

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS

A növényi cirkadián óra szerepének vizsgálata**a fotoreceptor gének kifejeződésének szabályozásában**

2.1 Cirkadián rendszerek

2.1.2 A cirkadián rendszerek tulajdonságai

2.1.3 A cirkadián órák fő komponensei

2.1.4 Az Arabidopsis cirkadián rendszere

doktori értekezés

2.1.5 A cirkadián óra szervezeti szintjei

2.2 Növényi fotoreceptorok

2.2.1 Arabidopsis fitokrómok

2.2.2 Arabidopsis kriptokrómok

Tóth Réka

2.2.3 A fotoreceptorok szövet- és sejtspecifikus kifejeződése

2.2.4 A fényreceptorok

Témavezető: Dr. Nagy Ferenc

2.2.5 A fitokrómok és kriptokrómok a cirkadián óra input elemei

2.2.6 A fényreceptorok mennyiségének és aktivitásának szabályozása

3. KÖZVETLEN ELŐZMÉNYEK, CÉLKITŰZÉSEK

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti anyagok, organizmusok

4.2. Molekuláris biológiai módszerek

4.3. Transzgenikus növények előállításának módszerei

4.4. *In vivo* hisztidin enzimaktivitás meghatározása

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

5. EREDMÉNYEK

5.1. Szövet- és sejtspecifikus kifejeződés

Növénybiológiai Intézet

5.2. Fotoreceptor promotorok

Foto-és Kronobiológiai Csoport

5.3. Fotoreceptorok promotorjainak cirkadián szabályozása

5.4. A fitokrómok és kriptokrómok mRNA molekuláinak cirkadián jellegű akkumulációja

5.5. A *PHYA* gén három különböző méretű mRNA molekulájának cirkadián ritmusa5.6. A *PHYA* transzkripció ritmicitásának és *PHYA* gén-kifejeződésének intenzitásának vizsgálata5.7. A *PHYA* és a *CAB2* gének kifejeződése levágott leveleiben5.8. A sebzés és kalluszosodás hatása a *PHYA* kifejeződésre

Szeged

2003

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1 Cirkadián rendszerek	8
2.1.1 A cirkadián ritmusok jellemző paraméterei	8
2.1.2 A cirkadián rendszerek tulajdonságai	9
2.1.3 A cirkadián órák fő komponensei.....	10
2.1.4 Az Arabidopsis cirkadián rendszere	13
2.1.5 A cirkadián óra szervezet szintű szabályozása	19
2.2 Növényi fotoreceptorok	20
2.2.1 Arabidopsis fitokrómok.....	21
2.2.2 Arabidopsis kriptokrómok	24
2.2.3 A fotoreceptorok szövetspecifikus kifejeződése.....	25
2.2.4 A fényreceptorok által irányított folyamatok	26
2.2.5 A fitokrómok és kriptokrómok a cirkadián óra input elemei.....	30
2.2.6 A fényreceptorok mennyiségének és aktivitásának szabályozása.....	33
3. KÖZVETLEN ELŐZMÉNYEK, CÉLKITŰZÉSEK	40
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	42
4.1. Kísérleti anyagok, organizmusok.....	42
4.2. Molekuláris biológiai módszerek.....	45
4.3 Transzgénikus növények előállítása, kallusz képzés	49
4.4. <i>In vivo</i> luciferáz enzimaktivitás-meghatározás	50
5. EREDMÉNYEK	54
5.1 Szövetspecifikus kifejeződés vizsgálata	54
5.2 Fotoreceptor promóterek diurnális szabályozása	57
5.3 Fotoreceptorok promótereinek cirkadián szabályozása	58
5.4 A fitokrómok és kriptokrómok mRNS molekuláinak cirkadián jellegű akkumulációja .	59
5.5 A <i>PHYA</i> gén három különböző méretű mRNS molekulájának cirkadián ritmusa	60
5.6 A <i>PHYA</i> transzkripció ritmicitásának eltérő mértékű kifejeződése intakt növényekben és izolált szervekben.....	61
5.7 A <i>PHYA</i> és a <i>CAB2</i> gének kifejeződése levágott levélben	63
5.8 A sebzés és kalluszosodás hatása a <i>PHYA</i> kifejeződésre	63

