchajúce jednotlivým témam. V tejto časti uvádzam ich skrátenú podobu s najpodstatnejšími informáciami (údajmi).

#### 3.1 Komplementačný test

**Publikácia 1:** Čížková M., Pichová A., Vítová M., Hlavová M., Hendrychová J., Umysová D., Gálová E., Ševčovičová A., Zachleder V., and Bišová K.: CDKA and CDKB kinases from *Chlamydomonas reinhardtii* are able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma*, v tlači.

Hoci je riasa *C. reinhardtii* intenzívne študovaná ako model eukaryotického bunkového cyklu, schopnosť komplementovať kvasinkové teplotne-senzitívne mutanty prostredníctvom riasových génov kódujúcich cyklín-dependentné kinázy (CDK) nebola doposiaľ preskúmaná. Preto sme sa rozhodli overiť, či CDKA (PSTAIRE kináza) a CDKB (rastlinne špecifická non-PSTAIRE kináza) z riasy *Chlamydomonas* môžu komplementovať *cdc28* mutáciu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

cDNA pre CDKA1 (CrCDKA) a CDKB1 (CrCDKB) z *Chlamydomonas* boli rekombinované z plazmidu pENTR do kvasinkového expresného vektoru pYES-DEST52, ktorý nesie *ura3* gén. Expresia z tohto vektoru bola kontrolovaná prostredníctvom inducibilného GAL1 promotora. Výsledné plazmidy, nazvané pYD52-CrCDKA a pYD52-CrCDKB, boli transformované do *S. cerevisiae CDC28* mutantného kmeňa *cdc28-1N*. Na základe rastu a morfológie kvasinkových transformantov, ako aj farbenia ich mikrotubulového systému, sme dospeli k záveru, že obe CDKA i CDKB sú schopné komplementovať mitotickú poruchu *cdc28-1N* mutanta *S. cerevisiae*.

Funkčná komplementácia *CDC28* mutanta bola závislá na transkripcii riasovej cDNA pre CDKA alebo CDKB. Vyplýva to z toho, že transformované bunky rástli v restričnej teplote (36°C), ak boli pestované v indukčnom médiu s obsahom galaktózy a rafinózy, ale nerástli v represnom glukózovom médiu pri tej istej teplote. Kmeň *cdc28-1N*, použitý pre daný komplementačný test, má poškodenú kontrolnú funkciu *CDC28* génu v G2/M prechode (Surana et al., 1990). CDKA je u riasy *Chlamydomonas* exprimovaná konštitutívne počas celého bunkového cyklu, zatiaľčo CDKB je exprimovaná prednostne počas S/M fázy (Bišová et al., 2005; Fang et al., 2006).

Táto práca dokazuje, že rovnako ako CDK typu A aj CDK typu B riasy *C. reinhardtii* je schopná komplementovať G2/M blok u teplotne-senzitívneho kvasinkového mutantu *cdc28-1N*. To naznačuje, že obe riasové kinázy by mohli hrať úlohu v regulácii mitózy, čo je v súlade s predpokladanou funkciou A- a B-typu CDK u vyšších rastlín. Je veľmi pozoruhodné, že schopnosť komplementovať CDC28 mutáciu bola dokázaná už u dvoch riasových CDK typu B, konkrétne u riasy *O. tauri* (Corellou et al., 2005) a riasy *C. reinhardtii* (táto práca), avšak táto schopnosť nebola zatiaľ dokázaná u žiadnej CDK typu B vyšších rastlín (Mironov et al., 1999).

Bolo by zaujímavé zistiť, či sú schopné túto mutáciu komplementovať aj CDKB iných riasových druhov a či je CDKB u *Chlamydomonas* hlavný regulátor mitózy *in vivo*.

### 3.2 Charakterizácia *uvsX1* a *uvsX2* mutantov

**Publikácia 2:** Sviežená B., Ševčovičová A., Gálová E., Hamzová A., Hendrychová J., Čížková M., Bišová K., Vítová M., Zachleder V., Vlček D.: The response of novel *Chlamydomonas reinhardtii* *uvsX1* and *uvsX2* mutants to DNA damage and the implications for cell cycle regulation. *Plant Cell Reports*, v 2. recenznom konaní.

Na rozpoznané DNA poškodenie reagujú bunky spustením signálnej transdukčnej kaskády (Weinert and Hartwell, 1990, 1993; Siede et al., 1994; de la Torre-Ruiz et al., 1998; Paulovich et al., 1998; Vialard et al., 1998), ktorá vedie k zastaveniu bunkového cyklu v kontrolnom bode (checkpoint) a spusteniu reparačných procesov (Hartwell and Weinert, 1989). Schopnosť rozpoznať primárne DNA poškodenie umožní zabrzdiť priebeh bunkového cyklu, kým nie je poškodenie odstránené a tým zabrániť genómovej nestabilite.

V rámci výskumu reparačných procesov u rias boli izolované a charakterizované dve alely, *uvsX1* a *uvsX2*, nového mutantného kmeňa *Chlamydomonas reinhardtii* citlivého na UV žiarenie. Sledovali sme účinky rôznych mutagénov, vrátane UV žiarenia na priebeh bunkového cyklu kontrolného kmeňa (wt, wild type) a mutantných kmeňov *uvsX1* a *uvsX2*.

Divý kmeň (wt) tvoril po pôsobení mutagénu prevažne životaschopné kolónie. Niektoré bunky s neopraviteľným poškodením DNA sa ďalej nedelili a zomreli v jednobunkovom štádiu. Na rozdiel od buniek divého kmeňa, väčšina buniek *uvsX1* a *uvsX2* vyprodukovala letálne mikrokolónie, pretože bunkový cyklus nebol po pôsobení mutagénu zastavený.

Prvotná podobnosť *uvsX1* a *uvsX2* mutantov u *C. reinhardtii* s *rad9* mutantom u *S. cerevisiae* naznačuje pravdepodobnú úlohu *UVSX1* a *UVSX2* génov v regulácii (zastavení) bunkového cyklu po poškodení DNA. Navyše, naše predchádzajúce výsledky



ukazujú, že zelená riasa *C. reinhardtii* vlastní kontrolný mechanizmus zastavenia bunkového cyklu v prípade DNA poškodenia (gén *UVS11*) (Slaninová et al., 2002; Slaninová et al., 2003). Avšak na druhej strane, umelé zastavenie bunkového cyklu prostredníctvom mikrotubulového jedu MBC, nevedlo k výraznému zníženiu počtu letálnych mikrokolónií *uvsX1* a *uvsX2* kmeňov *C. reinhardtii*. Takže charakter *uvsX1* a *uvsX2* mutácie sa zrejme líši od *C. reinhardtii uvs11* and *S. cerevisiae rad9* (Slaninová et al., 2002).

Mutantné bunky vykazovali zvýšenú indukovanú mutabilitu a *uvsX1* bunky navyše aj zvýšenú spontánnu mutabilitu. Na základe molekulárnej analýzy sme zistili, že oba *uvsX1* aj *uvsX2* kmene sú deficitné v excízii pyrimidínových dimérov. Tieto výsledky sú v súlade s ich citlivosťou k UV žiareniu.

Pomocou tetrádovej a komplementačnej analýzy *uvsX1* a *uvsX2* kmeňov sme zistili, že *uvsX1* a *uvsX2* sú alelické mutácie. Heteroalely s odlišnými fenotypmi boli popísané aj u *S. cerevisiae rad14* mutantov (Giannattasio et al., 2004; Guzder et al., 2006). Zvýšená mutabilita *uvsX1/uvsX2* sa zhoduje s nárastom dávkovy závislej mutagenézy u *rad14*-deficitných buniek (Giannattasio et al., 2004; Guzder et al., 2006). Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že *UVSX1/UVSX2* by mohol mať podobne ako *RAD14* funkciu v rozpoznávaní DNA poškodenia.

Sledovanie rastových a reprodukčných procesov, vrátane zmien v histón H1 kinázovej aktivite odhalilo nesprávny priebeh bunkového cyklu, možno práve v dôsledku neschopnosti rozpoznať primárne poškodenie. Bunky *uvsX1* a *uvsX2* boli značne menšie ako bunky divého typu nezávisle na pôsobení UV žiarenia a jadrové delenie UV ožiarených *uvsX2* buniek prebiehalo bez cytokinézy, čo malo za následok vznik mnohjadrových buniek.

Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že produkt(y) génu *UVSX1/UVSX2* by mohli mať úlohu v niektorom z prvých krokov regulačnej dráhy, najpravdepodobnejšie v rozpoznaní DNA poškodenia. Túto hypotézu podporuje skutočnosť, že mutanty izolované ako UV citlivé, nevykazovali len poruchy v dôsledku DNA poškodenia (citlivosť na mutagén, zvýšená mutabilita, neúčinné MBC-indukované zastavenie BC), ale aj poruchy bunkového cyklu spôsobené ľahostajnosťou voči DNA poškodeniu (pomalý rast, obtiažne uvoľňovanie dcérskych buniek, aberantné mitózy).

### 3.3 Cirkadiánne hodiny a bunkové delenie

**Publikácia 3:** Vítová M., Bišová K., Hendrychová J., Čížková M., Hlavová M., Umysová D., Zachleder V.: A circadian clock is not involved in the timing of cell division in the alga *Chlamydomonas reinhardtii*, rukopis.

Cirkadiánne rytmy kontrolujú u rias mnoho bunkových procesov, avšak ich úloha v regulácii bunkového cyklu je nejasná a publikované výsledky sú protichodné. Do dnešnej doby nebola urobená žiadna podrobná štúdia, ktorá by overila prípadnú aktivitu cirkadiánnych oscilátorov v časovaní bunkového delenia v širokom rozmedzí rastových podmienok, ktorým môžu byť riasy vystavené.

V tejto publikácii uvádzame výsledky pokusov, ktoré mali otestovať, či cirkadiánne hodiny riadia časovanie bunkového delenia u riasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Pokusy sme navrhli tak, aby bolo možné udržať bunky dostatočne dlhý čas v podmienkach spĺňajúcich kritéria pôsobenia endogénnych cirkadiánnych oscilátorov pre prípad, že by sa skutočne podieľali na časovaní bunkového delenia.

