Doktori (Ph.D.) értekezés

Terecskei Kata

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2013

**Egy kis GTP-kötő fehérje szerepe a növényi cirkadián óra,
stressz-válaszok és a fényfüggő endoreduplikáció
szabályozásában**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: Terecskei Kata

Témavezető: Dr. Kozma-Bognár László

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Növénybiológiai Intézet

Foto- és Kronobiológiai Csoport

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
BEVEZETÉS	3
SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
Cirkadián ritmusok	4
Alapfogalmak, mérési módszerek	4
A növényi cirkadián óra modellje	7
<i>A cirkadián óra felépítése</i>	<i>7</i>
<i>A központi óra</i>	<i>8</i>
A bemeneti oldal elemei	12
<i>A fényérzékelés</i>	<i>13</i>
<i>Jelátviteli utak</i>	<i>16</i>
A kimeneti oldal elemei	17
<i>A csíranövények növekedése</i>	<i>17</i>
<i>Szerv- és sejtszintű ritmikus folyamatok</i>	<i>18</i>
<i>A nappalhosszúság szerepe</i>	<i>19</i>
<i>A külső és belső idő összehangolásának jelentősége</i>	<i>20</i>
<i>A hormonok szerepe a cirkadián óra kimenetének szabályozásában</i>	<i>20</i>
A LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1 (LIP1) szerepe a cirkadián óra szabályozásában	21
<i>A lip1 mutáció hatása a periódusra</i>	<i>21</i>
<i>A lip1 mutánsok hajnalban érzékenyek a beállító fénypulzusra</i>	<i>21</i>
<i>A LIP1 szerepe a fotomorfogenezis szabályozásában</i>	<i>22</i>
<i>A LIP1 gén egy atipikus kis GTP-kötő fehérjét kódol</i>	<i>23</i>
Az abiotikus stressz-válaszokban szerepet játszó jelátviteli utak	24
<i>Ionikus stressz</i>	<i>24</i>
<i>Szárazság és ozmotikus stressz</i>	<i>25</i>
<i>A cirkadián óra szerepe a stressz-folyamatok szabályozásában</i>	<i>26</i>
Endoreduplikáció	27
<i>Az endoreduplikációs ciklusba lépés</i>	<i>29</i>
<i>Az endoreduplikációs ciklus fenntartása</i>	<i>29</i>
<i>Fiziológiai tényezők hatása az endoreduplikációra</i>	<i>30</i>
<i>A fitokrómok szerepe az endoreduplikáció szabályozásában</i>	<i>31</i>
<i>A cirkadián óra és az endoreduplikáció kapcsolata</i>	<i>31</i>
CÉLKITŰZÉSEK	33
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
Tápanyagok és táptalajok	34
<i>Bakteriális táptalajok</i>	<i>34</i>
<i>Növényi táptalajok</i>	<i>34</i>
Kísérleti élőlények	35
<i>Növények</i>	<i>35</i>
<i>Baktériumok</i>	<i>36</i>
Molekuláris biológiai és biokémiai módszerek	36
<i>Plazmidok</i>	<i>36</i>
<i>Riportergén és génkonstrukciók készítése</i>	<i>36</i>
<i>Növényi DNS tisztítása</i>	<i>37</i>
<i>Növényi RNS tisztítása</i>	<i>38</i>

<i>mRNS szint meghatározása valós idejű PCR-rel</i>	38
<i>Növényi összfehérje tisztítása</i>	39
<i>Relatív fehérjemennyiségek meghatározása immunoblot módszerrel</i>	39
Növények előkészítése és nevelése, alkalmazott vizsgálatok	40
<i>Magsterilizálás, növénynevelés</i>	40
<i>Transzgenikus növények előállítása</i>	41
<i>Fénykezelések</i>	41
<i>Lumineszcencia-mérés élő növényben</i>	41
Alkalmazott mikroszkópos eljárások	42
<i>Epifluoreszcens mikroszkópia</i>	42
<i>Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)</i>	42
<i>Differenciál interferencia kontraszt (DIC) mikroszkópia és a sejthalak faktor számítása</i>	43
<i>Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia</i>	43
DNS tartalom meghatározása áramlási citometriával	43
Statisztikai analízis	43
EREDMÉNYEK	44
A <i>LIP1</i> fehérje hiányában megváltozik a sziklevél felszíni bőrszöveti sejtjeinek alakja.....	44
A <i>lip1</i> mutáns növényekben megnő a magi DNS mennyisége	46
<i>A LIP1 fehérje hatása a csíranövények kromatintartalmára</i>	46
<i>A LIP1 fényfüggő módon gátolja az endoreduplikációt</i>	47
A <i>LIP1</i> szerepe a fotomorfogenezis szabályozásában a fitokróm B-től és a kriptokróm 1-2-től függ, de a fitokróm A-tól nem.....	51
A <i>lip1</i> mutánsok fokozottan érzékenyek az abiotikus stresszre	52
A <i>LIP1</i> sejten belüli elhelyezkedése.....	58
<i>A sejten belüli elhelyezkedés módosítása</i>	58
<i>A LIP1 fehérje sejtmagi elhelyezkedése esszenciális a cirkadián funkció ellátásához</i>	59
A <i>LIP1</i> szerepe a cirkadián óra szabályozásában.....	64
<i>A kimeneti elemek időbeli mintázatának vizsgálata</i>	64
<i>RNS szintű vizsgálatok</i>	65
<i>Episztatikus génkölcsonhatások vizsgálata</i>	66
AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE	71
A <i>LIP1</i> pleiotróp funkcióinak vizsgálata.....	71
<i>A LIP1 az endoreduplikáció szabályozásában fényfüggő módon vesz részt</i>	71
<i>A LIP1 fitokróm B és kriptokróm 1-2 függő módon szabályozza a fotomorfogenezist</i>	71
<i>LIP1 fehérje hiányában a növények érzékenysége megnő az ozmotikus stresszel szemben</i>	72
<i>Kis GTP-kötő fehérjék szerepe a stressz-válaszokban, a ploidia szint meghatározásában és a sejthalak kialakításában</i>	72
<i>A lip1 mutáció okozta fenotípusok komplementálhatósága</i>	74
<i>A LIP1 szerepe a növények fejlődésének korai szakaszában fontos</i>	74
A <i>LIP1</i> és a cirkadián óra kapcsolata	75
KÖVETKEZTETÉSEK	76
SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	77
IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK	78
ÖSSZEFOGLALÁS	88
SUMMARY	92
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA	abszcizinsav
ABRE	ABA RESPONSIVE ELEMENT
ACT	aktin
AM	Arabidopsis Medium, növényi táptalaj
BCIP	5-bróm-4-klór-3-indolil foszfát
bHLH	bázikus „helix-loop-helix” motívum
BRASS	Biological Rhythms Analysis Software System
C24	<i>Arabidopsis thaliana</i> , C24 ökotípus
CCT	„constans/constans-like/timing of cab 1” elem
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Columbia-0 ökotípus
Col-3	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Columbia-3 ökotípus
cps	count per seconds = 1 másodperc alatt beérkező fotonok száma
CSF	cell shape factor = sejtalak faktor
CTAB	cetil-trimetil-ammónium bromid
DIC	differential interference contrast
DRE	DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EE	evening element = esti elem
EMS	etil-metán szulfonát
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FMN	flavin-mononukleotid
FRC	fluence rate curve
GDI	guanine-nucleotide dissociation inhibitor
GDP	guanozin-difoszfát
GTP	guanozin-trifoszfát
LB	Luria-Bertani Medium
LOV	light/oxygen/voltage domén
MS	Murashige-Skoog növényi táptalaj
MTHF	metil-tetra-hidro-folát
NBT	nitroblue-tetrazólium
NES	nukleáris export szignál
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
PAS	Per/Arnt/Sim domén
P _{fr}	a fitokróm távoli vörös fényt abszorbeáló konfomerje
pPCV	plant cloning vector
P _r	a fitokróm vörös fényt abszorbeáló konfomerje
PRC	phase response curve
PRONE	Plant RHO Nucleotide Exchanger fehérjemotívum
PVP	polivinil-pirrolidon
RBCS	rubisco kis alegysége
RCA	rubisco aktiváz
ROS	reactive oxygen species = reaktív oxigéngyökök
SCF	Skp-Cullin-F-box
SD	standard deviation = standard eltérés
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SE	standard error = standard hiba
SEM	standard error of the mean = a középértékek standard hibája, illetve pásztázó elektron mikroszkóp szövegkörnyezettől függően
TRIS	trisz(hidroximetil)amino-metán
UV-A/B	ultraibolya-A/B sugárzás
YEB	Yeast Beef, <i>Agrobacterium</i> táptalaj

GÉNSZIMBÓLUMOK

ABF	ABRE-BINDING FACTOR
ABAR	ABA-BINDING PROTEIN
ACS	AMINO-CYCLOPROPANE-CARBOXYLATE SYNTHASE
CAB	CHLOROPHYLL A/B-BINDING
CBF	C-REPEAT BINDING FACTOR
CCA	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED
CCR	COLD CIRCADIAN CLOCK REGULATED
CHE	CCA1 HIKING EXPEDITION
CDK	CYCLIN DEPENDENT KINASE
CIR	CIRCADIAN
CK	CASEIN KINASE
CKB	CASEIN KINASE β -SUBUNIT
CKI	CYCLIN DEPENDENT KINASE INHIBITOR
COP	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS
COR	COLD RESPONSIVE
CRY	CRYPTOCHROME = kriptokróm
CYC	CYCLIN = ciklin
DET	DE-ETIOLATED
DREB	DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING
ELF	EARLY FLOWERING
EPR	EARLY PHYTOCHROME-RESPONSIVE
FHY	FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL
FIO	FIONA
FKF	FLAVIN BINDING KELCH F-BOX
FT	FLOWERING LOCUS T
GFP	GREEN FLUORESCENS PROTEIN
GI	GIGANTEA
GUN	GENOME UNCOUPLED
HY	ELONGATED HYPOCOTYL
HYH	HY5 HOMOLOG
KRP	KIP- RELATED PROTEIN
LHY	LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LIP	LIGHT INSENSITIVE PERIOD
LUC	LUCIFERASE <i>Photinus pyralis</i>
LUX	LUX ARRHYTHMO
MYB	MYELOBLASTOSIS VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
PER	PERIOD
PHOT	PHOTOTROPIN = fototropin
PHY	PHYTOCHROME = fitokróm
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PIL	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR-LIKE
PRR	PSEUDO RESPONSE REGULATOR
RAB	RESPONSIVE TO ABA
RCC	REGULATOR OF CHROMATIN CONDENSATION
RD	RESPONSIVE TO DESICCATION
ROP	RHO OF PLANTS
RVE	REVILLE
SIM	SIAMASE
SOS	SALT OVERLY SENSITIVE
SPY	SPINDLY
SRR	SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED
TEJ	„fényes” szanszkrit megfelelője
TIC	TIME FOR COFFEE
TOC	TIMING OF CAB
UVR	UV RESISTANCE LOCUS
YFP	YELLOW FLUORESCENS PROTEIN
ZTL	ZEITLUPE

BEVEZETÉS

24 órás gyakorisággal ismétlődő folyamatok szinte minden élőlényben megfigyelhetők. Ezek a periodikusan változó folyamatok állandó környezeti körülmények között is fennmaradnak napokig vagy akár hetekig, mivel egy belső ritmusgeneráló rendszer, a cirkadián óra fenntartja őket. A ritmus a környezetünkben tapasztalható nappal/éjjel ciklushoz környezeti jelek segítségével igazodik.

Az óra összhangja a külső környezeti idővel adaptív előnyt jelent az élőlények számára, segítségével a metabolikus és fiziológiai folyamataikat megfelelően tudják időzíteni a nap folyamán. A kétszikű *Arabidopsis thaliana* a laboratóriumi vizsgálatok során gyakran használt modell növény. Ebben a növényben a megfelelően beállított cirkadián óra hozzájárul a klorofill tartalom növekedéséhez, a fotoszintetikus szén fixálás hatékonyabbá tételéhez, ezáltal a gyorsabb növekedéshez és nagyobb biomassza termeléséhez is. A cirkadián óra kölcsönhat a stressz és a hormon jelátviteli utakkal is. A vegetatív növekedés során az óra nemcsak a külső fényjelekre, hanem a hőmérsékletváltozásra és a stresszre adott válaszokat is szabályozza.

A cirkadián óra szerepét a növények növekedésének és fejlődésének szabályozásában mi sem bizonyítja jobban, mint az, hogy milyen fontos szerepe van a napszakos változásoknak olyan hosszú távú folyamatokban, mint az egyes szervek fejlődése, vagy a szezonális változások. Az óra szerepe egy folyamaton belül is többszintű lehet. Kiváló példája ennek a virágzás fotoperiodikus szabályozása. Az óra szerepe a stressz-válaszok és az anyagcsere szabályozásában, a csírázási képesség befolyásolásában, a növekedés és virágzás szabályozásában sokkal fontosabb lehet, mint korábban gondoltuk. Az óra által szabályozott folyamatok modellje egyre bonyolultabbá és komplexebbé válik, amint összegezni próbáljuk a külső környezeti jelekre adott párhuzamos válaszokat és az egyes óra komponensek különböző válaszokban betöltött többértékű szerepét.

Munkánk során a LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1 (LIP1) vizsgálatával foglalkoztunk, ami több különféle életfolyamatban is részt vesz. A LIP1 szerepet játszik a cirkadián óra és a fotomorfogenikus folyamatok szabályozásában, az endoreduplikáció befolyásolásában és bizonyos stressz folyamatokban is.

SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

Cirkadián ritmusok

Alapfogalmak, mérési módszerek

A Föld tengely körüli forgásának következtében napszakos változások figyelhetők meg bizonyos környezeti tényezők esetében. Ilyen például a hőmérséklet és a fényviszonyok ciklikus változása a nap folyamán. Az evolúció során az élőlények alkalmazkodni kezdtek ezekhez a napszakosan változó körülményekhez, megtanultak időben felkészülni a periodikusan bekövetkező változásra. Ez az alkalmazkodó képesség teszi lehetővé, hogy a környezeti jelek érzékelésével, illetve az azokban bekövetkező változások előre jelzésével az élőlények a legmegfelelőbb időpontra tudják időzíteni belső folyamataikat. A külső idő érzékelése és az ezzel való szinkronizációs képesség egyaránt az ún. „belső órának” köszönhető, amely méri a külső időt és ugyanakkor egy belső, hozzávetőlegesen 24 órás ritmust is generál (Bell-Pedersen és mtsai, 2005). A cirkadián ritmusok napi rendszerességgel ismétlődnek (latin *circa diem*, egy nap körüli). Cirkadián szabályozás alatt áll az emberi alvás/ébrenlét ciklus, de a testhőmérséklet és a vérnyomás is. Cirkadián ritmusok szinte minden, az éjszakák és nappalok váltakozásának kitett élőlényben megfigyelhetők az egysejtűektől a gombákon át, egészen a növényekig és a gerincesekig (Dunlap, 1999).

A cirkadián ritmus jellemző változói Roenneberg és Merrow (2001) szerint:

- a külső környezeti jelek hiányában is fennmaradó ritmus (jelen esetben a szinusz görbének megfelelő oszcilláció);
- a 24 órás periódus (egy teljes ritmikus ciklus időtartama, egy jelenség ismétlődési gyakorisága);
- a kellően erőteljes amplitudó (a szinusz görbe minimuma és maximuma közti különbség), ami a kimeneti jelek fenntartásához szükséges;
- a ritmus önfenntartó képessége;
- a hőmérséklet kompenzáció (bizonyos hőmérséklet-tartományon belül az óra képes kompenzálni a hőmérséklet-ingadozást, így a szabadon futó ritmus periódusa és erőteljessége nem változik);
- a beállíthatóság (a ritmus külső 24 órás ciklushoz való egyeztetetőségének képessége).

1. ábra. Cirkadián ritmusok jellemző paramétereit

Az ábrán cirkadián óra által szabályozott folyamatok mérhető tulajdonságai láthatóak. A beállító fényviszonyokat a fekete és fehér szakaszok jelölik az x tengelyen. Változatlan fényviszonyok között a szubjektív éjszaka és nappal fogalmával azt fejezzük ki, hogy mikor következne a beállító fény/sötét váltásoknak megfelelő napszak. Kísérleteink során az utolsó beállító nappal kezdetétől számítjuk az eltelt időt. Periódusnak nevezzük két egymást követő minimum vagy maximum pont időbeli távolságát. A minimum és maximum érték közötti kitérés az amplitúdó. A ritmus fázisa azt mutatja meg, hogy a cirkadián cikluson belül hol tartózkodik a rendszer egy adott vonatkoztatási ponthoz képest. Ezt rendszerint a görbe csúcsidejének és a viszonyítási időpontnak a különbségeként adjuk meg.

A cirkadián ritmus legfontosabb paramétereit az 1. ábra mutatja be. Ha egy cirkadián tulajdonság kifejeződését az idő függvényében ábrázoljuk, akkor a periódust a görbe két azonos pontjának (pl. az egymást követő csúcsoknak) időbeli távolsága adja meg. Ha csökken a távolság, akkor a periódus rövidebb lesz, ha nő, akkor hosszabb. A szabadon futó cirkadián ritmusok periódusa általában 24 óra. A ritmus fázisa azt mutatja meg, hogy a cirkadián cikluson belül hol tartózkodik a rendszer egy választott vonatkoztatási ponthoz képest. A ritmust erőteljesnek mondjuk, ha a kitérések nem változnak számottevően az egymást követő ciklusok során. Szubjektív éjszakaként vagy nappalként tüntetjük fel a állandó körülmények között a beállító fény/sötét ciklusoknak megfelelő időszakokat. Ezzel azt fejezzük ki, hogy ekkor következne a megfelelő napszak. Kísérleteink során az utolsó beállító nappal kezdetétől számítjuk az eltelt időt. A cirkadián óra működése a legkönnyebben úgy követhető nyomon, ha egy általa vezérelt gén promóterét a szentjánosbogár *luciferáz* (*LUC*) génjéhez fűzünk (Somers és mtsai, 1998a). A luciferáz reakciót fénykibocsátás kíséri, a módszerrel a génkifejeződés cirkadián ritmusa hosszú ideig mérhető élő növényben is.

A cirkadián órát be lehet állítani rövid fénypulzussal is. Attól függően, hogy az óra milyen fázisban tart éppen, ez késést vagy sietést okoz. Az óra a nap egy részében szinte teljesen

érzékeny a beállító fényjelekre, a legnagyobb fáziscúszásokat pedig a szubjektív éjszaka közepén lehet kiváltani. Ha a szabadon futó rendszert különböző időpontokban adott azonos erősségű és időtartamú fénypulzusokkal állítjuk be, és a mért fáziscúszásokat az adott fénypulzusok idejének függvényében ábrázoljuk, megkapjuk az adott minőségű és intenzitású fénypulzusra adott fázisválasz görbét (PRC, Phase Response Curve) (Johnson, 1992) (2. ábra A).

Szabadon futó körülmények között a periódus a legtöbb élőlényben függ az alkalmazott fény erősségétől (Aschoff, 1979). Növényeknél minél erősebb a fény, annál rövidebb a periódus. A periódus fényerősségtől való függését a fényerősség-függés görbe (FRC, Fluence Rate Curve) segítségével vizsgálhatjuk. Az azonos módon beállított növényeket eltérő erősségű állandó monokromatikus fénybe helyezzük 96-120 órára, majd a periódushosszt mérjük és az alkalmazott fényerősség tízes alapú logaritmusának függvényében ábrázoljuk (2. ábra B).

2. ábra. A fény hatása a cirkadián órára

Az óra beállításának alapja, hogy egy központi óraelem működését egy fénypulzus ideiglenesen meg tudja változtatni. Attól függően, hogy a pulzus milyen fázisban éri az órát, sietést vagy késést vált ki.

(A) A sietéseknek és késéseknek a fénypulzus idejének függvényében való ábrázolásával kapjuk a fázisválasz görbét (PRC, Phase Response Curve). Erős pulzusokkal nagyobb fáziscúszásokat lehet kiváltani, mint gyengébbekkel.

(B) Az állandó körülmények között kialakuló periódust az alkalmazott fényerősség tízes alapú logaritmusának függvényében ábrázolva kapjuk a fényerősség-függés görbét (FRC, Fluence Rate Curve). Az ábrázolt egyenesek eltérő meredeksége az óra megváltozott fényérzékenységére utaló példa.

A növényi cirkadián óra modellje

A cirkadián óra körülbelül a gének 10-16%-ának transzkripcióját szabályozza *Arabidopsis*-ban (Covington és mtsai, 2008). A cirkadián óra által generált ritmus abban különbözik a külső környezeti jelekre adott válaszoktól, hogy állandó körülmények (állandó fény vagy sötétség) között is fennmarad. A cirkadián ritmusok környezeti jelekkel a nappal-éjjel ciklusokhoz igazíthatóak. Ilyen környezeti jelek például a változó hőmérsékleti és fényviszonyok hajnalban és szürkületkor, bár a beállító környezeti jelek más időpontokban is hatásosak lehetnek.

A növényi cirkadián óra által szabályozott folyamat például a levelek és a sziklevelek napszakos mozgása, a kloroplasztiszok sejten belüli rendeződése, a szik alatti szár megnyúlásának napszak-függése, a gázcsere nyitása-zárása és a virágzás fotoperiodikus szabályozása (Yakir és mtsai, 2007). Belső oszcilláció figyelhető meg gének kifejeződési mintázatában, fehérjék kifejeződésében, a nukleocitoplazmikus eloszlásban, de egyes fehérjék foszforiláltsági mintázatában is (McClung, 2006).

A cirkadián óra felépítése

Leegyszerűsítve a növényi cirkadián óra három fő alkotórészből épül fel (3. ábra): az első a bemeneti rész, ami a környezeti jeleket érzékeli és továbbítja az óra felé, a második a központi óra (oszcillátor), ami a ritmust generálja, a harmadik pedig a kimeneti rész, ami az oszcillátort a különféle biológiai folyamatokkal köti össze. A központi óra és a kimeneti rész egyaránt visszahatnak a bemeneti részre, illetve a kimeneti részt is közvetlenül szabályozhatják a beérkező környezeti jelek (Más, 2008). A központi óra elemeit kódoló gének cirkadián ritmusban fejeződnek ki, és a jelenleg elfogadott modell szerint három pozitív/negatív visszacsatoláson alapuló kört alkotnak.

3. ábra. A cirkadián óra vázlatos felépítése

A cirkadián órát három egységre bonthatjuk. A központi óra (oszillátor), amely a környezettől függetlenül képes ismétlődő mintázat létrehozására. Azonban fontos, hogy a belső ritmus a külső, természetes ritmussal összhangban legyen. Az órabeállítást naponta a környezeti jeleket érzékelő molekulák és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli elemek központi órához való csatolása teszi lehetővé (bemenet). Az órát sokféle környezeti jellel be lehet állítani, de a két legfontosabb a fény és a hőmérséklet. A létrehozott ismétlődő mintázat a kimeneti jelátviteli utakon keresztül nyilvánul meg különféle élettani folyamatokban, amelyek gén, illetve szerv szinten is megfigyelhetők. Az ábra eredeti verziója Más (2008) összefoglaló cikkéből származik.

A központi óra

A jelenleg elfogadott modell szerint *Arabidopsis*-ban a központi óra három visszacsatoláson alapuló körből épül fel (McWatters és Devlin, 2011) (4. ábra). Az első körben a CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) és a LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) MYB-típusú transzkripciós faktorok gátolják a *TIMING OF CAB 1* (*TOC1*), vagy más néven *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 1* (*PRR1*) gén kifejeződését (Alabadi és mtsai, 2001). A *PSEUDO RESPONSE REGULATOR* géncsalád tagjai cirkadián ritmus szerint fejeződnek ki (Nakamichi és mtsai, 2005), 2-3 órás késéssel érik el a maximumot egymás után a nap folyamán, mégpedig úgy, hogy a *PRR9* az első a nap reggelén és a *TOC1* az utolsó az este folyamán elért maximális kifejeződéssel. A *CCA1* és *LHY* mRNS kifejeződésének maximuma a nap kezdetén figyelhető meg, míg a *TOC1* kifejeződésének maximuma az esti órákra tehető. A nap folyamán a *CCA1* és az *LHY* foszforilálódnak, majd az így módosult fehérjék lebomlanak. Ez a *TOC1* kifejeződés gátlásának feloldásához vezet a délután folyamán, az így emelkedő *TOC1* fehérje szint pedig a *CCA1* és *LHY* gének kifejeződésének serkentésében fog szerepet játszani (McWatters és Devlin, 2011). A *CCA1* és *LHY* olyan MYB-elem tartalmú DNS-kötő fehérjék, amelyek a DNS-en az ún. esti elemet (Evening Element, EE) (Harmer és mtsai, 2000; Alabadi és mtsai 2001) ismerik fel. Szerepük részben átfed: a két gén bármelyikének túlermelése minden vizsgált ritmus megszűnését (Wang és Tobin, 1998), hiánya a ritmusok periódusrövidülését okozza (Green és Tobin, 1999;

Mizoguchi és mtsai, 2002), együttes hiányuk csaknem teljes aritmiával jár (Ding és mtsai, 2007a). Közvetlenül kötődnek a *TOC1* promóteréhez, és gátolják annak működését (Alabadí és mtsai, 2001). A *TOC1* komplexet képez egy TCP transzkripciós faktorról, a *CCA1* HIKING EXPEDITION (CHE)-vel, ami a *CCA1* promóterhez kapcsolódik (Pruneda-Paz és mtsai, 2009). A CHE és *TOC1* fehérjék közvetlen kölcsönhatásban állnak egymással és ugyanazon szakaszhoz kötődnek a *CCA1* promóteren. A CHE feltehetően azon mechanizmus egyik fontos alkotóeleme, ami által a *TOC1* a *CCA1* kifejeződését szabályozza. Lehetséges, hogy a *TOC1* és a CHE antagonisztikus hatásúak a *CCA1* promóteréhez való kötésben. A CHE azonban az *LHY* promóteréhez nem képes kötni, így ezen gén szabályozásában feltehetően más *TOC1*-kötő partnereknek lehet szerepe. A központi szabályozás egy másik szintje lehet továbbá az, hogy a *CCA1* és *LHY* képesek saját maguk és egymás kifejeződését is gátolni (Schaffer és mtsai, 1998; Wang és Tobin, 1998).

Matematikai modellek alapján feltételezik egy ún. X elem létét, amely serkentő hatással van a *CCA1/LHY* gének kifejeződésére. Az X elem szerepét részben a *TOC1* és a CHE, továbbá az EARLY FLOWERING 3 (ELF3) és/vagy az ELF4 molekulák töltik be (Locke és mtsai, 2005). ELF3 és ELF4 hiányában a *CCA1/LHY* kifejeződése drámaian lecsökken (Doyle és mtsai, 2002; Kikis és mtsai, 2005).

Az ún. reggeli szabályozó hurkot két PSEUDO RESPONSE REGULATOR, a *PRR7* és *PRR9*, valamint az általuk negatívan szabályozott *CCA1* és *LHY* alkotják. A *CCA1* és *LHY* fehérjék pedig kölcsönösen serkentik a *PRR7* és *PRR9* gének kifejeződését. A *PRR*-ek a karboxi-végükön egy CCT (CONSTANS, CONSTANS-LIKE, *TOC1*)-elemet hordoznak, amelyen egy sejtmagi lokalizációs szignál is található (Makino és mtsai, 2000). Az ilyen molekulák nem közvetlenül szabályozzák az átírást, hanem feltehetően segédfehérjéken keresztül (Ben-Naim és mtsai, 2006). A *TOC1*-hez hasonló gének mindegyikéről kimutatták, hogy közülük van a cirkadián órához, noha az egyszeres mutánsok cirkadián fenotípusa nem jelentős. A *toc1* mutáns rövid periódusú fenotípust mutat (Sommers és mtsai, 1998), a *prp5* mutáns szintén (Eriksson és mtsai, 2003), viszont a *prp7* mutánsnak gyakorlatilag nincsen cirkadián fenotípusa (Nakamichi és mtsai, 2005), a *prp9* mutáns pedig hosszú periódusú fenotípust mutat (Eriksson és mtsai, 2003). A többszörös mutánsok súlyosabban sérültek, például a *prp7 prp9* dupla mutáns extrém hosszú periódusú, holott az egyszeres *prp7* mutánsnak nincs is cirkadián fenotípusa. A legszélsőségesebb hatású a *prp5 prp7 prp9* háromszoros mutáns, amelyben megszűnik mindenféle ritmus (Nakamichi és mtsai, 2005).

4. ábra. A növényi cirkadián óra modellje

A jelenlegi modell szerint a központi oszcillátor három, negatív visszacsatoláson alapuló szabályozóhurokból épül fel. A reggeli hurkot a CIRCADIAN CLOCK REGULATED 1 (CCA1) és a LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), két MYB-típusú fehérje és génjei, valamint a PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7 és 9 (PRR7,9) fehérjék és génjeik alkotják. A CCA1/LHY fehérjék közvetlenül serkentik a *PRR7/9* gének átíródását, a PRR-ek pedig közvetett módon gátolják a *CCA1/LHY* géneket. A központi hurokban a TOC1 egy feltételezett X elemen keresztül serkenti a *CCA1/LHY* géneket, míg a *CCA1/LHY* fehérjék közvetlenül a *TOC1* promóteréhez kapcsolódva gátolják annak működését. Az X elem szerepét részben a CCA1 HIKING EXPEDITION (CHE) tölti be. A CHE közvetlenül köt a *CCA1* promóterhez, gátolva a *CCA1* kifejeződését. A CHE kifejeződését a CCA1 gátolja. A CHE és a TOC1 közti direkt fehérje-fehérje kölcsönhatás pedig gátolja a CHE kötődését a *CCA1* promóterhez. Az esti hurok tagjai a PRR-családba tartozó TIMING OF CAB 1 (TOC1) és egy Y elem, részben a GIGANTEA (GI). Az Y ismeretlen módon serkenti a *TOC1* gén kifejeződését, míg a TOC1 fehérje szintén ismeretlen módon gátolja az Y gént. A CCA1/LHY nemcsak a *TOC1*, hanem az Y, valamint saját génjeik kifejeződésére is gátló hatással vannak. Az EARLY FLOWERING 3 (ELF3) és LUX ARRHYTHMO (LUX) az esti hurok komponensei és a *PRR7* kifejeződését gátolják. A TOC1 fehérje lebontását a ZTL-SCF-E3 ubikvitin ligáz komplex végzi, ezt a GI és ZTL közti fényfüggő direkt kölcsönhatás gátolja. A PRR3 a ZTL-lel antagonizál a TOC1-hez való kötésben. A PRR3 és TOC1 közti kapcsolatot foszforillációjuk serkenti. A TOC1 kölcsönhatása a PRR5-tel a TOC1 sejtmagi akumulációját segíti. Az ábra eredeti verziója Haydon és mtsai (2011) cikkéből származik.

A harmadik szabályozó hurok az ún. esti időzítésű hurok. Ennek lényeges komponense egy ismeretlen Y elem, amelynek szerepe a *TOC1* gén kifejeződésének serkentése. Az Y génről matematikai modellek alapján prediktálható, hogy mind a TOC1, mind pedig a CCA1/LHY gátolja (Locke és mtsai, 2005). Az Y funkcióinak egy részéért a GIGANTEA

(GI) lehet a felelős, feltehetően további, eddig ismeretlen, illetve nem bizonyított faktorokkal együtt (Locke és mtsai, 2005; Zeilinger és mtsai, 2006). A GI (Mizoguchi és mtsai, 2005) egy nagyméretű sejtmagi fehérje, amely nem tartalmaz ismert fehérje motívumot. A *GI* mRNS és fehérje cirkadián módon fejeződik ki, kora esti maximummal (David és mtsai, 2006). A *gi* mutáns növényben az *LHY* és *CCA1* gének kifejeződése erősen csökkent, ami arra utal, hogy a GI a megfelelő *LHY* és *CCA1* szint kialakításában játszik szerepet. A *gi* mutánsok periódusa rövidebb a vad típusú növényekhez képest (Martin-Tryon és mtsai, 2007). A *gi* mutánsban a periódus fényerősség-függése is kisebb mértékű, mint a vad típusban (Park és mtsai, 1999).