5.9 A <i>PHYA</i> cirkadián kifejeződésének szövetspecifikus megjelenése	65
6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	67
6.1 A fotoreceptorok szövetspecifikus kifejeződése	67
6.2 Diurnális génexpresszió szabályozás	69
6.3 Fény-regulált promóter-aktivitás	69
6.4 A kifejeződés cirkadián szabályozása	70
6.5 A <i>PHYA</i> promóter cirkadián szabályozásának eltérései	73
6.6 A <i>PHYA</i> promóter cirkadián szabályozásának szövetspecifitása	75
6.7 Következtetések, új modell felállítása	76
7. ÖSSZEFOGLALÁS	78
8. SUMMARY.....	81
8.1 Introduction.....	81
8.2 Research objectives.....	82
8.3 Results and discussion	83
8.4 Conclusion	85
9. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	87
10. IRODALOMJEGYZÉK	88
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	97

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4-D	2,4 diklór-fenoxiecetsav
ARR4	<i>Arabidopsis thaliana</i> response regulator 4
CAB	klorofill a/b-kötő fehérje
CAT (2,3)	kataláz (2,3)
CBD	chromophore-binding domain
CCA1	circadian clock associated 1
CCD	charge-coupled device
CCR2	cold, circadian regulated 2
CO	constans
CRY (1,2)	kriptokróm (1,2)
DAS	<u>D</u> QXVP- <u>a</u> cidic- <u>S</u> TAES konzervált aminosavakat tartalmazó domén
dATP	dezoxi-adenozin trifoszfát
DD	dark/dark
DEPC	dietil-pirokarbonát
dCTP	dezoxi-citozin trifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
ELF3	early-flowering 3
FAD	flavin-adenin dinukleotid
FRC	fluence rate curve
FRP	free-running period
FyPP	phytochrome-associated protein phosphatase
GFP	green fluorescent protein
GUS	β-glükuronidáz
HIR	high irradiance response
IPTG	izopropil-tio-β-D-galaktozid
LD	light/dark
LFR	low fluence response
LHY	late-elongated hypocotyl
LL	light/light
LRE	light-responsive element
LUC+	módosított luciferáz

MOPS	3-morfolino-propánszulfonsav
NES	nukleáris export szignál
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
NOS	nopalín-szintáz
NPH4	non-phototropic hypocotyl 4
PAS	<u>Per</u> - <u>Arnt</u> - <u>Sim</u> homológ domén
PCR	polimerase chain reaction
P_{fr}	a fitokrómok aktív, távoli vörös fényt elnyelő konformációs formája
PHOT1	fototropin 1
PHR	photolyase-related
PHY (A,B,C,D,E)	fitokróm (A,B,C,D,E)
PIF3	phytochrome-interacting factor 3
pPCV	plant cloning vector
P_r	a fitokrómok inaktív, vörös fényt elnyelő konformációs formája
Q-box	Quail-box
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TOC1	timing of cab 1
UBQ10	ubiquitin10
VLFR	very low fluence response
X-GAL	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid
ZT	zeitgeber time
ZTL	zeitlupe

1. BEVEZETÉS

A környezeti tényezőkhez való alkalmazkodás képessége tette lehetővé az élőlények széleskörű elterjedését a Földön. Amíg az extrém környezetben élő fajoknál, például az Északi sarkon vagy hóforrásokban az adaptáció az egyed életben maradásának egyértelmű feltétele, addig az életet közvetlenül nem veszélyeztető környezeti tényezőkhez való alkalmazkodás csak hosszabb távon észlelhető, a populáció számára evolúciós előnyt jelent.