Pokusy boli robené buď s asynchrónnymi kultúrami, ktoré rástli dostatočne dlhú dobu (5 až 20 dní) v kontinuálnych, nemenných rastových podmienkach, alebo so synchronnými kultúrami v priebehu niekoľkých (4 až 20), po sebe nasledujúcich bunkových cyklov za odlišných svetelných intenzít a teplôt.

Zistili sme, že za určitých daných podmienok bolo trvanie jednotlivých, po sebe nasledujúcich bunkových cyklov konštantné. V rozmedzí dĺžok bunkových cyklov od 70 do 12 hodín bola zahrnutá aj dĺžka okolo 24 hodín. Takéto trvanie bunkového cyklu sme dosiahli v špecifických rastových podmienkach a iba v úzkom rozsahu svetelných intenzít, konkrétne medzi 40 a 115  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Bruce, Goto a Johnson, zástancovia cirkadiánneho riadenia bunkového delenia u *Chlamydomonas*, testovali kultúry práve za svetelnej intenzity medzi 40 a 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Avšak podľa našich výsledkov každé zníženie alebo zvýšenie svetelnej intenzity spôsobilo predĺženie alebo skrátenie bunkového cyklu, ďaleko od cirkadiánnych hodnôt.

Došli sme k záveru, že medzi všetkými možnými dĺžkami bunkových cyklov sa môže vyskytnúť aj bunkový cyklus, ktorý trvá približne 24 hodín. To však nie je spôsobené účinkom cirkadiánneho oscilátora, ale je to odpoveď na určitú kombináciu teploty a svetelnej intenzity, ktoré v skutočnosti určujú rastovú rýchlosť buniek.

Naše zistenia vylučujú úlohu cirkadiánnych hodín v bunkovom delení, pretože nespĺňajú kritéria, ktoré charakterizujú cirkadiánny rytmus a neposkytujú žiaden dôkaz na

podporenie teórie, že cirkadiánný oscilátor vplýva na časovanie bunkového delenia riasy *Chlamydomonas reinhardtii*.

### 3.4 Časovanie chloroplastového delenia

**Publikácia 4:** Hendrychová J., Vítová M., Čížková M., Bišová K., Zachleder V.: Chloroplast fission in the alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) occurs normally in the presence of extremely elevated mitotic cyclin-dependent kinase activity. Protoplasma, v recenznom konaní.

Bunky riasy *Scenedesmus quadricauda* sú vhodným modelom pre štúdium delenia chloroplastov, pretože obsahujú iba jeden chloroplast na rozdiel od vyšších rastlín, z ktorých väčšina má približne 10 chloroplastov v jednej bunke (prehľad (Butterfass, 1995). Mnoho publikácií popisuje existenciu regulačného systému, ktorý kontroluje proces delenia chloroplastov, ale mechanizmus časovania chloroplastového delenia ostáva neznámy (prehľad (Miyagishima, 2005).

Za účelom štúdia samostatného delenia chloroplastov zelenej riasy *S. quadricauda* sme zabránili jadrovému deleniu použitím inhibítora 5-fluorodeoxyuridínu (FdUrd). FdUrd špecificky blokuje replikáciu jadrovej DNA, ale neovplyvňuje replikáciu ptDNA, čo umožňuje delenie chloroplastov v absencii jadrového delenia (Zachleder, 1994; Zachleder et al., 1996).

Za týchto podmienok rast kultúry, ako aj dosiahnutie bodov rozhodnutia (CP) neboli pôsobením inhibítora takmer ovplyvnené, avšak DNA replikácia, jadrové delenie a delenie protoplastov boli blokované. Naopak, delenie chloroplastov prebiehalo väčšinou normálne, v rovnakom čase (veku bunky) ako v bunkách kontrolnej kultúry. Tieto výsledky teda podporujú teóriu, že výskyt chloroplastového a bunkového delenia v rovnakom čase bunkového cyklu je výsledkom nezávislej regulácie. Už skôr bolo dokázané, že chloroplastové a bunkové delenie môže byť oddelené (Zachleder, 1994; Zachleder et al., 1996). Podobne bolo zistené, že reprodukčné procesy v chloroplaste (ptDNA replikácia a delenie nukleoidov) nie sú prepojené s reprodukčnými procesmi jadra, ktoré závisia skôr na rastových podmienkach (Zachleder and Cepák, 1987; Kuroiwa et al., 1989; Zachleder, 1995). My však uvažujeme, že iniciácia jadrového a plastidového delenia by mala byť koordinovaná, aby sa zaistilo, že počet dcérskych chloroplastov bude zodpovedať počtu dcérskych buniek. Rovnaký impulz, napr. bod rozhodnutia (CP), by mohol spúšťať procesy delenia chloroplastov aj jadier, ktoré by potom pokračovali nezávisle až do konca bunkového cyklu.

Za účelom podrobnejšieho štúdia chloroplastového delenia sme sledovali proteín FtsZ1 z hľadiska jeho množstva a lokalizácie v bunke. Proteín FtsZ tvorí Z-prstence a pravdepodobne sa zúčastňuje na delení chloroplastov. Jeho množstvo a lokalizácia boli porovnateľné v kontrolných a inhibovaných bunkách. V oboch kultúrach bol proteín FtsZ lokalizovaný okolo pyrenoidov a tvoril veľké množstvo bodov a malých prstencov. To je v súlade s výsledkami z mikroskopického sledovania chloroplastového delenia, ktorého časovanie a charakter neboli ovplyvnené v prítomnosti FdUrd.

Je zaujímavé, že bunky rastúce v prítomnosti inhibítora vykazovali veľmi vysokú mitotickú histón H1 kinázovú aktivitu aj za neprítomnosti jadrového delenia. Na rozdiel od kontrolnej kultúry bola táto kinázová aktivita nadmerne vysoká a nekolísala. Je to prekvapujúce, pretože inhibícia DNA replikácie u kvasiniek a cicavčích buniek aktivuje DNA replikačný kontrolný bod. Aktivácia tohto bodu vedie následne k inhibícii aktivity CDK. Z toho vyplýva, že riasové bunky buď postrádajú DNA replikačný kontrolný bod, alebo kontrolný mechanizmus neovplyvňuje CDK aktivitu.

Naše výsledky podporujú hypotézu, že chloroplastové delenie je nezávislé na jadrovom delení, aj keď je pravdepodobne spustené súčasne s bunkovým delením v bode rozhodnutia (CP), aby sa zaistilo správne načasovanie a počet delení. Predpokladáme, že proces(y) vedúce k DNA replikácii a mitotickej aktivácii CDK sú spustené súčasne, zrejme tiež v bode rozhodnutia (CP) a tým pádom inhibícia DNA replikácie už neovplyvní CDK aktivitu. Iná možnosť je, že bunky *S. quadricauda* postrádajú kontrolný bod DNA replikácie/DNA poškodenia, ktorý je normálne schopný inhibovať CDK aktivitu.

## Zoznam citovanej literatúry

- Andrews, B., and Measday, V.** (1998). The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Reviews* **14**, 66-72.
- Barberis, M., De Gioia, L., Ruzzene, M., Sarno, S., Coccetti, P., Fantucci, P., Vanoni, M., and Alberghina, L.** (2005). The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27(Kip1) are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *Biochem. J.* **387**, 639-647.
- Barroco, R.M., De Veylder, L., Magyar, Z., Engler, G., Inze, D., and 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**, 401-412.
- Bates, S., Bonetta, L., MacAllan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C., and Peters, G.** (1994). CDK6(PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* **9**, 71-79.
- Bišová, K., Krylov, D.M., and Umen, J.G.** (2005). Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **137**, 475-491.
- Bišová, K., Patočka, M., Hendrychová, J., and Zachleder, V.** (2000). The activity of total histone H1 kinases is related to growth and commitment points while the p13(suc1)-bound kinase activity relates to mitoses in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Plant Physiol.Biochem.* **38**, 755-764.
- Bögre, L., Zwerger, K., Meskiene, I., Binarova, P., Csizmadia, V., Planck, C., Wagner, E., Hirt, H., and HeberleBors, E.** (1997). The cdc2Ms kinase is differently regulated in the cytoplasm and in the nucleus. *Plant Physiol.* **113**, 841-852.
- Boudolf, V., Barroco, R., Engler, J.d.A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., Inze, D., and De Veylder, L.** (2004). B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 945-955.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolphanderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B., and Sanford, J.C.** (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high-velocity microprojectiles. *Science* **240**, 1534-1538.
- Brotherton, D.H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P.J., Volyanik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B.O., Archer, S.J., Serrano, M., Brenner, S.L., Blundell, T.L., and Laue, E.D.** (1998). Crystal structure of the complex of the cyclin D dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19(INK4d). *Nature* **395**, 244-250.
- Brown, L.E., Sprecher, S.L., and Keller, L.R.** (1991). Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2328-2332.
- Bursens, S., Van Montagu, M., and Inze, D.** (1998). The cell cycle in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 9-19.
- Butterfass, T.** (1995). Reproduction and continuity of chloroplasts in spermatophytes. *Bot. Rev.*, **61**, 1-27.
- Ciechanover, A., and Schwartz, A.** (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2727-2730.