Több olyan cirkadián szabályozó elem is ismert, amelyek nagy hatással vannak az órára, de nincsenek benne minden jelenleg elfogadott modellben. Ilyen például a LUX ARRHYTHMO (LUX), amelynek hiányában teljes aritmia tapasztalható (Hazen és mtsai, 2005b). A LUX egy MYB-szerű DNS-kötő elemmel rendelkező fehérje, amely szükséges a *CCA1/LHY* megfelelő szintjének kialakításához és a *TOC1* ritmusának kialakulásához. A LUX a *TOC1*-hez hasonlóan szabályozódik, mivel a *CCA1/LHY* a promóterében levő esti elemhez kötődve gátolja a kifejeződését. A *REVILLE1 (RVE1)*, *CIRCADIAN1 (CIR1/RVE2)* és *EARLY PHYTOCHROME RESPONSIVE1 (EPR1/RVE7)* egy MYB transzkripciós géncsalád tagjai, mely családba a *CCA1* és *LHY* is tartoznak (Kuno és mtsai, 2003; Yanhui és mtsai, 2006; Zhang és mtsai, 2007). Kifejeződési mintázatuk a *CCA1* és *LHY*-éhoz hasonló, azonban úgy tűnik csak a *CIR1*-nek van szerepe a központi órában, az *EPR1* és *RVE1* az óra kimeneti útvonalaival állnak összeköttetésben. Az *RVE1* összefüggésbe hozható az auxin szint cirkadián ritmusú modulációjával (Kuno és mtsai, 2003). A SPINDLY (SPY) fehérje, egy acetil-glükózamin transzferáz, kölcsönhat a GI-vel, és az óra sebességére van hatással (Tseng és mtsai, 2004). Szintén az óra sebességét befolyásolják a TEJ, egy poli-(ADP-ribóz)-glikohidroláz (Panda és mtsai, 2002) és a FIONA 1 (FIO1), ami egy feltételezett metiltranszferáz (Kim és mtsai, 2008).

Az óragének átíródásának szabályozásán alapuló jelenlegi modell alapja az egyes komponensek mRNS szintjének időbeli változása. Az mRNS stabilitást és transzkripciót a cirkadián óra és a fény által szabályozott jelátviteli utak egyaránt befolyásolják (Kim és mtsai, 2003). Azonban fontos szerepet tölt be az óra működésében az egyes komponensek fehérjéinek poszt-transzlációs szabályozása is, ami egyaránt hatással van a fehérjék működésére és mennyiségére is. Sok órafehérje stabilitása a proteoszóma rendszer által szabályozott. A folyamat során a célfehérjét E3 ubiquitin ligázok ismerik fel és ubiquitinálják, majd a 26S proteoszóma bontja le őket. Az Skp/Cullin/F-box komplexek az E3 ubiquitin ligázok egy speciális csoportját képezik, ahol a szubsztrát-specifititás különböző F-box

fehérjék által meghatározott (Lechner és mtsai, 2006). A TOC1 és homológja a PRR5 proteoszóma általi lebomlása egy fényfüggő F-box fehérje, a ZEITLUPE (ZTL) által szabályozott (Kiba és mtsai, 2007; Fujiwara és mtsai, 2008). A ZTL az éjszaka folyamán kötődik a TOC1-hez, 26S proteoszóma általi degradációját serkentve. Két ZTL homológ, a FLAVIN BINDING KELCH F-BOX 1 (FKF1) és a LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) szintén kölcsönhatnak a TOC1-gyel (Más és mtsai, 2003). Ugyanakkor a ZTL és a GI között fényfüggő kapcsolat van, ami a GI fehérje szintet stabilizálja a nap folyamán (Kim és mtsai, 2007). Ez a kölcsönhatás gátolja a ZTL és a TOC1 közti interakciót. A TOC1 stabilizálását szolgálja továbbá, hogy komplexet képez a PRR3 fehérjével. Ez meggátolja a ZTL-lel való kölcsönhatást az éjszaka kezdetekor (Para és mtsai, 2007). Látható, hogy a TOC1 fehérje lebontása összetett folyamat, amelyben szerepet játszik a ZTL, a GI és a PRR3. Más órafehérjék szabályozott lebontása is megfigyelhető. A PRR3, PRR7 és PRR9 fehérjék szintje is az óra által szabályozott, de ez a ZTL-től független (Farré és Kay, 2007; Ito és mtsai, 2007; Fujiwara és mtsai, 2008).

A fehérje foszforilláció szintén egy olyan folyamat, ami az órakomponensek aktivitását és mennyiségét befolyásolja. A CASEIN KINASE 2 (CK2) 2 α és 2 β -alegységből épül fel. A CKB3 β -alegység a CCA1-et képes foszforilálni és ezáltal annak homodimer-képző, és DNS-kötő képességét is szabályozni (Daniel és mtsai, 2004). A CKB4 alegység foszforillációját és degradációját is az óra szabályozza (Perales és mtsai, 2006). Cirkadián foszforillációs mintázat megfigyelhető továbbá a PRR család már említett tagjainál is (Farré és Kay, 2007; Fujiwara és mtsai, 2008). A TOC1 és a PRR3 foszforilált formái megnövekedett kölcsönhatási hajlamot mutatnak egymással. Ez arra utal, hogy a TOC1 stabilitásának szabályozásában foszforiláltsági állapotuknak fontos szerepe van és így kompetíció alakul ki, tekintve, hogy a ZTL-el vagy a PRR3-mal hat kölcsön a TOC1 (Fujiwara és mtsai, 2008).

A bemeneti oldal elemei

A cirkadián ritmusok periódusa nem pontosan 24 óra, ezért az elcsúszás elkerülése érdekében az órát naponta hozzá kell igazítani a külső időhöz. A beállítást környezeti tényezők (elsősorban a fény és a hőmérséklet) változása váltja ki. A változást erre specializálódott molekulák érzékelik és fordítják át biokémiai jelekre. Az érzékelő molekulák a jelet ezután a hozzájuk kapcsolt jelátviteli hálózaton keresztül juttatják el a központi órához. A jel az órafehérjék szintjét vagy működését változtatja meg, mintegy finomhangolva ezzel a cirkadián órát.

A fényérzékelés

A cirkadián órát a fény nem a fotoszintézis fényelnyelő és energiaátalakító rendszerén, hanem speciális érzékelő fehérjéken keresztül szabályozza. A fényérzékelő molekulákat, melyeken keresztül a fény a cirkadián órát eléri, az általuk elnyelt fény hullámhossza alapján három nagy csoportba oszthatjuk:

1. A vörös/távoli vörös fényt érzékelő fitokrómok (Nagy és Schaefer, 2002)
2. Az UV-A és kék tartományban elnyelő kriptokrómok (Lin, 2002)
és a ZTL család tagjai (Demarsy és Fankhauser, 2009)
3. UV-B fényérzékelő molekulák (Fehér és mtsai, 2011).

A fitokrómokat *Arabidopsis*-ban öt gén kódolja, a PHYA, -B, -C, -D és -E (Nagy és Schaefer, 2002). Az egyes gének által kódolt fehérjék nagyfokú homológiát mutatnak. A magasabbrendű növényekben található fitokrómok két ~125 kDa molekulasúlyú fehérje által alkotott dimerként vannak jelen natív formában. A PhyA esetében csak homodimer, a PhyB-E esetében heterodimer képzés is megfigyelhető. Minden monomerhez (ún. apoprotein) kapcsolódik egy nyílt láncú tetrapirrol természetű fitokromobilin festékmolekula, egy konzervált ciszteinen keresztüli tioéter kötéssel. Így jön létre az apoproteinből és kromofórból álló holoprotein.

A kromofór fényelnyelési tulajdonságainak köszönhetően a fitokrómoknak két alakjuk van: a vörös fényt elnyelő etiolált növényben nagy mennyiségben felhalmozódó és élettanilag hatástalan P_r ($\lambda_{\max}=660$ nm) forma, valamint a távoli vöröset elnyelő aktív P_{fr} ($\lambda_{\max}=730$ nm) forma (Franklin, 2005). A fitokrómok a sejtben P_r alakban képződnek, majd vörös fény elnyelésekor átalakulnak P_{fr} alakba. Ez az alak távoli vörös fény hatására képes visszakerülni az eredeti P_r állapotba, amelybe egyébként idővel sötétben magától is visszaalakul. A fitokróm molekula karboxi-végén egy hisztidin-kinázokkal szekvencia homológiát mutató rész található, ezáltal a fitokróm fényszabályozott kinázként képes működni.

A fitokrómok sötétben a sejtplazmában helyezkednek el, fény hatására pedig a sejtmagba vándorolnak, ahol fényfüggő gének kifejeződését szabályozzák (Kevei és mtsai, 2007b). A fitokrómok működésük alapján két csoportba sorolhatók. Az I-es csoport tagjai (*Arabidopsis*-ban a PHYA) fényben gyorsan lebomlanak, fotolabilisak így legnagyobb mennyiségben a sötétben nőtt növényekben találhatók meg (Furuya és Schaefer, 1996). A PHYA szerepe elsősorban a csírázás megindításában és nagyon gyenge fényben a zöldülés szabályozásában van. A II-es csoportot a többi (*PHYB-E*) gén terméke alkotja. Ezek a fehérjék fényben nehezebben bomlanak, fotostabilak, ezért a zöld növények uralkodó

fitokrómjai. A zöldülés folyamatát, a szár megnyúlását, az árnyékelkerülést és a virágzást szabályozzák.

A kriptokróموkat elsőként növényekben azonosították, mint a mikrobiális DNS fotoliázokkal nagyfokú rokonságot mutató fehérjéket (Cashmore és mtsai, 1999). Növényekben elsősorban a kék/UV-A-függő élettani folyamatok szabályozásában játszanak szerepet. Amino-végükön flavin-adenin-dinukleotid (FAD), illetve metil-tetrahidrofolát (MTHF) festékmolekulát kötni képes fotoliáz-szerű, karboxi-végükön pedig szerin/treonin kináz fehérjeelemet tartalmaznak (Lin és Shalitin, 2003). A kriptokróموk sejtmagi elhelyezkedésűek. *Arabidopsis*-ban két kriptokróm található, a CRY1 és a CRY2. A két fehérje fénystabilitása különbözik: kék fény hatására a CRY2 lebomlik, míg a CRY1 fehérje szintje nem változik (Yu és mtsai, 2007). Ennek megfelelően a CRY2 szerepe gyenge, míg a CRY1-é inkább erős fényben fontosabb.

A kriptokróموk és a fitokróموk együttesen játszanak szerepet a deetioláció folyamatának kialakulásában. A deetioláció során a csíranövények az ún. szkotomorfogenikus (sötétben fejlődés) állapotból fotomorfogenikus (fényen fejlődés) állapotba lépnek át, mely folyamat során a hipokotil megnyúlása abbamarad, szétnyílnak és kizöldülnek a sziklevelek, valamint fejlődésnek indul a gyökérzet. A *cry1 cry2 phyA phyB* négyszeres mutáns fehér fényen nevelve a vad típusú etiolált növényhez hasonló morfológiát mutat. Azonban a cirkadián óra szabadon futó ritmusa, ami a sziklevelek ritmikus mozgásán figyelhető meg, megfelelően beállított marad. Szintén erőteljes cirkadián ritmus figyelhető meg a *phyA phyB phyC phyD phyE* ötszörös mutánsban is (Strasser és mtsai, 2010). Ez arra utal, hogy a szabadon futó ritmus kialakításához a fő fotoreceptoroktól jövő jelek nélkülözhetőek (Yanovsky és mtsai, 2000a). Folyamatos fehér fényben nevelt *Arabidopsis* növények esetében a szabadon futó periódus megközelítőleg 24 órás, míg folyamatos sötétben nevelt növények esetében a periódus 30 óra lesz néhány nap után. A deetiolációban főszerepet játszó fotoreceptorok mindegyike továbbít jelet a cirkadián óra felé. Folyamatos vörös fényben a PhyA és PhyB (valamint kisebb mértékben a Phy D és E is) rövidíti az óra periódusát, míg folyamatos kék fényben a periódus rövidüléséért a CRY1 és CRY2 felel. Két esetben lehetséges átfedés a fitokróm és a kriptokróm jelátviteli utak között. A fitokróm A olyan mennyiségben halmozódik fel gyenge fényviszonyok között, hogy kismértékű kék fény elnyelési képessége is nagyfokú periódus rövidülést okoz. Másodszorban pedig a CRY1-nek fontos szerepe van a gyenge vörös fényre adott vad típusú válasz kialakításában, holott az abszorpciós spektruma nem mutat fényelnyelést ebben a tartományban (Devlin és Kay, 2000).

A ZTL, az LKP2 és az FKF1 egy UV-A és kék fény érzékelő fehérjecs család tagjai (ADO/FKF/LKP/ZTL család). A bennük megtalálható LOV (LIGHT, OXIGENE OR VOLTAGE) domén a fototropinok LOV motívumával rokon. A LOV domén a PAS (Per-ARNT-Sim) szupercsalád tagja, és a fototropinok kék fény érzékelésében játszik szerepet (Ogura és mtsai, 2008). A LOV motívumot eredetileg olyan bakteriális fehérjékben azonosították, amelyek különféle környezeti tényezők, például fény, redox állapot, ill. feszültség érzékelésében vesznek részt. A LOV motívum flavin-mononukleotid (FMN) redoxfestéket köt. Található ezekben a fehérjékben egy F-box elem, ami olyan fehérjékre jellemző, amelyek az SCF (Skp1-Cul1-F-box) ubikvitin-ligáz komplex részeként fehérjék irányított lebomlásában működnek közre (Kipreos és Pagano, 2000). Az F-box fehérjék a lebontási folyamat kezdeti lépéseként a lebontandó célfehérjék felismerését és az ubikvitin-ligázhoz történő kapcsolását végzik. A harmadik motívum az ADO/FKF/LKP/ZTL család tagjaiban egy β -propeller szerkezetű fehérjefelismerő elem, a KELCH, amelynek változékonysága lehetővé teszi a célfehérjék egyedi felismerését (Adams és mtsai, 2000).

A ZTL gén elrontása a cirkadián ritmus periódusának hosszabbodását okozza, ugyanakkor a növény fejlődési és fiziológiai folyamataira nincs számottevő hatással (Somers és mtsai, 2000). A periódus változása a fényerősségtől erősen függ, ami arra utal, hogy a ZTL-nek a fénybemenetben van szerepe. Az FKF1 a virágzás nappalhosszúság függésében kulcsszerepet játszó fehérje, a *CONSTANS* (*CO*) gén napszakos kifejeződését szabályozza a CYCLING DOF FACTOR 1 (*CDF1*) lebontásán keresztül. Az *fkf1* mutánsban emellett a cirkadián ritmus is megváltozik (Imaizumi és mtsai, 2005). Az LKP2 túltermelése aritmiát okoz (Schultz és mtsai, 2001). Mint már korábban említettem, a ZTL kölcsönhat a *TOC1* és *PRR5* órakomponensekkel, serkentve proteasóma általi degradációjukat. A ZTL továbbá kölcsönhat a *GI* fehérjével kék fényfüggő módon. Ez a kölcsönhatás stabilizálja mind a *GI*, mind a ZTL fehérjét, utóbbit megakadályozva ezáltal abban, hogy kölcsönhasson szubsztrátfehérjével. A *GI* kölcsönhat a ZTL homológ FKF1-gyel is, szintén kék fényfüggő módon, ebben az esetben a virágzási idő befolyásolásában szerepet játszó transzkripciós faktor stabilitását szabályozva (Sawa és mtsai, 2007).

A fotomorfogenikus, nem károsító hatású UV-B fény is hatással van a cirkadián órára, az óra beállító jelként képes érzékelni azt (Fehér és mtsai, 2011). A folyamatban részt vesz a növényi UV-B fotoreceptor az UV RESISTANCE LOCUS 8 (*UVR8*) és a CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (*COP1*) fehérje (Rizzini és mtsai, 2011). Az *UVR8* a növényekben homodimerként előforduló, β -propeller szerkezetű fehérje, mely az emberi REGULATOR OF CHROMATIN CONDENSATION 1 (*RCC1*) fehérjével mutat nagyfokú

hasonlóságot. Az UV-B fényt specifikus helyzetű triptofán aminosavakon keresztül érzékeli, jellegzetes kromofórt nem köt a fehérje (Rizzini és mtsai, 2011). A molekula UV-B fény hatására percekben belül monomerizálódik és a sejtmagba vándorol. Ott kölcsönhat a COP1 fehérjével (Favory és mtsai, 2009), valamint kötődik az általa szabályozott gének, többek között az *ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5)* promoteréhez (Cloix és Jenkins, 2008). A cirkadián óra periódusa alacsony intenzitású UV-B hatására fényintenzitástól-függő módon rövidül, akárcsak a látható fény esetében. A HY5 és a vele homológ HY5 HOMOLOG (HYH) transzkripciós faktorokra nincs szükség ehhez a periódusváltozáshoz (Fehér és mtsai, 2011). Meghatározott időben adott UV-B pulzusokkal a cirkadián óra fázisa megváltoztatható a szubjektív éjszaka folyamán, a HY5 és HYH transzkripciós faktorokra nincs szükség a fázisváltáshoz. A beállítás az óragének transzkripciós aktiválásán keresztül történik (Fehér és mtsai, 2011). A cirkadián óra maga is visszahat az UV-B fénnel indukált génekre az ún. kapuzási mechanizmus segítségével. A kapuzás szerepe abban nyilvánul meg, hogy a növények egy adott környezeti jelre nem egyforma mértékben reagálnak a nap folyamán. A HY5 UV-B indukcióját nem szabályozza a cirkadián óra, azonban a HYH átíródását igen (Fehér és mtsai, 2011).

Jelátviteli utak

A fényérzékelő fotoreceptorok és a központi óraelemek közt elhelyezhető elemekről még keveset tudunk. Az ELF3 és ELF4 fehérjék negatívan szabályozzák az óra bemeneti részét, valamint mindkettő szükséges a megfelelő, erőteljes ritmus fenntartásához (McWatters és mtsai, 2000; McWatters és mtsai, 2007). A COP1 és az ELF3 fehérjék együttesen felelősek a GI fehérje ubiquitinálásáért és lebomlásáért, ezt a folyamatot a kék fény a CRY2-n keresztül gátolja (Yu és mtsai, 2008). A COP1 a fotomorfogenezis egyik fontos negatív szabályozó eleme, egy ubiquitin ligáz, ami számos fotomorfogenezisben szerepet játszó fehérje 26S proteaszóma általi lebontását szabályozza. A FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL 1 és 3 (FHY1 és FHY3) hiányában távoli vörös fénnel nem váltható ki fáziscssúszás (Yanovsky és mtsai, 2000b), így ezek a fehérjék is nélkülözhetetlenek az óra megfelelő működéséhez.

A TIME FOR COFFEE (TIC) szerepe elsősorban a cirkadián ritmusok periódusának és amplitudójának fenntartásában van (Ding és mtsai, 2007b). A *tic* mutánsokban minden kimenet sérül, de nem egyforma módon és mértékben. Ezekben a növényekben fényben és sötétben sem működik megfelelően a cirkadián óra.

A SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1 (SRR1) fehérje a vörös és fehér fényválaszok pozitív szabályozó eleme, és fontos szerepe van az óra sebességének szabályozásában (Staiger és mtsai, 2003). Az *srr1* mutáns kevésbé érzékeny a vörös fényre,

és számos egyéb, PHYB-függő fényválasza is sérült. Állandó körülmények között az *srr1* szabadon futó ritmusának periódusa a vad típushoz képest rövidebb. Az SRR1 kifejeződését a vörös fény serkeni, ezért az SRR1 az óra fényérzékenységének beállításában vesz részt.

A kimeneti oldal elemei

A cirkadián óra számos fejlődési szakaszt befolyásol a növény életciklusa folyamán. Némelyek ezek közül napi rendszerességgel ismétlődnek és a cirkadián óra direkt szabályozása alatt állnak, mások pedig évszakosan ismétlődnek és a nappalhossz változás alapján szabályozódnak, amit szintén a cirkadián óra közvetít. A cirkadián óra már a növényi élet legkorábbi szakaszában is működik. *Arabidopsis*-ban az órát már a magvak beáztatásával be lehet állítani. Csíranövényeket sötétben nevelve a beáztatást követő második naptól megfigyelhető az óragének kifejeződésében a cirkadián mintázat (Salomé és mtsai, 2008). Sok növényfajnál leírták már, hogy a virágzási időt a cirkadián óra határozza meg a nappalhosszúság mérésén keresztül, így időzítve azt a legmegfelelőbb évszakra.

A csíranövények növekedése

A cirkadián óra szabályozza *Arabidopsis* csíranövények szik alatti szárának megnyúlását: a megnyúlás mértéke nem egyforma a nap során. A fény és az óra együttesen alakítják ki a ritmikus mintázatot. A cirkadián óra kora éjszaka gátolja a szik alatti szár növekedését, de késő éjszaka nem (Nozue és mtsai, 2007). Ez a diurnális, vagyis napszakos, megvilágítástól függő növekedési mintázat aritmiás növényekben módosul, például a CCA1 túltermelő vagy az *elf3* mutáns növényekben a növekedés serkentése az éjszaka folyamán végig megfigyelhető (Nozue és mtsai, 2007).

A *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4)* és *5 (PIF5)* gének kifejeződését a cirkadián óra szabályozza. A maximum a nappal közepére esik, de a fény a fehérjék lebontását serkentve akadályozza a szár nappali megnyúlását, mivel a PIF4 és PIF5 fehérjék a megnyúlás fontos pozitív szabályzói. Az éjszaka elején viszont a cirkadián ritmus a minimumnál tart, ezért nincs elég fehérje. A külső (fény) és belső (cirkadián ritmus) tényezők időbeli elrendezésének eredménye, hogy csak az éjszaka végén van elég fehérje a megnyúlás beindításához. A fény gátló hatása nem teljes, mivel a megnyúlás mértéke periodikus marad állandó fényben is. Emiatt lehetséges az, hogy a cirkadián óra zavara rendszerint a szik alatti szár hosszának megváltozását is okozza (Dowson-Day és Millar, 1999). Az *Arabidopsis* növények hipokotilján megfigyelhető körkörös mozgás is cirkadián szabályozás alatt áll és a legnagyobb kitérést hajnalban mutatja (Niinuma és mtsai, 2005).

Szerv- és sejtszintű ritmikus folyamatok

A növekedés során a cirkadián óra szabályozza az árnyékelkerülést. Ennek lényege a szomszédos növények jelenlétének érzékelése, ami fontos a fényforrásért folytatott küzdelemben. A szomszédos növényt a növény azáltal érzékeli, hogy az árnyékoló leveleken keresztül érkező fény vörös/távoli vörös aránya a közvetlen napfényéhez képest kisebb. A megváltozott arány érzékelésében a fitokrómoknak van elsődleges szerepe. Az óra hatása génexpressziós szinten nyilvánul meg, többek között a már említett *PIF* transzkripció faktorok és a *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 1 (PIL1)* szabályozásán keresztül. A beárnyékolt növények száruk és levéllyeik megnyúlásával próbálják kompenzálni a kedvezőtlen fényviszonyokat (Salter és mtsai, 2003).

A közvetlen cirkadián szabályozás sejtszinten is megfigyelhető. Ilyen sejtszintű folyamat a gázcsere nyitódása és záródása, amelyet a cirkadián órán kívül sok egyéb tényező (fény, hőmérséklet, páratartalom, CO₂, hormonok, stb.) is szabályoz. Az éghajlati körülmények nagymértékben befolyásolják, hogy a gázcsere nyitódások mely napszakban nyitottak a legnagyobb mértékben. *Arabidopsis*-ban és a legtöbb mérsékelt égövi növényben a gázcsere nyitódások napközben kinyílnak, éjjel pedig bezáródnak (Somers és mtsai, 1998b). A nyitódás közvetlen szabályozásán túl a cirkadián óra a külső szabályozójelek (pl. a fény) hatását kapuzza (Gorton és mtsai, 1993).

A legismertebb napszakosan ismétlődő sejtszintű folyamatok a fotoszintézis és a szénmegkötés. *Arabidopsis*-ban számos, a fotoszintézis fény- és sötétszakaszában fontos gén kifejeződése áll cirkadián szabályozás alatt. Például az I-es és II-es fényelnyelő rendszer klorofill A/B-kötő fehérjéit (*CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN, CAB*) kódoló géneké, a klorofill szintéziséért felelős géneké (pl. *protoporfirin IX magnézium kelatáz*), valamint a CO₂-megkötésben szerepet játszó rubisco enzim kis alegységét (RBCS) és a rubisco aktivált (RCA) kódoló géneké (Harmer és mtsai, 2000). A fehérjék szintje és azok módosítása (például foszforillása) is cirkadián szabályozás alatt áll (Booij-James és mtsai, 2002).

A cirkadián óra a fejlődési faktorokat szabályozhatja például a promotereikben található szabályozó régiókon keresztül. A már említett esti elem a cirkadián óra által szabályozott gének promotereiben gyakran előforduló szakasz. Ugyanakkor ez az elem gyakori a hideg által szabályozott gének promotereiben is (Mikkelsen és Thomashow, 2009). Az esti elem csak néhány nukleotidban különbözik a CCA1-kötő helytől (CBS), amit először a *CAB1* gén promoterében azonosítottak (Michael és McClung, 2003). Ez azonban sokkal ritkábban fordul elő a cirkadián gének promoterében mint az esti elem. A *PRR9* gén promoterében található

meg például egy ún. reggeli elem (Harmer és Kay, 2005), azonban a hozzá kapcsolódó transzkripció faktor még ismeretlen.

A nappalhosszúság szerepe

A mérsékelt égövön az időjárás az év során előre jelezhetően változik és ezek a változások évente nagyjából ugyanúgy ismétlődnek. Az évszakok közötti legkiszámíthatóbb különbség azonban nem az időjárásban, hanem a nappalok hosszában figyelhető meg. Az időbeli tájékozódás legbiztosabb módja éppen ezért a nappalhosszúság változásának mérése, ami a cirkadián óra és a fényérzékelő rendszerek együttműködésén alapul.

A legismertebb évszakhoz kötött fejlődési folyamat az önfenntartó állapotról a reprodukzív állapotra való átkapcsolás, amely visszafordíthatatlan, ezért különösen fontos annak pontos időzítése. A virágzás időzítésének szempontjából megkülönböztetünk hosszúnappalos és rövidnappalos, illetve nappalhosszúságra érzéketlen növényeket. A hosszú- és rövidnappalos azt jelenti, hogy a növények akkor virágoznak inkább, ha a nappalok kellően hosszúak, illetve kellően rövidek.

A virágzást fehérjeszinten a nappalhosszúság azáltal befolyásolja, hogy egy cirkadián módon kifejeződő, fényérzékeny szabályozó fehérje kellően magas szintje kell, hogy elegendően hosszú ideig egybeessen a fényszakasszal a virágzás indukálásához (Searle és Coupland, 2004). *Arabidopsis*-ban ez a fényérzékeny fehérje a CONSTANS (CO) (Suárez-López és mtsai, 2001). A CO feltételezhetően nem közvetlenül, hanem az ún. CCAAT-kötő segédfehérjékkel összekapcsolódva más gének átírását irányítja (Wenkel és mtsai, 2006). A cirkadián óra úgy szabályozza a CO mRNS szintjét, hogy az hosszú nappalos körülmények között már a naplemente előtt emelkedni kezd, és magas szinten marad a következő reggelig. Rövid nappalon viszont csak éjszaka ér el magas szintet, és a keletkező CO fehérje a sötétben lebomlik. A nappal elején a fény a PHYB-n keresztül a CO fehérje lebomlását serkenti, a nap végén a PHVA és a CRY2 játszik szerepet a CO fehérje a távoli vörös és a kék fényfüggő stabilizálásában (Valverde és mtsai, 2004; Liu és mtsai, 2008). Ezért elegendő CO fehérje csak hosszú nappalon, a fényszakasz végén tud felhalmozódni. A nappalok hosszabbodásával a nap végén a CO fehérje mennyisége egyre hosszabb ideig marad magas szinten. Az egyik fő virágzásszabályozó gén, a *FLOWERING LOCUS T (FT)* átírásának beindításához a CO fehérje mennyiségének egy küszöbértéket kell meghaladnia. Az FT mRNS és fehérje a levelekből a csúcsi osztódó szövetbe transzportálódik, ahol beindítja a virágzást (Huang és mtsai, 2005). A virágzás szabályozása a rövidnappalos rizsben is hasonlóképpen zajlik, azonban a CO-nak megfelelő gén az FT-nek megfelelő gént hosszú nappalon nem serkenti, hanem gátolja.

A cirkadián óra az önfenntartó állapotról a reprodukív állapotra való jutáson kívül egyéb fejlődési folyamatokat is a nappalhosszúság mérésén keresztül szabályoz. Ilyen a tápanyag-raktározó szervek évszakos kialakulása (pl. burgonyagumó) és bizonyos mérsékelt égővi fák téli nyugalmi állapota. Ezeknek a folyamatoknak a szabályozása is a *CO* és az *FT* gének működéséhez kapcsolódik.

A külső és belső idő összehangolásának jelentősége

A működőképes órával rendelkező *Arabidopsis* növények életképesebbek váltakozó fényviszonyok mellett, mint a ritmus nélküliek (Green és mtsai, 2002). Egy kísérlet során egy rövid és egy hosszú periódusú *Arabidopsis* mutáns növekedését és fejlődését hasonlították össze különböző hosszúságú napok alkalmazásával. Kiderült, hogy a rövid periódusú mutáns rövid napos (10 óra fény/10 óra sötét) míg a hosszú periódusú mutáns hosszú napos (14 óra fény/14 óra sötét) körülmények között növekszik hatékonyabban, bizonyítva a külső és belső ritmus összehangolásának fontosságát (Dodd és mtsai, 2005).

A hormonok szerepe a cirkadián óra kimenetének szabályozásában

Az abszcizinsav (ABA), a citokininek, a metil-jázmonát, a szalicilsav és az auxin mennyiségét egyaránt szabályozza a cirkadián óra (Covington és Harmer, 2007). A cirkadián óra szabályzó hatása a hormonok kifejeződésére nem meglepő, mivel a hormonok is a cirkadián óra kimeneti részét képezik. Érdekes módon az egyes hormonok is visszahatnak az órára, befolyásolják a periódust, az amplitudót vagy a fázist.

Arabidopsis-ban az etilén hormon kifejeződése napszakos ingadozást mutat. Az AMINO-CYCLOPROPANE-CARBOXYLATE SYNTHASE 8 (ACS8) felelős az etilén egyik prekursorának bioszintéziséért. Az etilén termelődését a cirkadián óra szabályozza, ez arra utal, hogy az etilénnek a kimeneti folyamatokban lehet szerepe. Azonban az etilén bioszintézis és jelátviteli mutánsok esetében a cirkadián rendszer zavara nem figyelhető meg (Thain és mtsai, 2004).

Az indolecetsav és indolecetsav-aszpartát szintje egyaránt ritmikus ingadozást mutat folyamatos fényviszonyok között. Mind az auxin szintézis, percepció és transzport esetében megfigyelhető a ritmikus változás. A virág szár eltávolításával a ritmikus szármegnyúlás, amiért az auxin felel, meggátolható, mivel ez a szerv az endogén auxin képződésének helye. Külsőleg adott auxin segítségével a ritmikus szármegnyúlás helyreállítható (Jouve és mtsai, 1999).

A gibberellinek és a cirkadián óra viszonya bonyolultabb. Az óra és a gibberellinek egyaránt szabályozzák a virágzási időt, de külön genetikai útvonalon (Boss és mtsai, 2004).

A LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1 (LIP1) szerepe a cirkadián óra szabályozásában

A *lip1* mutáció hatása a periódusra

A *lip1* mutációt egy mutáns szűrés során azonosították *Arabidopsis thaliana* C24 ökotípusában (Kevei és mtsai, 2007a). Reggeli és esti kifejeződésű kimeneti géneket vizsgálva egyaránt rövid periódus figyelhető meg a *lip1* mutánsban, sötétben és folyamatos fényben is. Vad típusú növényekben a periódushossz a fényerősség növekedésével csökken. A *lip1* mutánsokban a periódushossz gyakorlatilag változatlan marad minden vizsgált fényintenzitáson vörös és kék fényben is (5. ábra). A LIP1 negatív szerepet tölt be a cirkadián óra periódusának szabályozásában és fényintenzitás-függő módon képes szabályozni azt. A LIP1 hiánya tulajdonképpen a fény jelenlétét mimikálja, ezért tapasztalható rövid periódus a *lip1* mutánsban alacsony fényintenzitáson. A rövid periódus a vizsgált óragének (*CCA1*, *TOC1*, *LHY*) mindegyikének esetében megfigyelhető *lip1* mutánsban (Kevei és mtsai, 2007a).

5. ábra. A *CCR2:LUC* jelzőgén periódusának fényerősségtől való függése vörös és kék fényben

A növényeket 12 óra fény/12 óra sötét ciklusokon nevelték 5 napig, majd folyamatos

(A) vörös, illetve

(B) kék fénybe helyezték őket.

Luminométerrel 5 napig követték a markergén működését.

A periódusértékeket BRASS2 program segítségével számolták. A fényerősséget logaritmikus skálán tüntették fel.

Az eredmények alapján két fontos dolog állapítható meg: egyrészt a *lip1-1* periódusa alig érzékeny a fényre, másrészt erős fényben a *lip1-1* és a vad típus periódusa nem különbözik (Kevei és mtsai, 2007a).

A *lip1* mutánsok hajnalban érzékenyek a beállító fénypulzusra

A cirkadián óra szabályozza saját érzékenységét a beállító fénypulzusokra. A szubjektív éjszaka első felében sokkal nagyobb fáziscsúszások válthatók ki *lip1* mutánsokban, mint vad típusú növények esetében (6. ábra) (Kevei és mtsai, 2007a).

6. ábra. A cirkadián óra beállíthatóságának vizsgálata fénypulzusokkal

A *CCR2:LUC* markergént hordozó növényeket 12 óra fény/12 óra sötét ciklusokon nevelték 7 napig, majd folyamatos sötétbe helyezték őket. 3 óránként 1 óráss, ugyanolyan erősségű

(A) közepes vörös ($18 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

(B) erős vörös ($150 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fénypulzust kaptak. A szürke sávok az időtengelyen a szubjektív nappalt jelölik. A *lip1-1*-ben ugyanolyan fénypulzusokkal nagyobb késéseket lehet kiváltani az éjszaka első felében, mint a vad típusban.

A sietést kiváltó fényre a *lip1-1* vagy érzéketlenebb (B), vagy a vad típushoz hasonló (A) (Kevei és mtsai, 2007a).

A LIP1 szerepe a fotomorfogenezis szabályozásában

A mutánsban a kék és vörös fényre adott fotomorfogenikus válaszok megváltoznak, ez azonban nem a cirkadián óra hibás működésének az eredménye (7. ábra). A LIP1 szerepet játszik a vörös és kék fény általi hipokotil megnyúlás gátlás szabályozásában, azonban a távoli-vörös fény által szabályozott folyamatban nincs szerepe. A *lip1* mutáns növények szik alatti szára rövidebb, mint a vad típusé olyan nagy intenzitású vörös és kék fényben is, ahol a *lip1* cirkadián fenotípusa már nem figyelhető meg. A cirkadián óra szabályozásában és a fotomorfogenikus folyamatokban betöltött szerepe a LIP1-nek ezért különválasztható (Kevei és mtsai, 2007a).

7. ábra. A hipokotilhossz fényerősség-függése

A növényeket 4 napig nevelték monokromatikus fényen, állandó hőmérsékleten (22 °C). A szik alatti szár hosszát mérték, azonos ideig sötétben nevelt növények szárhosszára vonatkoztatták, majd az így kapott értékeket az alkalmazott fényerősség függvényében, logaritmikus skálán ábrázolták. A mintaszám $n = 50$, a hibahatárok a standard hibát jelölik (SE). A *lip1-1* és a vad típusú növények hipokotiljának fényfüggő megnyúlása különbözik vörös (A) és kék (B) fényben, azonban távoli vörös (C) fényben nem (Kevei és mtsai, 2007).

A *LIP1* gén egy atipikus kis GTP-kötő fehérjét kódol

A *LIP1* nagyfokú hasonlóságot mutat a kis GTP-kötő fehérjékkel (Vernoud és mtsai, 2003). A kis GTP-ázok 20–40 kDa molekulásúlyú fehérjék, amelyek guanozin-trifoszfát (GTP) kötésére képesek. Ezek a fehérjék alapállapotukban guanozin-difoszfátot (GDP-t) kötnek. Külső jel hatására egy nukleotidcserélő segédfehérje (GUANINE EXCHANGE FACTOR, GEF) a GDP-t GTP-re cseréli. A GTP-áz szerkezeti átrendeződésen megy keresztül, aminek eredményeképpen a célfehérjéivel képes kölcsönhatni. A nukleotidrogzító segédfehérjék (GUANINE-NUCLEOTIDE DISSOCIATION INHIBITORS, GDI) a cserét gátolják. A GTP-kötött GTP-áz gyenge GTP-bontó képességgel is rendelkezik, ami lehetővé teszi az inaktív, GDP-kötött állapotba való visszaalakulást (Geyer és Wittinghofer, 1997; Paduch és mtsai, 2001). A kis GTP-kötő fehérjék változatos folyamatokat szabályoznak, például a növekedést, osztódást, sejtvezet átrendeződését, sejtmozgást és a sejten belüli anyagmozgatást. A kis GTP-ázokat öt nagyobb és több kisebb családba sorolhatjuk. Az öt nagyobb család a Ras, Rho, Rab, Arf és a Ran (Takai és mtsai, 2001; Wennerberg és mtsai, 2005). Ezen kívül egyre több olyan GTP-ázt írnak le, amelyek sem szerkezetükben, sem működésükben nem hasonlítanak a klasszikus kis GTP-kötő fehérjékre (Leipe és mtsai, 2002).

Növényekben Ras és a Rho család teljesen hiányzik. Helyettük a RHO OF PLANTS (ROP) molekulák vannak jelen. Számos élettani folyamatot szabályoznak, például a sejtvál átrendeződésben van szerepük (Settleman, 2005). Növényekben a Plant RHO Nucleotid Exchanger (PRONE)-elemet tartalmazó RopGEF-ek végzik a nukleotidcserét (Berken és mtsai, 2005).

A LIP1 fehérjében több olyan motívum is található, ami a klasszikus kis GTP-kötő fehérjékre nem jellemző, valamint több konzervált aminosav esetében is eltéréseket mutat. Például a 94-es pozíciójú, igen konzervált glutamin (Vetter és Wittinghofer, 2001) helyett hisztidin található benne. Ennek a glutaminnak a mutációja a GTP-áz aktivitás elvesztéséhez vezet a klasszikus GTP-kötő fehérjék esetében, bár a GTP-kötő képességük megmarad. A C és az N terminálison másodlagos fehérje módosulásokért felelős szakaszok is hiányoznak a LIP1 molekuláról, melyek lipidmódosításokon keresztül a sejthártyához való kötődésért felelősek más kis GTP-kötő fehérjék esetében. A LIP1 a kis GTP-kötő fehérjék egy új alcsaládjába sorolható, GTP-kötő és bontó aktivitással is rendelkezik *in vitro*. Növények esetében ez az első kis GTP-kötő fehérje, amit kapcsolatba hoztak a cirkadián órával.

Az abiotikus stressz-válaszokban szerepet játszó jelátviteli utak

Az alacsony, illetve magas hőmérséklet, a szárazság és a magas só koncentráció olyan általános stressz körülmények, melyek károsíthatják a növények fejlődését és terméshozamát. A környezeti stresszre adott válasz molekuláris és sejtszintű folyamatainak megértése intenzíven kutatott tudományterület. A környezeti változásokra válaszként szignáltranszdukciós kaszkád útvonalak aktiválódnak, amelyek a fiziológiai és biokémiai folyamatokat koordinálják és az adaptációhoz szükségesek.

Egy általános szignál transzdukció a szignál érzékelésével kezdődik, amit másodlagos hírvivő molekulák generálása követ (pl. Ca^{2+} , reaktív oxigéngyökök (ROS), inozitol-foszfátok). A másodlagos hírvivők hatására az intercelluláris Ca^{2+} szint tovább változik, amit Ca^{2+} szenzorok érzékelnek. Ennek következményeképpen foszforillációs kaszkád indul meg, amit a fő stressz-válasz gének indukciója követ (Xiong és mtsai, 2002).

Ionikus stressz

A só stressz során a növények ionikus homeosztázisa sérül, ami a Na^+ toxikus felhalmozódásához vezet a citoplazmában, valamint olyan esszenciális ionok egyensúlyának felborulásához, mint például a K^+ . A SALT OVERLY SENSITIVE (SOS) útvonal nélkülözhetetlen a citoplazma megfelelő ion-koncentrációjának fenntartásához és a só stressz tolerálásához (Zhu, 2002). Az ozmotikus és ionikus stresszre adott válaszok több egymást

követő, illetve párhuzamos lépésből adódnak össze (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1994). A korai válaszok során a sejten belüli Ca^{2+} szint megemelkedik, ez a sejtek ionháztartásának SOS fehérjék által szabályozott változásához vezet. A Ca^{2+} szint megemelkedése és más másodlagos hírvivő molekulák megjelenése (foszfolipidek, reaktív oxigén gyökök) olyan kináz jelátviteli utakat aktivál, amik a korai stressz-válasz gének transzkripcióját serkentik. Az SOS3 egy Ca^{2+} -kötő fehérje, ami a só stressz által indukált kalcium szignált érzékeli. Az SOS2 egy szerin/treonin típusú kináz, az SOS1 pedig egy Na^+/H^+ antiporter a plazmamembránon (Shi és mtsai, 2000). A só stressz során az SOS2 és 3 komplexet képezve foszforilálja és aktiválja az SOS1 antiportert (Batelli és mtsai, 2007). Az SOS1 szerepe a Na^+ sejtől való eltávolítása.

Szárazság és ozmotikus stressz

Az ABA vízhiányos körülmények között termelődik, és fontos szerepet játszik a szárazság és a magas só koncentráció tolerálásában. Külsőleg adott ABA számos dehidrációban és hideg stresszben szerepet játszó gén kifejeződését serkenti. Azonban több olyan gént is leírtak, amelyek szárazság és hideg stressz esetén indukálódnak, azonban külsőleg adott ABA kezelés hatására nem (Zhu, 2002).

A *COLD RESPONSIVE GENES/RESPONSIVE TO DESICCATION* család tagja a *COR78/RD29A* szárazságra, hidegre és exogén ABA kezelésre egyaránt indukálódó gén (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1993). Azonban ABA inszenzitív mutánsokban és ABA bioszintézis mutánsokban is kimutatható indukciója, ezért az ABA-függő és -független útvonalnak is része. A promóterében található DRE-elem (DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT) fontos cisz-ható eleme az ABA független válaszoknak, és más szárazság, illetve hideg stresszre indukálódó gének promóterében is megtalálható (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1994). Az elemhez kötő transzkripciós faktorok a C-REPEAT BINDING FACTOR/DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING 1 és 2 (CBF/DREB1 és 2). Előbbinek a hideg stressz-válaszokban, utóbbinak a szárazság stresszben van szerepe. Nyolc DREB2 homológot írtak le, ezek közül a DREB2A és B a szárazság stressz fő transzkripciós faktorai (Sakuma és mtsai, 2002). Az ABA-válaszelem (ABA RESPONSIVE ELEMENT, ABRE) az ABA-függő útvonal fontos cisz-ható eleme. Két ABRE motívum található például az *RD29B* esetében, melyekhez ABRE-kötő faktorok (ABRE-binding factor, ABF) kötnek és aktiválják az ABA-függő kifejeződést (Choi és mtsai, 2000). A MYC és MYB fehérjék szintén az ABA-függő útvonal aktivátorai, szintézisüket az endogén ABA koncentráció növekedése serkenti (Abe és mtsai, 2003). A RESPONSIVE TO ABA (RAB18) az ABA-függő útvonal részeként indukálódó ozmoprotektáns fehérje. Egyaránt serkenti

kifejeződését szárazság és a só stressz, de a cukor és a foszfáthiány is (Cieszko és Kleczkowski, 2002). Kifejeződésének serkentésében fontos szerepe van az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásának (Ghelis és mtsai, 2000).

A cirkadián óra szerepe a stressz-folyamatok szabályozásában

A cirkadián órának rendkívül fontos szerepe van a stressz-válaszok időbeli szervezésében. A fény ugyan elsődlegesen energiaforrás a növények számára, de a túl sok fény káros lehet a fényelnyelő rendszerekre és a DNS-re is. A fény által okozott károk csökkentése érdekében a növényekben már a napfelkelte előtt megkezdődik a fényvédő molekulák (fenilpropanoidok) képződéséért felelős enzimek génjeinek kifejeződése (Harmer és mtsai, 2000). Nappal a sok fény mellett a magas hőmérséklet és a szárazság, valamint a talajvízben oldott anyagok koncentrációja miatt a só és az ozmotikus stressz okozhat problémát. A gázcsere nyitódását, valamint ioncsatornák és pumpák génjeinek kifejeződését is időzíti az óra ilyenkor. Éjszaka a hideg jelenti a legnagyobb gondot. Erre felkészülendő a növényekben a deszaturázok szintje kezd emelkedni már naplemente előtt, a membránok fagyállóképességét növelve. A növények a cirkadián óra kapuzási folyamata miatt nem azonos mértékben érzékenyek a hidegre és a megre a nap során: kimutatták például, hogy a gyapot növény a hidegre a nap elején érzékenyebb, a megre pedig a nap végén (Rikin és mtsai, 1993).

A vegetatív növekedési fázisban a cirkadián óra szabályozza a fény mellett a hőmérsékletváltozásokra adott válaszokat is. Az olyan fiziológiás határon kívül eső hőmérséklet, mint a fagyás vagy a hőség stressz-válaszokat idéznek elő. A fagytürésben szerepet játszó CBF1/DREB1 családba tartozó transzkripciós faktorok ritmikus kifejeződést mutatnak a nap folyamán (Fowler és mtsai, 2005), mivel cirkadián kontoroll alatt állnak. Az óra képes gátolni a *CBF* gének válaszképességét hideg stresszre a nap folyamán, ezáltal a maximális fagytürés képességet éjszakára időzíteni, amikor arra a legnagyobb szükség van. A *CBF3* esetében kimutatták, hogy kifejeződését a délután folyamán a TOC1 gátolja, a PIF7 transzkripciós faktorról történő kölcsönhatás révén (Kidokoro és mtsai, 2009).

Az órát érintő mutációk is hatással lehetnek a hidegtűrő képességre. A *GI* gén mutációja fokozott érzékenységet okoz a hideggel szemben és ez a hatás a CBF útvonaltól független (Cao és mtsai, 2005). A *gi* mutáns megnövekedett toleranciát mutat oxidatív stresszel szemben, ami emelkedett szuperoxid-dizmutáz és aszcorbinsav-peroxidáz szinttel párosul (Kurepa és mtsai, 1998; Cao és mtsai, 2005). A *GI* szerepét leírták továbbá a keményítő metabolizmusban is, a *gi* mutánsban a keményítő felhalmozódása figyelhető meg, pedig a *GI* maga nem egy keményítő metabolizmusban részt vevő enzim (Eimert és mtsai, 1995). Megfigyelhető továbbá a mutánsban az egyszerű szénhidrátok felhalmozódása is (Messerli és

mtsai, 2007). Az *lhy cca1* dupla mutáns enyhén érzékeny só, ozmotikus és hő-stresszre (Kant és mtsai, 2008).

Az óra és a szárazság-stresszre adott válasz közti kapcsolat már bizonyított az ABA jelátviteli útvonal által (Legnaioli és mtsai, 2009). Nem meglepő az a tény, hogy a szárazság, só és ozmotikus stresszben fontos szerepet játszó gének nagy része szintén cirkadián kontroll alatt áll (Covington és mtsai, 2008). Emelkedett TOC1 szint a szárazságtűrő képesség csökkenéséhez vezet, míg csökkent TOC1 szint emelkedett szárazságtűrést okoz. Ez a jelenség összefüggésbe hozható azzal, hogy a TOC1 képes az *ABA-BINDING PROTEIN/GENOME UNCOUPLED 5 (ABAR/GUN5)* gén promoteréhez cirkadián módon kötni, ezzel a gén kifejeződését az este folyamán gátolni. Az ABAR/GUN5 szerepe a szárazságtűrésben a gázcsereenyílás méretének szabályozása. Nemcsak az óra képes az ABA - függő útvonalat szabályozni, hanem a hormon is képes akut módon befolyásolni a *TOC1* gén kifejeződését (Legnaioli és mtsai, 2009). Ez a visszacsatolás biztosítja az ABA jelátvitel és a sztómányitás megfelelő időzítését és érzékenységét. Az ABA-val indukálható gének kifejeződése eltérő a nap folyamán, továbbá az ABA prekursorainak, illetve a bioszintézisében szerepet játszó enzimek egy részének kifejeződése is cirkadián szabályozás alatt áll (Covington és mtsai, 2008). Az ABA egyes prekursorai, a bioszintézisben résztvevő gének és több ABA jelátvitelben résztvevő gén is diurnális kifejeződést mutat, valamint transzkripciójuk megváltozik cirkadián óra mutánsokban, például a *prp9 prp7 prp5* tripla mutánsban vagy a CCA1 fehérjét túltermelő növényekben (Fukushima és mtsai, 2009). Az aritmiás *prp5 prp7 prp9* tripla mutánsban ozmolitok, ABA, antioxidánsok és a trikarbonsav ciklus intermediereinek emelkedett szintje figyelhető meg (Fukushima és mtsai, 2009; Nakamichi és mtsai, 2009). A *prp9 prp7 prp5* háromszoros mutánsban az ABA-független *DREB1/CBF* magasabb szinten fejeződik ki, ez fokozott só-, szárazság- és hidegtűrést okoz (Nakamichi és mtsai, 2009), míg ugyanez a gén alacsonyabb szinten fejeződik ki a *cca1 lhy* kétszeres mutánsban, ezért ezek a növények érzékenyebbek a hideg és só stresszre (Kant és mtsai, 2008; Dong és mtsai, 2011).

Endoreduplikáció

Az eukarióta sejtek osztódása rendszerint a mitotikus sejtciklussal megy végbe, ahol a sejt DNS tartalma állandó marad az egyes osztódási ciklusok után. A sejtciklus sokféleképpen módosulhat attól függően, hogy az adott sejtípusnak milyen környezeti vagy fiziológiai követelményeknek kell megfelelnie (Jakoby és Schnittger, 2004). Egy extrém példája ennek a virágos növények endospermiumának első osztódása, ahol a megtermékenyítést követően a központi sejtben csupán a sejtmagok sorozatos osztódása történik meg citokinézis nélkül, ezzel

sokmagvas struktúrát, azaz szincíciumot hozva létre (Boisnard-Lorig és mtsai, 2001). Egy másik példa a szkotomorfogenezis során a hipokotil nagymértékű megnyúlása, ahol a sejtméret növekedése nem jár együtt sejtszótódással (Gendreau és mtsai, 1997).

Az endoreduplikáció során a sejt a DNS tartalmát folyamatosan duplikálja, poliploid (több kromoszómakészlettel rendelkező) sejtet hozva létre. A folyamat növényi és állati sejtekben egyaránt megfigyelhető, főként a magas metabolikus aktivitású sejtekre jellemző. Az endoreduplikáció lehetőséget nyújt a DNS templát mennyiségének növelésére, ezáltal a génexpresszió hatékonyságának növelésére. Az endoreduplikáció során létrejött magas ploidájú sejt gyakorlatilag funkcionálisan több diploid sejtnek felel meg (D'Amato, 1964). Jellemzően az endoreduplikálódó sejtek nagyobb méretűek, mint a normálisan osztódó sejtek. Az endoreduplikáció gyakran figyelhető meg gazdaságilag fontos növényi szerveknél. Például raktározó képleteknél, mint a búzaszem endospermiuma (Sabelli és Larkins, 2009) vagy a pillangósvirágúak nitrogén-fixáló gyökérgümőinél (Kondorosi és Kondorosi, 2004). *Arabidopsis* esetében az endoreduplikáció megfigyelhető felszíni szervek szórképleteinek sejtjeiben (Hülkamp és mtsai, 1994), de a sziklevelek bőrszöveti sejtjeiben is gyakran megfigyelhető emelkedett kromatintartalom (Galbraith és mtsai, 1991).

Ahogy az endoreduplikációra képes sejtek is sokfélék, az endoreduplikáció maga is többféleképpen mehet végbe. Az endomitózis a mitózis egy formája, melyben a DNS megkettőződése után a sejt nem válik ketté, olyan sejtet eredményezve, melynek kromoszómaszáma jóval több, mint a normális. A parciális endoreduplikáció esetében pedig az újra replikálódások száma korlátozott.

A szabályos mitotikus ciklus négy szakaszból áll: két ún. növekedési fázis (G1 és G2), a DNS replikáció (S fázis) és a kromoszómák szétválása (M fázis) (Gutierrez, 2009). Az endoreduplikáció során a genom amplifikációja a kromatin kondenzációja és szegregációja nélkül, valamint citokinézis nélkül következik be. Normál esetben a kromoszómák egyszer osztódnak egy sejtciklus folyamán. A sejtciklus során a G1-S és a G2-M fázisátmeneteket a ciklin-dependens kinázok (CYCLIN DEPENDENT KINASE, CDK) szabályozzák, mégpedig úgy, hogy a sejtciklus egyes fázisaiból más fázisokba való átlépést szabályozó fehérjéket foszforilálnak (Gutierrez, 2009). *Arabidopsis*-ban két csoportjukat különböztetjük meg, az A- és B-típust. Az A-típusú CDK a G1-S és a G2-M fázisátmenetek szabályozásában fontos. A B-típus eukarióták közül csak a növényekben fordul elő. A B-típusba tartozik a CDKB1 és CDKB2, előbbi a sejtciklus elején már kifejeződik, utóbbi pedig a G2-M átmenet alatt. Mindkettő a G2-M átmenetben játszik fontos szerepet.

Működésükhöz és aktiválódásukhoz ciklinekre van szükség. *Arabidopsis*-ban három ciklin típust különböztetünk meg. A CYCLIN A (CYCA) az S fázis fenntartásában és a G2-M átmenetben fontos, a CYCB a G2-M átmenetben és a mitózis fenntartásában játszik szerepet, a CYCD pedig összehangolja a környezeti jeleket és a sejtciklus során végbemenő szignalizációs útvonalat. A ciklinek különböző mennyiségben fejeződnek ki a sejtciklus során, attól függően, hogy melyik fázisban tart éppen a ciklus (Wang és mtsai, 2004).

Az endoreduplikációs ciklusba lépés

Az endoreduplikáció során a normál mitotikus ciklus megváltozik. Az endoreduplikációs ciklus fenntartásához a ciklinek aktivitását megfelelően alacsony szinten kell tartani, hogy a mitózist még ne serkentsék. Ez például a mitotikus és premitotikus szabályozó faktorok működésének befolyásolásán keresztül valósulhat meg (Jakoby és Schnittger, 2004). *Arabidopsis* levél fejlődése során a mitotikus CDK és ciklin gének transzkripciójának csökkenése egybeesik az endociklus kezdetével (Boudolf és mtsai, 2004). Az endociklus kezdetének első lépése lehet a CDKB1 aktivitásának részleges vagy teljes csökkentése a G2-M átmenet során. Egy másik lehetséges módja az endociklusba lépésnek az ún. hármas ismétlődésű MYB fehérjék (MYB3R) ciklinek általi foszforilálódásának elmaradása. Ezek a fehérjék a G2-M átmenet során a kifejeződő gének transzkripcióját szabályozzák, többek között a B- típusú ciklinekét is (Ito és mtsai, 2001). Így a MYB3R foszforilálódásának hiánya végső soron az M fázisban fontos gének kifejeződésének elmaradásához vezet (Wildermuth, 2010). A mitotikus CDK-ciklin komplex inaktiválásának egy lehetséges módja a ciklin lebontása az ANAPHASE PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME (APC/C) segítségével, ami egy E3 ubiquitin ligáz és a fehérjék 26S proteaszóma általi lebontásában van szerepe.

A mitotikus ciklinek aktivitása egy harmadik útvonalon is csökkenthető, CDK inhibitorok (CKI) közreműködésével. A *SIAMASE-RELATED* családba tartozó *SIAMASE* (SIM) gén kódolja azt a CKI fehérjét, ami az endoreduplikációs ciklusba lépésért felel (Churchman és mtsai, 2006).

Az endoreduplikációs ciklus fenntartása

Az endociklusba lépés folyamata sokkal jobban ismert, mint az, ahogyan a ciklus fennmarad. Feltehetően minden egyes endociklikus körbe való belépés alapja a CDK aktivitás ciklikus változása. A ciklus fenntartásában feltehetőleg szerepe van a KIP-RELATED PROTEIN (KRP)/INTERACTOR OF CDK családba tartozó KRP1 és 2 fehérjéknek, melyek a SIM-hez hasonlóan CKI funkciót töltenek be. Ezek a fehérjék a CDKA-CYCD komplexet gátolják, túltermelésük mitotikusan aktív sejtekben a sejtosztódást gátolja és az endoreduplikációt serkenti (Verkest és mtsai, 2005). A KRP-k dózis-függő módon hatnak, kis

mennyiségben a mitotikus sejtciklust gátolják, nagy mennyiségben pedig az endoreduplikációt serkentik. Matematikai modellek alapján feltételezhető, hogy az endociklus fenntartásához elegendő a KRP-k ciklikus felhalmozódása, ami periodikusan gátolja a CDK aktivitást a G1-S átmenetben, valamint a SIM fehérjék által kifejtett specifikus gátló hatást a G2-M átmenetnél (Roodbarkelari és mtsai, 2010).

Az E2F/DP családba olyan transzkripciós faktorok tartoznak (E2Fa, E2Fb, E2Fc), amelyek a DNS replikációhoz szükséges gének kifejeződését befolyásolják. Az E2F/DP-szerű fehérjék (E2Fd, E2Fe, E2Ff) olyan transzkripciós faktorok, amelyek az osztódó sejtek differenciációs eseményeit szabályozzák, így az endoreduplikációt és a sejt növekedését is. Az E2Fe/DEL1 az endociklusba lépés fontos negatív regulátora. Az osztódó szövetekben a DEL1 mennyisége az E2Fb-től és E2Fc-től függ. Az E2Fb a *DEL1* génkifejeződés aktivátora, míg az E2Fc a represszora. Az E2Fc fényben az SCF ubiquitin-ligáz komplex által ubiquitin-függő módon gyorsan lebomlik (del Pozo és mtsai, 2002). Az E2Fb sötétben bomlik le, ez a folyamat a COP1 által szabályozott. Ezért fényben a DEL1 felhalmozódik és az endociklusba való lépést gátolja, míg sötétben inaktiválódik, így az endociklus végbemehet. A DEL1 fényszabályozása az E2Fb és E2Fc egyensúlyán keresztül valósul meg (Berckmans és mtsai, 2011).

Fiziológiai tényezők hatása az endoreduplikációra

A sötétben nevelt *Arabidopsis* csíranövények esetében a fény hiánya a hipokotil sejtjeiben egy extra endoreduplikációs ciklust eredményez (Gendreau és mtsai, 1997). Fotomorfogenikus mutánsok vizsgálata során kiderült, hogy a sötét által indukált endoreduplikációban a fitokrómoknak fontos szerepe van, és hogy ez a szkotomorfogenikus fejlődés fontos lépése (Gendreau és mtsai, 1998). Az endociklus hozzájárulhat a hipokotil sejtjeinek megnyúlásos növekedéséhez, de a DNS tartalom növekedése és a sejt méretének növekedése közti összefüggés nem teljesen tisztázott még. *Arabidopsis* növények árnyékban nőtt leveleiben a DNS tartalom csökkenése figyelhető meg (Cookson és Granier, 2006). A levelek és a hipokotil esetében tehát ellentétes hatás figyelhető meg az endoreduplikációra a fényviszonyok tekintetében. A ploidia szám növekedése előnyt jelent vízhiányos körülmények között. A vízhiány következtében a vad típusú *Arabidopsis* növények esetében a sejtméret és a DNS tartalom csökkenése figyelhető meg, ami a levélméret csökkenéséhez vezet. Magasabb endoreduplikációs szintet mutató transzgenikus növények esetében azonban a ploidia függvényében sejt-, illetve szervméret növekedés figyelhető meg (Cookson és Granier, 2006).

A magasabb ploidia előnyt jelent az UV-B sugárzással szemben is. Akut UV-B kezelés következtében vad típusú *Arabidopsis* növények esetében sejtszám és sejtméret csökkenés figyelhető meg. Azok a növények azonban, amelyek az endoreduplikációs ciklus egyik regulátorára az *E2Fe/DELI*-re mutációt hordoznak, a sejtméret és a sejtszám csökkenése nem olyan mértékű, mint a vad típusban (Radziejwoski és mtsai, 2011).

A fitokrómok szerepe az endoreduplikáció szabályozásában

Mint már említettem, *Arabidopsis*-ban többek között a hipokotil sejtjeiben figyelhető meg az endoreduplikáció. A csírázás során két endociklus zajlik le úgy, hogy nem előzi meg érdemi sejtméret növekedés. A sejtméretet drámaian csökkentő *cpm17* mutációnak például nincs hatása a harmadik endociklus kimenetelére. A *cpm17* egy brasszinoszteroid bioszintézis mutáns, melynek szik alatti szára folyamatos sötétben jóval rövidebb, mint a vad típusé, viszont DNS tartalma csaknem azonos vele. Ez arra utal, hogy az endoreduplikáció és a sejtméret szabályozása között nem egyszerű visszacsatolós kapcsolat van (Gendreau és mtsai, 1998). Fitokróm mutánsokkal végzett kísérletek igazolták, hogy a harmadik endociklus hiánya távoli-vörös fényben a fitokróm A jelátviteli utakhoz köthető, valamint kisebb mértékben ugyan, de vörös és fehér fényben a fitokróm B-hez. Utóbbi esetben feltehetőleg egyéb fény-stabil fitokrómok szerepe sem zárható ki (Gendreau és mtsai, 1998). A fitokrómok által közvetített fényjel egyaránt limitálja a sejtméret növekedését és az endoreduplikációt, azonban a két jelenség közt feltehetőleg bonyolultabb kapcsolat van az egyszerű ok-okozati összefüggésnél.

A cirkadián óra és az endoreduplikáció kapcsolata

Növények esetében ezidáig nincs olyan irodalmi adat, ami megerősítené a cirkadián óra és az endoreduplikáció közötti kapcsolatot. Emlős sejtek esetében is csak nemrégiben írtak le kapcsolatot a sejtciklus és a cirkadián óra között. A sejtciklus bonyolult hálózatának sok eleme áll cirkadián szabályozás alatt emlős sejtekben. Például a ciklin-dependens kinázok közül a Wee kináz, ami a G2-M fázisátmenetet gátolja, a CLOCK/BMAL1 komplex (Gekakis és mtsai, 1998) szabályozása alatt áll (Matsuo és mtsai, 2003), ami az emlős cirkadián óra egyik kulcseleme. Kimutatták, hogy a sejtciklus is képes 24, illetve 48 órás periódussal ismétlődni. A sejtciklus periódusának beállítása nem mindig áll cirkadián szabályozás alatt, egy bizonyos beállító tartományon kívül a két ritmus szétkapcsolódik, illetve a sejtciklus olyan rendhagyó ciklikusan ismétlődő folyamatra válhat át, mint például az endoreduplikáció. A modell szerint a 24, illetve 48 órás ciklusra való beállítás akkor következhet be például, amikor bizonyos növekedési faktorok szintje egy kritikus érték alá csökken (Gérard és Goldbeter, 2012).