Mivel a növények helyhez kötött életmódot folytatnak, csak korlátozott mértékben térhetnek ki az őket ért behatások elől, ezért inkább megfelelően reagálva alkalmazkodniuk kell mindenféle körülményhez. A magasabb rendű növények számára az egyik legfontosabb környezeti tényező a fény, mely kettős szerepet játszik az életükben. Egyrészt a fotoszintézis során a fény energiáját hasznosítva épülnek fel a szerves vegyületek. Másrészt viszont a fotoszintetikus rendszer komponensei megsérülhetnek a túl erős vagy UV-hullámhossz-tartományban gazdag napsugárzásban, ez is magyarázza egy érzékelő rendszer jelenlétét, mely minden körülményben megállapítja a környezet fényviszonyait és ehhez igazítja a fotoszintetikus aktivitást illetve a rendszer védelmét. Ebből fakad, hogy a fény nemcsak energiaforrásként, hanem környezeti jelként is jelentős szerepet kap. Természetesen a fotoszintézis mellett számos folyamat érzékeny a fényre, így a fényérzékelő apparátus széleskörűen szabályozza a növények valamint egyedfejlődésének számos lépését a csírázástól a virágzásig. A fény, mint környezeti jel által szabályozott folyamatokat fotobiológiai folyamatoknak nevezzük.

A fotobiológiai folyamatok kezdeti, és egyben központi elemei a fényreceptorok, melyek érzékelik a fényt, majd ezután jelátviteli utakat elindítva vezérlik a fény hatására kialakuló fényválaszokat. Ezen molekulák segítségével a növény meghatározza a megvilágító fény hullámhossz-spektrumát, intenzitását, valamint irányát, melyek együttesen szabják meg a szükséges válasz-reakciókat.

A Föld tengely körüli forgásának következtében a fény megjelenése naponta ismétlődő, azaz ciklikus jelenség. A fény szakasz, azaz a nappal melegebb hőmérséklettel párosul, míg a sötét szakasz, azaz az éjszaka általában hőmérséklet csökkenéshez vezet. Habár éjszakák és nappalok váltakozása nem gyakorol közvetlen szelekciós nyomást, mégis olyan körülmény, melynek a legtöbb élőlény folyamatosan ki van téve. Ennek megfelelően nemcsak a növények, hanem minden élőlény esetében nyomon követhető a napi ciklushoz történő adaptáció, gondoljunk csak az egyes állatok és az ember alvás/ébrenlét ciklusára, a

táplálkozás napi ritmusára, vagy egyes növények (például a mimóza) levelének napszakfüggő mozgására. Linné virágórája is a virágszirmok órára pontos kinyílásán alapult.

Ezekon a könnyen észlelhető példakon túl még számos fiziológiai és molekuláris folyamat mutat szabályos napi ritmust, ilyen például a növények energiatermelő folyamata, a fotoszintézis is. Mivel éjszaka nincs a fotoszintézis számára hasznosítható energiaforrás, optimális esetben ekkor nem áll készenlétben a fénybegyűjtő rendszer, azaz részlegesen lebomlik. Azonban ha reggel közvetlenül a fényviszonyok megváltozása indukálná az apparátus újra felépítését, úgy a tényleges fényelnyelés csak órák múlva indulna el. A szervezet úgy érheti el a legnagyobb hatékonyságot, ha előre fel tud készülni a napszakváltásra, azaz – a konkrét esetben- az energiatermelésre már napkeltekor alkalmas. Mivel a fény/sötét és ennek megfelelően a melegebb és hidegebb napszakok változása ritmikusan azaz naponta nagyjából azonos időben következik be, így az élőlények nemcsak változás után igazodhatnak a kialakult körülményekhez, hanem előre fel is készülhetnek rá.

A naponta szabályosan ismétlődő környezeti változások előrejelzésére olyan belső rendszerre van szükség, mely képes folyamatosan mérni az időt és az ebből származó információk alapján irányítani bizonyos biológiai folyamatokat. Ezt a feladatot egy molekuláris mechanizmus látja el, az ún. **biológiai óra**, mely a szabályozott folyamatoknak közel 24 óránként ismétlődő ritmust biztosít. Innen ered a másik elnevezése, a **cirkadián óra** a latin *circa diem*, azaz „kb. 1 nap” kifejezésből.