- Colasanti, J., Tyers, M., and Sundaresan, V.** (1991). Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34<sup>cdc2</sup> homologue from *Zea mays*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**, 3377-3381.
- Corellou, F., Camasses, A., Ligat, L., Peaucellier, G., and Bouget, F.Y.** (2005). Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase. Plant Physiol. **138**, 1627-1636.
- Corellou, F., Bisgrove, S.R., Kropf, D.L., Meijer, M., Kloareg, B., and Bouget, F.-Y.** (2000). A S/M DNA replication checkpoint prevents nuclear and cytoplasmic events of cell division including centrosomal axis alignment and inhibits activation of cyclin-dependent kinase-like proteins in fucoid zygotes. Development **127**, 1651-1660.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., and Kim, S.H.** (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. Nature **363**, 595-602.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., and Leone, G.** (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. J. Biol. Chem. **278**, 42041-42049.
- de la Torre-Ruiz, M.A., Green, C.M., and Lowndes, N.F.** (1998). RAD9 and RAD24 define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. EMBO J. **17**, 2687-2698.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van der Schueren, E., Jacquemard, A., Engler, G., and Inze, D.** (2002). Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. EMBO J. **21**, 1360-1368.
- Denu, J.M., and Dixon, J.E.** (1995). A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 5910-5914.
- Dewitte, W., and Murray, J.A.H.** (2003). The plant cell cycle. Annu. Rev. Plant Biol. **54**, 235-264.
- Di Stefano, L., Jensen, M.R., and Helin, K.** (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. EMBO J. **22**, 6289-6298.
- Doonan, J., and Fobert, P.** (1997). Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. Curr. Opin. Cell Biol. **9**, 824-830.
- Endicott, J.A., and Nurse, P.** (1995). The cell cycle and *suc1*: from structure to function? Structure **3**, 321-325.
- Šetlík, I., and Zachleder, V.** (1984). The multiple fission cell reproductive patterns in algae. In The Microbial Cell Cycle., E. Streiblová, ed (Boca Raton, Florida USA, CRC Press Inc.), pp. 253-279.
- Šetlík, I., Berková, E., Doucha, J., Kubín, Vendlová, J., and Zachleder, V.** (1972). The coupling of synthetic and reproduction processes in *Scenedesmus quadricauda*. Arch. Hydrobiol., Algolog. Stud. **7**, 172-217.
- Fang, F., and Newport, J.W.** (1991). Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different *cdc2* proteins in higher eukaryotes. Cell **66**, 731-742.
- Fang, S.C., de los Reyes, C., and Umen, J.G.** (2006). Cell size checkpoint control by the retinoblastoma tumor suppressor pathway. Plos Genetics **2**, 1565-1579.
- Fauman, E.B., and Saper, M.A.** (1996). Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. Trends Biochem. Sci. **21**, 413-417.
- Ferreira, P., Hemerly, A., de Almeida Engler, J., Bergounioux, C., Burssens, S., Van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D.** (1994). Three discrete classes of *Arabi-*

- dopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 11313-11317.
- Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., Villaruel, R., Van Montagu, M., and Inze, D.** (1991). The *Arabidopsis* functional homolog of the p34<sup>cdc2</sup> protein kinase. Plant Cell **3**, 531-540.
- Fisher, R.P., and Morgan, D.O.** (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. Cell **78**, 713-724.
- Fuerst, R.A., Soni, R., Murray, J.A., and Lindsey, K.** (1996). Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. **112**, 1023-1033.
- Genschik, P., Criqui, M.C., Parmentier, Y., Derevier, A., and Fleck, J.** (1998). Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. Plant Cell **10**, 2063-2075.
- Giannattasio, M., Lazzaro, F., Longhese, M.P., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M.** (2004). Physical and functional interactions between nucleotide excision repair and DNA damage checkpoint. EMBO J. **23**, 429-438.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature **349**, 132-138.
- Goebel, M.G., Yochem, J., Jentsch, S., McGrath, J.P., Varshavsky, A., and Byers, B.** (1988). The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. Science **241**, 1331-1335.
- Gould, K.L., and Nurse, P.** (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2<sup>+</sup> protein kinase regulates entry into mitosis. Nature **342**, 39-45.
- Gutierrez, C.** (1998). The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. Curr. Opin. Plant Biol. **1**, 492-497.
- Guzder, S.N., Sommers, C.H., Prakash, L., and Prakash, S.** (2006). Complex formation with damage recognition protein Rad14 is essential for *Saccharomyces cerevisiae* Rad1-Rad10 nuclease to perform its function in nucleotide excision repair in vivo. Mol. Cell. Biol. **26**, 1135-1141.
- Hanks, S.K., and Hunter, T.** (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. **9**, 576-596.
- Harris, E.H.** (1989). The Chlamydomonas Sourcebook. A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use, 780.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A.** (1989). Checkpoints - controls that ensure the order of cell-cycle events. Science **246**, 629-634.
- Hata, S., Kouchi, H., Suzuka, I., and Ishii, T.** (1991). Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. EMBO J. **10**, 2681-2688.
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Inze, D., and Ferreira, P.** (1992). Genes regulating the plant-cell cycle - isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 3295-3299.
- Hemerly, 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**, 1711-1723.
- Hindley, J., and Phear, G.A.** (1984). Sequence of the cell division gene CDC2 from *Schizosaccharomyces pombe*: patterns of splicing and homology to protein kinases. Gene **31**, 129-134.
- Hindley, J., Phear, G., Stein, M., and Beach, D.** (1987). Sucl<sup>+</sup> encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and is directly involved in the division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Cell. Biol. **7**, 504-511.

- Hirt, H., Pay, A., Bögre, L., Meskiene, I., and Heberle-Bors, E.** (1993). *cdc2msB*, a cognate *cdc2* gene from alfalfa, complements the G1/S but not the G2/M transition of budding yeast *cdc28* mutants. *Plant J.* **4**, 61-69.
- Hirt, H., Pay, A., Györgyey, J., Bakó, L., Neméth, K., Bögre, L., Schweyen, R.J., Heberle-Bors, E., and Dudits, D.** (1991). Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to *p34<sup>cdc2</sup>*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1636-1640.
- Hirt, H., Mink, M., Pfosser, M., Bögre, L., Gyorgyey, J., Jonak, C., Gartner, A., Dudits, D., and Heberle-Bors, E.** (1992). Alfalfa cyclins: differential expression during the cell cycle and in plant organs. *Plant Cell* **4**, 1531-1538.
- Hoek, C.v.d., Mann, D.G., and Jahns, H.M.** (1995). *Algae, an introduction to phycology*. (Cambridge: Cambridge University Press).
- Hunter, T., and Plowman, G.D.** (1997). The protein kinases of budding yeast: Six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 18-22.
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Gutierrez, C., Doonan, J.H., and Murray, J.A.** (1998). The maize retinoblastoma protein homologue *ZmRb-1* is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (*CycD*) proteins. *Plant Mol. Biol.* **37**, 155-169.
- Ito, M., MarieClaire, C., Sakabe, M., Ohno, T., Hata, S., Kouchi, H., Hashimoto, J., Fukuda, H., Komamine, A., and Watanabe, A.** (1997). Cell cycle regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures. *Plant J.* **11**, 983-992.
- Jacobs, T.W.** (1995). Cell-Cycle Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **46**, 317-339.
- John, P.C., Sek, F.J., and Lee, M.G.** (1989). A homolog of the cell cycle control protein *p34<sup>cdc2</sup>* 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, P.C.L.** (1984). Control of the cell division cycle in *Chlamydomonas*. *Microbiol. Sci.* **1**, 96-101.
- John, P.C.L., Sek, F.J., and Hayles, J.** (1991). Association of the plant *p34<sup>cdc2</sup>*-like protein with *p13<sup>suc1</sup>* - implications for control of cell-division cycles in plants. *Protoplasma* **161**, 70-74.
- John, P.L.C.** (1987). Control points in the *Chlamydomonas* cell cycle. In *Algal Development. Molecular and Cellular Aspects*, R.C. Starr, ed (Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag), pp. 9-16.
- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., and Renaudin, J.-P.** (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 607-620.
- Khadaroo, B., Robbens, S., Ferraz, C., Derelle, E., Eychenie, S., Cooke, R., Peaucellier, G., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y., Picard, A., and Moreau, H.** (2004). The first green lineage *cdc25* dual-specificity phosphatase. *Cell Cycle* **3**, 513-518.
- Kindle, K.L.** (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1228-1232.
- King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.-M., and Kirschner, M.W.** (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652-1659.



- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M.W.** (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**, 279-288.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (2002). E2Ls, E2F-like repressors of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *J. Biol. Chem.* **277**, 16553-16558.
- Kuroiwa, T., Nagashima, H., and Fukuda, I.** (1989). Chloroplast division without DNA synthesis during the life cycle of the unicellular alga *Cyanidium caldarium* M-8 as revealed by quantitative fluorescence microscopy. *Protoplasma* **149**, 120-129.
- Landrieu, I., da Costa, M., De Veylder, L., Dewitte, F., Vandepoele, K., Hassan, S., Wieruszkeski, J.-M., Corellou, F., Faure, J.-D., Van Montagu, M., Inze, D., and Lippens, G.** (2004). A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13380-13385.
- Lapidotlieson, Y., Patinkin, D., Prody, C.A., Ehrlich, G., Seidman, S., Benaziz, R., Benseler, F., Eckstein, F., Zakut, H., and Soreq, H.** (1992). Cloning and antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a human homolog of Cdc2 required in hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 579-583.
- Lee, J., Das, A., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., and Umeda, M.** (2003). Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *Plant J.* **34**, 417-425.
- Lee, M.H., and Yang, H.Y.** (2003). Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers. *Cancer Metastasis Rev* **22**, 435-449.
- Logan, N., Delavaine, L., Graham, A., Reilly, C., Wilson, J., Brummelkamp, T.R., Hijmans, E.M., Bernards, R., and La Thangue, N.B.** (2004). E2F-7: a distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* **23**, 5138-5150.
- Lörincz, A.T., and Reed, S.I.** (1984). Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes. *Nature* **307**, 183-185.
- Makela, T.P., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Frutiger, S., Hughes, G.J., and Weinberg, R.A.** (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* **371**, 254-257.
- Martinez, M.C., Jorgensen, J.E., Lawton, M.A., Lamb, C.J., and Doerner, P.W.** (1992). Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7360-7364.
- Mendenhall, M.D.** (1993). An inhibitor of p34(CDC28) protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **259**, 216-219.
- Mendenhall, M.D., and Hodge, A.E.** (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1191-1243.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.-H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.-L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernandez, E., Fukuzawa, H., Gonzalez-Ballester, D., Gonzalez-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.-**

- P., Riano-Pachon, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.-J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Honick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martinez, D., Ngau, W.C.A., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigriev, I.V., Rokhsar, D.S., and Grossman, A.R.** (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245-251.
- Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L.H.** (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* **11**, 2909-2917.
- Minshull, J.** (1989). Cyclin and MPF: Driving mitosis. *BioEssays* **11**, 149-151.
- 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**, 509-529.
- Miyagishima, S.** (2005). Origin and evolution of the chloroplast division machinery. *J. Plant Res.* **118**, 295-306.
- Morgan, D.O.** (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Muller, F.W., Igloi, G.L., and Beck, C.F.** (1992). Structure of a gene encoding heat-shock protein HSP70 from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, **111**, 165-173.
- Murray, A.W.** (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-234.
- Nasmyth, K.** (1995). The yeast cell cycle. I.M.P. Scientific Report, 39-42.
- Nasmyth, K.** (1996). At the heart of the budding yeast cell cycle. *TIG* **12**, 405-412.
- Nurse, P.** (1980). Cell cycle control - both deterministic and probabilistic? *Nature* **286**, 9-10.
- Nurse, P., and Bissett, Y.** (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292**, 558-560.
- Paulovich, A.G., Armour, C.D., and Hartwell, L.H.** (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics* **150**, 75-93.
- Pavletich, N.** (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821-828.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A.** (1994). P27(Kip1), a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor Beta and contact inhibition to cell-cycle arrest. *Genes Dev.* **8**, 9-22.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheldt, J.P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R.D., Casteels, P., Van Montagu, M., Inze, D., and Mironov, V.** (2001). A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G(2)/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* **276**, 36354-36360.
- Randolphanderson, B.L., Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Johnson, A.M., Dorthu, M.P., and Matagne, R.F.** (1993). Further characterization of the respiratory deficient Dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 235-244.
- Reed, S.I.** (1997). Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* **29**, 7-23.