Allotetraploid (olyan poliploid alak, ami két különböző genomú diploid faj hibridizációja és a hibrid kromoszóma-garnitúrájának kétszereződésével jön létre) *Arabidopsis* növények esetében írták le, hogy a bennük magasabb kifejeződést mutató kb. 130 gén közel egyharmada tartalmaz vagy CCA1-kötő vagy esti elemet (Wang és mtsai, 2006; Chen, 2010). Ezek egy része a klorofill bioszintézisében szerepet játszó gén, más részük pedig a cukrok transzportjában, illetve a keményítő metabolizmusban játszik szerepet (Ni és mtsai, 2009). Ezek az adatok közvetetten a cirkadián óra és az endoreduplikáció közti kapcsolatra utalnak.

CÉLKITŰZÉSEK

A cirkadián óra részletes tanulmányozása során egyre több órakomponensről és óra kapcsolt elemről derül ki, hogy pleiotróp funkciókkal rendelkeznek, és fontos szerepük van a sejtek legkülönbözőbb folyamatainak szabályozásában. Nem egy órakomponensről kimutatták nemrégiben azt, hogy szerepet játszik a stressz-válaszok kialakításában, befolyásolja a hormonrendszer működését, vagy éppen a metabolikus folyamatok szabályozásában vesz részt.

A laboratóriumunkban azonosított LIP1 fehérje

- az első kis GTP-áz, ami kapcsolatba hozható a cirkadián órával,
- részt vesz a fotomorfogenikus folyamatok szabályozásában,
- valamint megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt.

A közelmúltban végzett vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a *lip1* mutáns növények érzékenyek só stresszre, valamint hogy sziklevelek bőrszöveti sejtjei rendellenes morfológiát mutatnak.

Célunk annak megismerése és kiderítése volt, hogy a fent említett folyamatokban hogyan vesz részt a LIP1. Munkánk során az alábbi kérdések megválaszolásához végeztünk kísérleteket,

- mely órakomponenseken keresztül szabályozza a LIP1 a cirkadián óra működését,
- mely fotoreceptorokon keresztül vesz részt a fotomorfogenezisben,
- mi a szerepe a stressz-válaszok kialakításában,
- mi okozza a bőrszöveti sejtek morfológiájának elváltozását, továbbá hogy
- a LIP1 sejten belüli elhelyezkedésének van-e szerepe ezen funkciók ellátásában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Tápoldatok és táptalajok

Bakteriális táptalajok

LB (Luria-Bertani medium): 10 g/l tripton (Reanal), 5 g/l élesztő kivonat (Reanal), 10 g/l NaCl (Reanal); táptalajhoz szükség esetén: 15 g/l agar (Reanal), kiegészítve 5M KOH-dal pH 7.0-ra

YEB (Yeast Beef, *Agrobacterium* táptalaj)(pH 7.0): 5g/l marhahús kivonat (Difco), 1g/l élesztő kivonat, 5g/l Bacto[®] pepton (Difco), 5g/l szacharóz (Reanal), 2 mM MgSO₄ (csíramentesre szűrve, autoklávozás után hozzáadva; Reanal); táptalajhoz szükség esetén: 15g/l Bacto[®] agar (Difco)

Növényi táptalajok

- MS3 (Murashige-Skoog medium) (pH 5.6): 4.3 g/l MS por (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma), 3% szacharóz, 1% agar (Difco)
- 1/2MS1 (Murashige-Skoog Medium) (pH 5.6): 2.16 g/l MS por (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma), 1% szacharóz, 1% agar (Difco)
- AM (Arabidopsis Medium) (pH 5.6): 2.16 g/l MS por, 1% szacharóz, 0.2% phytagel (Sigma)

Munkánk során az 1. táblázatban feltüntetett antibiotikum törzsoldatokat használtuk, melyeket csíramentesre szűrve a tápoldatba, ill. táptalajba autoklávozás (121 °C, 25 perc) és 60 °C-ra hűtés után kevertünk. A klaforánt a baktériumfertőzés csökkentése érdekében használtuk, a Basta[®] pedig az AgrEvo (Bad Soden, Németország) cég által forgalmazott glufozinát hatóanyagú gyomirtószer, amit transzgenikus növények szelektálására használtunk.

Szervezet	Szelektáló ágens	Koncentráció
<i>Escherichia coli</i>	Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Karbenicillin (Cb)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
	Rifampicin (Rif)	200 µg/ml
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Higromicin (Hyg)	25 µg/ml
	Klaforán (Cf)	250 µg/ml
	Basta [®]	20000x

1. táblázat. A munkánk során szelektáláshoz használt ágensek

Kísérleti élőlények

Növények

Kísérleteinkhez *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 és a vele nagyfokú rokonságot mutató C24 ökotípusait használtuk, valamint a 2. táblázatban összefoglalt mutáns növényvonalakat:

Vonal	Hivatkozás	Mutáció típusa	Háttér
<i>lip1-1</i>	Kevei és mtsai, 2007	deléció	C24
<i>lip1-2</i>	Kevei és mtsai, 2007	T-DNS inszerció	Col-3
<i>cca1-1</i>	Green és Tobin, 1999	T-DNS inszerció	Col-0
<i>gi</i> (SALK 092757)	-	T-DNS inszerció	Col-0
<i>prp5-1</i>	Eriksson és mtsai, 2003	T-DNS inszerció	Col-0
<i>prp9-1</i>	Eriksson és mtsai, 2003	T-DNS inszerció	Col-0
<i>toc1-4</i>	Hazen és mtsai, 2005a	Q103STOP	Col-0
<i>phyA-211</i>	Reed, 1994	deléció	Col-pOCA107-2
<i>phyB-9</i>	Reed, 1993	W397STOP	Col-0
<i>cry1-304 cry2-1</i> (<i>cry1cry2</i>)	Mockler és mtsai, 1999	deléció	Col-0

2. táblázat. A vizsgálatok során használt mutáns *Arabidopsis thaliana* növények

Baktériumok

A klónozó műveletekhez az *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsét használtuk (Stratagene). A növénybe juttatandó T-DNS alapú plazmidokat először *Escherichia coli* S17-1 törzsébe vittük be. Ez a konjugatív funkciókat hordozó törzs képes plazmidot átadni az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzsének. Utóbbi két törzs Dr. Koncz Csaba laboratóriumából származik (Max-Planck Intézet, Köln).

Molekuláris biológiai és biokémiai módszerek

Plazmidok

A növényekbe juttatandó konstrukciókat általában pBluescript® II KS/SK plazmidban (Stratagene) állítottuk össze, vagy a célplazmidban hoztuk létre. Célplazmidunk a pPCV (Plant Cloning Vector) volt, melyet Dr. Koncz Csaba csoportja fejlesztett ki. Két változatát használtuk ennek a plazmidnak, a higromicin rezisztenciáért felelős higromicin-foszfotranszferáz gént tartalmazó (pPCVH), valamint a glufozinát rezisztenciáért felelős foszfinotricin-acetiltranszferáz gént tartalmazó változatot (pPCVB). Ezek a plazmidok az *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plazmidján alapulnak. Ennek jobb és bal oldali határoló szekvenciái közötti DNS szakaszt (T-DNS) az *Agrobacterium* képes bejuttatni növényi sejtekbe, ahol azok véletlenszerűen beépülnek a növény génállományába. A pPCV plazmid olyan elemeket is tartalmaz (ORI_{ColE1} replikációs origó és az ampicillin/karbenicillin rezisztenciáért felelős β -laktamáz gén), amelyek lehetővé teszik fennmaradását *Escherichia coli* sejtekben.

Riportergén és génkonstrukciók készítése

A promóter aktivitás vizsgálatok elvégzéséhez a *CAB2:LUC*, *CCR2:LUC*, *CCA1:LUC*, *LHY:LUC*, *PRR9:LUC*, *GI:LUC* markergéneket használtuk. Ezeket a következő elemekből építettük fel:

- *CAB2* promóter - *CAB2* gén kódoló része előtti 320 bp-os szakasz (Millar és mtsai, 1992)
- *CCR2* promóter – a gén kódoló része előtti 2233 bp-os szakasz (Doyle és mtsai, 2002)
- *CCA1* promóter – a gén kódoló része előtti 1128 bp-os szakasz (Doyle és mtsai, 2002)

- *LHY* promóter – a gén kódoló része előtti 1812 bp-os szakasz (Kevei és mtsai, 2007a)
- *GI* promóter – a gén kódoló része előtti 2749 bp-os szakasz (Palágyi és mtsai, 2010)
- *PRR9* promóter – a gén kódoló része előtti 1330 bp-os szakasz (Palágyi és mtsai, 2010).

A teljes hosszúságú *LIP1* cDNS klónozásához a RIKEN intézettől (Yokohama) vásárolt pda02083 jelölésű cDNS klónt használtuk. A restriktációs endonukleáz emésztéseket és egyéb DNS módosító kezeléseket a forgalmazó (ThermoScientific) által szállított pufferekben és körülmények között végeztük. A termékeket agaróz gélen (SeaKem[®] LE, Cambrex), elektroforézissel választottuk el, a megfelelő DNS darabokat a gélből kivágtuk és fenolozással tisztítottuk. A DNS szakaszokat a T4 DNS ligázzal a forgalmazó (ThermoScientific) útmutatásai alapján kapcsoltuk össze. A ligált DNS-eket Inoue (1990) módszere szerint előkészített XL-1 Blue sejtekbe egy gyors és hatékony transzformációs módszerrel (Pope és Kent, 1996) juttattuk be. A plazmidot hordozó baktériumsejtek szelektálását a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezekben 37 °C-on, 16 órán át végeztük. A plazmidokat az *Escherichia coli* sejtekből a hagyományos lúgos feltárás módosított változatával tisztítottuk (Ahn és mtsai, 2000), majd felépítésüket restriktációs enzimekkel ellenőriztük. A *lip1-2* mutáció komplementálásához a *35S:YFP-LIP1*, *35S:YFP-LIP1-NES* és *35S:YFP-LIP1-NLS* konstrukciókat készítettük el. A *35S:YFP-LIP1* esetében a laboratóriumunkban már elkészített konstrukciót használtuk (Kevei és mtsai, 2007a). Az SV40 NLS és a PKI (protein kináz inhibitor) NES elemeket tartalmazó konstrukciók elkészítéséhez az elemeket és a dohánymózaik vírus 35S promoterét, illetve az YFP stop kodon nélküli változatát már tartalmazó, szintén laboratóriumunkban előállított pPCV alapú konstrukciókat használtuk fel (Palágyi és mtsai, 2010).

Növényi DNS tisztítása

Körülbelül 1 cm² területű levél mintát folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, majd 1.5 ml-es centrifugacsőben elporítottunk. A mintára 500 µl CTAB (cetil-trimetil-ammónium bromid) puffert (1% CTAB, 100 mM Tris·HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.42 M NaCl, 1% PVP 40 (polivinil-pirrolidon 40), 0.5% β-merkaptoetanol) mértünk, majd többször összerázva a csövet, 30 percig 65 °C-on inkubáltuk. 10 perc centrifugálás után (szobahőmérséklet, 10000g) a tiszta felülúszót új csőbe mértük át, és azonos térfogatú kloroformmal ráztuk össze. A vizes és a szerves fázist 10 perc centrifugálással választottuk szét. A felső vizes fázisból a DNS-t

0.75x térfogatnyi 2-propanollal csaptuk ki szobahőmérsékleten 10 perc alatt, majd 10 perc centrifugálással ülepítettük. A csapadékot 70%-os etanollal mostuk, légszivattyúval szárítottuk és 100 µl desztillált vízben feloldottuk. A mintát 10 µg RNáz-A enzimmel kezeltük 37 °C-on 1 órán át, majd fenol-kloroform (1:1) elegyével extraháltuk. Centrifugálás után a vizes fázist kloroformmal is tisztítottuk, majd a vizes fázisból a DNS-t 0.2 térfogatnyi 3 M nátrium-acetát (pH 5.2) és 0.75 térfogatnyi 2-propanol hozzáadásával szobahőmérsékleten 10 perc alatt csaptuk ki. Centrifugálás és 70%-os etanollal történő mosás után a csapadékot megszárítottuk és 100 µl desztillált vízben oldottuk fel.

Növényi RNS tisztítása

Össz-RNS-t ~100 mg, folyékony nitrogénben porított növényi anyagból a Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit-jével tisztítottunk (oszlopon történő RNáz-mentes DNáz kezeléssel kiegészítve) a gyártó leírása alapján. A kapott RNS mennyiségét és minőségét a minta 260 és 280 nm-en mért fényelnyeléséből határoztuk meg.

mRNS szint meghatározása valós idejű PCR-rel

Mérési pontonként ~100 db csíranövényből tisztítottunk össz-RNS-t. 1 µg RNS-ből cDNS-t a ThermoScientific által gyártott RevertAid™ First-Strand cDNA Synthesis Kit segítségével készítettünk a gyártó útmutatásának megfelelően. A méréseket valós idejű PCR-rel ABI PRISM® 7300 (Applied Biosystems) gépen, ABI Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) használatával végeztük.

Minden primerpár esetében kalibrációs egyenest készítettünk, és az egyes mintákban az mRNS szintet ennek segítségével határoztuk meg (Standard Curve Method, a PCR készülék gyártójának útmutatása alapján). A kapott értékeket a minták β -*TUBULIN* 2 és β -*TUBULIN* 3 mRNS szintjére vonatkoztattuk, a dolgozatban a továbbiakban *TUBULIN*-ként feltüntetve. Minden mintán három párhuzamos mérést végeztünk. A használt primerek az alábbiak voltak:

CCA1 RT-PCR F: 5'-CTGTGTCTGACGAGGGTCGAA-3'

CCA1 RT-PCR R: 5'-ATATGTAAACTTTGCGGCAATACCT-3'

GI RT-PCR F: 5'- AATTCAGCACGCGCCTATTG -3'

GI RT-PCR R: 5'- GTTGCTTCTGCTGCAGGAAGTT -3'

PRR9 RT-PCR F: 5'- GCCTTCTCAAGATTTGAGGAAAGC -3'

PRR9 RT-PCR R: 5'- TTTGGCTCACCTGAAGTACTCTC -3'

TOC1 RT-PCR F: 5'-ATCTTCGCAGAATCCCTGTGATA-3'

TOC1 RT-PCR R: 5'-GCACCTAGCTTCAAGCACTTTACA-3'

RD29A RT-PCR F: 5'- ATCCCACCAAAGAAGAAACTG -3'

RD29A RT-PCR R: 5'- TCAGGAGACTCATCAGTCAC -3'
RD29B RT-PCR F: 5'- GATGAGTATGACGAGCAAGAC -3'
RD29B RT-PCR R: 5'- GACTTAGGTTTACCCGTTACAC -3'
SOS2 RT-PCR F: 5'- TACACGAAACTTCAAGACAAGG -3'
SOS2 RT-PCR R: 5'- CCACCTCGTAAATCTCTATCAC -3'
RAB18 RT-PCR F: 5'- GCTTAAGACAAGAAGAACATGG -3'
RAB18 RT-PCR R: 5'- ATTTCCGTACTCGTCATACTG -3'
DEL1 RT-PCR F: 5'- TGTCTTGTCGTCATGAATCTC -3'
DEL1 RT-PCR R: 5'- CTCACCATTGTACCCTAACC -3'
TUB2/3 RT-PCR F: 5'- CCAGCTTTGGTGATTTGAAC -3'
TUB2/3 RT-PCR R: 5'- CAAGCTTTCGGAGGTCAGAG -3'

A PCR körülményei az alábbiak voltak: 94 °C 2.5 perc, 40 ciklus (95 °C 15 mp, 60 °C 1 perc), 95 °C 15 mp, 60 °C 15 mp.

Növényi összfehérje tisztítása

50–100 mg növényi anyagot folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és 1.5 ml-es csőben porrá őröltük. Az elporított mintára 100 mg-onként 200 µl 95 °C-ra előmelegített feltáráspuffert mértünk (4 M urea, 5% SDS, 5% β-merkaptoetanol, 16.66% glicerin). A mintákat homogenizáltuk, majd 95 °C-os vízfürdőbe helyeztük őket 10 percre. Többször összeráztuk a csöveket. A törmeléket ezután 30 perc szobahőmérsékletű centrifugálással távolítottuk el. A tiszta felülúszót új csövekbe mértük át. Az így elkészített mintákat vittük fel SDS poliakrilamid gélre.

Relatív fehérjemennyiségek meghatározása immunoblot módszerrel

Mintánként 20 µg fehérjekivonatot analizáltunk 10%-os SDS-poliakrilamid gélen Tris/glicin/SDS futatópufferben. A gélből az elválasztott fehérjéket elektroblot készülékkel (Bio-Rad; 100 V, 2 h) átvittük Immobilon® P PVDF (polivinilidén-difluorid) műanyag membránra (Millipore). Az átvitel után a membránt TBST pufferrel (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween® 20) öblítettük át. A szabadon maradt kötőhelyeket 5% sovány tejporral kiegészített TBST pufferben semlegesítettük 4 °C-on egy éjszakán át. Ezután a membránt YFP elleni elsődleges ellenanyaggal kezeltük (Clontech, Living Colors A.v. Monoclonal Antibody JL-8, 500-szoros hígításban TBST pufferben). Az ellenanyagot egy órán keresztül hagytuk a membránon, majd 3×10 perc TBST pufferes mosással távolítottuk el az ellenanyag maradványokat. Ezután TBST pufferben 10.000-szeresre hígított, alkalikus-foszfataázhoz kapcsolt egér-IgG elleni másodlagos ellenanyaggal (Sigma, A-3562) kezeltük a

membránt szobahőmérsékleten egy óráig. Ezt követően 3×10 percig TBST pufferben mostuk. A folyadék eltávolítása után 100 mM Tris HCl pH 9.7, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, 0.02% BCIP (5-bróm-4-klór-3-indolil foszfát), 0.03% NBT (nitroblue-tetrazólium) összetételű, szobahőmérsékletű előhívó oldatba helyeztük a membránt, és addig hagytuk benne, amíg a fehérje sávok láthatóvá nem váltak. A reakciót vizes öblítéssel leállítottuk, majd a membránt megszárazítottuk és képet készítettünk róla.

Növények előkészítése és nevelése, alkalmazott vizsgálatok

Magsterilizálás, növénynevelés

Az *Arabidopsis thaliana* magokat legalább három napig desztillált vízben 4 °C-on sötétben hidegkezeltek, majd felszínüket 10 percig 0.5-1%-os nátrium hipoklorit oldatban sterilizáltuk. Ezután csíramentes desztillált vízzel ötször átmostuk. Az így kezelt magokat szelekcióhoz AM, lumineszcencia mérésekhez, stresszvizsgálatokhoz és só indukált gének RNS szintű vizsgálatához MS3, endoreduplikáció és sejtalak vizsgálatokhoz pedig 1/2MS1 lemezekre szélesztettük. A növényeket 22 °C-on, 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) cikluson neveltük növénynevelő kamrában (MLR-350, Sanyo) hét napig (a továbbiakban 12:12 LD kezelésként feltüntetve, az angol light és dark megjelölések rövidítéseként). Az ettől eltérő nevelési körülmények a dolgozatban külön jelölve vannak. A szik alatti szár megnyúlásának vizsgálatához a növényvonalak magjait nedves szűrőpapírra szélesztettük, három napig 4 °C-on sötétben hidegkezeltek. Majd 22 °C-on $50 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fehér fénnel négy órán keresztül indukáltuk a csírázást, ezután 20 óra 22 °C sötét kezelést alkalmaztunk, majd a megfelelő monokromatikus fényforrás alá helyeztük őket a kívánt fényintenzitáson. A növényeket ezután agar lemezre fektettük és a szik alatti szár hosszát az ImageJ program segítségével mértük.

A stressz vizsgálatokhoz a csíranövényeket 12:12 LD cikluson 14 napig só, illetve ozmotikum tartalmú táptalajon neveltük. A só csírázásra gyakorolt hatását 200 mM NaCl tartalmú MS3 lemezen vizsgáltuk. A csírázó magokat naponta számoltuk öt napig. Csírázó magnak azt a magot tekintettük, amelynek a gyököcskéje megjelent. Sötétben és 12:12 LD cikluson nevelt növényeket vizsgáltunk. A sötétben tartott minták esetében a csírázást naponta új lemezen számoltuk. A gyökérhossz méréshez a növényeket 12:12 LD cikluson neveltük hét napig sómentes MS3 táptalajon, majd különböző koncentrációjú NaCl-ot tartalmazó, függőleges helyzetű lemezre helyeztük át őket. A gyökér hosszát az ImageJ program segítségével mértük, az értékeket sómentes talajon nevelt növények gyökérhosszára normalizáltuk.

Az ABA csírázásra gyakorolt hatását 0.3 és 0.5 μM ABA tartalmú MS3 lemezen vizsgáltuk. A lemezeket 12:12 LD ciklusra vagy folyamatos sötétbe helyeztük. A csírázó magokat naponta számoltuk öt napig.

Transzgenikus növények előállítása

A növényekbe juttatni kívánt pPCV alapú plazmidot először *Escherichia coli* S17-1 törzsbe vittük be, amely képes konjugációra a növényi transzformáció során használt *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 PMP90RK háromszoros rezisztenciát hordozó törzsével. A két baktériumtenyészetből folyadékkultúrát neveltünk, 0.5-0.5 ml-t összekevertünk, a sejteket üleptítettük, majd a tömény baktérium keveréket YEB táplemezen növesztettük. A 24 óra után a növekedésnek indult baktériumtenyészetből kis mennyiséget rifampicin, karbenicillin és kanamicin tartalmú YEB lemezre szélesztettünk. A felnövekvő *Agrobacterium* telepeket legalább három alkalommal passzáltuk, hogy az *E. colitól* megtisztítsuk, mielőtt a növények kezeléséhez használtuk volna őket.

Az *Agrobacterium* által hordozott konstrukció növényekbe juttatásához *Arabidopsis* növények virágzatát mártogattunk bele folyadékkultúrában nevelt baktériumok 3%-os szacharózban felfuszpendált oldatába (Clough és Bent, 1998). A felnevelt növényekről magot gyűjtöttünk. Megfelelő szelektív ágensekkel kiegészített AM táptalajon csíramentes körülmények között válogattuk ki a rezisztens egyedeket. Ezeket kellően erőteljes gyökérzet kialakulása után (10–12 nap) földbe ültettük és felneveltük üvegházi körülmények között. Általában 20–30 független T1 vonalat állítottunk elő. Vizsgálatainkat a T3 nemzedék homozigóta egyedein végeztük.

Fénykezelések

A fénykezelésekhez Quantum Devices Inc. (USA) Snaplite™ LED-eket tartalmazó monokromatikus fényforrásokat használtuk. Az alkalmazott vörös fény hullámhossza 665 ± 15 nm, a távoli-vörös fény hullámhossza 730 ± 15 nm, a kék fény hullámhossza pedig 470 ± 15 nm volt. A használt fényintenzitást a kísérletek leírásánál külön tüntettük fel.

Lumineszcencia-mérés élő növényben

A luciferázos markergéneket kifejező csíranövényeket 12:12 LD cikluson állandó 22 °C-on hét napig neveltük MS3 lemezeken. A mérés kezdete előtt 6-8 órával a csíranövényeket steril körülmények között 96 zsebes mikrotiterlemezbe helyeztük, melynek minden zsebe 0.25 ml MS3 táptalajt tartalmazott. Minden egyes növényre 20 μl 2.5 mM-os luciferin (D-Luciferin Firefly, Biosynth AG) oldatot cseppentettünk. A mérés a csírázást követő hetedik

napon indult. A méréseket TopCount[®]NXT[™] önműködő luminométerrel (PerkinElmer) végeztük, amely a lemez zsebeiben elhelyezett csíranövény által kibocsátott fényt a mérési idő végéig folyamatosan rögzítette (Hall és Brown, 2007). A luminométerben a mintákat az egyes kísérleteknél külön leírt fényviszonyok között tartottuk. A folyamatos fényben levő minták csak a mérés idejére (1–2 óránként 3 percre) kerültek a mérőtérben sötétbe, ami a cirkadián óra működését nem befolyásolta (Millar és mtsai, 1995). A mérési eredmények feldolgozása a TopTempII nevű Microsoft Excel makróval (Dr. Andrew Millar fejlesztése) történt. A luminométer által mért értékek az egy másodperc alatt beérkezett fotonok számát (count per seconds, cps) mutatják. Az egyedi növények esetében mért értékeket az adott növény összes mért értékének átlagával osztottuk el. Ezt az értéket az idő függvényében ábrázoltuk. Az ábrákon legalább 16 csíranövény lumineszcencia értékéből számolt átlagértéket tüntettük fel. A periódushossz mérését a Biological Rhythms Analysis Software System (BRASS) (Locke és mtsai, 2005) segítségével végeztük el. Ezzel a Microsoft Excel alapú makróval a TopCount[®]NXT[™] luminométerrel mért adatok kiértékelhetőek. A program a „Fast Fourier Transform-Non-Linear Least Squares (FFT-NLLS)” módszerrel (Plautz és mtsai, 1997) minden egyedi növény adatsorára illesztett görbe alapján ad becslést a periódusra. Minden kísérletben 80-120 órás mérési időtartamból származó adatokat használtunk fel. Csoportonként legalább 20 növény periódusát mértük. A periódus becslése során csak azokat az értékeket vettük figyelembe, amelyek a 20 és 28 óra közti cirkadián tartományba estek. A hibahatárokat a standard hiba (Standard Error, SE) középértékeként ($\pm$ SEM) tüntettük fel minden esetben.

Alkalmazott mikroszkópos eljárások

Epifluoreszcens mikroszkópia

Az epifluoreszcens vizsgálatokat Axioskop Zeiss mikroszkóppal végeztük, Axiocam Zeiss kamerarendszerrel kombinálva. Az YFP nyomonkövetéséhez YFP-szűrőkészletet használtunk (AHF Analysentechnik).

Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A pásztázó elektronmikroszkópos képek Zeiss Supra 40VP (Carl Zeiss SMT AG) hidegkatódos Emitech K1250X (Quorum Emitech) transzfer rendszerrel kombinált készülékkel készültek. A biológiai mintákat kriogenizációs eljárással készítettük elő, a friss növényi szövetet Tissue-Tec (O.C.T. Compound) ragasztóval rögzítettük a mintatartó asztalhoz és arany/palládium réteggel vontuk be vezetőréteggé.

Differenciál interferencia kontraszt (DIC) mikroszkópia és a sejtalak faktor számítása

A vizsgálandó növényi mintát 12 órán át áztattunk 160 g klór-hidrát (Sigma-Aldrich) 100 ml vízzel és 50 ml glicerinnel készített oldatában. DIC optikával (Leica) felszerelt Leica DMRB mikroszkóppal vizsgáltuk az így előkészített szikleveleket. A képeket Leica DFC 490 kamerával készítettük a Leica Application Suite 2.5.0 szoftvert használva. A bőrszöveti sejtek területét és területét az ImageJ program segítségével mértük meg, és a sejtalak faktort 4π terület/kerület² formájában adtuk meg. A szignifikanciát t-teszt alapján a SigmaStat 3.5 szoftver segítségével határoztuk meg.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia

A csíranövények festetlen szikleveleit vizsgáltuk. Az YFP fluoreszcens jelét 40× és 63× lencsékkel, valamint argon/kripton lézerrel és 405 nm dióda lézerrel (Leica) felszerelt Leica TCS SP2 AOBS CLSM mikroszkóppal detektáltuk.

DNS tartalom meghatározása áramlási citometriával

A vizsgálandó növényi anyagot homogenizáltuk, CyStain UV precise P DNA festékkel (Partec) festettük. 50 µm átmérőjű filter segítségével távolítottuk el a törmeléket. A ploidia szintet Ploidy Analyser PA-1 (Partec) segítségével mértük és FloMax 2.52 szoftverrel (Partec) értékeltük az eredményeket.

Statisztikai analízis

A szignifikanciát Student-féle t-teszttel vizsgáltuk, illetve ahol páronkénti összehasonlítás volt szükséges több adatsor esetén (ploidia és szik alatti szár mérések *lip1* mutációval kombinált fotoreceptor mutánsokban), ott Tukey-féle eljárás és egyutas ANOVA módszerekkel a SigmaStat 3.5 szoftver segítségével határoztuk meg, hogy a tapasztalt különbség szignifikáns-e. A P-érték jelöli ki azt a szignifikancia-tartományt, amelyen belül már biztosan nincs szignifikáns különbség az összehasonlított adatsorok között. Ha a P-érték nagy, akkor a két mintasor között nincs szignifikáns különbség ($P < 0.05$), míg ha kicsi, akkor biztosan szignifikánsan különböznek ($P < 0.001$). A dolgozatban használt jelölések: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, és * $P < 0.05$.

EREDMÉNYEK

A LIP1 fehérje hiányában megváltozik a sziklevel felszíni bőrszöveti sejtjeinek alakja

A *lip1-1* és *lip1-2* mutáns csíranövények mikroszkópos analízise azt mutatta, hogy a mutáció a sziklevelek felszíni bőrszöveti sejtjeinek rendellenes fejlődését okozza. A növényeket 12:12 LD körülmények között neveltük 7 napig, majd a C24 és a *lip1-1*, valamint a Col-0 és a *lip1-2* csíranövények sziklevelének epidermisz sejtjeit mikroszkóppal vizsgáltuk. A fényen nevelt *lip1-1* és *lip1-2* mutáns csíranövények bőrszöveti sejtjeinek alakja jellegzetes módon eltér a vad típusétól (8. ábra A), mivel nem alakul ki a vad típusra jellemző, karéjos sejthalak. Azonban az etiolált növények esetében különbség nem figyelhető meg (8. ábra F). A fényen nőtt *lip1-1* és *lip1-2* mutánsok bőrszöveti sejtjei kisebbek, mint a vad típusé. A sejthalak lekerekítettebb, a sejtek alakja kevésbé összetett. A sejt alak faktor ami a sejtek gömbölyűségének mértékét adja meg, szignifikáns különbséget mutat t-teszt alapján a vad típus és a *lip1* mutánsok sejthalakja között (8. ábra B).

C24 és *lip1-1*, valamint Col-0 és *lip1-2* növényeket 12:12 LD cikluson neveltük 7 napig majd a csíranövények sziklevelét pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A *lip1-2* mutánsok esetében azt tapasztaltuk, hogy a sziklevelek széle jellegzetesen felfelé görbül (8. ábra C). Ezt a morfológiai változást az okozza, hogy az epidermális sejtek nem hoznak létre összefüggő réteget a levél felszínén. Ez az elváltozás vad típusú növények esetében nem figyelhető meg. A jelenséget feltehetően egyes bőrszöveti sejtek elhalása okozza, az elhalt gázcserenyílások zárósejtjeinek és az elhalt bőrszöveti sejteknek a helye is tisztán kivehető a készített felvételeken (8. ábra D).

A *lip1-2* mutánssal ellentétben a *lip1-1* esetében összefüggő bőrszöveti réteg figyelhető meg (8. ábra C), ami ökotípusok közötti eltérésre utal, tekintve hogy mindkét allél funkcióvesztéses mutáció. Továbbá, adataink azt mutatják, hogy a sejthalak megváltozása és a nem összefüggő bőrszöveti sejtréteg a fejlődés bizonyos szakaszában alakul ki, mivel *lip1-1* és *lip1-2* mutáns növények első igazi levelein ezek az elváltozások nem láthatóak (8. ábra E). A növényeket ennek vizsgálatához 12:12 LD cikluson neveltük 21 napig, majd a Col-0 és a *lip1-2* csíranövények sziklevelének epidermisz sejtjeit mikroszkóppal vizsgáltuk. A karéjos sejtek egyértelműen kivehetőek voltak a *lip1-2* mutánsok esetében is. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a LIP1 fehérjének fontos szerepe van a növényi életciklus korai szakaszában.