A fotobiológiai folyamatok és a cirkadián szabályozás (kronobiológiai folyamatok) két, egymással több szinten is szorosan összefüggő jelenség. A cirkadián óra által szabályozott folyamatok nagy része egyben fényregulált is, de ez fordított értelemben is igaz, bár kevésbé általános jelleggel. A fény, a fényérzékelő receptorok közvetítésével, speciális jelátviteli utakon keresztül szabályozza a fotobiológiai folyamatokat, de ugyanezen fotoreceptorok által továbbított fény végzi a cirkadián óra beállítását is. A kettősen szabályozott folyamatokban alapvetően a fény és a cirkadián óra egymás hatását elősegítő rendszert képez. A fény, mint környezeti jel úgy módosítja a növények életműködéseit, hogy azok a lehető legjobban alkalmazkodjanak az aktuális fényviszonyokhoz. A cirkadián óra e regulációs folyamatokat kiegészítve, az alkalmazkodás „finomhangolását” teszi lehetővé.

Mivel a fényreceptorok széleskörű és jelentős hatást gyakorolnak a növény számos élettani folyamatára jellemzésük a növényi molekuláris biológia egyik igen intenzíven kutatott területe. Ez magában foglalja a receptorok szerkezetének leírását, a fényabszorpciót követő molekuláris események feltárását, a receptoroktól a célgénig húzódó jelátviteli utak azonosítását, a célgén működésének jellemzését, valamint az e gén megváltozott

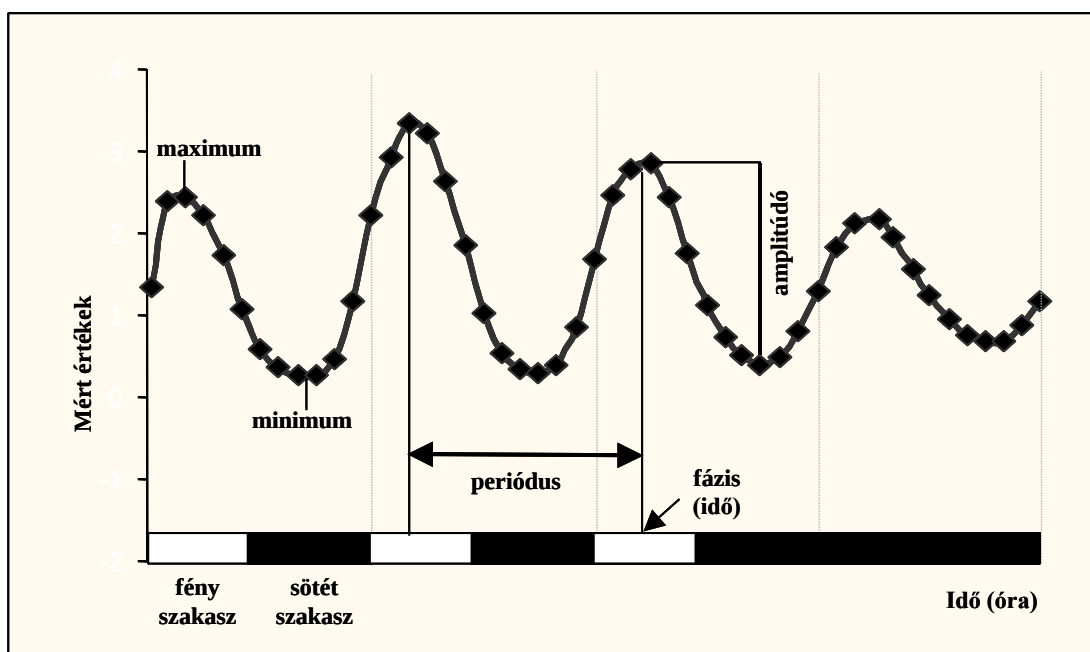
kifejeződésének eredményeképp megjelenő fiziológiai vagy makroszkópos válaszok vizsgálatát. Munkacsoportunk fő kutatási területe a növényi fotoreceptorok molekuláris szintű jellemzése, valamint a foto- és kronobiológiai folyamatok szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata. Dolgozatomban a közelmúlt eredményeit mutatom be, melyek bizonyítják a cirkadián óra szerepét a fényreceptor gének kifejeződésének szabályozásában, ami által a belső óra elősegíti a fényérzékelés “finomhangolását” és a gyorsabb és pontosabb fényválaszok megjelenését.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Cirkadián rendszerek

2.1.1 A cirkadián ritmusok jellemző paraméterei

A cirkadián óra által szabályozott napi oszcillációt **cirkadián ritmus**nak nevezzük. Egy ritmust pontosan meghatározhatunk néhány speciális paraméter megadásával. Érdekes röviden áttekinteni ezek jelentését az 1. ábra segítségével.