- Renaudin, J.P., Colasanti, J., Rime, H., Yuan, Z., and Sundaesan, V.** (1994). Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mitotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7375-7379.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaesan, 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**, 1003-1018.
- Russell, P., and Nurse, P.** (1986). Cdc25<sup>+</sup> functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145-153.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P.** (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 696-700.
- Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.O., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P.** (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16(INK4a). *Nature* **395**, 237-243.
- Serrano, M.** (1997). The tumor suppressor protein p16(INK4a). *Exp. Cell Res.* **237**, 7-13.
- Sherr, C.J.** (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**, 1059-1065.
- Sherr, C.J.** (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M.** (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163.
- Shimotohno, A., Matsubayashi, S., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., and Umeda, M.** (2003). Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **534**, 69-74.
- Schnittger, A., Schobinger, U., Bouyer, D., Weinl, C., Stierhof, Y.-D., and Hulskamp, M.** (2002). Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in *Arabidopsis* trichomes. *PNAS* **99**, 6410-6415.
- Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M.D., and Nasmyth, K.** (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor P40(Sic1) controls the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **79**, 233-244.
- Siede, W., Friedberg, A.S., Dianova, I., and Friedberg, E.C.** (1994). Characterization of G1 checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents. *Genetics* **138**, 271-281.
- Simanis, V., Russel, P., and Nurse, P.** (1986). Cell cycle control genes of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell cycle and oncogenes*, 13-23.
- Slaninová, M., Ševčovičová, A., Nagyová, B., Miadoková, E., Vlček, V., and Vlček, D.** (2002). *Chlamydomonas reinhardtii* UVS11 gene is required for cell cycle arrest in response to DNA damage. *Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud.* **107**, 123-131.
- Slaninová, M., Nagyová, B., Gálová, E., Hendrychová, J., Bišová, K., Zachleder, V., and Vlček, D.** (2003). The alga *Chlamydomonas reinhardtii* UVS11 gene is responsible for cell division delay and temporal decrease in histone H1 kinase activity caused by UV irradiation. *Mut. Res. DNA Repair* **2**, 737-750.
- Sorrell, D.A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, J.R., Rogers, H.J., and Francis, D.** (2002). A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**, 518-522.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A.** (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Cell* **6**, 185-198.
- Sun, Y.J., Dilkes, B.P., Zhang, C.S., 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. USA **96**, 4180-4185.
- Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., and Nasmyth, K.** (1990). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell **65**, 145-161.
- Szarka, S., Fitch, M., Schaerer, S., and Moloney, M.** (1995). Classification and expression of a family of cyclin gene homologues in *Brassica napus*. Plant. Mol. Biol. **27**, 263-275.
- Umeda, M., Bhalerao, R.P., Schell, J., Uchimiya, H., and Konecz, C.** (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 5021-5026.
- Umeda, M., Umeda-Hara, C., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., and Uchimiya, H.** (1999). Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. Plant Physiol. **119**, 31-40.
- Umen, J.G., and Goodenough, U.W.** (2001). Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in *Chlamydomonas*. Genes Dev **15**, 1652-1661.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., and Inze, D.** (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. Plant Cell **14**, 903-916.
- Vialard, J.E., Gilbert, C.S., Green, C.M., and Lowndes, N.F.** (1998). The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. EMBO J. **17**, 5679-5688.
- Weinberg, R.A.** (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell **81**, 323-330.
- Weinert, T.A., and Hartwell, L.H.** (1990). Characterization of Rad9 of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell-cycle arrest after DNA damage. Mol. Cell. Biol. **10**, 6554-6564.
- Weinert, T.A., and Hartwell, L.H.** (1993). Cell-cycle arrest of Cdc mutants and specificity of the Rad9 checkpoint. Genetics **134**, 63-80.
- Weissig, H., and Beck, C.F.** (1991). Action spectrum for the light-dependent step in gametic differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. **97**, 118-121.
- Wittenberg, C., and Reed, S.I.** (2005). Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. Oncogene **24**, 2746-2755.
- Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D.** (1992). D-Type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. Cell **71**, 505-514.
- 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**, 613-619.
- Yamaguchi, M., Fabian, T., Sauter, M., Bhalerao, R.P., Schrader, J., Sandberg, G., Umeda, M., and Uchimiya, H.** (2000). Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. Plant J. **24**, 11-20.
- Zachleder, V.** (1994). The effect of hydroxyurea and fluorodeoxyuridine on cell cycle events in the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta). J. Phycol. **30**, 274-279.
- Zachleder, V.** (1995). Regulation of growth processes during the cell cycle of the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* under a DNA replication block. J. Phycol. **30**, 941-947.
- Zachleder, V., and Cepák, V.** (1987). Variations in chloroplast nucleoid number during the cell cycle in the alga *Scenedesmus quadricauda* grown under different light conditions. Protoplasma **141**, 74-82.

- Zachleder, V., and Šetlík, I.** (1990). Timing of events in overlapping cell reproductive sequences and their mutual interactions in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *J. Cell Sci.* **97**, 631-638.
- Zachleder, V., and van den Ende, H.** (1992). Cell cycle events in the green alga *Chlamydomonas eugametos* and their control by environmental conditions. *J. Cell Sci.* **102**, 489-474.
- Zachleder, V., Kawano, S., and Kuroiwa, T.** (1996). Uncoupling of chloroplast reproductive events from cell cycle division processes by 5-fluorodeoxyuridine in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Protoplasma* **192**, 228-234.
- Zachleder, V., Schläfli, O., and Boschetti, A.** (1997). Growth-controlled oscillation in activity of histone H1 kinase during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **33**, 673-681.
- Zavitz, K.H., and Zipursky, S.L.** (1997). Controlling cell proliferation in differentiating tissues: genetic analysis of negative regulators of G1/S-phase progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 773-781.
- Zhang, K., Letham, D.S., and John, P.C.** (1996). Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34<sup>cdc2</sup>-like H1 histone kinase. *Planta* **200**, 2-12.

## **Publikácia 1**

**Čížková M.**, Pichová A., Vítová M., Hlavová M., Hendrychová J., Umysová D.,  
Gálová E., Ševčovičová A., Zachleder V., and Bišová K.

**CDKA and CDKB kinases from *Chlamydomonas reinhardtii*  
are able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of  
*Saccharomyces cerevisiae*.**

Protoplasma, v tlači.

## CDKA and CDKB kinases from *Chlamydomonas reinhardtii* are able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*

M. Čížková<sup>1</sup>, A. Pichová<sup>2</sup>, M. Vítová<sup>1</sup>, M. Hlavová<sup>1</sup>, J. Hendrychová<sup>1</sup>, D. Umysová<sup>1</sup>, E. Gálová<sup>3</sup>, A. Ševčovičová<sup>3</sup>, V. Zachleder<sup>1</sup>, and K. Bišová<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cell Cycles of Algae, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 379 81 Třeboň, Czech Republic

<sup>2</sup>Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Genetics, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská Dolina B-1, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

**Summary.** Cyclin-dependent kinases (CDK) play a key role in coordinating cell division in all eukaryotes. We investigated the capability of cyclin-dependent kinases CDKA and CDKB from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to complement a *Saccharomyces cerevisiae cdc28* temperature-sensitive mutant. The full-length coding regions of algal CDKA and CDKB cDNA were amplified by RT-PCR and cloned into the yeast expression vector pYES-DEST52, yielding pYD52-CDKA and pYD52-CDKB. The *S. cerevisiae* strain *cdc28-1N* transformed with these constructs exhibited growth at 36 °C in inducing (galactose) medium, but not in repressing (glucose) medium. Microscopic observation showed that the complemented cells had the irregular cylindrical shape typical for G2 phase-arrested cells when grown on glucose at 36°C, but appeared as normal budded cells when grown on galactose at 36°C. Sequence analysis and complementation tests proved that both CDKA and CDKB are functional *CDK28/cdc2* homologs in *C. reinhardtii*. The complementation of the mitotic phenotype of the *S. cerevisiae cdc28-1N* mutant suggests a mitotic role for both of the kinases.

**Keywords:** Cell cycle; *CDK28* homolog, *Chlamydomonas reinhardtii*; Cyclin-dependent kinases; *Saccharomyces cerevisiae*

### Introduction

Progression through the eukaryotic cell cycle is controlled by evolutionally highly conserved serine/threonine kinases, termed cyclin-dependent kinases (CDKs). CDKs form heterodimers with an indispensable regulatory subunit cyclin and contain a variant of the PSTAIRE motif in the cyclin-binding domain. Whereas both budding and fission yeasts require only one CDK for the regulation of the whole cell cycle (Nurse and Bissett 1981), the majority of eukaryotic cells possess multiple CDKs (for recent reviews, see Guo and Stiller 2004, Murray 2004). Plants encode a particularly elaborate set of CDK subfamilies that have been organized into five classes (CDKA–CDKE) (Joubes et al. 2000). The main plant cell cycle regulators, A-type CDKs, possess a conserved PSTAIRE motif. In contrast to other eukaryotes, another CDK subfamily is involved in cell cycle regulation in plants, a plant-specific B-type CDK that contains a variant of the PSTAIRE motif (PPTALRE or PPTTLRE) (for reviews, see Mironov et al. 1999, Dewitte and Murray 2003, Inze 2005). The role of CDKs in the exact timing of cell cycle processes, e.g. DNA replication, karyokinesis and cytokinesis, is

performed via phosphorylation of target proteins that include transcription factors, tumor suppressor Rb, cytoskeleton components and other proteins (Ubersax et al. 2003, Archambault et al. 2004).