8. ábra. A LIP1 fehérje fejlődési állapottól függően befolyásolja a sejtalakot

A vizsgálatokhoz a növényeket 12:12 LD cikluson neveltük 7 (A, B, C, D) illetve 21 napig (E).

(A) Epidermisz sejtek alakja fénymikroszkóppal vizsgálva, Col-0, *lip1-2*, C24 és *lip1-1* növények szikleveleiben. Skála: 50 μ m.

(B) Sejt alak faktor a sziklevel epidermális sejteinek területéből és kerületéből számolva. 43-54 sejtet mértünk vonalanként, t-teszt: $P < 0.001$ minden mintára. A hibahatárok a standard hibát jelölik (SE).

(C) SEM képek Col-0, *lip1-2*, C24 és *lip1-1* növények szikleveléről. Skála: 200 μ m.

(D) Közele SEM kép *lip1-2* levél felszínéről. Anyilak az elhalt sztóma zárósejtekre mutatnak. Skála: 20 μ m.

(E) SEM képek Col-0 és *lip1-2* növények első igazi levelének felszínéről. Skála: 50 μ m.

(F) DIC képek 7 napig folyamatos sötétben nevelt C24 és *lip1-1* növények sziklevelének felszínéről. Skála: 25 μ m.

A *lip1* mutáns növényekben megnő a magi DNS mennyisége

A LIP1 fehérje hatása a csíranövények kromatintartalmára

Mivel a sejttalak változása gyakran összefüggésbe hozható az örökítő anyag mennyiségének megváltozásával (Guimil és Dunand, 2007), meghatároztuk a magi DNS mennyiségét *lip1* mutáns növények sziklelevelében áramlási citometriával. A növényeket 12:12 LD cikluson neveltük 7 napig a mérést megelőzően. Azt tapasztaltuk, hogy a mutánsokban megnőtt az olyan sejtmagok százalékos aránya, amelyek emelkedett mennyiségű DNS-t tartalmaztak. Különösképpen megnőtt a 16-szoros kromoszómakészlettel (16C) rendelkező sejtmagok aránya, valamint a vad típussal ellentétben a *lip1-2* mutánsok sziklelevelében 32-szeres kromoszómakészlettel (32C) rendelkező magok is detektálhatóak voltak (9. ábra A és B).

9. ábra. A *lip1* mutánsokban megnő a magi örökítőanyag mennyisége

A ploidia szintet vad típusú és *lip1* mutáns növények különböző szerveiben mértük.

A növényeket 12:12 LD cikluson neveltük 7 (A, B, C, D) illetve 21 (E) napig. Vizsgáltuk a sziklevelet (A, B), szárát (C), teljes növényt (D) és az első igazi levelet (E).

A feltüntetett DNS mennyiséget tartalmazó sejtmagok százalékos arányát tüntettük fel. Mérésenként 4 párhuzamos mintát vizsgáltunk. Egy minta 10 db sziklevelet (A, B), 10 db szik alatti szárát (C), 5 db csíranövényt (D) vagy 4 db levelet (E) tartalmazott.

A hibahatárok standard eltérés (SD) formájában vannak feltüntetve.

A ploidia szint változása gyakran jár együtt megváltozott sejtszámmal is (Sabelli és Larkins, 2009). A sejtszám változását vizsgáltuk *lip1-1* mutáns és vad típusú növények sziklelevelének bőrszöveti, valamint mezofill sejtjeire vonatkozóan fény/sötét cikluson nevelt (3. táblázat) és etiolált (4. táblázat) növényekben is.

Genotípus	Sziklevel felszíni bőrszöveti sejtek			Oszlopos parenchima	
	Sziklevel méret (mm ²)	Szám/sziklevél		Szám/sziklevél	Méret (μm ²)
		felszín	Méret (μm ²)		
C24	2.082 ± 0.176	561 ± 61	3697 ± 202	1797 ± 253	1165 ± 156
<i>lip1-1</i>	1.568 ± 0.194	528 ± 77	2874 ± 175	1894 ± 310	821 ± 129
P	< 0.001	0.53	< 0.001	0.29	0.0041

3. táblázat. Sziklevelek bőrszöveti és oszlopos parenchima sejtjeinek főbb jellemzői fény/sötét cikluson nevelt csíranövényekben

12:12 LD cikluson 7 napig nevelt növények sziklevelének felszínéről készítettünk digitális képeket. A sziklevelek (10-15 db mérésenként) és a sejtek méretét (16-22 sziklevelenként) vizsgáltuk. A mérések átlagát tüntettük fel, a hibahatárokat standard eltérés (SD) formájában adtuk meg.

Genotípus	Sziklevel felszíni bőrszöveti sejtek			Oszlopos parenchima	
	Sziklevel méret (mm ²)	Szám/sziklevél		Szám/sziklevél	Méret (μm ²)
		felszín	Méret (μm ²)		
C24	0.229 ± 0.039	581 ± 75	394 ± 61	1423 ± 281	161 ± 31
<i>lip1-1</i>	0.207 ± 0.031	549 ± 83	368 ± 69	1321 ± 235	136 ± 27
P	0.09	0.47	0.39	0.18	0.12

4. táblázat. Sziklevelek bőrszöveti és oszlopos parenchima sejtjeinek főbb jellemzői etiolált csíranövényekben

7 napig sötétben nevelt növények sziklevelének felszínéről készítettünk digitális képeket. A sziklevelek (9-11 db mérésenként) és a sejtek méretét (35-60 db sziklevelenként) vizsgáltuk. A mérések átlagát tüntettük fel, a hibahatárokat standard eltérés (SD) formájában adtuk meg.

Érdekes módon a *lip1-1* mutáns növények esetében tapasztalható megnövekedett örökítőanyag tartalom a sejt méret csökkenésével járt együtt, azonban az össz sejtszámra nem volt hatással. Következésképpen a *lip1-1* mutáns növények sziklevelének mérete kisebb, mint a vad típusé. Hogy ellenőrizzük a *lip1* mutáció okozta megnövekedett örökítőanyag tartalom szövetspecifikus mivoltát, szik alatti szár és teljes növény tartalmú mintákat is megvizsgáltunk az örökítőanyag mennyiségét tekintve (9. ábra C és D). A ploidia szint ezekben a mintákban nagyon hasonlított a sziklevel esetében mért szintre, ami arra utal, hogy a LIP1 által a DNS tartalomban okozott változás nem szövetspecifikus. Az első igazi levelek esetében pedig nem tapasztaltunk különbséget a ploidia szintekben *lip1-2* mutáns és vad típusú növények között (9. ábra E), ami arra utal, hogy a LIP1 fejlődési stádiumtól-függő módon játszik szerepet a ploidia szint befolyásolásában.

A LIP1 fényfüggő módon gátolja az endoreduplikációt

A sejt DNS tartalma az endoreduplikáció során megnő. Sötétben nevelt *Arabidopsis* csíranövények szik alatti szárában négy endoreduplikációs ciklus játszódhat le, ami 32-szeres kromoszómakészletet eredményez (32C). A negyedik ciklus fény által gátolt (Gendreau és

mtsai, 1998). Mivel a LIP1 szerepet játszik a cirkadián óra és a fotomorfogenikus folyamatok fény általi szabályozásában (Kevei és mtsai, 2007a), kíváncsiak voltunk, hogyan változik a ploidia mintázat különböző fényviszonyok között nevelt *lip1* mutáns növényekben.

A növényeket 6 napig neveltük folyamatos sötétben, 12:12 LD cikluson, illetve folyamatos, 80 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fehér fényen. A ploidia szint emelkedését tapasztaltuk fény/sötét ciklusokon nevelt *lip1* mutánsok esetében (10. ábra C és D), valamint a DNS tartalom tovább nőtt a folyamatos fényen nevelt mutáns növényekből származó mintákban (10. ábra E és F). Azonban etiolált *lip1* mutáns és vad típusú növények között nem tapasztalható eltérés a ploidiat tekintve (10. ábra A és B), ami arra utal, hogy a LIP1 gátló hatása az endoreduplikációra fényfüggő.

10. ábra. A LIP1 hatása fény-függő a ploidia szintjére

C24 és *lip1-1* (A, C, E), valamint Col-0 és *lip1-2* (B, D, F) növényeket neveltünk

(A, B) folyamatos sötétben,

(C, D) 12:12 LD cikluson,

(E, F) folyamatos 80 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fehér fényben 6 napig. A ploidia szint méréséhez teljes csíranövényeket használtunk. Az adott DNS mennyiséget tartalmazó sejtmagok százalékos arányát tüntettük fel. Mérésként 4 párhuzamos mintát vizsgáltunk. A hibahatárok a standard hibát jelölik (SD).

Folyamatos vörös fényben az endoreduplikáció fény-általi gátlása a fitokróm B fotoreceptortól függ, mivel sötétben, illetve vörös fényben nevelt *fitokróm B* mutánsokban egyformán magas ploidia szint mérhető (Gendreau és mtsai, 1998). Hogy teszteljük a *LIP1* és a *fitokróm B* közti génkölsönhatást (episztatikus hatást) a vörös fényfüggő endoreduplikáció szabályozásában, megmértük a kromatintartalmat *lip1-2* és *phyB-9* egyszeres, valamint *lip1-2 phyB-9* kétszeres mutánsokban.

A növényeket 7 napig neveltük folyamatos vörös fényben ($40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a méréshez teljes csíranövényeket használtunk. Mind a *lip-2*, mind a *phyB-9* egyszeres mutánsok esetében azt tapasztaltuk, hogy a 16-szoros kromatintartalmú magok aránya megemelkedett a mintákban (11. ábra B). A mérés statisztikai analízisét egy utas ANOVA és Tukey-féle eljárás segítségével végeztük el, melyek eredményeként az mondható el szintén, hogy a legkevésbé szignifikáns eltérés a *lip-2 phyB-9* és *phyB-9* mintapárok között volt. Ez azt jelenti, hogy a *lip-2 phyB-9* kétszeres mutáns esetében a két mutáció hatása nem összegződött, a kromatintartalom az egyszeres *phyB-9* mutánshoz hasonlóan változott a vad típushoz képest. Vagyis a *fitokróm B* gén episztatikus hatása érvényesül a *LIP1* gén felett. Sötétben nevelt növények esetében a DNS tartalom megegyezett a mutánsokban a vad típusával, ami a mutációk fényfüggő hatását bizonyítja ismételtén (11. ábra A).

Az előző kísérlet mintájára megvizsgáltuk a génkölsönhatásokat *kriptokróm 1*, *kriptokróm 2* és *lip1-2* között. A növényeket folyamatos kék fényben ($40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (11. ábra D), neveltük 7 napig, a méréshez teljes csíranövényeket használtunk fel. A *lip1-2* mutáns esetében a ploidia szint jelentősen megnőtt folyamatos kék fényben a vad típushoz képest (11. ábra D). A *lip1 cry1 cry2* háromszoros mutáns kromatintartalma hasonló volt a *cry1 cry2* kétszeres mutánshoz. A statisztikai analízis alapján a legkevésbé szignifikáns eltérés a *lip-2 cry1 cry2* és *cry1 cry2* mintapárok között volt.

A *phyA-211* mutáció hatását folyamatos távoli vörös fényben ($5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (11. ábra E) 7 napig nevelt növényeken vizsgáltuk. A *lip1-2* mutáns esetében a ploidia szint megkülönböztethetetlen volt a vad típustól folyamatos távoli vörös fényben, míg a *lip1-2 phyA-211* dupla mutánsban a kromatintartalom a *phyA211* egyszeres mutánssal egyezett meg. Sötétben nevelt *phyA-211* és *lip1-2 phyA-211* növényekben a ploidia szint nem különbözött a Col-0 -tól, illetve a *lip1-2* mutánstól szignifikánsan.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a LIP1 fehérje fontos szerepet játszik az endoreduplikáció kék, illetve vörös fény általi szabályozásában, továbbá úgy tűnik, hogy a szignalizációs útban a LIP1 a fitokróm B valamint a kriptokróm 1 és kriptokróm 2 alatt helyezkedik el.

Egy atipikus E2F transzkripciós faktor, a *DEL1* fény által szabályozott transzkripciójáról mutatták ki nemrégiben, hogy fontos szerepet játszik az endoreduplikáció fény-általi szabályozásában (Berckmans és mtsai, 2011). Megvizsgáltuk, hogy a LIP1, illetve a fitokróm B szerepet játszik-e a *DEL1* fényfüggő transzkripciójában. A növényeket 7 napig neveltük folyamatos sötétben, illetve folyamatos vörös fényben ($40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a mintaszedést megelőzően. A *DEL1* mRNS szintjét mértük vad típusú, *lip1-2* és *phyB-9* egyszeres, illetve *lip1-2 phyB-9* kétszeres mutánsokban valós idejű PCR segítségével. Vad típusú növényekben a *DEL1* mRNS szint magasabb volt fényben, mint sötétben (11. ábra F). Azonban, a fénykezelés által okozott emelkedett szintű *DEL1* kifejeződés minden mintaában tapasztalható volt (11. ábra F). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy vörös fényben a LIP1 és a fitokróm B az endoreduplikációt nem a *DEL1* transzkripció befolyásolásán keresztül szabályozzák.

11. ábra. A LIP1 fehérje csökkenti az endoreduplikáció mértékét vörös és kék fényben, de távoli vörösben nem

A jelölt genotípusú növényeket 7 napig (A, C, F) folyamatos sötétben, (B, F) vörös fényben ($40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (D) kék fényben ($40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (E) távoli vörös fényben ($5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) neveltük. Egész csíranövényeket használtunk a ploidia méréshez. A hibahatárok a standard eltérést (SD) jelölik.

(F) A *DEL1* fényindukált kifejeződését valós idejű PCR-al mértük. Az értékeket *TUBULIN* mRNS szintre normalizáltuk. Három független mérés átlagát ábrázoltuk. A hibahatárok a standard hibát (SE) jelölik. T-teszt alapján a mért különbségek nem szignifikánsak ($P > 0.1$) a vizsgált körülmények között. A B-9 ábracímre utal a *PhyB-9*, *A211* a *PhyA-211* mutánsra.

A LIP1 szerepe a fotomorfogenezis szabályozásában a fitokróm B-től és a kriptokróm 1-2-től függ, de a fitokróm A-tól nem

Mint azt korábban laboratóriumunkban már korábban kimutatták, *lip1-1* mutáns növényekben a hipokotil hossza vörös és kék fényben megváltozik, a távoli vörös fénytől függő jelátviteli út azonban érintetlen (Kevei és mtsai, 2007a). Hogy többet tudjunk meg a LIP1 szerepéről a fitokrómok és kriptokrómok által szabályozott fényfüggő jelátvitelben, megmértük a hipokotil hosszának változását *lip-2 phyB-9*, *lip1-2 phyA-211*, *lip1-2 cry1 cry2* többszörös mutánsokban vörös, távoli vörös, illetve kék fényben.

A növényeket nedves szűrőpapíron csíráztattuk, majd 4 napra monokromatikus vörös, kék és távoli vörös fénybe helyeztük különböző intenzitásokon. Folyamatos vörös fényben a *lip1-2* mutánsok szik alatti szárának hossza szignifikánsan rövidebb volt, mint a vad típusé, azonban a *lip-2 phyB-9* kétszeres mutáns hipokotilja jelentősen hosszabb volt, mint a vad típusé, és csak alig volt rövidebb, mint a *phyB-9* egyszeres mutánsé (12. ábra A). Folyamatos kék fényben a *lip1-2* mutánsok szik alatti szárának hossza, ha nem is jelentősen, de szignifikánsan rövidebb volt, mint a vad típusé, azonban a *lip1-2 cry1 cry2* háromszoros mutáns hipokotilja a *cry1 cry2* dupla mutánshoz hasonlóan hosszú volt (12. ábra B). Folyamatos távoli vörös fényben a *lip1-2* mutáns a vad típusához hasonlóan viselkedett, a *lip1-2 phyA-211* dupla mutáns pedig a *phyA-211* mutánssal megegyező hipokotil hosszúságú volt (12. ábra C).

Ezek az adatok megerősítik, hogy a LIP1 nem vesz részt a fitokróm A által szabályozott távoli vörös fényfüggő folyamatokban. A *lip1* mutáns vörös fényben tapasztalható fotomorfogenikus fenotípusa a fitokróm B által szabályozott jelátviteli út zavarával magyarázható, melyhez kisebb mértékben hozzájárulnak egyéb fitokrómok is (fitokróm C, D, E). Ezen kívül a *lip1* mutáns fenotípusa kék fényben a kriptokróm 1 és kriptokróm 2 fotoreceptoroktól függ.

12. ábra. Fényre adott fiziológiai válaszok *lip1-2* mutánsban

A csíranövényeket folyamatos vörös (A), kék (B), távoli vörös (C) fényen neveltük a megadott fényintenzitásokon 4 napig, majd a növények szik alatti szárának hosszát mértük. Az értékeket sötétben nevelt azonos korú növények szárának hosszához viszonyítottuk. Az így kapott értékeket a fényintenzitás függvényében, logaritmikus skálán ábrázoltuk. A hibahatárokat standard hibaként adtuk meg (SE), mintánként 28-32 növényt vizsgáltunk. A *B-9* ábrafelirat utal a *PhyB-9* mutánsra, az *A211* a *PhyA-211*-re.

A *lip1* mutánsok fokozottan érzékenyek az abiotikus stresszre

Hogy további információkat szerezzünk a LIP1 fehérje funkciójáról, megvizsgáltuk hogyan viselkednek a *lip1* mutáns növények különféle abiotikus stressz körülmények között. Azt tapasztaltuk, hogy 12:12 LD cikluson nevelve fokozott érzékenységet mutatnak a tápközeg só (NaCl) tartalmának emelkedésére (13. ábra). 100 mM NaCl-ot vad típusú növények még képesek tolerálni, de a *lip1* mutáns csíranövények növekedése és fejlődése ekkor már komoly zavart szenved.

A *lip1-1* mutánsok kevésbé érzékenyek sóra, mint a *lip1-2* mutánsok, ami feltehetően ökotípusok közötti különbségekkel magyarázható, mivel a vad típusú C24 növények is toleránsabbak a sóstresszel szemben, mint a Columbia-0 növények. Nemcsak a növekedés és a fejlődés szenved zavart só jelenlétében a *lip1* mutáns növényekben, hanem a csírázási képesség is (14. ábra B).

13. ábra. A *lip1* mutáns növények érzékenyek a tápközeg sótartalmára

A csíranövényeket 12:12 LD cikluson neveltük 14 napig a feltüntetett NaCl koncentrációt tartalmazó MS3 táplemezeken. A *lip1* mutánsok mindkét ökotípus esetében fokozott érzékenységet mutattak a tápközeg sótartalmára.

A csírázási képességet vizsgáltuk a fény/sötét cikluson és a folyamatos sötétben nevelt növények esetében is. Vad típusú (Col-0) és mutáns (*lip1-2*) növények magjait szélesztettük MS3 táplemezre, valamint 200 mM NaCl tartalmú MS3 táplemezre. 3 nap 4 °C hidegkezelés után a magok 22 °C-ra lettek helyezve 12:12 LD cikluson, illetve 4 óra fehér fénykezelés után folyamatos sötétbe. A *lip1-2* mutáns növények mindkét esetben érzékenyebbek voltak a vad típusnál a tápközeg magas sókoncentrációjára, utalva ezzel arra, hogy a sóérzékenység nem egy fényfüggő zavar következménye (például a ploidia szint változásáé), viszont a fejlődést minden esetben gátolja.

14. ábra. Sóstressz hatása a csírázásra *lip1-2* és Col-0 növényekben

Vad típusú (Col-0) és mutáns (*lip1-2*) növények magjait szélesztettük MS3 táplemezre (A), valamint 200 mM NaCl tartalmú MS3 táplemezre (B). 3 nap 4 °C hidegkezelés után a magok 22 °C-ra lettek helyezve 12:12 LD cikluson (telt szimbólumok), illetve 4 óra fehér fény kezelés után folyamatos sötétbe (üres szimbólumok). A *lip1-2* mutánst a piros szín jelöli, a Col-0-t pedig a kék.

A *lip1-2* mutánsok csírázási képessége só tartalmú táptalajon rosszabb, mint a vad típusé a vizsgált fényviszonyok között.

A következő kísérletben azt vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a *lip1* mutánsban mérhető rövid periódus és a sóérzékeny fenotípus között. A méréshez a növényeket 12:12 LD cikluson neveltünk 7 napig 100, illetve 50 mM NaCl-dal kiegészített MS3 táptalajon, majd folyamatos gyenge fehér fénybe helyeztük át őket 5 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitáson, szintén 100, illetve 50 mM NaCl-dal kiegészített MS3 táptalajon. A *CCR2:LUC* markergén ritmikus kifejeződését mértük. A *lip1-2* mutáció által okozott rövid periódusú fenotípust a sókezelés nem befolyásolta (5. táblázat).

Vonal	NaCl	Periódushossz (óra)	± SEM
Col-0	-	25.94	0.17
Col-0	50mM	25.78	0.19
<i>lip1-2</i>	-	24.56	0.08
<i>lip1-2</i>	50mM	24.7	0.26
Col-0	-	25.32	0.48
Col-0	100mM	25.81	0.32
<i>lip1-2</i>	-	24.06	0.37
<i>lip1-2</i>	100mM	24.3	0.51

5. táblázat. Asóstressz nincs hatással a *lip1-2* mutáció okozta periódus rövidülésre

A növényeket 12:12 LD cikluson neveltünk 7 napig 100 illetve 50 mM NaCl-dal kiegészített MS3 táptalajon, majd folyamatos gyenge fehér fénybe (5 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) helyeztük őket, szintén 100 illetve 50 mM NaCl-dal kiegészített MS3 táptalajon. A *CCR2:LUC* markergén ritmikus kifejeződését mértük. A periódushossz mérést a BRASS2 program segítségével végeztük. A *lip1-2* mutáció által okozott rövid periódusra a sókezelés nem volt hatással.

A csírázás gátlása mellett a magas NaCl koncentráció zavart okoz a gyökér fejlődésében is. A növényeket 7 napig neveltük 12:12 LD cikluson MS3 táptalajon, majd áthelyeztük őket függőleges helyzetű, különböző koncentrációjú NaCl tartalmú lemezekre. A 15. ábra mutatja, hogy a gyökér növekedését a só erőteljesebben gátolja *lip1* mutánsban, mint a vad típusban.

A magas sókoncentráció ozmotikus és ionikus stresszt is jelent a növények számára. Az ozmotikus stressz korai stresszválasz gének indukciójához vezet. Ilyen gének az *RD29A*, *RD29B* és a *RAB18*. Az ionikus stressz (emelkedett Na^+ koncentráció a sejten belül) pedig az *SOS2* indukcióját idézi elő, ami egy Na^+/H^+ antiporter, az *SOS1* aktivátora (Batelli és mtsai, 2007). Hogy megvizsgáljuk a LIP1 részt vesz-e ezekben a folyamatokban, 7 napos 12:12 LD cikluson nevelt *lip1-2* mutáns és vad típusú növényeket helyeztünk 200 mM NaCl tartalmú táplemezre. 3 óránként mintát szedtünk és valós idejű PCR segítségével vizsgáltuk az *RD29A* (Yamaguchi-Shinozaki és Shizonaki, 1993), *RD29B* (Yamaguchi-Shinozaki és Shizonaki, 1993), *RAB18* (Ciereszko és Kleczkowski, 2002) és *SOS2* (Batelli és mtsai, 2007) gének só indukált kifejeződését. A 16. ábra mutatja, hogy nem volt jelentős különbség az indukció kinetikájában és mértékében egyik gén esetében sem a mutáns és a vad típus között. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a LIP1 szerepe elhanyagolható a só érzékelés jelátviteli folyamatában és a vizsgált sóstressz által indukálható gének transzkripciójának aktivációjában. Lehetséges azonban hogy a LIP1-nek nem transzkripciós szinten, hanem például poszt-transzlációs módosítások, vagy a sejten belüli elhelyezkedés változtatásának szintjén van szerepe ezen komponensek esetében.

16. ábra. A LIP1 hatása a sóstresszel indukálható gének expressziójára

Vad típusú és *lip1-2* mutáns növényeket neveltünk 7 napig 12:12 LD cikluson, majd helyeztünk át 200 mM NaCl tartalmú táptalajra 0 időpontban. Mintaszedés a jelölt időpontokban történt. *RD29A* (A), *RD29B* (B), *RAB18* (C) és a *SOS2* (D) gének kifejeződését vizsgáltuk valós idejű PCR segítségével.

Az értékeket *TUBULIN* szintjére normalizáltuk. Két független mérés eredményeinek átlagát ábrázoltuk.

A hibahatárok a standard hibát (SE) jelzik.

Megvizsgáltuk hogyan képesek fejlődni a *lip1-2* mutáns növények különféle ionikus (K^+ , Cs^{2+} , Li^{2+}), ozmotikus és hőmérsékleti stresszhatások alatt, valamint hogyan változik a fejlődés, illetve a csírázás ABA hatására, ami bizonyos stressz-válaszutak fontos szabályozó eleme. Az ionikus-stressz vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a *lip1* mutánsok 12:12 LD cikluson nevelve fokozott érzékenységet mutatnak a tápközeg $CsCl_2$ (10 mM), KCl (150 mM), $LiCl_2$ (20 mM) tartalmára egyaránt (17. ábra). Ez arra utal, hogy a *lip1* mutánsban nem specifikusan a nátrium érzékenység szenved zavart, és részben magyarázza, hogy a valós idejű PCR vizsgálatok során miért nem tapasztaltunk eltérést az *SOS2* indukciójában. Az ozmotikus stresszre adott választ 250 mM mannitolt tartalmazó táplemez segítségével vizsgáltuk. A *lip1-2* mutánsok ebben az esetben is érzékenyebbnek bizonyultak a vad típusnál (17. ábra). A hőmérséklet stressz során ismételtén azt tapasztaltuk, hogy a *lip1-2* mutáns növények fokozottan érzékenyen reagálnak a hőmérséklet emelkedésére. Ezen kísérlet során a növényeket 7 napig neveltük 12:12 LD cikluson 22 °C-on, majd 2 napra 37 °C-ra helyeztük át őket. A 2. nap elteltével a növények visszakérültek 22 °C-ra további 7 napra. A *lip1-2*

mutánsok nem éltek túl a kezelést, viszont a vad típusú növények normális fejlődést mutattak a 16. napon (17. ábra).

17. ábra. Ionikus, ozmotikus és hőmérsékleti stressz hatása a *lip1-2* mutáns növényekre

Col-0 és *lip1-2* mutáns növényeket neveltünk 14 napig 12:12 LD cikluson

(A) 150 mM KCl, (B) 10 mM CsCl₂, (C) 20 mM LiCl₂, (D) 250 mM mannitol tartalmú MS3 táplemezen.

(E) A hőmérséklet stressz vizsgálatához a növényeket 7 napig neveltük 12:12 LD cikluson

22 °C-on, majd 2 napra 37 °C-ra helyeztük át őket. A 2 nap elteltével a növények visszakérültek 22 °C-ra további 7 napra. A *lip1-2* mutánsok a vizsgált körülmények között érzékenyebbnak bizonyultak a stresszhatásokra a vad típusnál.

Az ABA mellett, hogy fontos szerepe van stressz jelátviteli utak szabályozásában, csírázást gátló hatással is bír. Ezért megvizsgáltuk, hogy *lip1-2* mutáns növények hogyan képesek csírázni 0.3 és 0.5 mM ABA tartalmú táplemezen. Azt tapasztaltuk, hogy a *lip1-2* mutánsok csírázási képessége sokkal rosszabb ABA tartalmú táplemezen, mint a vad típusé (6. táblázat). A LIP1 negatívan szabályozza az ABA jelátvitel ezen ágát. Az *RD29A* és *RD29B*, valamint a *RAB18* az ABA-függő jelátviteli útvonal komponensei, kifejeződési mintázatuk azonban nem változott a *lip1* mutánsban a vad típushoz képest (16. ábra).

Ezek a mérési eredmények arra utalnak, hogy a LIP1 többféle stresszfolyamatban is részt vesz, és feltehetően egy olyan cirkadián órát szabályozó elem, amely összeköttetéssel bír a cirkadián óra és a stressz folyamatok között. Egyre több cirkadián óra komponensről derült ki a közelmúltban, hogy szerepet játszik különféle stresszfolyamatok szabályozásában, illetve összeköttetést biztosít az óra és a stressz-válaszok között, hogy a növények a legmegfelelőbb időpontban legyenek felkészülve az őket várható módon érő stresszhatásokra (pl. hidegstressz hajnalban, szárazságstressz délben) (Sanchez és mtsai, 2011).

Csírázási arány (%)	<i>lip1-2</i>	<i>Col-0</i>	<i>lip1-1</i>	<i>C24</i>
kontrol	90+/-5	97+/-2	91+/-5	96+/-2
0.3 μ M ABA	25+/-3	92.5+/-4	66+/-12	78.5+/-8
0.5 μ M ABA	9.2+/-1.5	85+/-2	55+/-4	65+/-2

6. táblázat. Csírázási képesség vizsgálata ABA hatására *lip1* mutánsokban

Col-0, *lip1-2*, *C24* és *lip1-1* növények magjait 4°C-on hidegkezeltek 3 napig, majd 22°C-on ABA tartalmú táplemezen folyamatos gyenge fehér fénybe helyezték. A 4. napon vizsgáltuk a csírázási képességet. Mind a *lip1-2*, mind a *lip1-1* rosszabb csírázási képességet mutatott mint a vad típus.

A LIP1 sejten belüli elhelyezkedése

A sejten belüli elhelyezkedés módosítása

Korábban már kimutattuk, hogy a LIP1 fehérje a citoplazmában és a sejtmagban is egyaránt jelen van, valamint hogy eloszlását sem a fényviszonyok, sem a cirkadián óra nem befolyásolja (Kevei és mtsai, 2007a). Felmerült a kérdés, hogy a fent említett pleiotróp fenotípusok köthetők-e sejten belüli elhelyezkedéshez, ezért olyan növényeket állítottunk elő, amelyek a *lip1-2* mutáns háttérben YFP–LIP1 fúziós fehérjét fejeznek ki nukleáris lokalizációs szignállal (NLS), illetve nukleáris export szignállal (NES) ellátva (18. ábra A). Olyan transzgenikus vonalakat választottunk ki a további kísérletekhez, amelyekben a kifejeződési szintek összemérhetőek voltak (18. ábra B). A LIP1 fehérje mennyiségi vizsgálatát immunoblot módszerrel végeztük. A növényeket folyamatos fehér fényen (50 μ mol foton $m^{-2} s^{-1}$) neveltük 4 napig a mintaszedést megelőzően. A LIP1 fúziós fehérjék sejten belüli elhelyezkedését epifluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk. A növényeket 10 napig neveltük 12:12 LD cikluson a mikroszkopizálást megelőzően. Az YFP–LIP1 fúziós fehérje detektálható volt a sejtmagban és a citoplazmában is, az YFP–LIP1-NLS a sejtmagban volt jelen, míg az YFP–LIP1-NES esetében az YFP jel a sejtmagban nem volt kimutatható (18. ábra C).

18. ábra. YFP-LIP1 fúziós fehérje sejtben belüli lokalizációjának módosítása

(A) LIP1 fúziós konstrukciók sématis ábrája.

YFP: yellow fluorescent protein; *NLS*: magi lokalizációs szignál; *NES*: magi export szignál. A kifejeződést dohánymozzaik vírus 35S promotere biztosítja.

(B) LIP1 fehérje mennyiségi vizsgálata immunoblot módszerével. A növényeket folyamatos 50 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fehér fényen neveltük 4 napig a mintaszedést megelőzően.