1. ábra Egy cirkadián ritmus grafikonja és jellemző paraméterei

A vizsgálat ideje alatt uralkodó fényviszonyokat az X tengely felett a fekete (sötét) illetve fehér (fény) sávokkal jelöltük.

A cirkadián ritmus periódusa: a görbe két jellemzően ismétlődő pontja, általában a maximumok közötti szakasz hossza. Egy periódus órában kifejezett értéke a periódushossz, ami esetünkben körülbelül 24 óra. Másik jellemző paraméter a maximumhoz tartozó időpont, a ritmus fázisa. A ritmikus jelleg „erősségét” az amplitúdó mutatja meg, mely a görbe egy perióduson belül mért maximumának és minimumának hányadosa.

2.1.2 A cirkadián rendszerek tulajdonságai

A cirkadián rendszerek négy általános érvényű sajátosságát szükséges kiemelni (Somers, 1999):

1. A cirkadián ritmusok első számú ismertetőjele a közelítőleg 24 órás periódushossz. A naponta ismétlődő környezeti változások határozzák meg a periódus hosszát, mely megegyezik a külső környezeti tényezők ciklusával. Ez bizonyos határokon belül eltérhet a 24 órától, így szélsőséges esetben akár 16 vagy 28 órás ciklus is kialakulhat, ha a környezeti tényezők ilyen periódushosszal oszcillálnak.
2. A cirkadián ritmus állandó körülmények között is fennmarad. Ez a tulajdonság különbözteti meg a cirkadián oszcillációt a diurnális vagy nokturnális ritmusoktól, melyeket közvetlenül a fény- és/vagy a hőmérsékletviszonyok napi változása hoz létre, így azok megszűnése után a ciklikus jelleg is eltűnik. Az utóbbiak jellemzője, hogy a változó tendencia megjelenése szigorúan köthető a környezeti viszonyok változásának időpontjához; ellenben a cirkadián ritmusok emelkedő vagy csökkenő szakasza már a napszakváltás előtt elkezdődhet. Az állandó körülmények között megjelenő, ún. „szabadon futó” ritmus az organizmusra jellemző saját periódushosszal oszcillál, mely sohasem pontosan 24 óra (FRP=free running period). A „szabadon futó” ritmus fogalmát csak a laboratóriumokban létrehozott, mesterségesen leegyszerűsített vizsgálati rendszerekben értelmezhetjük, hiszen konstans körülmények nem fordulnak elő a természetben; ahol minden cirkadián ritmus periódushosszát a külső környezeti ritmus határozza meg, ami a Földön 24 órának adódik.
3. Egy óra csak akkor tudja ellátni a feladatát, ha időközönként pontosan beállítják. Így van ez a biológiai óra esetében is, ahol a napszakokat kísérő váltakozó környezeti jelek minden nap hozzáigazítják az óra által mért szubjektív időt a valós, objektív időhöz. Ennek megfelelően az éjszaka-nappal átmenetet jelző sötét/fény és hideg/meleg váltások naponta újraindítják a ciklust a napkelte fázisától. A „szabadon futó” ritmus 24 órától eltérő periódushossza azzal magyarázható, hogy az újraállítás, más néven „resetting” könnyebben végrehajtható egy flexibilis időmérő mechanizmuson, mely bizonyos határokon belül képes alkalmazkodni a 24 órától eltérő külső ciklushoz is. A cirkadián kísérletek során az ún. ZT-nek (zeitgeber time) nevezzük a kísérlet kezdetétől számított időt, mely az utolsó beállító jeltől (mint a ZT0 időponttól) indul, amely a leggyakrabban, valamint a jelen dolgozatban is a mérést megelőző az utolsó sötét-fény átmenet időpontja.