*Chlamydomonas reinhardtii* is a unicellular chlorococcal alga that has served as a model organism for the study of photosynthesis, chloroplast biogenesis, flagellar biosynthesis and cell cycle regulation (Goodenough 1992, Rochaix 1995, Gutman and Niyogi 2004). Its genome is about to be completely sequenced (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>).

*Chlamydomonas reinhardtii* divides by a cell cycle modification called multiple fission. The cell cycle\* is characterized by a long growth-dependent G1 phase followed by growth-independent S, G2 and M phases occurring in several rounds of repetitive sequence at the very end of the cell cycle (Coleman 1982, Harper and John 1986). Proper progression through the cell cycle is ensured by control points, the key one being the commitment point (CP). Progression through this point enables the completion of the cell cycle (Spudich and Sager 1980, Donnan and John 1983, Donnan and John 1984, John 1987, Zachleder and van den Ende 1992). During the G1 phase, the cell may grow to several-fold its original size ( $2^n$ ), and with each doubling of cell size it attains a commitment point. Thus, several commitment points (n) may be reached within one cell cycle, leading to multiple cell divisions producing  $2^n$  daughter cells (Šetlík et al. 1972, Zachleder and Šetlík 1990, Zachleder and van den Ende 1992). *Chlamydomonas* encodes homologs of the major plant CDK (CDKA–E) and cyclin (cyclinA–D) families. Moreover, it encodes four novel CDKs (G1, G2, H1 and I1) and two novel cyclins (CYCAB1 and CYCM1) that have not been found in higher plants, fungi or animals (Bišová et al. 2005)

As stated above, CDKs are highly conserved proteins. Genes encoding for *cdc2* (fission yeast CDK) homologs from humans (Lee and Nurse 1987), chickens (Krek and Nigg 1989), mice (Cisek and Corden 1989) and *Drosophila* (Jimenez et al. 1990) were initially isolated by complementation of yeast cell cycle mutants. Similarly, complementation of yeast temperature-sensitive CDK mutants by plant cDNA suggests that the yeast and plant *cdc2* genes are functionally interchangeable. The alfalfa *cdc2Ms* cDNA is able to complement the *cdc2* mutant

\*Correspondence and reprints: Laboratory of Cell Cycles of Algae, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 379 81 Třeboň, Czech Republic  
E-mail: bisova@alga.cz

phenotype of fission yeast at the restrictive temperature (Hirt et al. 1991). Also, a full-length maize cDNA clone, *cdc2ZmA*, has been shown to complement a *cdc28* mutation in budding yeast (Colasanti et al. 1991). *Arabidopsis thaliana cdc2* cDNA expressed in a *CDC28<sup>ts</sup>* *Saccharomyces cerevisiae* strain partially restored its capacity to grow at 36°C, indicating that the cDNA is a functional homolog of the p34<sup>cdc2</sup> kinase (Ferreira et al. 1991). Moreover, CDKB from a marine unicellular alga *Ostreococcus tauri* has been shown to be able to rescue a yeast *cdc28<sup>ts</sup>* mutant (Corellou et al. 2005).

Although *Chlamydomonas* has been intensively studied, the capability of its cell cycle genes to complement yeast temperature-sensitive mutants has not yet been demonstrated. We, therefore, decided to test whether two types of *Chlamydomonas* CDKs (CDKA, CDKB) can complement budding yeast *cdc28* mutants. We isolated cDNA clones encoding CDKA1 and CDKB1, and, based on transformed yeast growth, morphology studies and staining of the microtubular system, we demonstrate that both A- and B-type CDKs can complement the mitotic defects of the *Saccharomyces cerevisiae cdc28-1N* mutant.

## Material and methods

### Isolation of RNA

*Chlamydomonas reinhardtii* wild-type strain 21gr (CC-1690; Chlamydomonas Genetics Center, Duke University, Durham, NC) was cultured at 30°C in inorganic nutrient high-salt (HS) medium (Sueoka 1960), aerated with 2% CO<sub>2</sub> in air under a 12h:12h light-dark regime. Total RNA was isolated from  $1 \times 10^7$  cells using the RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions.

### Preparation of cDNA encoding cyclin-dependent kinases from *Chlamydomonas reinhardtii*

Initially, total RNA (5 µg) was treated with RNase-free DNase (QIAGEN). DNA-free RNA was reverse transcribed by ThermoScript DNA polymerase (ThermoScript RT-PCR system, Invitrogen), using oligo(dT) primers in a total volume of 40 µl according to the manufacturer's instructions. For each RT-PCR reaction, 1 µl of cDNA was used. PCR fragments were amplified by ExTaq DNA polymerase (TaKaRa) in the presence of 1 µM primers and 2% DMSO in a final volume of 20 µl. The gene-specific primers used to isolate the CDKA1 and CDKB1 cDNA sequences from *C. reinhardtii* were 5' CDKA (5' CACCATGGACAAGTA TGAGAAGCT 3'), 3' CDKA (5' TCAGCGCATCAC GCCC 3'), 5' CDKB (5' CACCATGGATGCCTACG AGAAGAT 3') and 3' CDKB (5' TCAGCAGACAAC GTTGGCG 3'), in which the nucleotides in italics

corresponded to the start and stop codons. The products of PCR amplification were subcloned into the pENTR vector (Invitrogen) and the nucleotide sequences were verified by sequencing. Sequence analyses, including amino acid translations, comparisons and multiple alignments, were performed using VectorNTI (Invitrogen).

### Complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant carrying a temperature-sensitive mutation of the *CDC28* gene

To complement a *cdc28* mutation of *S. cerevisiae*, the open reading frames of the *Chlamydomonas reinhardtii* CDKA1 (CrCDKA) and CDKB1 (CrCDKB) cDNAs cloned in pENTR were recombined into the yeast expression vector pYES-DEST52, which carries the *ura3* gene, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Gateway system). Expression from this vector was controlled by the inducible GAL1 promoter. The resulting plasmids, named pYD52-CrCDKA and pYD52-CrCDKB, were transformed by the lithium acetate method (Ito et al. 1983) into the *S. cerevisiae CDC28* mutant strain *cdc28-1N* (Mat a, *ade1*, *tri1*, *ura3*, *leu2*, *his2*) obtained from Dr. Misako Ohkusu. The transformants were grown for 4 days at 25°C, and the resulting *ura*<sup>+</sup> colonies were cultivated overnight at 25°C in CM-*ura* medium containing glucose as a carbon source. The cells were pelleted, washed, resuspended in CM-*ura* medium containing 2% glycerol and grown further at 25°C. This step was necessary to permit expression of the cloned gene(s) from the galactose-inducible promoter, which was tightly catabolically repressed on the glucose-containing medium. After 4 h, the cells were pelleted and resuspended in CM-*ura* medium containing 2% galactose-1% raffinose, and then shifted to the restrictive temperature of 36°C. As controls, non-transformed mutant and wild-type cells were treated in the same way. Samples for phenotype observation and fluorescence staining were taken every 90 min and observed using a compound microscope. As a control, cells were cultivated in parallel at 25 and 36°C for 1 day in liquid glucose CM-*ura* medium. For growth experiments, cells were cultivated on solid CM-*ura* medium containing glucose or galactose, at 25 or 36°C. The *S. cerevisiae* wild-type strain, which grew normally at 36°C, and the non-transformed temperature-sensitive mutant strain were used as controls.

### Fluorescence staining of the microtubular system and DNA

The microtubular system was stained as described previously (Hašek et al. 1987). The mouse monoclonal antibody DM-1A against  $\alpha$ -tubulin (Sigma), diluted 1:10, was used as a primary antibody. The secondary antibody was the fluorescein isothiocyanate-conjugated



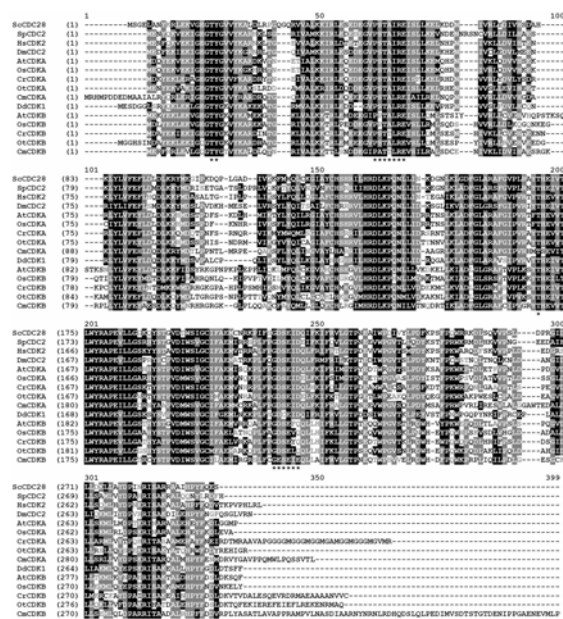
swine anti-mouse antibody SwAM/FITC (Sevac, Prague). Nuclei were visualized by staining with DAPI.

### Microscopy

Observation in transmitted light and fluorescence microscopy was carried out using a BX51 microscope (*Olympus*) equipped with a U-MWIBA2 filter block (excitation 460–490 nm, emission 510–550 nm), Nomarski (DIC) and phase contrast. The photomicrographs were taken using an F-View II CCD camera (*Olympus*). The AnalySIS<sup>®</sup> pro software was used for image analysis.

## Results and discussion

It has been shown previously that the *Chlamydomonas* CDKA1 and CDKB1 genes branch on phylogenetic trees with A- and B-type CDKs, respectively (Bišová et al. 2005). Here, we present a sequence comparison (Fig. 1) of *Chlamydomonas*, yeast, plant and animal CDKs showing sequence homologies among these proteins.



**Fig. 1.** Alignment of *Chlamydomonas reinhardtii* CDKA (CrCDKA) and CDKB (CrCDKB) amino acid sequences with those of CDK homologs from *Saccharomyces cerevisiae* (ScCDC28, CAA85119), *Schizosaccharomyces pombe* (SpCdc2, CAC37513), human (HsCDK2, CAA43807), *Drosophila melanogaster* (DmCDC2, CAA40733), *Dictyostelium discoideum* (DdCDK1, AAA33178), *Arabidopsis thaliana* (AtCDKA P24100, AtCDKB, P25859), rice (OsCDKA, XP 463932, OsCDKB, XP 483316) and *Cyanidioschyzon merolae* (CmCDKA, CmCDKB). Stars depict the conserved motifs.