(1) Nem transzformált Col-0,

(2) YFP-t 35S promoterről kifejező Col-0, valamint

(3) YFP-LIP1,

(4) YFP-LIP1-NLS,

(5) YFP-LIP1-NES fúziós fehérjét kifejező *lip1-2* mutáns.

Két egyforma gélt blottoltunk és kezeltünk YFP illetve aktin (αACT) specifikus ellenanyaggal. A bal oldalon látható fehérje molekulásúly marker az YFP-specifikus jelek méretét mutatja.

(C) YFP-LIP1 fúziós fehérje sejtben belüli elhelyezkedése.

A növényeket 10 napig neveltük 12:12 LD cikluson a mikroszkopizálást megelőzően. A bal oldalon az epifluoreszcens képek, a jobb oldalon a referencia képek láthatóak YFP-LIP1, YFP-LIP1-NLS és YFP-LIP1-NES fúziós fehérjéket kifejező *lip1-2* növények szárának bőrszöveti sejtjeiről.

Askála 10 μm -t jelöl, nu: sejtmag.

A LIP1 fehérje sejtmagi elhelyezkedése esszenciális a cirkadián funkció ellátásához

A kiválasztott transzgenikus vonalakban vizsgáltuk a ploidia, só, fotomorfogenikus és cirkadián fenotípusok komplementálhatóságát. A növényeket folyamatos fehér fényen ($80 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) neveltük 7 napig a ploidia méréshez. A 19. A ábra mutatja, hogy a *lip1* mutáns háttérben kifejezett YFP-LIP1, YFP-LIP1-NES és YFP-LIP1-NLS fúziós fehérjék képesek helyreállítani a mutáció által okozott ploidia szint változást. Legjobban szemlélteti ezt a 16C DNS tartalmú magok aránya. A ploidia szinthez hasonlóan, a jellegzetes karéjos sejtalak is helyreállt a sziklevek epidermisz sejtjein a komplementáló vonalakban (19. ábra B). A sejtalakot 7 napig folyamatos fehér fényen nőtt növények sziklevelének felszíni bőrszöveti sejtjein vizsgáltuk.

19. ábra. A ploidia és a bőrszöveti sejthalak fenotípus komplementálása LIP1 fúziós fehérjékkel *lip1-2* háttérben

A növényeket folyamatos fehér fényen ($80 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) neveltük 7 napig a vizsgálatokat megelőzően.

(A) Ploidia szintek Col-0, *lip1-2* mutáns és YFP-LIP1, YFP-LIP1-NLS vagy YFP-LIP1-NES fúziós fehérjéket kifejező *lip1-2* mutáns növényekben. Mérésenként 4 párhuzamos mintát vizsgáltunk.

A hibahatárok a standard eltérést (SD) jelölik.

(B) A szikleveleket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, kivéve az YFP-LIP1-NLS vonalat, ahol fénymikroszkópot használtunk. Mivel a fluoreszcens jel ebben a vonalban a sejtmagra korlátozódik és nem rajzolódik ki emiatt a sejtek kontúrja. A kis képen látható a fluoreszcens és a fénymikroszkópos kép átfedése.

A skála a felső sorban 13, az alsó sorban 50 μm -t jelöl.

A fúziós fehérjékkel mindkét vizsgált fenotípus komplementálható volt.

Vizsgáltuk a fúziós fehérjéket kifejező növényvonalak sótűrő képességét is. A kontroll és a fúziós fehérjéket kifejező *lip1-2* mutáns növényeket 14 napig neveltük 100 mM NaCl-ot tartalmazó táplemezen.. Az YFP-LIP1, YFP-LIP1-NLS, YFP-LIP1-NES fúziós fehérjéket kifejező *lip1-2* mutáns növények képesek voltak tolerálni 100 mM NaCl-ot a tápközegben, akárcsak a vad típusú növények (20. ábra).

20. ábra. A LIP1 fúziós fehérjékkel komplementált *lip1-2* növények nem túlérzékenyek sóstresszre.

Col-0, *lip1-2*, valamint YFP-LIP1, YFP-LIP1-NLS, és YFP-LIP1-NES fúziós fehérjéket *lip1-2* mutáns háttérben kifejező növényeket 12:12 LD cikluson neveltünk 22°C-on 14 napig MS3 és 100mM NaCl-al kiegészített MS3 táptalajon. A komplementáló konstrukciókat hordozó mutáns vonalak egyike sem mutatott a vad típusnál nagyobb mértékű érzékenységet a tápközeg sótartalmára.

A fotomorfogenikus fenotípus vizsgálatához a fúziós fehérjéket *lip1-2* háttérben kifejező csíranövényeket különböző intenzitású monokromatikus vörös (21. ábra A), kék (21. ábra B), távoli vörös (21. ábra C) fényen neveltük 4 napig, majd a növények szik alatti szárának hosszát mértük. A szik alatti szár hossza nem tért el szignifikánsan a komplementáló vonalak esetében a vad típustól vörös, kék, illetve távoli vörös fényben sem. A mérési eredmények alapján a LIP1 fehérje kompartmentalizációja nem szükséges ezekben a funkciókban betöltött szerepéhez. Vagyis nem zárható ki, hogy az a minimális mennyiségű fehérje, ami az NLS/NES motívum ellenére is a citoplazmában/sejtmagban helyezkedik el, elegendő a sikeres komplementáláshoz.

21. ábra. *lip1-2* mutáns fotomorfogenikus fenotípusának komplementálása LIP1 fúziós fehérjékkel

Hipokotil megnyúlás fényválasz görbéje

(A) folyamatos vörös,

(B) kék,

(C) távoli-vörös fényben.

Col-0, *lip1-2*,

valamint YFP-LIP1, YFP-LIP1-NLS és YFP-LIP1-NES fúziós fehérjéket *lip1-2* háttérben kifejező növényeket neveltük a megadott fényintenzitásokon négy napig, majd a növények hipokotilhosszát mértük. Az értékeket sötétben nevelt azonos korú növények szárának hosszához viszonyítottuk. Az így kapott értéket a fényintenzitás függvényében, logaritmikus skálán ábrázoltuk.

A hibahatárokat standard hibaként adtuk meg (SE), a mintaszám 28-32 volt mérési pontonként.

A fényviszonyoktól függetlenül nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a vad típus és a fúziós fehérjéket kifejező vonalak között.

Teszteltük a cirkadián fenotípus komplementálhatóságát is. A fúziós fehérjéket kifejező *lip1-2* mutáns növényeket 12:12 LD cikluson neveltünk 7 napig, majd folyamatos $3 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású vörös fénybe helyeztük át. A *CCR2:LUC* markergén ritmikus kifejeződését mértük. Az YFP-LIP1 és YFP-LIP1-NLS fúziós fehérjéket kifejező *lip1-2* mutánsok esetében a mutáció okozta rövid periódus nem látható (22. ábra A és B; 7. táblázat), míg az YFP-LIP1-NES-t kifejező vonalak esetében a periódus a *lip1-2* mutánsban mérhető periódushosszal egyezett meg (22. ábra C, 7. táblázat).

22. ábra. *lip1-2* mutáns cirkadián fenotípusának komplementálása LIP1 fúziós fehérjékkel

Col-0, *lip1-2*, valamint

(D) YFP-LIP1,

(E) YFP-LIP1-NLS,

(F) YFP-LIP1-NES fúziós fehérjéket kifejező *lip1-2* mutáns növényeket 12:12 LD cikluson neveltünk 7 napig, majd folyamatos 3 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású vörös fénybe helyeztük át.

A *CCR2:LUC* markergén ritmikus kifejeződését mértük, a feltüntetett értékek az átlagra lettek normalizálva.

Három független transzgenikus vonalat mértünk minden konstrukcióra nézve ugyanazzal az eredménnyel. Az YFP-LIP1 és YFP-LIP1-NLS fúziós fehérjék teljes mértékben képesek voltak helyreállítani a rövid periódusú fenotípust, míg az YFP-LIP1-NES esetében komplementáció nem látható.

A cirkadián óra szabályozásában betöltött szerepének ellátásához a LIP1 fehérje jelentős részének sejtmagi elhelyezkedése elengedhetetlen. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a LIP1 cirkadián órában betöltött szerepe különválasztható a fejlődésben, endoreduplikációban, stressztoleranciában, illetve fotomorfogenezisben betöltött szerepétől.

Vonal	Periódushossz (óra)	$\pm$ SEM
Col-0	29.95	0.28
<i>lip1-2</i>	27.37	0.77
YFP-LIP1	29.74	0.36
YFP-LIP1-NLS	29.33	0.7
YFP-LIP1-NES	27.42	0.31

7. táblázat. A cirkadián fenotípus komplementálása LIP1 fúziós fehérjékkel

A növényeket 12:12 LD cikluson neveltük 7 napig, majd 5 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású folyamatos vörös fénybe helyeztük őket. A *CCR2:LUC* markergén ritmikus kifejeződését mértük. A periódushossz mérést a BRASS2 program segítségével végeztük. Az YFP-LIP1 és YFP-LIP1-NLS fúziók komplementálták a rövid periódust, míg az YFP-LIP1-NES fúzió nem.

A LIP1 szerepe a cirkadián óra szabályozásában

A kimeneti elemek időbeli mintázatának vizsgálata

A cirkadián óra tanulmányozásának legáltalánosabb módja, ha valamely kimeneti elemének időbeli mintázatát figyeljük. A fő órakomponensek promotereit (*CCA1*, *LHY*, *GI*, *PRR9*) kimeneti elemként használva megvizsgáltuk, hogy a LIP1 hiánya milyen változást okoz. Korábbi vizsgálatokból már ismert volt, hogy a LIP1 hiányában rövid periódus figyelhető meg a reggel kifejeződő *CAB2* (*CHLOROPHYLL A/B-BINDING 2*) és az este kifejeződő *CCR2* (*COLD- AND CIRCADIAN REGULATED 2*) általánosan használt kimeneti elemek esetében (Kevei és mtsai, 2007a). A promoterek működését a szentjánosbogár luciferáz enzim aktivitásának nyomonkövetésével vizsgáltuk *in vivo*. *CCA1:LUC*, *LHY:LUC*, *GI:LUC*, *PRR9:LUC* markergének kifejeződését teszteltük Col-0 és *lip1-2* mutáns növényekben.

A markergének működését gyenge vörös fényben követtük nyomon luminométerrel. A *lip1-1* rövid periódusa ilyen körülmények között már szembetűnő (Kevei és mtsai, 2007a). Minden markergén esetében a *CCR2:LUC* és *CAB2:LUC* markergéneknél már korábban leírt rövid periódust tapasztaltuk (8. táblázat). Ezek az eredmények azt is bizonyítják, hogy a *LIP1* nem egy mellékszabályozókör része, mivel hiánya több különböző kimenetet is hasonló módon érint.

Vonal	Kimenet	Periódushossz (óra)	± SEM
Col-0	<i>CAB</i>	26.71	0.25
<i>lip1-2</i>		23.41	0.29
Col-0	<i>CCR2</i>	27.01	0.51
<i>lip1-2</i>		25.42	0.32
Col-0	<i>CCA1</i>	26.71	0.54
<i>lip1-2</i>		23.88	0.65
Col-0	<i>LHY</i>	26.4	0.28
<i>lip1-2</i>		24.63	0.23
Col-0	<i>GI</i>	26.28	0.45
<i>lip1-2</i>		25.75	0.35
Col-0	<i>PRR9</i>	26.78	0.46
<i>lip1-2</i>		23.98	0.45

8. táblázat. Óragének kifejeződésének mintázata *lip1-2* mutánsban

A növényeket 12:12 LD cikluson neveltünk 7 napig, majd 5 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ intenzitású folyamatos vörös fénybe helyeztük őket. A feltüntetett markergének ritmikus kifejeződését mértük. A periódushossz mérést a BRASS2 program segítségével végeztük. Minden kimeneti gén esetében a periódus a *lip1-2* mutánsban rövidebb volt mint a vad típusban.

RNS szintű vizsgálatok

A jelenlegi modell szerint a növényi cirkadián óra az óragének transzkripcióján és az mRNA molekulák translációján alapuló visszacsatolási körökből épül fel. Az elmélet szerint az óragének mRNA szintjének változása szükséges a ritmikus mintázat létrehozásához (McWatters és Devlin, 2011). Az mRNA szint változásának ezek szerint hatással kellene lennie a periódusra és a beállíthatóságra is. Számos olyan kísérleti eredmény létezik azonban, amelyek szerint az mRNA szintű szabályozás nem lényeges a ritmus létrehozása szempontjából, hanem csak kiegészítő szerepe van (Harmer és Kay, 2005). Egyre több olyan óraelemet azonosítanak, amelyek nem a transzkripció szintjén befolyásolják az óra működését (Kim és mtsai, 2007; Martin-Tryon és Kay, 2008).

A jelenlegi óramodell szerint ha az egyik hurkot elrontjuk egy komponens mutációjával, az nem állítja meg az órát, mert a többi hurok bizonyos mértékben képes azt továbbvinni (McWatters és Devlin, 2011). Az mRNA szintekben bekövetkező változások azonban jellemzőek lehetnek egy-egy hurokra, így egy elrontott génről meg lehet mondani, hogy melyik hurok működésére van hatással. Annak kiderítésére, hogy milyen hatással van a *LIP1* a központi óraelemek mRNA mintázatára, megvizsgáltuk a reggeli *CCA1* és *PRR9*, valamint az esti *TOC1* és *GI* gének időbeli kifejeződését *lip1-2* mutáns háttérben. A *CCA1*, *PRR9*, *TOC1* és a *GI* mRNA szintjét 12 óra sötét/12 óra gyenge fehér fény ($5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) cikluson nevelt csíranövényekben mértük valós idejű PCR segítségével. A kifejeződési szint maximuma jelentősen lecsökkent a *CCA1* és *TOC1* gének esetében a *lip1-2* mutánsban (23. ábra A és B). A *GI* és a *PRR9* gének kifejeződésének mintázata nem változott számottevően a mutánsban a vad típushoz képest (23. ábra C és D). A *lip1* mutáció a fentiek alapján negatív hatással lehet a *TOC1* transzkripciójára, ami viszont a *CCA1* transzkripciót serkentené, ez magyarázza, hogy a *lip1-2* mutánsban mindkettő csökkent kifejeződést mutat.

23. ábra. A központi óragének mRNS szintjének időbeli változása diurnális körülmények között

A növényeket 12 óra sötét/12 óra gyenge fehér fény ($5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) cikluson neveltük 9 napig, majd 3 óránként mintát vettünk belőlük 30 órán keresztül, amiből össz-RNS-t tisztítottunk. A központi óragének mRNS-szintjét valós idejű PCR segítségével határoztuk meg, az értékeket a *TUBULIN* mRNS szintjéhez viszonyítva ábrázoltuk. Az x tengelyen a fehér sávok a nappalt, a fekete sáv a sötétet jelöli, 0-24 óra egy fény/sötét ciklus.

(A) *CCA1* (reggeli gén), (B) *TOC1* (esti gén), (C) *GI* (esti gén), (D) *PRR9* (reggeli gén) géneket vizsgáltuk.

A maximális kitérés csökkenése tapasztalható a *CCA1* és *TOC1* gének esetében. Ez arra utal, hogy a vizsgált körülmények között a *LIP1* részt vesz ezen óragének mRNS szintjének szabályozásában.

Episztatikus génkölsönhatások vizsgálata

A következő kísérletsorozatban gének közötti kölcsönhatásokat (episztatikus hatásokat) vizsgáltunk a *LIP1* és központi óragének között, hogy többet tudjunk meg arról, mely órakomponenseken keresztül befolyásolja a *LIP1* a cirkadián óra működését. A vizsgálatokhoz a *CCA1*, *GI*, *TOC1*, *PRR9*, *PRR5* óragéneket választottuk ki és a *cca1-1*, *gi*, *toc1-4*, *prr9-1* és *prr5-1* Columbia-0 háttérű mutánsokat használtuk fel, hogy kétszeres mutánsokat hozzunk létre. A növényeket 12:12 LD cikluson neveltük 7 napig, majd lumineszcencia méréseket végeztünk a *CCR2:LUC* markergént használva (kivéve a *toc1-4* esetében, ahol a *CAB2:LUC* markert használtuk). Különböző monokromatikus fényforrásokat és különböző fényintenzitásokat alkalmaztunk, hogy olyan optimális fénykörülmények között tudjunk vizsgálni, ahol mindkét mutáció fenotípusa megbízhatóan érvényesül.

24. ábra. Jelzőgén kifejeződési mintázata *lip1-2* és óragén kétszeres mutásokban

Anövényeket 12:12 LD cikluson neveltük 7 napig, majd

(A, C) folyamatos vörös fénybe ($16 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

(D, E) folyamatos kék fénybe ($10 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

(B) folyamatos gyenge vörös fénybe ($1 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) helyeztük őket. A markergének működését 4 napig követtük nyomon luminométerrel.

(A, C, D, E) *CCR2:LUC* markergént és (B) *CAB:LUC* markergént használtunk. A *lip1-2* mutációt (A) *cca1-1*, (B) *toc1-4*, (C) *prr5-1*, (D) *prr9-1* és (E) *gi* mutációkkal kombináltuk. A két mutáció által okozott hatás egyedül a *lip1-2 gi* duplamutánsban nem adódott össze, ebből arra következtethetünk, hogy a LIP1 a GI órakomponensen keresztül hat a cirkadián óra működésére.

A *cca1-1* mutáció rövid periódust okoz $35\text{--}40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vörös fényben (Alabadi és mtsai, 2002). A *lip1-2* mutáció okozta periódus rövidülés tudjuk, hogy gyenge vörös fényben erőteljesebb, mint erős vörösben, ezért olyan tartományt kellett választanunk ahol még mindkét mutáció okozta periódus rövidülés megbízhatóan mérhető. A kísérletet $16 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vörös fényben végeztük. A dupla mutáns esetében azt tapasztaltuk, hogy a periódus rövidebb, mint bármelyik egyszeres mutáns esetében, vagyis a két mutáció hatása

összeadódott a kétszeres mutánsban, ami arra enged következtetni, hogy a két mutáció egymástól függetlenül fejti ki hatását (24. ábra A és 9. táblázat). A *prp5-1* mutáció körülbelül 1 órás periódus rövidülést okoz $15 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vörös fényben (Eriksson és mtsai, 2003). A dupla mutáns vizsgálatához ebben az esetben is $16 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vörös fényt alkalmaztunk, és a génkölcsonhatásról ugyanazt a következtetést tudtuk levonni, mint a *cca1-1* esetében (24. ábra C és 9. táblázat).

A *prp9-1* mutánsok vizsgálatakor a vörös fényt nem tudtuk alkalmazni, mert a *prp9* mutáció által okozott hosszú periódusú fenotípus nem tűnt szignifikánsnak ilyen körülmények között. A kétszeres mutánsok vizsgálatára alkalmasabbnak bizonyult $10 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kék fényt használnunk. Ilyen körülmények között a *prp9-1* által okozott enyhén hosszú periódus erőteljesebb, mint vörös fényben (Eriksson és mtsai, 2003), valamint a *lip1-2* rövid periódusa is jól mérhető. A dupla mutáns kombináció esetében köztes fenotípust tapasztaltunk, a periódus hosszabb volt a *lip1-2* mutánsénál viszont rövidebb a *prp9-1* egyszeres mutánsénál (24. ábra D , 9. táblázat). Vagyis a mérések alapján a LIP1 nem ezen a komponensen keresztül hat az órára.

A *toc1-4* mutáns esetében gyenge vörös fényben ($1-10 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) rövid periódust figyeltek meg (Somers és mtsai, 1998b). A mérést $5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vörös fényben végeztük, ahol mind a két mutáció által okozott rövid periódus mérhető. Szerencsésebbnek bizonyult a gyenge fényviszonyok miatt a *CAB2* promótert használnunk kimeneti elemként. A dupla mutánsban mindkét egyszeres mutánsnál rövidebb periódust tapasztaltunk, vagyis a két mutáció hatása összegződött, ami ismételten arra utal, hogy a LIP1 nem ezen az órakomponensen keresztül fejti ki a hatását (24. ábra B és 9. táblázat).

A *gi* mutáns esetében olyan intenzitású kék fényt ($10 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) alkalmaztunk (Martin-Tryon és mtsai, 2007), ahol mérhető volt a *gi* által okozott rövid periódus és amplitudó csökkenés, valamint még a *lip-2* rövid periódusa is. A kétszeres mutánsban a két mutáció által okozott rövid periódus nem adódott össze, a *gi* egyszeres mutánséhoz hasonlított periódus, valamint a *gi* által okozott jellegzetes amplitudó csökkenés is tisztán kivehető volt (24. ábra E és 9. táblázat). Ezen mérések alapján arra következtethetünk, hogy a GI egy olyan órakomponens, amin keresztül a LIP1 befolyással bír a cirkadián órára. Eközött a két gén között episztatikus kölcsönhatás figyelhető meg. Az episztatikus gén a *GI*, amelynek funkcióvesztése nem engedi érvényre jutni a másik gén, a *LIP1* (hiposztatikus gén) hatását a fenotípusban.

Vonal	Periódushossz (óra)	± SEM	Fényviszonyok
Col-0	27.4	0.38	vörös
<i>lip1-2</i>	25.48	0.54	
<i>cca1-1</i>	26.79	0.65	
<i>lip1-2 cca1-1</i>	24.5	0.18	
Col-0	27.76	0.52	gyenge vörös
<i>lip1-2</i>	25.4	0.26	
<i>toc1-4</i>	26.28	0.38	
<i>lip1-2 toc1-4</i>	24.86	0.41	
Col-0	26.27	0.46	vörös
<i>lip1-2</i>	24.3	0.69	
<i>prr5-1</i>	24.6	0.61	
<i>lip1-2 prr5-1</i>	23.5	0.20	
Col-0	26.05	0.66	kék
<i>lip1-2</i>	24.22	0.19	
<i>prr9-1</i>	28.2	0.62	
<i>lip1-2 prr9-1</i>	27.2	0.24	
Col-0	26.71	0.25	kék
<i>lip1-2</i>	23.41	0.29	
<i>gi</i>	24.91	0.23	
<i>lip1-2 gi</i>	24.72	0.51	

9. táblázat. Periódushossz analízise *lip1-2* és óragén kétszeres mutánsokban

A növényeket 12:12 LD ciklusokon neveltük 7 napig, majd lumineszcencia méréseket végeztünk a *CCR2:LUC* markergént használva (kivéve a *toc1-4*, ahol a *CAB2:LUC* markert használtuk), a feltüntetett monokromatikus fényforrásokat használva. A periódushossz értékek jól mutatják, hogy a két mutáció okozta változás a *lip1-2 gi* dupla mutáns esetében nem adódott össze.

További vizsgálatokat is végeztünk a *lip1-2 gi* dupla mutánssal. A fő szempontunk az volt, hogy találunk-e olyat a LIP1 pleiotróp funkciói között, ami összekötő elem lehet a cirkadián órával a GI-n keresztül. Bár az elsődleges eredmények (a kompartmentalizáció szükségessége a cirkadián órában betöltött szerep ellátásához) azt mutatták, hogy a LIP1 a cirkadián és az egyéb funkciók szabályozásában eltérő módon vesz részt. A *lip1-2 gi* dupla mutáns esetében megvizsgáltuk hogyan változik a hipokotil hossza vörös fényben, mivel azt tudjuk, hogy a fotomorfogenezis szabályozásában a cirkadián óra és azon belül a GI is részt vesz (Martin-Tryon és mtsai, 2007). Col-0, *lip1-2*, *gi* és *lip1-2 gi* csíranövényeket különböző intenzitású monokromatikus vörös fényen neveltük 4 napig, majd a növények szik alatti szárának hosszát mértük (25. ábra A). Azt tapasztaltuk, hogy a vártak megfelelően a *gi* mutánsok hipokotilja hosszabb volt, a *lip1-2* mutánsoké pedig rövidebb, mint a vad típusé. A *lip1-2 gi* dupla mutáns esetében a hipokotil hossza a *gi* egyszeres mutánséval egyezett meg. Vagyis ezen fenotípus esetén is a GI episztatikus a LIP1-gyel szemben.

Megvizsgáltuk továbbá a sóstressz tűrési képességét is a *lip1-2 gi* dupla mutánsoknak, mivel sok cirkadián óra komponensről tudott, hogy szerepet játszik különféle stressz-válaszok szabályozásában. Az egyszeres *gi* mutáns esetében azt tapasztaltuk, hogy sótűrő képessége a

vad típuséhoz hasonló. A dupla mutáns esetében pedig a *lip1* mutáció okozta érzékenység nem érvényesült, a sótűrő képessége a vad típuséhoz, illetve az egyszeres *gi* mutánséhoz volt hasonló (25. ábra B).

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A LIP1 pleiotróp funkcióinak vizsgálata

A *lip1-1* mutánst egy mutáns-szűrés során azonosítottuk (Kevei és mtsai, 2007a). A mutáció a szabadon futó periódus rövidülését okozza gyenge intenzitású vörös fényben, valamint a vörös és kék fényre adott fotomorfogenikus válaszok is sérülnek benne. A *lip1-1* és a *lip1-2* mutánsok számos egyéb pleiotróp fenotípussal is rendelkeznek. Munkánk során többek között ezeket a fenotípusokat vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a LIP1-nek fontos szerepe van az endoreduplikáció fény általi gátlásának szabályozásában, valamint az abiotikus stressz tolerálásában.

Az előző fejezetben sok esetben szükséges volt a további kísérletek bevezetéséhez, és a kísérletek értelmezéséhez az egyes alfejezetekben konklúziót levonni. Így ebben a fejezetben a kapott eredmények összefoglalására törekszem, részletesebben tárgyalva azokat a szempontokat amelyekre az eredmények részben nem tértem ki.

A LIP1 az endoreduplikáció szabályozásában fényfüggő módon vesz részt

Korábban kimutatták, hogy a fitokróm A és fitokróm B fotoreceptorok által érzékelt vörös és távoli vörös fény az endoreduplikáció utolsó ciklusát gátolja *Arabidopsis* hipokotil bórszöveti sejtjeiben, azonban a kék fény hatását még nem egyértelmű, hogy melyik fotoreceptor szabályozza (Gendreau és mtsai, 1998). A *lip1* mutáns csíranövényekben a kromatintartalom megnő fehér, vörös és kék fényben, sötétben azonban nem (10. és 11. ábra). Ez arra utal, hogy az endoreduplikáció fény által szabályozott formája szenved zavart a *lip1* mutánsban. A vörös és kék fény által szabályozott ploidia mintázat genetikai analízise a *fitokróm B* és a *kriptokróm 1 2* epiztatikus hatását mutatta ki a *LIP1* felett (11. ábra). Ezek szerint a LIP1 a fitokróm B és a kriptokróm 1-2 által szabályozott útvonalakon keresztül vesz részt az endoreduplikáció vörös és kék fény általi gátlásában. Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/>) és e-FP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) adatok alapján (2012. június) a *LIP1* transzkripciója nem korlátozódik az osztódásban levő sejtekre. Ezért feltételezhető, hogy elsősorban az endoreduplikációs ciklus terminálásában lehet szerepe és nem az endoreduplikációs ciklusba való belépésért felel. Az endociklus terminációs lépéseiről azonban még hiányosak az ismeretek.

A LIP1 fitokróm B és kriptokróm 1-2 függő módon szabályozza a fotomorfogenezist

A *lip1-1* mutáns növényekben a szik alatti szár hossza vörös és kék fényben megváltozik, a távoli vörös fénytől függő jelátviteli út azonban érintetlen. A *lip1* mutáns vörös fényben

tapasztalható fotomorfogenikus fenotípusa a fitokróm B-től, valamint a kék fényben a kriptokróm 1 és kriptokróm 2 fotoreceptoroktól függ.

A magasabb ploidia szinttel rendelkező sejtek általában nagyobbak vagy megnyúltak a normál kromatin mennyiséggel rendelkező sejtekhez képest. Ezért az endoreduplikációnak feltehetőleg szerepe van a szik alatti szár megnyúlásában. A *lip1* mutánsok szik alatti szára rövidebb, mint a vad típusé folyamatos vörös, illetve kék fényben. Ez arra utal, hogy a fotomorfogenikus fenotípust nem az endoreduplikáció gátlásának megszűnése okozza. Mindkét fenotípus megfigyelhető vörös és kék fényben, de távoli vörösben nem, valamint mindkét fenotípus függ a fitokróm B-től és a kriptokróm 1-2-től egyaránt. Ebből arra következtethetünk, hogy a LIP1 a fitokróm B és kriptokróm 1-2 által szabályozott jelátviteli útvonal egy olyan közös pontján helyezkedik el, ahol még a szik alatti szár megnyúlásáért és az endoreduplikációért felelős útvonalak nem váltak szét.

LIP1 fehérje hiányában a növények érzékenysége megnő az ozmotikus stresszel szemben

A *lip1* mutáns növények rosszabbul fejlődnek magas NaCl tartalmú táptalajon, mint a vad típusú növények (13. ábra). Nemcsak a fejlődés, hanem a csírázási képesség (14. ábra) és a gyökér növekedése (15. ábra) is zavart szenved. A *lip1* mutánsban ozmotikus stressz hatására az ABA-függő és -független gének a vad típuséhoz hasonlóan indukálódnak (16. ábra). Ez alapján feltételezhető, hogy a LIP1 hiányában nem a stressz érzékelése, a szignalizációs kaszkád, vagy a jelátviteli utak transzkripciójának aktiválása sérül.

A sóérzékeny fenotípus nem hozható kapcsolatba az endoreduplikációban bekövetkező változásokkal, mivel a mutáns növények olyan körülmények között is érzékenyek sóra (folyamatos sötétben), ahol a ploidia fenotípus nem érvényesül (14. ábra). A sóstressz nem befolyásolta a LIP1 hiányában mérhető periódushossz változást sem (5. táblázat).

A LIP1 szerepe feltehetőleg a cirkadián óra és bizonyos stressz folyamatok közötti kapcsolat biztosítása. A *lip1* mutáns növények általában is fokozott érzékenységet mutatnak a tápközeg magas ion és ozmotikum tartalmára valamint a hőmérséklet stresszre (17. ábra).

Kis GTP-kötő fehérjék szerepe a stressz-válaszokban, a ploidia szint meghatározásában és a sejthalak kialakításában

A hosszan fennálló stresszhatás lassú adaptációs folyamatokat indít be, amik óvják a növényt a károsodástól. Ilyen folyamatok például a sztómanyitás serkentése, valamint ozmolitok, antioxidánsok és másodlagos anyagcseretermékek akkumulálódása. Elképzelhető, hogy a LIP1 szerepe a stressz-válaszokban ezen késői folyamatok valamelyikének a sejtszintű

szabályozása. Egyes kis GTP-kötő fehérjék emlősekben, élesztőben és növényekben is szerepet játszanak a reaktív oxigéngyökök termelődésének szabályozásában (Finkel, 2006), így a LIP1 szerepe sem zárható ki hasonló folyamatokban. Egy ROP típusú kis GTP-kötő fehérje, az OsRAC1, közvetlenül kölcsönhat egy NADPH oxidázzal rizsben, így szabályozva a reaktív oxigéngyökök képződését (Wong és mtsai, 2007). Az OsRAC1, és *Arabidopsis*-ban található homológja a ROP2, egyaránt szerepet játszik biotikus és abiotikus stressz-válaszok, valamint az azokat kísérő apoptózis-szerű sejthalál szabályozásában (Ono és mtsai, 2001; Park és mtsai, 2004). A fokozott stresszérzékenység mellett a *lip1-2* mutánsban is megfigyelhető sejtelhalás, azonban itt csak a sziklevelek bőrszöveti sejteire korlátozódik a fejlődés korai szakaszában (8. ábra), míg az OsRAC1 hiányában az igazi leveleken jelennek meg nekrotikus léziók. Továbbá, a reaktív oxigéngyökök mennyiségének szabályozásában résztvevő kis GTP-ázok többnyire plazmamembrán-kötöttek, a LIP1 azonban a sejtmagban és a citoplazmában is egyaránt jelen van (18. ábra). A fokozott stresszérzékenység, amit a LIP1 hiánya okoz, a sejtmagban lokalizált LIP1 fehérjével is helyreállítható (20. ábra). A ploidia szint változása és a sejtelhalás következtében feltételezhető lenne, hogy a bőrszövet védő funkciója sérül a *lip1* mutánsban, így a sóstressz hatását nem tudja megfelelően kivédeni. Azonban sötétben nevelt *lip1* mutáns növények számottevő ploidia és bőrszöveti sejthalak változás nélkül is érzékenyek tápközeg sótartalmának növekedésére. Mindez arra utal, hogy a sóérzékenységet a *lip1* mutáns esetében nem a sejtelhalás és a ploidia szám változása okozza.

A LIP1 a növényi kis GTP-ázok egy új és még nem teljesen jellemzett alcsaládjába tartozik. Jelenleg az egyetlen kis GTP-kötő fehérje, ami funkcionálisan kapcsolatba hozható a cirkadián óra szabályozásával (Kevei és mtsai, 2007a). Érdekes módon a ROP és a RAB alcsaládok egyes tagjai hasonló funkciókat szabályoznak, mint a LIP1. Például, egyes ROP GTP-ázok (ROP 2, 4 és 6) a bőrszöveti sejtek alakjának kialakításában vesznek részt a kortikális mikrofílamentumok és a mikrotubulus hálózat összerendeződésének és szerveződésének szabályozásán keresztül (Fu és mtsai, 2005; Fu és mtsai, 2009). Egy RAB típusú GTP-áz, az ARA6 a vezikuláris transzport szabályozásában vesz részt az endoszómák és a plazmamembrán között, valamint a sóstressz-tolerancia kialakításában van szerepe (Ebina és mtsai, 2011). Nemrégiben mutatták ki, hogy a ROP8 GTP-áz aktivitását a fitokrómok szabályozzák, és ezáltal a fényszabályozott gyökérnövekedésben van fontos szerepe (Shin és mtsai, 2010). Annak a molekuláris mechanizmusa azonban, ahogyan a kis GTP-kötő fehérjék által szabályozott folyamatok sejtszinten szerveződnek, még ismeretlen.

A *lip1* mutáció okozta fenotípusok komplementálhatósága

A cirkadián óra nem megfelelő működése, azaz a periódus rövidülése sötétben nevelt *lip1* mutáns növényekben is megfigyelhető (Kevei és mtsai, 2007a). Ilyen körülmények között a ploidia szint nem különbözik *lip1* és vad típusú növényekben. Továbbá, a sóérzékenység, a fotomorfogenikus fenotípus és a ploidia számbeli változás olyan körülmények között is megfigyelhető, ahol a mutánsnak nincs cirkadián fenotípusa (például erős vörös vagy fehér fényben) (Kevei és mtsai, 2007a). Ezek a tények arra utalnak, hogy a LIP1 cirkadián funkciója független egyéb funkcióitól. Eszerint a cirkadián óra megváltozott működése nem a stressz, a ploidia vagy a fotomorfogenikus fenotípus következménye. Ezt a következtetést erősítik a komplementációs kísérletek eredményei is. A cirkadián fenotípus helyreállítható LIP1-YFP és LIP1-YFP-NLS fúziós fehérjékkel, azonban LIP1-YFP-NES fúziós fehérjével nem. Ez arra utal, hogy a cirkadián funkció betöltéséhez a LIP1 fehérjének a sejtmagban egy kritikus mennyiség felett kell jelenlennie. A cirkadián fenotípus teljes komplementálása miatt feltehető, hogy a LIP1 az óra működését érintő citoplazmatikus folyamatokat nem szabályozza, de az órafehérjék sejtmagi importját befolyásolhatja. A többi fenotípus egyaránt komplementálható volt LIP1-YFP, LIP1-YFP-NLS és LIP1-YFP-NES fúziós fehérjékkel. Azonban fontos megjegyezni, hogy a NES és NLS motívumok ugyan nagymértékben megváltoztatják a LIP1 fehérje sejten belüli eloszlását, de nem korlátozzák annak jelenlétét kizárólagosan csak a sejtmagra, illetve csak a citoplazmára. Különösképpen igaz ez a NES motívumra, amely például nem gátolja meg a nukleáris importot, de a nukleáris exportot segíti. Ezáltal csökkenti a fúziós fehérje által a sejtmagban töltött időt. Nem zárható ki, hogy nagyon kis mennyiségű sejtmagi LIP1-YFP-NES fúziós fehérje elégséges lehet bizonyos funkciók, mint például az endoreduplikáció szabályozásához. Ez a mennyiség azonban nem elegendő a cirkadián funkció helyreállításához. A sóstressz, a fotomorfogenikus és az endoreduplikációs fenotípus esetében nem jelenthető ki egyértelműen, hogy a LIP1 megfelelő funkciói mely sejtalkotóhoz köthetők.

A LIP1 szerepe a növények fejlődésének korai szakaszában fontos

A LIP1 fontos szerepet tölt be kedvezőtlen körülmények között a csírázás szabályozásában, alacsony fényintenzitás mellett a cirkadián óra beállításában, valamint a fiatal csíranövények morfológiájának kialakításában. Mindezek alapján a LIP1 a csíranövények fejlődésének fontos regulátora. Azonban kizárt, hogy a LIP1 összes funkciója a csíranövény állapotra korlátozódna, mivel kifejeződése a legtöbb szervben kimutatható kifejelett növényben is. Kifejelett *lip1* mutáns növényben a sejtalak és a ploidia fenotípus nem figyelhető meg, ami vagy a fejlődés során eltérő módon szabályozott és funkcionálisan a

LIP1-gyel redundáns fehérjék jelenlétével magyarázható, vagy pedig a fejlődés különböző stádiumaiban jelenlevő eltérő kölcsönható partnerekkel. Azoknak a LIP1-gyel konformációfüggő módon kölcsönható fehérjéknek az azonosítása, melyek a LIP1 aktivitását szabályozzák, vagy éppen a LIP1 által szabályozódnak, kulcsfontosságú lehet a LIP1 különböző szignalizációs utakban betöltött szerepének a megismeréséhez.

A LIP1 és a cirkadián óra kapcsolata

LIP1 deficiens növényekben a *luciferáz* riportergén vizsgálatok a markergénél korábban megfigyelt rövid periódust mutatták. RNS szinten a *CCA1* és *TOC1* esetében a maximális kifejeződésben csökkenést tapasztaltunk a vizsgált körülmények között. Az óragének mutációját a *lip1* mutációval kombinálva sikerült kimutatnunk, hogy a LIP1 és a cirkadián óra között az összekötő elem a GI órakomponens. A GI episztatikus hatása azonban nemcsak a cirkadián fenotípus esetében érvényesül, ugyanígy megfigyelhető a sóérzékeny és a fotomorfogénikus fenotípusok esetében is.

A GI-ről nemrégiben mutatták ki, hogy szerepet játszik a sóstressz-tolerancia kialakításában (Kim és mtsai, 2013). A vizsgált *gi-1* allélt hordozó mutáns toleránsnak bizonyult sóval szemben, ellentétben az általunk vizsgált *gi* vonallal, ami nem mutatta ezt a fenotípust a mi kísérleti rendszerünkben. A GI képes komplexet képezni az SOS2-vel, ami az SOS útvonal egyik komponense, és nélkülözhetetlen a citoplazma megfelelő ionkoncentrációinak fenntartásához és a sóstressz tolerálásához (Zhu, 2002). A komplex gátolja az SOS2 aktivitását stresszmentes körülmények között, azonban sóstressz hatására az SOS2 felszabadul és aktiválja az SOS1 Na^+/H^+ antiportert (Kim és mtsai, 2013). Eredményeik alapján érdemes lenne megvizsgálni, hogy fehérje szinten a LIP1-nek van-e hatása az SOS rendszer komponenseire, esetleg befolyásolja-e a GI-SOS2 komplex kialakulását. Mi az SOS2-t transzkripciós szinten vizsgáltuk *lip1* mutánsban és nem tapasztaltunk változást LIP1 hiányában.

Azt, hogy a LIP1 és a GI között milyen jellegű kapcsolat van, nem tudtuk bizonyítani, a LIP1 nem a transzkripció szintjén van hatással a GI-ra. Viszont a GI pozitívan szabályozza a *TOC1* gén kifejeződését, ami szintén pozitív hatással van a *CCA1* transzkripcióra. Ezért feltételezhető, hogy a *lip1* mutánsban tapasztalt *CCA1* és *TOC1* mRNS szint csökkenés a LIP1 és GI kölcsönhatásának következménye. A *cca1* és a *toc1* mutánsok egyaránt rövid periódust mutatnak (Somers és mtsai, 1998b; Alabadí és mtsai, 2002). Ezek alapján a *lip1* mutánsban tapasztalt rövid periódus lehetséges, hogy a csökkent *CCA1* és *TOC1* szint következménye. Ugyanakkor ennek ellentmond a *CCA1* és *LIP1* vagy *TOC1* és *LIP1* gének közti episztatikus kölcsönhatás hiánya.

KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozatban leírt eredmények alapján az alábbi következtetések vonhatóak le:

1. A *lip1* mutáns növényekben csíranövény stádiumban fényfüggő módon megváltozik a bőrszöveti sejtek alakja és mérete.
2. A *lip1* mutáns növényekben a kromatintartalom megnő fehér, vörös és kék fényben, sötétben azonban nem. Az endoreduplikáció fény által szabályozott fitokróm B és kriptokróm-függő formája szenved zavart a *lip1* mutánsban. A *lip1* mutánsok szik alatti szára rövidebb, mint a vad típusé folyamatos vörös, illetve kék fényben. A *lip1* mutáns vörös fényben tapasztalható fotomorfogenikus fenotípusa főként a fitokróm B-től, valamint a kék fényben a kriptokróm 1 és kriptokróm 2 fotoreceptoroktól függ.
3. A *lip1* mutáns növények rosszabbul fejlődnek só tartalmú táptalajon, mint a vad típusú növények. Nemcsak a fejlődés, hanem a csírázási képesség és a gyökér növekedése is zavart szenved. LIP1 hiányában nem a stressz érzékelése, a szignalizációs kaszkád vagy a jelátviteli utak transzkripciójának aktiválása sérül. A sóérzékeny fenotípus független a cirkadián, a ploidia és a sejtalak fenotípusoktól. A *lip1* mutáns növények fokozott érzékenységet mutatnak a tápközeg CsCl₂, LiCl₂ és mannitol tartalmára, valamint a hőmérséklet stresszre is.
4. A cirkadián fenotípus helyreállítható LIP1-YFP és LIP1-YFP-NLS fúziós fehérjékkel, azonban LIP1-YFP-NES fúziós fehérjével nem. A cirkadián funkció betöltéséhez a LIP1 sejtmagi elhelyezkedésére van szükség.
5. A többi fenotípus (sejtalak, ploidia, hipokotil, stressz) egyaránt komplementálható LIP1-YFP, LIP1-YFP-NLS és LIP1-YFP-NES fúziós fehérjékkel. Ezekben az esetekben nem jelenthető ki egyértelműen, hogy mely sejtalkotóhoz köthető az adott szabályozó szerepük.
6. LIP1 hiányában minden vizsgált kimeneti marker (*CCR2*, *CAB*, *PRR9*, *CCA1*, *LHY*, *GI*) esetében rövid periódus tapasztalható, míg RNS szinten a *CCA1* és *TOC1* kifejeződésében a maximum értékek csökkenése figyelhető meg. A *lip1* mutációt óragén mutációkkal kombinálva vizsgáltuk az episztatikus kölcsönhatás meglétét a gének között a cirkadián fenotípus tekintetében (*prp9*, *prp5*, *cca1*, *toc1*, *gi*). A *GI* gén volt episztatikus a *LIP1* felett, ez a kölcsönhatás további fenotípusok esetében is megfigyelhető volt (hipokotil, stressz).

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapját képező közlemény:

Terecskei K*, Tóth R*, Gyula P, Kevei É, Bindics J, Coupland G, Nagy F, Kozma-Bognár L. 2013. The Circadian Clock-Associated Small GTPase LIGHT INSENSITIVE PERIOD1 Suppresses Light-Controlled Endoreplication and Affects Tolerance to Salt Stress in Arabidopsis. *Plant Physiol* 161(1):278-90.

Egyéb közlemények:

Kredics L*, **Terecskei K***, Antal Z, Szekeres A, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C. 2008. Purification and preliminary characterization of a cold-adapted extracellular proteinase from *Trichoderma atroviride*. *Acta Biol Hung* 59(2):259-68.

Sorokina O, Kapus A, **Terecskei K**, Dixon LE, Kozma-Bognár L, Nagy F, Millar AJ. 2009. A switchable light-input, light-output system modelled and constructed in yeast. *J Biol Eng* 3:15.

Palágyi A*, **Terecskei K***, Ádám É, Kevei É, Kircher S, Mérai Z, Schaefer E, Nagy F, Kozma-Bognár L. 2010. Functional analysis of amino-terminal domains of the photoreceptor phytochrome B. *Plant Physiol* 153(4):1834-45.

Kircher S, **Terecskei K**, Wolf I, Sipos M, Ádám É. 2011. Phytochrome A-specific signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 6(11):1714-9.

* megosztott első szerzők

IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15(1):63-78.
- Adams J, Kelso R, Cooley L. 2000. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* 10(1):17-24.
- Ahn SC, Baek BS, Oh T, Song CS, Chatterjee B. 2000. Rapid mini-scale plasmid isolation for DNA sequencing and restriction mapping. *Biotechniques* 29(3):466-8.
- Alabadí D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA. 2001. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science* 293(5531):880-3.
- Alabadí D, Yanovsky MJ, Más P, Harmer SL, Kay SA. 2002. Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in Arabidopsis. *Curr Biol* 12(9):757-61.
- Aschoff J. 1979. Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 49(3):225-249.
- Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, Schumaker KS, Grillo S, Zhu JK. 2007. SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol* 27(22):7781-90.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 6(7):544-56.
- Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper-Bamnolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E. 2006. The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J* 46(3):462-76.
- Berckmans B, Lammens T, Van Den Daele H, Magyar Z, Bögre L, De Veylder L. 2011. Light-dependent regulation of DEL1 is determined by the antagonistic action of E2Fb and E2Fc. *Plant Physiol* 157(3):1440-51.
- Berken A, Thomas C, Wittinghofer A. 2005. A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* 436(7054):1176-80.
- Boisnard-Lorig C, Colon-Carmona A, Bauch M, Hodge S, Doerner P, Bancharel E, Dumas C, Haseloff J, Berger F. 2001. Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in arabidopsis show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell* 13(3):495-509.
- Booij-James IS, Swegle WM, Edelman M, Mattoo AK. 2002. Phosphorylation of the D1 photosystem II reaction center protein is controlled by an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol* 130(4):2069-75.
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C. 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16 Suppl:S18-31.
- Boudolf V, Barrôco R, Engler JA, Verkest A, Beeckman T, Naudts M, Inzé D, De Veylder L. 2004. B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 16(4):945-55.
- Cao S, Ye M, Jiang S. 2005. Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in Arabidopsis. *Plant Cell Rep* 24(11):683-90.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D. 1999. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284(5415):760-5.
- Castillon A, Shen H, Huq E. 2007. Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* 12(11):514-21.
- Chen ZJ. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci* 15(2):57-71.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275(3):1723-30.

- Churchman ML, Brown ML, Kato N, Kirik V, Hülskamp M, Inzé D, De Veylder L, Walker JD, Zheng Z, Oppenheimer DG, Gwin T, Churchman J, Larkin CJ. 2006. SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18(11):3145-57.
- Ciereszko I, Kleczkowski LA. 2002. Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of *rab18* in *Arabidopsis*: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. *Biochim Biophys Acta* 1579(1):43-9.
- Cloix C, Jenkins GI. 2008. Interaction of the *Arabidopsis* UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin. *Mol Plant* 1(1):118-28.
- Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16(6):735-43.
- Cookson SJ, Granier C. 2006. A dynamic analysis of the shade-induced plasticity in *Arabidopsis thaliana* rosette leaf development reveals new components of the shade-adaptive response. *Ann Bot* 97(3):443-52.
- Covington MF, Harmer SL. 2007. The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 5(8):e222.
- Covington MF, Maloof JN, Straume M, Kay SA, Harmer SL. 2008. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol* 9(8):R130.
- D'Amato. 1964. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia* 17:41-52.
- Daniel X, Sugano S, Tobin EM. 2004. CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):3292-7.
- David KM, Armbruster U, Tama N, Putterill J. 2006. *Arabidopsis* GIGANTEA protein is post-transcriptionally regulated by light and dark. *FEBS Lett* 580(5):1193-7.
- del Pozo JC, Boniotti MB, Gutierrez C. 2002. *Arabidopsis* E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* 14(12):3057-71.
- Demarsy E, Fankhauser C. 2009. Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr Opin Plant Biol* 12(1):69-74.
- Devlin PF, Kay SA. 2000. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12(12):2499-2510.
- Ding Z, Doyle MR, Amasino RM, Davis SJ. 2007a. A complex genetic interaction between *Arabidopsis thaliana* TOC1 and CCA1/LHY in driving the circadian clock and in output regulation. *Genetics* 176(3):1501-10.
- Ding Z, Millar AJ, Davis AM, Davis SJ. 2007b. TIME FOR COFFEE encodes a nuclear regulator in the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Plant Cell* 19(5):1522-36.
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA. 2005. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309(5734):630-3.
- Dong MA, Farré EM, Thomashow MF. 2011. Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (CBF) pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17):7241-6.
- Dowson-Day MJ, Millar AJ. 1999. Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J* 17(1):63-71.
- Doyle MR, Davis SJ, Bastow RM, McWatters HG, Kozma-Bognár L, Nagy F, Millar AJ, Amasino RM. 2002. The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 419(6902):74-7.
- Dunlap JC. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96(2):271-90.

- Ebine K, Fujimoto M, Okatani Y, Nishiyama T, Goh T, Ito E, Dainobu T, Nishitani A, Uemura T, Sato MH, Thordal-Christensen H, Tsutsumi N, Nakano A, Ueda T. 2011. A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat Cell Biol* 13(7):853-9.
- Eimert K, Wang SM, Lue WI, Chen J. 1995. Monogenic Recessive Mutations Causing Both Late Floral Initiation and Excess Starch Accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* 7(10):1703-1712.
- Eriksson ME, Hanano S, Southern MM, Hall A, Millar AJ. 2003. Response regulator homologues have complementary, light-dependent functions in the Arabidopsis circadian clock. *Planta* 218(1):159-62.
- Farré EM, Kay SA. 2007. PRR7 protein levels are regulated by light and the circadian clock in Arabidopsis. *Plant J* 52(3):548-60.
- Favory JJ, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravecz A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ, Steidlitz HK, Nagy F, Ulm R. 2009. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *EMBO J* 28(5):591-601.
- Fehér B, Kozma-Bognár L, Kevei É, Hajdu A, Binkert M, Davis SJ, Schaefer E, Ulm R, Nagy F. 2011. Functional interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE LOCUS 8-controlled UV-B signaling pathways in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 67(1):37-48.
- Finkel T. 2006. Intracellular redox regulation by the family of small GTPases. *Antioxid Redox Signal* 8(9-10):1857-63.
- Fowler SG, Cook D, Thomashow MF. 2005. Low temperature induction of Arabidopsis CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiol* 137(3):961-8.
- Franklin KA, Lerner VS, Whitelam GC. 2005. The signal transducing photoreceptors of plants. *Int J Dev Biol* 49(5-6):653-64.
- Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, Yang Z. 2005. Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120(5):687-700.
- Fu Y, Xu T, Zhu L, Wen M, Yang Z. 2009. A ROP GTPase signaling pathway controls cortical microtubule ordering and cell expansion in Arabidopsis. *Curr Biol* 19(21):1827-32.
- Fujiwara S, Wang L, Han L, Suh SS, Salomé PA, McClung CR, Somers DE. 2008. Post-translational regulation of the Arabidopsis circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *J Biol Chem* 283(34):23073-83.
- Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, Kobayashi M, Hayashi N, Sakakibara H, Mizuno T, Saito K. 2009. Impact of clock-associated Arabidopsis pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(17):7251-6.
- Furuya M, Schaefer E. 1996. Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends Plant Sci* 1(9):301-307.
- Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S. 1991. Systemic Endopolyploidy in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* 96(3):985-9.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280(5369):1564-9.
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Höfte H. 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* 114(1):295-305.
- Gendreau E, Höfte H, Grandjean O, Brown S, Traas J. 1998. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the Arabidopsis thaliana hypocotyl. *Plant J* 13(2):221-30.

- Gérard C, Goldbeter A. 2012. Entrainment of the mammalian cell cycle by the circadian clock: modeling two coupled cellular rhythms. *PLoS Comput Biol* 8(5):e1002516.
- Geyer M, Wittinghofer A. 1997. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7(6):786-92.
- Ghelis T, Dellis O, Jeannette E, Bardat F, Miginiac E, Sotta B. 2000. Absciscic acid plasmalemma perception triggers a calcium influx essential for RAB18 gene expression in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett* 483(1):67-70.
- Gorton HL, Williams WE, Assmann SM. 1993. Circadian Rhythms in Stomatal Responsiveness to Red and Blue Light. *Plant Physiol* 103(2):399-406.
- Green RM, Tobin EM. 1999. Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7):4176-9.
- Green RM, Tingay S, Wang ZY, Tobin EM. 2002. Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* 129(2):576-84.
- Guimil S, Dunand C. 2007. Cell growth and differentiation in *Arabidopsis* epidermal cells. *J Exp Bot* 58(14):3829-40.
- Gutierrez C. 2009. The *Arabidopsis* cell division cycle. *Arabidopsis Book* 7:e0120.
- Hall A, Brown P. 2007. Monitoring circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana* using luciferase reporter genes. *Methods Mol Biol* 362:143-52.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290(5499):2110-3.
- Harmer SL, Kay SA. 2005. Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(7):1926-40.
- Haydon MJ, Bell LJ, Webb AA. 2011. Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *J Exp Bot* 62(7):2333-48.
- Hazen SP, Borevitz JO, Harmon FG, Pruneda-Paz JL, Schultz TF, Yanovsky MJ, Liljegren SJ, Ecker JR, Kay SA. 2005a. Rapid array mapping of circadian clock and developmental mutations in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138(2):990-7.
- Hazen SP, Schultz TF, Pruneda-Paz JL, Borevitz JO, Ecker JR, Kay SA. 2005b. LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(29):10387-92.
- Huang T, Böhlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O. 2005. The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309(5741):1694-6.
- Hülkamp M, Misra S, Jürgens G. 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* 76(3):555-66.
- Huq E, Tepperman JM, Quail PH. 2000. GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17):9789-94.
- Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA. 2005. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* 309(5732):293-7.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-28.
- Ito M, Araki S, Matsunaga S, Itoh T, Nishihama R, Machida Y, Doonan JH, Watanabe A. 2001. G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* 13(8):1891-905.
- Ito S, Nakamichi N, Kiba T, Yamashino T, Mizuno T. 2007. Rhythmic and light-inducible appearance of clock-associated pseudo-response regulator protein PRR9 through programmed degradation in the dark in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 48(11):1644-51.

- Jakoby M, Schnittger A. 2004. Cell cycle and differentiation. *Curr Opin Plant Biol* 7(6):661-9.
- Johnson CH. 1992. Phase Response Curves: What can they tell us about circadian clocks? *Circadian clocks from cell to human*. p. 209-246.
- Jouve L, Gaspar T, Kevers C, Greppin H, Degli Agosti R. 1999. Involvement of indole-3-acetic acid in the circadian growth of the first internode of *Arabidopsis*. *Planta* 209(1):136-42.
- Kant P, Gordon M, Kant S, Zolla G, Davydov O, Heimer YM, Chalifa-Caspi V, Shaked R, Barak S. 2008. Functional-genomics-based identification of genes that regulate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. *Plant Cell Environ* 31(6):697-714.
- Kevei É, Gyula P, Fehér B, Tóth R, Viczián A, Kircher S, Rea D, Dorjgotov D, Schaefer E, Millar, Kozma-Bognár L, Nagy F. 2007a. *Arabidopsis thaliana* circadian clock is regulated by the small GTPase LIP1. *Curr Biol* 17(17):1456-64.
- Kevei É, Schaefer E, Nagy F. 2007b. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *J Exp Bot* 58(12):3113-24.
- Kiba T, Henriques R, Sakakibara H, Chua NH. 2007. Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19(8):2516-30.
- Kidokoro S, Maruyama K, Nakashima K, Imura Y, Narusaka Y, Shinwari ZK, Osakabe Y, Fujita Y, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009. The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151(4):2046-57.
- Kikis EA, Khanna R, Quail PH. 2005. ELF4 is a phytochrome-regulated component of a negative-feedback loop involving the central oscillator components CCA1 and LH1. *Plant J* 44(2):300-13.
- Kim J, Kim Y, Yeom M, Kim JH, Nam HG. 2008. FIONA1 is essential for regulating period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 20(2):307-19.
- Kim JY, Song HR, Taylor BL, Carré IA. 2003. Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LH1. *EMBO J* 22(4):935-44.
- Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG, Somers DE. 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449(7160):356-60.
- Kim WY, Ali Z, Park HJ, Park SJ, Cha JY, Perez-Hormaeche J, Quintero FJ, Shin G, Kim MR, Qiang Z, Ning L, Park HC, Lee SY, Bressan RA, Pardo JM, Bohnert HJ, Yun DJ. 2013. Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 4:1352.
- Kipreos ET, Pagano M. 2000. The F-box protein family. *Genome Biol* 1(5):REVIEWS3002.
- Kondorosi E, Kondorosi A. 2004. Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett* 567(1):152-7.
- Kuno N, Møller SG, Shinomura T, Xu X, Chua NH, Furuya M. 2003. The novel MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(10):2476-88.
- Kurepa J, Smalle J, Van Montagu M, Inzé D. 1998. Oxidative stress tolerance and longevity in *Arabidopsis*: the late-flowering mutant *gigantea* is tolerant to paraquat. *Plant J* 14(6):759-64.
- Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T, Genschik P. 2006. F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* 9(6):631-8.
- Legnaioli T, Cuevas J, Mas P. 2009. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *EMBO J* 28(23):3745-57.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L. 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* 317(1):41-72.
- Lin C. 2002. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 14 Suppl:S207-25.

- Lin C, Shalitin D. 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 54:469-96.
- Liu LJ, Zhang YC, Li QH, Sang Y, Mao J, Lian HL, Wang L, Yang HQ. 2008. COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20(2):292-306.
- Locke JC, Southern MM, Kozma-Bognár L, Hibberd V, Brown PE, Turner MS, Millar AJ. 2005. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol Syst Biol* 1:2005.0013.
- Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T. 2000. Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41(6):791-803.
- Martin-Tryon EL, Kreps JA, Harmer SL. 2007. GIGANTEA acts in blue light signaling and has biochemically separable roles in circadian clock and flowering time regulation. *Plant Physiol* 143(1):473-86.
- Martin-Tryon EL, Harmer SL. 2008. XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER coordinates light signals for proper timing of photomorphogenesis and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20(5):1244-59.
- Más P, Kim WY, Somers DE, Kay SA. 2003. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 426(6966):567-70.
- Más P. 2008. Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends Cell Biol* 18(6):273-81.
- Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. 2003. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* 302(5643):255-9.
- McClung CR. 2006. Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 18(4):792-803.
- McWatters HG, Bastow RM, Hall A, Millar AJ. 2000. The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408(6813):716-20.
- McWatters HG, Kolmos E, Hall A, Doyle MR, Amasino RM, Gyula P, Nagy F, Millar AJ, Davis SJ. 2007. ELF4 is required for oscillatory properties of the circadian clock. *Plant Physiol* 144(1):391-401.
- McWatters HG, Devlin PF. 2011. Timing in plants--a rhythmic arrangement. *FEBS Lett* 585(10):1474-84.
- Messerli G, Partovi Nia V, Trevisan M, Kolbe A, Schauer N, Geigenberger P, Chen J, Davison AC, Fernie AR, Zeeman SC. 2007. Rapid classification of phenotypic mutants of *Arabidopsis* via metabolite fingerprinting. *Plant Physiol* 143(4):1484-92.
- Michael TP, McClung CR. 2003. Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132(2):629-39.
- Mikkelsen MD, Thomashow MF. 2009. A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 60(2):328-39.
- Millar AJ, Short SR, Chua NH, Kay SA. 1992. A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4(9):1075-87.
- Millar AJ, Straume M, Chory J, Chua NH, Kay SA. 1995. The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 267(5201):1163-1166.
- Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, Wright L, Mizoguchi M, Song HR, Carré IA, Coupland G. 2002. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 2(5):629-41.
- Mizoguchi T, Wright L, Fujiwara S, Cremer F, Lee K, Onouchi H, Mouradov A, Fowler S, Kamada H, Putterill J, Coupland G. 2005. Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(8):2255-70.

- Mockler TC, Guo H, Yang H, Duong H, Lin C. 1999. Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* 126(10):2073-82.
- Nagy F, Schaefer E. 2002. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:329-55.
- Nakamichi N, Kita M, Ito S, Yamashino T, Mizuno T. 2005. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 46(5):686-98.
- Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, Saito K, Sakakibara H, Mizuno T. 2009. Transcript profiling of an Arabidopsis PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol* 50(3):447-62.
- Ni Z, Kim ED, Ha M, Lackey E, Liu J, Zhang Y, Sun Q, Chen ZJ. 2009. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* 457(7227):327-31.
- Niinuma K, Someya N, Kimura M, Yamaguchi I, Hamamoto H. 2005. Circadian rhythm of circumnutation in inflorescence stems of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 46(8):1423-7.
- Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN. 2007. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448(7151):358-61.
- Ogura Y, Tokutomi S, Wada M, Kiyosue T. 2008. PAS/LOV proteins: A proposed new class of plant blue light receptor. *Plant Signal Behav* 3(11):966-8.
- Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K. 2001. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2):759-64.
- Paduch M, Jeleń F, Otlewski J. 2001. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* 48(4):829-50.
- Palágyi A, Terecskei K, Ádám E, Kevei É, Kircher S, Mérai Z, Schaefer E, Nagy F, Kozma-Bognár L. 2010. Functional analysis of amino-terminal domains of the photoreceptor phytochrome B. *Plant Physiol* 153(4):1834-45.
- Panda S, Poirier GG, Kay SA. 2002. *tej* defines a role for poly(ADP-ribosyl)ation in establishing period length of the arabidopsis circadian oscillator. *Dev Cell* 3(1):51-61.
- Para A, Farré EM, Imaizumi T, Pruneda-Paz JL, Harmon FG, Kay SA. 2007. PRR3 Is a vascular regulator of TOC1 stability in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* 19(11):3462-73.
- Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, Kim HJ, Kay SA, Nam HG. 1999. Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the Arabidopsis GIGANTEA gene. *Science* 285(5433):1579-82.
- Park J, Gu Y, Lee Y, Yang Z. 2004. Phosphatidic acid induces leaf cell death in Arabidopsis by activating the Rho-related small G protein GTPase-mediated pathway of reactive oxygen species generation. *Plant Physiol* 134(1):129-36.
- Perales M, Portolés S, Más P. 2006. The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the Arabidopsis biological clock. *Plant J* 46(5):849-60.
- Plautz JD, Straume M, Stanewsky R, Jamison CF, Brandes C, Dowse HB, Hall JC, Kay SA. 1997. Quantitative analysis of *Drosophila* period gene transcription in living animals. *Journal of Biological Rhythms* 12(3): 204-217.
- Pope B, Kent HM. 1996. High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* 24(3):536-7.
- Pruneda-Paz JL, Breton G, Para A, Kay SA. 2009. A functional genomics approach reveals CHE as a component of the Arabidopsis circadian clock. *Science* 323(5920):1481-5.