CDKs are universally conserved serine/threonine kinases. Conserved regions include the glycine-rich loop of the ATP-binding site, the highly conserved PSTAIRE motif and the GDSEID motif at the N-

terminal end. The inhibitory phosphorylation sites T14 and Y15 are both in the middle of the glycine-rich loop that serves as a phosphate anchor in ATP binding (De Bondt et al. 1993). The activating phosphorylation site, T160, has been found at the apex of the T-loop, blocking the protein substrate-binding site (De Bondt et al. 1993).

The complete sequence of the budding yeast genome has revealed the presence of 5 CDKs among the 113 conventional protein kinases of this unicellular eukaryote (Hunter and Plowman 1997, Andrews and Measday 1998). However, CDC28 is the only CDK to play an essential role in cell cycle regulation (Mendenhall 1998). The amino acid sequences of Cdc28/Cdc2p homologs from yeasts are well conserved, especially the PSTAIRE motif involved in the cyclin-binding domain. Their kinase activity is regulated by activating phosphorylation of a conserved threonine (T) residue in the T-loop domain and inhibitory phosphorylation of conserved threonine (T) and tyrosine (Y) residues within the ATP-binding domain (Mendenhall 1998). Of the five mammalian CDKs strongly implicated in cell cycle control, three (CDC2/CDK1, CDK2 and CDK3) are closely related to the prototypical yeast *cdc2* and have the same characteristic PSTAIRE motif in the cyclin-binding domain (De Bondt et al. 1993). The other two CDKs, CDK4 and CDK6, form a distinct subfamily, in which PSTAIRE is substituted with PISTVRE or PLSTIRE, respectively. Both CDK4 and CDK6 are known to function exclusively in the G1 phase (Morgan 1997). In plants, CDKs harboring the consensus PSTAIRE motif are referred to as to A-type CDKs, whereas non-PSTAIRE cell cycle-regulating CDKs encompass a class unique to plants, the B-type CDKs (Joubes et al. 2000).

*Chlamydomonas* CDKs are characterized by a kinase domain (ATP-binding site) and a cyclin-binding domain with a PSTAIRE-like motif or with a variant thereof. *Chlamydomonas* CDKA and CDKB possess the conserved inhibitory phosphorylation T14 and Y15 sites (Fig. 1), implying that they are Cdc28/Cdc2p homologs. The threonine (T) residue can be found in all fungal Cdc28/Cdc2p homologs at the equivalent of the T169 position of *S. cerevisiae* Cdc28. Both CDKs from *Chlamydomonas* share this conserved stimulatory phosphorylation site. The threonine residues are located at position 161 (T161) in CrCDKA and at position 169 in CrCDKB (Fig. 1). The second indication for *Chlamydomonas* CDKA and CDKB being Cdc28/Cdc2p homologs is the presence of the GDSEID motif, a well-conserved sequence that is confined to the Cdc28/Cdc2p homologs and is not conserved in other types of CDKs. This motif is involved in phosphorylation of threonine 167 by CDK-activating kinase (Fleig et al. 1992). The GDSEID motif is perfectly conserved in CrCDKA, while a variant (GDSEYQ) is present in CrCDKB (Fig. 1). A similar situation is also true in the case of the PSTAIRE motif. Most of the Cdc28/Cdc2p homologs complementing *CDC28/cdc2* mutations are known to possess the conserved PSTAIRE motif. CDKA from

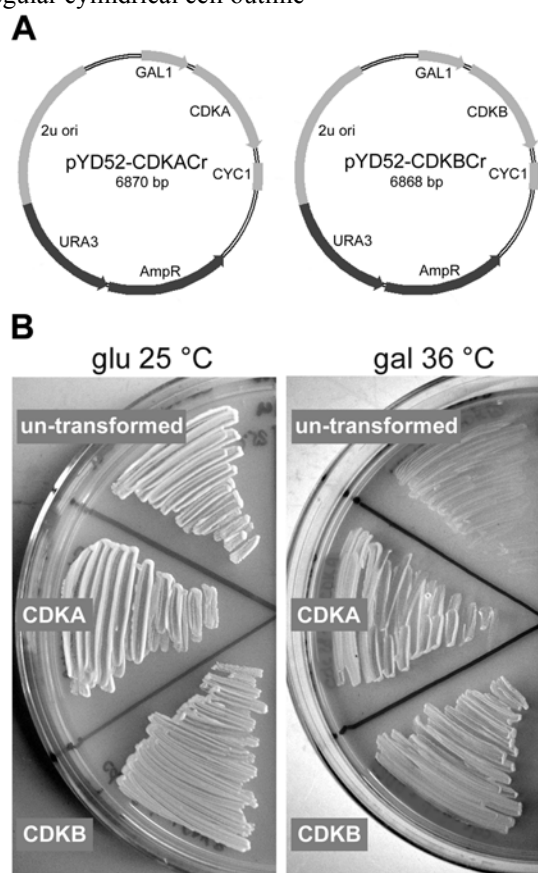
*Chlamydomonas*, a presumed major cell cycle regulator, contains this conserved motif. However, in CrCDKB, we found a variant of the PSTAIRE motif, a PSTTLRE amino acid sequence (Fig. 1). Nevertheless, some CDKs with a variant of the PSTAIRE motif are known to be able to complement *CDC28/cdc2* mutations; for example, CDKs with the PSTRVRE motif found in *Caenorhabditis elegans* (Mori et al. 1994), the PSTALRE motif in *Dictyostelium discoideum* (Michaelis and Weeks 1992), the PQTALRE motif in *Leishmania major* (Wang et al. 1998) and the PSTSIRE motif in *Cryptococcus neoformans* (Takeo et al. 2004). Furthermore, plant-specific CDKB from *Ostreococcus tauri* has been shown to be able to rescue a yeast *cdc28<sup>ts</sup>* mutant, despite the lack of a consensus PSTAIRE motif (PSTALRE motif) (Corellou et al. 2005).

The complementation of a *CDC28* *S. cerevisiae* mutant strain was undertaken to prove that the *Chlamydomonas* CDKs are functional homologs of *CDC28/cdc2*. The open reading frames of the CDKA1 and CDKB1 cDNAs were cloned into the yeast expression vector pYES-DEST52, downstream from the GAL1 promoter regulating expression of the target gene in *S. cerevisiae* (Invitrogen, Gateway system). The resulting plasmids, named pYD52-CrCDKA and pYD52-CrCDKB, are shown in Fig. 2A.

The above-mentioned plasmids were used to complement *S. cerevisiae* strain *cdc28-1N* carrying a temperature-sensitive mutation in the *CDC28* gene. *Cdc28-1N* is a single amino acid change from the conserved proline at position 250 into leucine (Lőrincz and Reed 1984). At the restrictive temperature of 36°C, the mutant normally undergoes Start and DNA replication but is impaired in executing mitosis (Surana et al. 1990). The mutant strain is unable to grow at this temperature, because the cells are arrested in the G2/M phase of the cell cycle, and therefore are unable to finish mitosis and stop dividing. Cells were grown either in galactose- raffinose medium, where expression of the cloned cDNA via the GAL1 promoter was induced, or in glucose medium, where expression was suppressed. Cells of the *S. cerevisiae* mutant *cdc28-1N* carrying the *Chlamydomonas* CDKA or CDKB exhibited growth and formed colonies at the restrictive temperature in galactose-containing media (Fig. 2B), while the cells of the non-transformed control did not (Fig. 2B).

For detailed verification of the complementation ability of CDKA and CDKB, morphology studies were performed. The wild type and both transformed and non-transformed *S. cerevisiae* strains cultivated in glucose medium at the permissive temperature (25°C) formed new buds and were able to complete the cell cycle (Fig. 3). However, when the same strains were grown at 36°C in glucose medium, all of the cells, except the wild-type (rounded shape), were arrested in the G2/M phase of the cell cycle with elongated buds, and some of them had bizarre shapes. When grown at the restrictive temperature (36°C), cell division of the *cdc28-1N* strain ceased, no new buds were present and *S. cerevisiae* the contin-

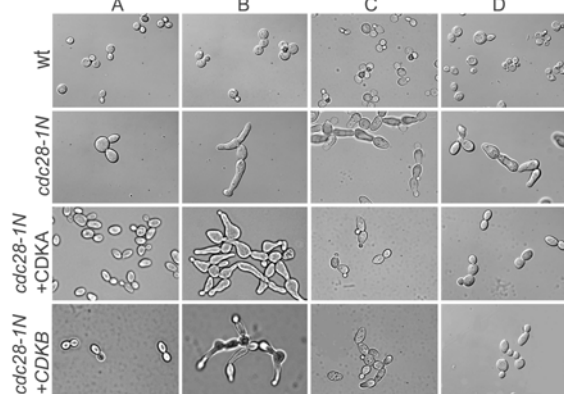
ued growth of the already present buds caused an irregular cylindrical cell outline



**Fig. 2.** **A** Structure of yeast expression vectors pYD52-CrCDKA and pYD52-CrCDKB. The *Chlamydomonas* CDKA1 or CDKB1 cDNA is flanked at the 5' end by the galactose-inducible GAL1 promoter and at the 3' end by the CYC1 polyadenylation region. Abbreviations: CmR, chloramphenicol resistance gene; Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistance gene; URA3, selection for uracil prototrophy in yeast; 2μ ori, origin of replication of the yeast 2-μm plasmid. The construction of the plasmid is described in Material and methods. **B** Growth of the *S. cerevisiae* non-transformed temperature-sensitive mutant *cdc28-1N* and of the same strain transformed with the pYD52-CrCDKA or pYD52-CrCDKB constructs in medium containing glucose (repressing) and galactose (inducing) at 25 and 36°C.

(Fig. 3, second row, B–D), in contrast to the wild type (Fig. 3, first row). When *cdc28-1N* strains carrying pYD52-CrCDKA or pYD52-CrCDKB were grown at 36 °C in glucose medium, cell division did not occur and the cells had an irregular cylindrical phenotype (Fig. 3, fourth and fifth row, B), as in the non-transformed cells. However, after the temperature shift to 36 °C in galactose medium, the *cdc28-1N* cells transformed with pYD52-CrCDKA or pYD52-CrCDKB formed small and large buds (Fig. 3, fourth and fifth row, arrows). After this shift, the CDKA expression induced by galactose brought about a normal phenotype within 90 minutes. Although the cells expressing CDKB formed normal buds, they showed a prolonged shape even 180 min after the induction of expression and became normal after 270 minutes. This functional complementation of the *CDC28* mutation was dependent

upon transcription of the algal CDK cDNAs, because cell division was arrested in the same way as in the mutant strain in the presence of glucose, which repr-

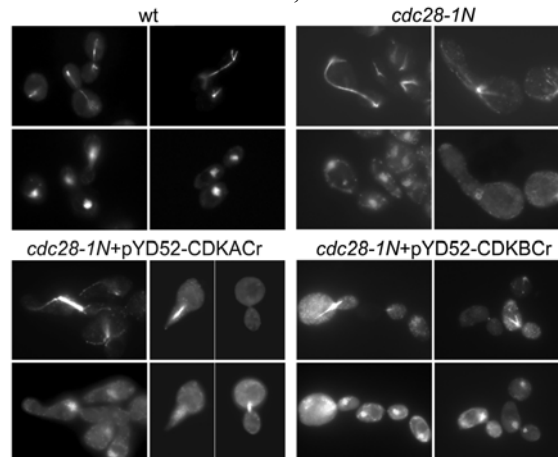


**Fig. 3.** Wild-type (first row), and both non-transformed (second row) and transformed (third to fifth row) *S. cerevisiae* strains cultivated in glucose medium at 25 °C (A), in glucose medium at 36 °C (B) and in galactose (inducing) medium at 36 °C for different periods of time (270, 360 min) after the temperature shift (C, D). All strains were able to complete the cell cycle in glucose medium at the permissive temperature (25 °C). However, when the same strains were grown at 36 °C in glucose medium, all of the cells, except the wild-type (rounded shape), stopped dividing and some of them had an irregular shape. After the temperature shift to 36 °C in galactose medium, the *cdc28-1N* cells transformed with pYD52-CrCDKA or pYD52-CrCDKB formed small and large buds (arrows).

essed the galactose-inducible promoter of the pYD52-CrCDKA and pYD52-CrCDKB plasmids, when the cultures were shifted from 25 to 36 °C.

Additional evidence of complementation ability is shown in Fig. 4, where nuclear morphology (bottom panels of each foursome) and spindle formation (top panels of each foursome) in formaldehyde-fixed cells is revealed by DAPI staining and indirect immunofluorescence using the mouse monoclonal antibody DM-1A against  $\alpha$ -tubulin. In the wild type, large budded cells were indicative of cells in G2 or M phase. Their nuclei were normally located in the bud neck, or in the case of cells that had completed mitosis, the divided nuclei were found in both the mother and the bud (McMillan and Tatchell 1994). As shown in Fig. 4 (bottom panels of each foursome), wild-type (wt) cells that had grown at 25 or 36 °C in glucose medium, had nuclei in one of these two normal configurations. Note that a similar situation can be seen in the *cdc28-1N* strain transformed with either pYD52-CrCDKA or pYD52-CrCDKB grown at 25 °C in glucose medium or at 36 °C in galactose medium. However, the pattern was different in the non-transformed mutant strain. The cells grew normally at 25 °C, but at 36 °C in galactose medium, abnormal cells contained either one or two nuclei in one cell body. After a period of growth at the restrictive temperature, temperature-sensitive mutant cells showed rather uniform and sometimes unusual cellular and nuclear morphologies. The cells of the *cdc28-1N* mutant continued to elongate at the restrictive temperature and, after two or more generations, displayed very elongated and even branched structures (Hartwell et al. 1973, Sur-

ana et al. 1990). In yeast, microtubules emanate from the spindle pole body (SPB), the functional equivalent of the centrosome in animal cells, which is embedded in



**Fig. 4.** Morphology of wild-type, non-transformed and transformed *cdc28-1N* temperature-sensitive mutant strain of *S. cerevisiae*. Each foursome represents one strain at the permissive temperature (25 °C) in glucose medium (left panels) and after 4 h at the restrictive temperature (36 °C) in inducing galactose medium (right panels). The top panels show indirect fluorescence of  $\alpha$ -tubulin, bottom panels show the nuclei stained by DAPI.

the nuclear envelope (Hartwell et al. 1973, Byers 1981). The SPB is duplicated at around the time of bud emergence, and these later separate to opposite sides of the nucleus. Astral microtubules extend from the SPBs into the cytoplasm, while intranuclear microtubules extend between the SPBs and from SPBs to kinetochores to form a spindle (Byers 1981). Spindle formation was evident in the wild type and the mutant strains transformed with the *Chlamydomonas* CDKA or CDKB genes, grown either at the permissive temperature (25 °C) in glucose medium or at the restrictive temperature (36 °C) in galactose medium. However, in the case of the temperature-sensitive mutant *cdc28-1N* (Fig. 4) grown at 36 °C, spindle formation was not visible and only astral microtubules were observed.

The presented results indicate that mutant yeast cells expressing the *Chlamydomonas* CDKs were able to progress through the cell cycle. The functional complementation of the *CDC28* mutant was dependent upon transcription of the algal CDKA or CDKB cDNA because transformed cells exhibited growth at the restrictive temperature (36 °C) in the inducing galactose-raffinose medium, while there was no growth in the repressing glucose medium at the same temperature. The *cdc28-1N* strain used for the complementation is impaired in the G2/M-specific functions of *CDC28* (Surana et al. 1990). The ability of both CDKA and CDKB to complement this mutation implies that they could have a role in the regulation of mitosis. CDKA is expressed ubiquitously during the *Chlamydomonas* cell cycle, while CDKB is expressed preferentially during the S/M phase (Bišová et al. 2005, Fang et al. 2006). It would be interesting to know whether both kinases regulate mitosis *in vivo* and if, and to what extent, their

functions overlap. The ability of plant-specific CDKB from *Chlamydomonas* to rescue the yeast temperature-sensitive mutant suggests that it was capable of binding yeast cyclins, despite a modification of the PSTAIRE motif. This indicates that *Chlamydomonas* CDKB could still be fulfilling an evolutionary primitive role in the regulation of mitosis while higher plant CDKBs have acquired other functions outside the cell cycle, as suggested by Corellou et al. (2005). Previously, the only B-type CDK known to be able to complement a *CDC28<sup>ts</sup>* mutation of *S. cerevisiae* was CDKB from the distantly related green alga *Ostreococcus tauri* (Corellou et al. 2005). It is intriguing that *O. tauri* CDKB complements the *cdc28-4* mutation in *S. cerevisiae*, since this mutant is impaired in the G1/S function of CDC28. However, analysis of expression and kinase activity implied that CDKB is the major regulator of mitosis in *O. tauri* (Corellou et al. 2005). We, therefore, expect that it should also complement the “mitotic” *cdc28-1N* mutation.

The current work shows that both A- and B-type CDKs from the green alga *C. reinhardtii* are able to complement the G2/M block of the budding yeast *cdc28-1N* temperature-sensitive mutant. This indicates that both kinases may have a role in the regulation of mitosis, which is in agreement with the presumed functions of A- and B-type CDKs in higher plants. Interestingly, while two algal B-type CDKs are known to be able to complement *CDC28* mutation: *O. tauri* (Corellou et al. 2005) and *C. reinhardtii* (this work), none of the higher plant B-type CDKs are able to do so (Mironov et al. 1999). It would be interesting to see whether B-type CDKs from other algal species can complement this mutation and whether *Chlamydomonas* CDKB is a major mitotic player *in vivo*, or has more derived functions similar to higher plant CDKBs.

## Acknowledgements

We thank Dr. Misako Ohkusu for the *S. cerevisiae cdc28-1N* mutant strain, Dr. Steve Reed and Dr. Kim Nasmyth for the plasmids with the *CDC28* gene, and Prof. John Brooker for critical reading and suggestions.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grants 204/06/0102 and 301/03/0289), the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (grants no. IAA5020305 and IAA500200614) and the Institutional Research Concept (no. AV0Z50200510).

## References

Andrews B, Measday V (1998) The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet* 14: 66–72

Archambault V, Chang EJ, Drapkin BJ, Cross FR, Chait BT, Rout MP (2004) Targeted proteomic study of the cyclin-Cdk module. *Mol Cell* 14: 699–711

Bišová K, Krylov DM, Umen JG (2005) Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 137: 475–491

Byers B (1981) Cytology of the yeast life cycle. In: Strathern JN, Jones EW, Broach JR (eds) *Molecular biology of the yeast Sac-*

*charomyces*. Life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 59–96

Cisek LJ, Corden JL (1989) Phosphorylation of RNA-polymerase by the murine homolog of the cell-cycle control protein *cdc2*. *Nature* 339: 679–684

Colasanti J, Tyers M, Sundaresan V (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional *p34<sup>cdc2</sup>* homologue from *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3377–3381

Coleman AW (1982) The nuclear-cell cycle in *Chlamydomonas* (Chlorophyceae). *J Phycol* 18: 192–195

Corellou F, Camasses A, Ligat L, Peaucellier G, Bouget FY (2005) Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* 138: 1627–1636

De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363: 595–602

Dewitte W, Murray JAH (2003) The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54: 235–264

Donnan L, John PCL (1983) Cell cycle control by timer and sizer in *Chlamydomonas*. *Nature* 304: 630–633

Donnan L, John PCL (1984) Timer and sizer controls in the cell cycles of *Chlamydomonas* and *Chlorella*. In: Streiblová E (ed) *Microbial cell cycle*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp 231–251

Fang SC, de la Reyes C, Umen JG (2006) Cell size checkpoint control by the retinoblastoma tumor suppressor pathway. *PLoS Genet* 2: e167

Ferreira PCG, Hemery AS, Villarroel R, Van Montagu M, Inze D (1991) The *Arabidopsis* functional homologue of the *p34<sup>cdc2</sup>* protein kinase. *Plant Cell* 3: 531–540

Fleig UN, Gould KL, Nurse P (1992) A dominant negative allele of *p34(cdc2)* shows altered phosphoamino acid content and sequesters *p56(cdc13)* cyclin. *Mol Cell Biol* 12: 2295–2301