- Radziejwoski A, Vlieghe K, Lammens T, Berckmans B, Maes S, Jansen MA, Knappe C, Albert A, Seidlitz HK, Bahnweg G, Inzé D, De Veylder L. 2011. Atypical E2F activity coordinates PHR1 photolyase gene transcription with endoreduplication onset. *EMBO J* 30(2):355-63.
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J. 1993. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* 5(2):147-57.
- Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M, Chory J. 1994. Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant Physiol* 104(4):1139-1149.
- Rikin A, Dillwith JW, Bergman DK. 1993. Correlation between the Circadian Rhythm of Resistance to Extreme Temperatures and Changes in Fatty Acid Composition in Cotton Seedlings. *Plant Physiol* 101(1):31-36.
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schaefer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R. 2011. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 332(6025):103-6.
- Roenneberg T, Merrow M. 2001. Circadian systems: different levels of complexity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1415):1687-96.
- Roodbarkelari F, Bramsiepe J, Weinl C, Marquardt S, Novák B, Jakoby MJ, Lechner E, Genschik P, Schnittger A. 2010. Cullin 4-ring finger-ligase plays a key role in the control of endoreplication cycles in Arabidopsis trichomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(34):15275-80.
- Sabelli PA, Larkins BA. 2009. The contribution of cell cycle regulation to endosperm development. *Sex Plant Reprod* 22(4):207-19.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 290(3):998-1009.
- Salomé PA, Xie Q, McClung CR. 2008. Circadian timekeeping during early Arabidopsis development. *Plant Physiol* 147(3):1110-25.
- Salter MG, Franklin KA, Whitelam GC. 2003. Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature* 426(6967):680-3.
- Sanchez A, Shin J, Davis SJ. 2011. Abiotic stress and the plant circadian clock. *Plant Signal Behav* 6(2):223-31.
- Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T. 2007. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science* 318(5848):261-5.
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carré IA, Coupland G. 1998. The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93(7):1219-29.
- Schultz TF, Kiyosue T, Yanovsky M, Wada M, Kay SA. 2001. A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Cell* 13(12):2659-70.
- Searle I, Coupland G. 2004. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J* 23(6):1217-22.
- Settleman J. 2005. Intercalating Arabidopsis leaf cells: a jigsaw puzzle of lobes, necks, ROPs, and RICs. *Cell* 120(5):570-2.
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK. 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6896-901.
- Shin DH, Cho MH, Kim TL, Yoo J, Kim JI, Han YJ, Song PS, Jeon JS, Bhoo SH, Hahn TR. 2010. A small GTPase activator protein interacts with cytoplasmic phytochromes in regulating root development. *J Biol Chem* 285(42):32151-9.

- Somers DE, Devlin PF, Kay SA. 1998a. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282(5393):1488-90.
- Somers DE, Webb AA, Pearson M, Kay SA. 1998b. The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125(3):485-94.
- Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay SA. 2000. ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101(3):319-29.
- Staiger D, Allenbach L, Salathia N, Fiechter V, Davis SJ, Millar AJ, Chory J, Fankhauser C. 2003. The *Arabidopsis* SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes Dev* 17(2):256-68.
- Strasser B, Sánchez-Lamas M, Yanovsky MJ, Casal JJ, Cerdán PD. 2010. *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(10):4776-81.
- Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410(6832):1116-20.
- Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, Kawata M. 1992. Small GTP-binding proteins. *Int Rev Cytol* 133:187-230.
- Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven LJ, Dowson-Day MJ, Wang ZY, Tobin EM, Harren FJ, Millar AJ, Van Der Straeten D. 2004. Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136(3):3751-61.
- Tseng TS, Salomé PA, McClung CR, Olszewski NE. 2004. SPINDLY and GIGANTEA interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements. *Plant Cell* 16(6):1550-63.
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. 2004. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303(5660):1003-6.
- Verkest A, Weinl C, Inzé D, De Veylder L, Schnittger A. 2005. Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiol* 139(3):1099-106.
- Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. 2003. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131(3):1191-208.
- Vetter IR, Wittinghofer A. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294(5545):1299-304.
- Wang ZY, Tobin EM. 1998. Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93(7):1207-17.
- Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, DePamphilis CW, Ma H. 2004. Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* 135(2):1084-99.
- Wang J, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Chen ZJ. 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics* 172(1):507-17.
- Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierc J, Samach A, Coupland G. 2006. CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18(11):2971-84.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118(Pt 5):843-6.
- Wildermuth MC. 2010. Modulation of host nuclear ploidy: a common plant biotroph mechanism. *Curr Opin Plant Biol* 13(4):449-58.
- Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K, Tabata R, Yaeno T, Hasegawa K, Kojima C, Yoshioka H, Iba K, Kawasaki T, Shimamoto K. 2007. Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* 19(12):4022-34.

- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14 Suppl:S165-83.
- Yakir E, Hilman D, Harir Y, Green RM. 2007. Regulation of output from the plant circadian clock. *FEBS J* 274(2):335-45.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 236(2-3):331-40.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6(2):251-64.
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S, Li Z, Xiaohui D, Jingchu L, Xing-Wang, Zhangliang C, Hongya G, Li-Jia Q. 2006. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* 60(1):107-24.
- Yanovsky MJ, Mazzella MA, Casal JJ. 2000a. A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr Biol* 10(16):1013-5.
- Yanovsky MJ, Whitelam GC, Casal JJ. 2000b. *fhy3-1* retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiol* 123(1):235-42.
- Yu JW, Rubio V, Lee NY, Bai S, Lee SY, Kim SS, Liu L, Zhang Y, Irigoyen ML, Sullivan, Zhang Y, Lee I, Xie Q, Paek NC, Deng XW. 2008. COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Mol Cell* 32(5):617-30.
- Yu X, Klejnot J, Zhao X, Shalitin D, Maymon M, Yang H, Lee J, Liu X, Lopez J, Lin C. 2007. *Arabidopsis* cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell* 19(10):3146-56.
- Zeilinger MN, Farré EM, Taylor SR, Kay SA, Doyle FJ. 2006. A novel computational model of the circadian clock in *Arabidopsis* that incorporates PRR7 and PRR9. *Mol Syst Biol* 2:58.
- Zhang X, Chen Y, Wang ZY, Chen Z, Gu H, Qu LJ. 2007. Constitutive expression of CIR1 (RVE2) affects several circadian-regulated processes and seed germination in *Arabidopsis*. *Plant J* 51(3):512-25.
- Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247-73.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során egy kis GTP-kötő fehérjét, a LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1-et (LIP1) vizsgáltuk. A LIP1 szerepet játszik a cirkadián óra és a fotomorfogenikus folyamatok szabályozásában, az endoreduplikáció befolyásolásában és bizonyos stressz folyamatokban is. A LIP1 negatív szerepet tölt be a cirkadián óra periódusának szabályozásában és fényintenzitás függő módon képes szabályozni azt. A mutánsban a kék és vörös fényre adott fotomorfogenikus válaszok is megváltoznak. A LIP1 szerepet játszik a vörös és kék fény általi hipokotil megnyúlás gátlásában, azonban a távoli-vörös fény által szabályozott folyamatban nincs szerepe. A *lip1* mutáns növények szik alatti szára rövidebb, mint a vad típusé olyan nagy intenzitású vörös és kék fényben is, ahol a cirkadián fenotípus már nem figyelhető meg. A LIP1 nagyfokú hasonlóságot mutat a kis GTP-kötő fehérjékkel (Vernoud és mtsai, 2003). A LIP1 fehérjében több olyan motívum is található, ami a klasszikus kis GTP-kötő fehérjékre nem jellemző és több konzervált aminosavban is eltéréseket mutat. A LIP1 a növényi kis GTP-ázok egy új és még nem teljesen jellemzett alcsaládjába tartozik. Jelenleg az egyetlen kis GTP-kötő fehérje, ami funkcionálisan kapcsolatba hozható a cirkadián óra szabályozásával. A cirkadián óra részletes tanulmányozása során egyre több órakomponensről és óra kapcsolt elemről derül ki, hogy pleiotróp funkciókkal rendelkeznek, és fontos szerepük van a sejtek legkülönbözőbb folyamatainak szabályozásában.

A *lip1* mutáns növényekben csíranövény stádiumban fényfüggő módon megváltozik a bórszöveti sejtek alakja és mérete. A fényen nevelt *lip1-1* és *lip1-2* mutáns csíranövények bórszöveti sejtjeinek alakja jellegzetes módon eltér a vad típusétól, nem alakul ki a vad típusra jellemző, karéjos sejtalak. Etiolált növények esetében különbség nem figyelhető meg. A *lip1* mutáns csíranövények sziklelevelében a kromatintartalom megnő fehér, vörös és kék fényben, sötétben azonban nem. Ez arra utal, hogy az endoreduplikáció fény által szabályozott formája szenved zavart a *lip1* mutánsban. Kifejlett *lip1* mutáns növényben a sejtalak és a ploidia fenotípus sem figyelhető meg. Hipokotil és teljes növény tartalmú mintákat is vizsgáltunk az örökítőanyag mennyiségét tekintve. A ploidia mintázat ezekben a mintákban nagyon hasonlított a sziklevel esetében tapasztaltra, ami arra utal, hogy a LIP1 által okozott endoreduplikációs változás nem szövet specifikus.

lip1 és fotoreceptor többszörös mutánsokat hoztunk létre és mértük a DNS tartalmat a csíranövényekben. A vörös és kék fény által szabályozott ploidia mintázat genetikai analízise a *fitokróm B* és a *kriptokróm 1-2* episztatikus hatását mutatta ki a *LIP1* felett. Ezek szerint a LIP1 a fitokróm B és a kriptokróm 1-2 által szabályozott útvonalakon keresztül vesz részt az endoreduplikáció vörös és kék fény-általi gátlásában.

A *lip1-1* mutáns növényekben a hipokotil hossza vörös és kék fényben megváltozik, a távoli vörös fény függő jelátviteli út azonban érintetlen. A *lip1* és fotoreceptor kétszeres mutánsokat vizsgálva kimutattuk, hogy a *lip1* mutáns vörös fényben tapasztalható fotomorfenikus fenotípusa részben a fitokróm B-től, valamint kék fényben a kriptokróm fotoreceptoroktól függ.

A magasabb ploidia szinttel rendelkező sejtek általában nagyobbak vagy megnyúltak a normál kromatin mennyiséggel rendelkező sejtekhez képest. Ezért az endoreduplikációnak feltehetőleg szerepe van a szik alatti szár megnyúlásában. A *lip1* mutánsok szik alatti szárai rövidebb, mint a vad típusé folyamatos vörös, illetve kék fényben. Ez arra utal, hogy a fotomorfenikus fenotípust nem az endoreduplikáció gátlásának megszűnése okozza. Mindkét fenotípus megfigyelhető vörös és kék fényben, de távoli vörösben nem, valamint mindkét fenotípus függ a fitokróm B-től és a kriptokróm 1-2-től egyaránt. Ebből arra következtethetünk, hogy a LIP1 a fitokróm B és kriptokróm 1-2 által szabályozott jelátviteli útvonal egy olyan közös pontján helyezkedik el, ahol még a hipokotil megnyúlásáért és az endoreduplikációért felelős útvonalak nem váltak szét.

A *lip1* mutáns növények rosszabbul fejlődnek magas NaCl tartalmú táptalajon, mint a vad típusú növények. A csírázási képesség és a gyökér növekedése is zavart szenved. A csírázási képességet vizsgáltuk fény/sötét cikluson és folyamatos sötétben nevelt növényekben is. A *lip1-2* mutánsok mindkét esetben érzékenyebbek voltak a vad típusnál a tápközeg magas sókoncentrációjára, utalva ezzel arra, hogy a sóérzékenység nem egy fényfüggő zavar következménye (mint például a ploidia szint változásáé).

Az ozmotikus stressz korai stresszválasz gének indukciójához vezet, ilyenek az *RD29A* (*RESPONSIVE TO DESICCATION 29A*), *RD29B* és a *RAB18* (*RESPONSIVE TO ABA 18*). Az ionikus stressz (emelkedett Na^+ koncentráció a sejten belül) pedig az *SOS2* (*SALT OVERLY SENSITIVE 2*) indukcióját idézi elő, ami egy Na^+/H^+ antiporter, az *SOS1* aktivátora (Batelli és mtsai, 2007). A *lip1* mutánsban ozmotikus stressz hatására az ABA függő és független gének indukciós kinetikája vad típuséhoz hasonló, ez alapján feltételezhető, hogy a LIP1 hiányában nem a stressz érzékelése, a szignalizációs kaszkád vagy a jelátviteli utak transzkripciójának aktiválása sérül. A *lip1* mutáns növények fokozott érzékenységet mutatnak további ionikus (Cs^{2+} , K^+ , Li^{2+}) és ozmotikus stresszre, valamint a hőmérséklet stresszre is.

A sóérzékeny fenotípus nem hozható kapcsolatba az endoreduplikációban bekövetkező változásokkal, mivel a mutáns növények olyan körülmények között is érzékenyek sóra (folyamatos sötétben), ahol a ploidia fenotípus nem érvényesül. A só stressz nem befolyásolta a cirkadián óra LIP1 hiányában tapasztalható megváltozott működését sem.

A cirkadián óra nem megfelelő működése, vagyis a periódus rövidülése sötétben nevelt *lip1* mutáns növényekben is megfigyelhető (Kevei és mtsai, 2007). Ilyen körülmények között a ploidia szint nem különbözik *lip1* és vad típusú növényekben. Továbbá, a sóérzékenység, a fotomorfenikus fenotípus és a ploidia számbeli változás olyan körülmények között is megfigyelhető, ahol a mutánsnak nincs cirkadián fenotípusa (például erős fehér fényben) (Kevei és mtsai, 2007). Ezek a tények arra utalnak, hogy a *lip1* mutánsokban a cirkadián óra megváltozott működése nem a stressz, a ploidia vagy a fotomorfenikus fenotípus következménye.

A LIP1 fehérje a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt jelen van. Felmerült a kérdés, hogy a fent említett pleiotróp fenotípusok köthetők-e a fehérje sejten belüli elhelyezkedéshez, ezért olyan növényeket állítottunk elő, amelyek a *lip1-2* mutáns háttérben YFP-LIP1 fúziós fehérjét fejeznek ki nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) illetve nukleáris export szignállal (NES) ellátva. A cirkadián fenotípus helyreállítható LIP1-YFP és LIP1-YFP-NLS fúziós fehérjékkel, azonban LIP1-YFP-NES fúziós fehérjével nem, ami arra utal, hogy a cirkadián funkció betöltéséhez a LIP1 fehérjének a sejtmagban egy kritikus mennyiség felett kell jelen lennie. A többi fenotípus (sejtalak, ploidia, hipokotil, stressz) egyaránt komplementálható volt mindhárom fúziós fehérjével. Ezekben az esetekben nem jelenthető ki egyértelműen, hogy mely sejtalkotóhoz köthető a funkció.

A LIP1 fontos szerepet tölt be kedvezőtlen körülmények között a csírázás szabályozásában, alacsony fényintenzitás mellett a cirkadián óra beállításában, valamint a fiatal csíranövények morfológiájának kialakításában. Mindezek alapján a LIP1 a csíranövények fejlődésének fontos regulátora. Azonban kizárt, hogy a LIP1 összes funkciója a csíranövény állapotra korlátozódna, mivel kifejeződése a legtöbb szervben kimutatható idősebb növényben is. Kifejlett *lip1* mutáns növényben a sejtalak és a ploidia fenotípus nem figyelhető meg, ami vagy a fejlődés során eltérő módon szabályozott és funkcionálisan a LIP1-gyel redundáns fehérjék jelenlétével magyarázható, vagy pedig a fejlődés különböző stádiumaiban jelenlevő eltérő kölcsönható partnerekkel. Azoknak a LIP1-gyel konformáció-függő módon kölcsönható fehérjéknek az azonosítása, melyek a LIP1 aktivitását szabályozzák, vagy éppen a LIP1 által szabályozódnak, kulcsfontosságú lehet a LIP1 különböző szignalizációs utakban betöltött szerepének a megismeréséhez.

RNS szinten a *CCA1* és *TOC1* esetében a maximális kifejeződésében csökkenést tapasztaltunk fény/sötét cikluson nevelt növényekben. A kifejeződés mintázata nem változott számottevően a *GI* és a *PRR9* gének esetében a mutánsban a vad típushoz képest. A *lip1* mutáció a fentiek alapján negatív hatással lehet a *TOC1* transzkripciójára, ami viszont a

CCA1 transzkripciót serkentené, ez magyarázza, hogy a *lip1-2* mutánsban mindkettő csökkent kifejeződést mutat.

Az óragének mutációját (*CCA1*, *GI*, *TOC1*, *PRR9*, *PRR5*) a *lip1* mutációval kombinálva sikerült kimutatnunk, hogy a *LIP1* és a cirkadián óra között az összekötő elem a *GI* órakomponens. A *GI* episztatikus hatása nemcsak a cirkadián fenotípus esetében érvényesül, megfigyelhető a sóérzékeny és a fotomorfogenikus fenotípusok esetében is.

A *GI*-ről nemrégiben mutatták ki, hogy szerepet játszik a sóstressz-tolerancia kialakításában (Kim és mtsai, 2013). A vizsgált *gi-1* allélt hordozó mutáns toleránsnak bizonyult sóval szemben. A *GI* képes komplexet képezni az *SOS2*-vel, ami az *SOS* útvonal egyik komponense, és nélkülözhetetlen a citoplazma megfelelő ion-koncentrációinak fenntartásához és a sóstressz tolerálásához (Zhu, 2002). A komplex gátolja az *SOS2* aktivitását stresszmentes körülmények között, azonban sóstressz hatására az *SOS2* felszabadul és aktiválja az *SOS1* Na^+/H^+ antiportert (Kim és mtsai, 2013). Eredményeik alapján érdemes lenne megvizsgálni, hogy fehérje szinten a *LIP1*-nek van-e hatása az *SOS* rendszer komponenseire, esetleg befolyásolja-e a *GI*-*SOS2* komplex kialakulását. Mi az *SOS2*-t transzkripciós szinten vizsgáltuk *lip1* mutánsban és nem tapasztaltunk változást *LIP1* hiányában.

A *LIP1* nem transzkripció szintjén van hatással a *GI*-re. A *GI* pozitívan szabályozza a *TOC1* transzkripcióját, ami szintén pozitív hatással van a *CCA1* transzkripcióra. Ezért feltételezhető, hogy a *lip1* mutánsban tapasztalt *CCA1* és *TOC1* mRNS szint csökkenés a *LIP1* és *GI* kölcsönhatásának következménye. A *cca1* és a *toc1* mutánsok egyaránt rövid periódust mutatnak (Alabadí és mtsai, 2002; Somers és mtsai, 1998). Ezek alapján a *lip1* mutánsban tapasztalt rövid periódus lehetséges, hogy a csökkent *CCA1* és *TOC1* szint következménye, bár ennek ellentmond a *CCA1* és *LIP1* vagy *TOC1* és *LIP1* gének közti episztatikus kölcsönhatás hiánya.

SUMMARY

Introduction

The optimal growth and development of plants are mediated by various signaling pathways that enable plants to modulate their molecular and physiological reactions in response to changes of the environment. To monitor changes in ambient light conditions, plants evolved several families of photoreceptors. The red/far-red light-absorbing phytochromes (PhyA–PhyE) and the blue light-absorbing cryptochromes (CRY1 and CRY2) are considered to mediate the majority of physiological and developmental responses to visible light. These photoreceptors also play an essential role in entraining/synchronizing the circadian clock to the daily light/dark cycles (Devlin and Kay, 2000). Circadian clocks are biochemical timers regulating many physiological and molecular processes according to the day/night cycle. The central clockwork generates the primary oscillation in the expression of clock components with a period of about 24 h.

The rhythm generating module of the *Arabidopsis thaliana* clock consists of at least three interconnected feedback loops (McWatters and Devlin, 2011). The “central loop” functions through the reciprocal regulation between the *CCA1*, *LHY* and *TOC1* genes (Alabadi et al., 2001). The morning-expressed *CCA1/LHY* Myb transcription factors repress the *TOC1* gene; conversely, the evening-expressed *TOC1* positively regulates the transcription of *CCA1/LHY*. The “evening loop” is formed by *TOC1* and a hypothetical factor *Y*, both expressed in the evening. *Y* positively regulates *TOC1*, whereas *TOC1* represses *Y* transcription, which is also inhibited by *CCA1/LHY*. *TOC1* promotes *CCA1/LHY* transcription via another hypothetical component; *X*. *GI* (a nuclear protein with unknown biochemical function) is an essential contributor to *Y* function (Locke et al., 2005; Zeilinger et al., 2006). The “morning loop” is formed by *CCA/LHY* and *PRR7/9* (Makino et al., 2000). *CCA1/LHY* activates *PRR7/9* expression in the morning; conversely, *PRR7/9* inhibit *CCA1/LHY* during the rest of the day.

Circadian regulation is clearly overrepresented among the genes that are implicated in light, hormonal, or stress signaling, suggesting a molecular basis for the temporal modulation of these pathways (Covington et al., 2008). Adaptation to the changing environment also requires plasticity of the developmental program both at the organism and cell levels.

Previously, we identified the small GTPase LIGHT INSENSITIVE PERIOD1 (*LIP1*) as a circadian clock associated factor in *Arabidopsis* (Kevei et al., 2007). Loss of *LIP1* function in the *lip1-1* mutant severely reduced the effect of light on the shortening of freerunning period.

Results

Loss of function of LIP1 protein causes altered cell shape

Microscopic analysis of young *lip1-1* and *lip1-2* mutant seedlings (Kevei et al., 2007) revealed defects in cell development. In wild-type *Arabidopsis* plants, pavement cells have a characteristic jigsaw puzzle shape with lobes, whereas in *lip1-1* and *lip1-2* mutants the cell shape is more rounded and much less complex. Pavement cells in the first true leaves of *lip1-1* and *lip1-2* mutants had wild-type morphology.

LIP1 affects ploidy levels at the seedling stage

The alteration of cell morphology is frequently linked with changes in nuclear DNA content (Guimil and Dunand, 2007). Therefore, we analyzed ploidy patterns in the cotyledons of *lip1* mutants by flow cytometry and found that the proportion of nuclei having high DNA content was increased in the mutants. Ploidy patterns in isolated hypocotyls of the *lip1-2* mutant showed the same tendency as in the cotyledons, demonstrating that in the seedling stage the effect of LIP1 on endoreplication is not organ specific. Ploidy patterns in the matured first leaves of *lip1-2* and wild-type plants were not significantly different suggesting that LIP1 suppresses ploidy levels in a developmentally regulated manner.

Light-dependent inhibition of endoreplication by LIP1

Four cycles of endoreplication could occur in dark grown *Arabidopsis* seedlings, whereas the fourth cycle is inhibited in light (Gendreau et al., 1998). We analyzed ploidy patterns in *lip1* mutants grown under different light conditions. Elevated ploidy level was detected in *lip1* seedlings grown under light/dark cycles and the DNA content increased further when plants were grown in continuous white light. Ploidy levels were identical in etiolated *lip1* and wild-type seedlings. In red light, the light-induced inhibition of endoreplication depends on the photoreceptor PhyB (Gendreau et al., 1998). We tested the epistatic relation between LIP1 and PhyB in controlling red light-dependent endoreplication. In continuous red light (cR), both *lip1-2* and *phyB-9* mutants showed similarly increased ratios of 16C and 32C nuclei. The *lip1-2 phyB-9* double mutant phenocopied the *phyB-9* single mutant in cR. The DNA content of these mutants grown in darkness displayed patterns like in wild-type seedlings. Ploidy level of *lip1-2* mutant showed significant increases in cB, but it was indistinguishable from the wild type in cFR. The mutation in the *LIP1* gene was combined with the *cry1 cry2* and *PhyA-211* mutations. In cB, the ploidy pattern of the *lip1-2 cry1 cry2* triple mutant was most similar to that of the *cry1 cry2* double mutant. In cFR, the *lip1-2 phyA-211* double mutant phenocopied the *phyA-211* single mutant.

The function of LIP1 in controlling photomorphogenesis depends on PhyB, CRY1, and CRY2 but is independent of PhyA

It had been demonstrated that *lip1-1* mutants show elevated photomorphogenic responses to red and blue light but not to far-red light (Kevei et al., 2007). We characterized the responsiveness of *lip1-2 phyB-9*, *lip1-2 phyA-211*, and *lip1-2 cry1 cry2* multiple mutants to red, far-red, and blue light, respectively. In cR, the *lip1-2* mutant showed significantly shorter hypocotyls than the wild type; however, the *lip1-2 phyB-9* double mutant produced hypocotyls much longer than the wild type and was very similar to that of the *phyB-9* single mutant. In cB, the *lip1-2* mutant displayed significant hypersensitivity compared with the wild-type, but *lip1-2 cry1 cry2* produced long hypocotyls similar to the *cry1 cry2* double mutant. In cFR, *lip1-2* phenocopied wild-type plants, and the *lip1-2 phyA-211* double mutant showed hypocotyl lengths identical to those of the *phyA-211* mutant.

***lip1* mutants are hypersensitive to stress**

lip1 mutants grown under 12-h-light/12-h-dark cycles displayed an increased sensitivity to salt (NaCl). In addition to poor growth and development, the germination rate of *lip1-2* seedlings was also significantly reduced and the relative inhibition of root growth was significantly stronger in the *lip1* mutants under salt stress conditions as compared to the wild type. We have also analyzed germination rate in dark-grown plants. *lip1-2* mutants were more sensitive than wild-type plants, indicating that the salt stress phenotype is not caused by other light-dependent defects of *lip*. We tested the effect of salt stress on the clock function in *lip1* mutants. There was no observable connection between the hypersensitivity to salt and the defect of the clock function.

Osmotic stress leads to the induction of early stress inducible genes like *RESPONSIVE TO DESICCATION29 A (RD29A)*, *RD29B*, or *RESPONSIVE TO ABA 18 (RAB18)*, whereas ionic stress induces the transcription of *SOS2 (SALT OVERLY SENSITIVE2)*, an activator of the Na^+/H^+ transporter *SOS1*. Salt-induced expression of *RD29A*, *RD29B*, *RAB18*, and *SOS2* genes was monitored by quantitative reverse transcription (qRT)-PCR. There were no significant differences in the kinetics or the level of induction of these genes in the mutant. These results indicate that LIP1 plays a minor role, if any, in sensing salt stress signals and the transcriptional activation of the salt stress related genes tested.

The *lip1* mutants grown under 12-h-light/12-h-dark cycles displayed an increased sensitivity to K^+ , Cs^{2+} , Li^{2+} and heat stress as well. These data indicate that LIP1 has a more general role in the regulation of responses to abiotic stress conditions.

Subcellular localization of LIP1

We showed previously that the yellow fluorescent protein YFP-LIP1 fusion protein is detectable both in the cytosol and in the nucleus and that this distribution pattern is not affected by light conditions or the circadian clock (Kevei et al., 2007). To test if any of the pleiotropic functions of LIP1 require specific subcellular localization, we generated transgenic *lip1* plants expressing the LIP1-YFP fusion protein with or without nuclear localization signal (NLS) or nuclear export signal (NES). Transgenic lines with comparable expression levels were selected and localization of the different LIP1 fusion proteins was analyzed by fluorescence microscopy. As expected, YFP-LIP1 was detectable both in the cytoplasm and in the nuclei, whereas YFP-LIP1-NLS and YFP-LIP1-NES were clearly restricted to the nucleus and the cytoplasm.

Nuclear localization of LIP1 is essential for its circadian function

Complementation of the poidy, salt stress, photomorphogenic, and circadian phenotypes of the *lip1* mutants was tested in the selected transgenic lines. Expression of YFP-LIP1, YFP-LIP1-NLS, or YFP-LIP1-NES in the *lip1* mutant background restored poidy levels to the wildtype level. The jigsaw shape of cotyledon pavement cells was also restored in all complemented lines. Furthermore, *lip1-2* plants expressing either of the LIP1 fusion proteins were able to tolerate 100 mM NaCl and develop similarly to wildtype plants. Hypocotyl lengths of either of the complemented lines grown in red, blue, or far-red light were also indistinguishable from that of the wild type. The expression of YFP-LIP1 or YFP-LIP1-NLS restored wild-type circadian rhythms, whereas YFP-LIP1-NES-expressing transgenic *lip1-2* seedlings displayed rhythms very similar to that of *lip1-2*. Period estimates quantitatively demonstrated full complementation or the complete lack of complementation as indicated. We conclude that for the regulation of the circadian clock, a significant portion of LIP1 needs to be present in the nucleus. These observations suggest that the function of LIP1 in the circadian clock can be separated from its role in the control of cell development, endoreplication, stress tolerance, and photomorphogenesis.

Integrating LIP1 into the plant circadian network

The lack of LIP1 causes short period phenotype with all tested output marker genes (*CCR2*, *CAB*, *PRR9*, *CCA1*, *LHY*, *GI*), proving its importance in the plant circadian network. We measured the mRNA of core clock components in *lip1* mutants grown under 12-h-light/12-h-dark cycles and found that the peak level of *CCA1* and *TOC1* mRNA decreased significantly compared to the wild type. Examination of genetic interactions between *LIP1*

and *TOC1*, *CCA1*, *PRR5*, *PRR9* and *GI* genes via double mutant analysis revealed that *GI* is a clock component mediating *LIP1* action. *GI* has epistatic effect on *LIP1*, regarding the circadian, photomorphogenic and the stress phenotype as well. The relation between *GI* and *LIP1* is probably responsible for the decrease in the mRNA levels of *CCA1* and *TOC1*, based on the positive transcriptional regulation between *GI* and *TOC1* and between *TOC1* and *CCA1*. *cca1* and *toc1* mutants have short period phenotype. The decrease in *CCA1* and *TOC1* level can contribute to the short period phenotype of the *lip1* mutant in part.

Conclusions

In this work, we provide physiological and molecular data demonstrating the following remarks:

1. *LIP1* is required for the normal development of pavement cells in young seedlings.
2. *LIP1* is a component of the *PhyB*-controlled red light and *CRY*-controlled blue light signaling cascade inhibiting endoreplication and *LIP1* is involved in mediating *PhyB*- and *CRY*-controlled photomorphogenesis.
3. *LIP1* function is required for stress tolerance.
4. By manipulating the subcellular localization of *LIP1*, we show that the circadian function of *LIP1* can be separated from its other functions, not only at the physiological level but also at the cellular level. Nuclear localised *LIP1* is required for proper clock function.
5. The cell shape, ploidy, hypocotil and stress phenotype could be complemented with *LIP1*-YFP, *LIP1*-YFP-NLS and *LIP1*-YFP-NES fusion constructs as well.
6. The lack of *LIP1* causes short period phenotype of all tested output marker genes (*CCR2*, *CAB*, *PRR9*, *CCA1*, *LHY*, *GI*). At the mRNA level, we could observe decrease in the maximum level of the *CCA1* and *TOC1* expression. Examination of *clock gene/lip1* double mutants showed that *gi* mutation has epistatic effect above *lip1* mutation regarding the circadian, hypocotil and stress phenotype as well.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban szereplő kísérleteket a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetében, a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjaként végeztem.

Köszönettel tartozom csoportvezetőmnek, Dr. Nagy Ferencnek és témavezetőmnek, Dr. Kozma-Bognár Lászlónak jelentős anyagi és szellemi támogatásukért. Valamint köszönöm a Foto- és Kronobiológiai Csoport minden tagjának a munkám iránt tanúsított érdeklődésüket. Köszönöm Dr. Dudits Dénes volt-, Dr. Ormos Pál jelenlegi főigazgató és Dr. Vass Imre igazgató uraknak, hogy munkámat lehetővé tették.

Köszönöm Dr. Gyula Péternek és Kozma-Bognárné Hajdu Anitának a szakmai segítséget a munkám kezdeti időszakában. Köszönöm Dr. Tóth Rékának az endoreduplikációs vizsgálatokhoz szükséges kísérletek elvégzését.

Köszönöm Jószai Katalin és Veres Gabriella asszisztenseknek a kísérletek előkészítésében nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Fehér Balázsnak dolgozatom írása során hasznos tanácsait és észrevételeit.