Goodenough UW (1992) Green yeast. *Cell* 70: 533–538

Guo Z, Stiller JW (2004) Comparative genomics of cyclin-dependent kinases suggest co-evolution of the RNAP II C-terminal domain and CTD-directed CDKs. *BMC Genomics* 5: 69

Gutman BL, Niyogi KK (2004) *Chlamydomonas* and *Arabidopsis*. A dynamic duo. *Plant Physiol* 135: 607–610

Harper JDI, John PCL (1986) Coordination of division events in the *Chlamydomonas* cell cycle. *Protoplasma* 131: 118–130

Hartwell LH, Mortimer RK, Culotti J, Culotti M (1973) Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 74: 267–286

Hašek J, Rupeš I, Svobodová J, Streiblová E (1987) Tubulin and actin topology during zygote formation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 133: 3355–3363

Hirt H, Pay A, Györgyey J, Bakó L, Neméth K, Bögre L, Schweyen RJ, Heberle-Bors E, Dudits D (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to *p34<sup>cdc2</sup>*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1636–1640

Hunter T, Plowman GD (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 22: 18–22

Inze D (2005) Green light for the cell cycle. *EMBO J* 24: 657–662

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 15: 163–168

Jimenez J, Alphey L, Nurse P, Glover DM (1990) Complementation of fission yeast *cdc2Ts* and *cdc25Ts* mutants identifies 2 cell cycle genes from *Drosophila* - A *cdc2* homologue and string. *EMBO J*: 3565–3571

John PCL (1987) Control points in the *Chlamydomonas* cell cycle. In: Wiesnar W, Robinson DG, Starr RC (eds) *Algal development. Molecular and cellular aspects*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, pp 9–16

Joubes J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin J-P (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* 43: 607–620

Krek W, Nigg EA (1989) Structure and developmental expression of the chicken *cdc2* kinase. *EMBO J* 8: 3071–3078

Lee MG, Nurse P (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327: 31–35

Lörincz AT, Reed SI (1984) Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene *CDC28* and vertebrate oncogenes. *Nature* 307: 183–185

- McMillan JN, Tatchell K (1994) The *JNM1* gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is required for nuclear migration and spindle orientation during the mitotic cell-cycle. *J Cell Biol* 125: 143–158
- Mendenhall MD (1998) Cyclin-dependent kinase inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Top Microbiol Immunol* 227: 1–24
- Michaelis C, Weeks G (1992) Isolation and characterization of a *cdc2* cDNA from *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* 1132: 35–42
- Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inzé D (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants - the nexus. *Plant Cell* 11: 509–529
- Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261–291
- Mori H, Palmer RE, Sternberg PW (1994) The identification of a *Caenorhabditis elegans* homolog of p34<sup>cdc2</sup> kinase. *Mol Gen Genet* 245: 781–786
- Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116: 221–234
- Nurse P, Bissett Y (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 control of mitosis in fission yeast. *Nature* 292: 558–560
- Rochaix JD (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet* 29: 209–230
- Šetlík I, Berková E, Doucha J, Kubín, Vendlová J, Zachleder V (1972) The coupling of synthetic and reproduction processes in *Scenedesmus quadricauda*. *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* 7: 172–217
- Spudich JL, Sager R (1980) Regulation of the *Chlamydomonas* cell-cycle by light and dark. *J Cell Biol* 85: 136–146
- Sueoka N (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 83–91
- Surana U, Robitsch H, Price C, Schuster T, Nasmyth K (1990) The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 65: 145–161
- Takeo K, Ogura Y, Virtudazo E, Raclavsky V, Kawamoto S (2004) Isolation of a CDC28 homologue from *Cryptococcus neoformans* that is able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 4: 737–744
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425: 859–864
- Wang Y, Dimitrov K, Garrity LK, Sazer S, Beverley SM (1998) Stage-specific activity of the *Leishmania major* CRK3 kinase and functional rescue of a *Schizosaccharomyces pombe cdc2* mutant. *Mol Biochem Parasitol* 96: 139–150
- Zachleder V, Šetlík I (1990) Timing of events in overlapping cell reproductive sequences and their mutual interactions in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *J Cell Sci* 97: 631–638
- van den Ende H (1992) Cell cycle events in the green alga *Chlamydomonas eugametos* and their control by environmental factors. *J Cell Sci* 102: 469–474

## **Publikácia 2**

Sviežená B., Ševčovičová A., Gálová E., Hamzová A., Hendrychová J.,  
Čížková M., Bišová K., Vítová M., Zachleder V., Vlček D.

**The response of novel *Chlamydomonas reinhardtii*  
*uvrX1* and *uvrX2* mutants to DNA damage and the implications  
for cell cycle regulation.**

Plant Cell Reports, v 2. recenznom konaní

Barbara Sviežená<sup>1</sup>, \*Andrea Ševčovičová<sup>1</sup>, Eliška Gálová<sup>1</sup>, Alena Hamzová<sup>1</sup>, Jana Hendrychová<sup>2</sup>, Mária Čížková<sup>2</sup>, Kateřina Bišová<sup>2</sup>, Milada Vítová<sup>2</sup>, Vilém Zachleder<sup>2</sup>, Daniel Vlček<sup>1</sup>

## The response of novel *Chlamydomonas reinhardtii* *uvsX1* and *uvsX2* mutants to DNA damage and the implications for cell cycle regulation

**Abstract** Two alleles of a novel *Chlamydomonas reinhardtii* UV-sensitive mutant, *uvsX1* and *uvsX2* have been isolated and characterized. The mutant cells showed higher induced mutability, *uvsX1* cells also showed higher spontaneous mutability. Both *uvsX1* and *uvsX2* were found to be deficient in pyrimidine-dimer excision. Moreover, in contrast to the wild type cells, large proportion of *uvsX1* and *uvsX2* cells underwent divisions before dying and formed microcolonies of dead cells after mutagen treatment. Interestingly, the mutant cells were also significantly smaller than wild type cells. The tendency of the mutant cells to form microcolonies of dead cells indicated a possible role of *UVSXI/2* gene in the coordination of the cell cycle in the presence of DNA damage. To study the possible involvement of *UVSXI/2* in DNA-damage dependent cell-cycle arrest, we artificially blocked cell cycle in G2 delay by MBC, a drug affecting microtubules. This block was not sufficient for the restoration of the standard phenotype implying that it is rather DNA damage sensing/repair what is affected by the mutation. The effect of DNA damage on the cell cycle progression of the mutant cells has been investigated. The course of growth and reproductive processes including changes in the histone H1 kinase activity revealed affected cell-cycle progression; probably due to the inability to detect the primary lesion. A putative role of *UVSXI/UVSX2* in DNA damage recognition is discussed.

**Keywords** Cell-cycle regulation; Cyclin-dependent kinase; DNA damage; *Chlamydomonas reinhardtii*; UV sensitivity;

## **Publikácia 3**

Vítová M., Bišová K., Hendrychová J., Čížková M., Hlavová M.,  
Umysová D., Zachleder V.

**A circadian clock is not involved in the timing of cell division in the alga  
*Chlamydomonas reinhardtii*.**

(rukopis)



# **A circadian clock is not involved in the timing of cell division in the alga *Chlamydomonas reinhardtii***

Milada Vítová, Kateřina Bišová, Jana Hendrychová, Mária Čížková, Monika Hlavová, Dáša Umysová, Vilém Zachleder<sup>1</sup>

Laboratory of Cell Cycles of Algae, Division of Autotrophic Microorganisms, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 37981 Třeboň, Czech Republic

Author for correspondence:

e-mail zachleder@alga.cz, phone 420 384 724389, fax 420 384 721246

Running title: Circadian clock and cell division in algae

## **ABSTRACT**

Circadian rhythms control many cellular processes in algae. Their role in regulating the cell cycle is, however, unclear and published results are controversial. To test the alleged circadian timing of cell division in algae, we examined asynchronous and synchronized cultures of the alga *Chlamydomonas reinhardtii* in a wide range of both light intensity and temperature. The length of the cell cycle varied widely with minimal values below and maximal values far above the circadian ones. We conclude that circadian clocks do not play a role in the timing of *Chlamydomonas* cell division.

per hour.

## Publikácia 4

Hendrychová J., Vítová M., Čížková M., Bišová K., Zachleder V.

**Chloroplast fission in the alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) is concomitant with the activity of a mitotic cyclin-dependent kinase.**

Protoplasma, v recenznom konaní.

# **Chloroplast fission in the alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) occurs normally in the presence of extremely elevated mitotic cyclin-dependent kinase activity**

**J. Hendrychová, M. Vítová, M. Čížková, K. Bišová, and V. Zachleder\***

Laboratory of Cell Cycles of Algae, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 37981 Třeboň, Czech Republic

\*Correspondance and reprints: Laboratory of Cell Cycles of Algae, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 37981 Třeboň - Opatovický mlýn, Czech Republic.  
E-mail: zachleder@alga.cz

Running title: Chloroplast fission in *Scenedesmus*

**Summary.** Chloroplast and cellular divisions can be in green alga *Scenedesmus quadricauda* uncoupled in the presence of a specific inhibitor of nuclear DNA replication, 5-fluorodeoxyuridine. Under these conditions, growth of the culture and attaining of the commitment points was nearly unaffected while DNA replication(s), nuclear division(s), and protoplast fission(s) were blocked. On contrary, division of chloroplast occurred almost normally with same timing as in the control culture. A Z-ring forming chloroplast protein FtsZ involved in the plastid fission was followed during the cell cycle. FtsZ was localized around pyrenoids and formed numerous spots and mini-rings. The abundance and localization of the protein were comparable in control and inhibited cells. Interestingly, the cells grown in the presence of inhibitor possessed very high mitotic histone H1 kinase activity in the absence of any nuclear division(s). Comparing to the control cultures the kinase activity was excessively high without any oscillation. The data imply that either a process/es leading to DNA replication and the mitotic activation of CDK are triggered simultaneously or the *S. quadricauda* cells lack a DNA replication/DNA damage checkpoint mechanism inhibiting CDK activity.

**Keywords:** Cell cycle; Chloroplast fission; Cyclin-dependent kinase; Fluorodeoxyuridine; FtsZ; *Scenedesmus quadricauda*