4. További megfigyelés, hogy a cirkadián ritmusok periódushossza kevésbé hőmérséklet-függő, mint általában a biokémiai folyamatok sebessége. Ezt a Q_{10} értékkel jellemezhetjük, mely mutatja meg, hogy a hőmérséklet 10 °C-kal történő megemelése hányszorosára növeli a vizsgált folyamat sebességét. A Q_{10} értéke a biokémiai folyamatok esetében 2-2.5, míg a cirkadián ritmusoknál ez 0.8-1.2-nek adódik, tehát bizonyos hőmérséklet-határokon belül a periódushossz lényegében állandónak tekinthető. Ezt a jelenséget hőmérséklet-kompenzációnak nevezzük (Pittendrigh, 1993)

2.1.3 A cirkadián órák fő komponensei

A legjobban jellemzett cirkadián rendszereket *Drosophilában* és az emlősökben írták le, de sok adat áll rendelkezésre egyéb modellszervezetekben működő cirkadián órákról is. Úgy tűnik, hogy a prokariótákban és egyes eukariótákban a biológiai óra konvergens evolúció eredménye (Young és Kay, 2001), mégis a különböző organizmusokból származó cirkadián rendszerek alapvető működési mechanizmusukban megegyeznek.

Összehasonlító vizsgálatok alapján felállított modell szerint sejtszinten a ritmust egy transzkripció-transzláció szintű negatív visszacsatolás alakítja ki. Első lépésként a pozitív faktor indukálja a negatív faktor(ok) transzkripcióját. A fokozatosan emelkedő mennyiségű negatív faktor képes belépni a sejtmagba, ahol gátolja a pozitív faktor hatását, ami végül leállítja az indukciót. Ezután a negatív faktor gyorsan lebomlik, így a pozitív faktor serkentő hatása újra érvényesülhet, tehát a ciklus előlről kezdődik.

A viszonylag hosszú, közel 24 órás periódus a folyamatban több lépésben is megjelenő késleltetés eredményeként alakul ki. A késleltetés létrehozásában túlnyomórészt poszt-transzlációs mechanizmusok vesznek részt, melyek az említett faktorok stabilitását befolyásolják, ezáltal akár 10-12 órás csúszást is okozhatnak az mRNS- és a fehérje-felhalmozódás maximuma között. Mivel a transzláció illetve az azt követő fehérjemódosítások főleg a citoplazmában, ezzel szemben a transzkripciót szabályozó lépések a sejtmagban játszódnak le, így a ritmus kialakításában a faktorok szabályozott sejtmagi transzportja is lényeges momentum, mely újabb késleltetési pont lehet. Bár a legtöbb organizmusban már ismertek a visszacsatolásban résztvevő negatív és pozitív faktorok, az ezek felhalmozódását és lebomlását szabályozó további faktorok közül még csak néhányat sikerült azonosítani.

A ritmus kialakításához és fenntartásához szükséges molekulákat óramelemeknek hívjuk (Dunlap, 1999). Gyakran előfordul, hogy a pozitív vagy a negatív faktor szerepét több fehérje tölti be. Ezek lehetnek hasonló szerkezetű fehérjék, melyek homo és/vagy heterodimer formában aktívak (*Neurospora*), vagy egyszerűen a hasonlóságuk okán redundáns funkciót látnak el (*Arabidopsis*). Más esetben lehetnek nem homológ fehérjék, melyek csakis együtt, fehérje-fehérje kölcsönhatás révén válnak stabil fehérjékké, s képesek betölteni szerepüket. Ezek ellenére az egyes szervezetekben leírt óramelemek sok tulajdonságukban megegyeznek. A kutatások korai szakaszában a fent ismertetett mechanizmusra, és az állatokban azonosított óramelemekre alapozva felállítottak egy kritériumrendszert (Somers, 1999), amely leírja egy klasszikus óraelem főbb jellemzőit, melyet a következőképpen összegezhetünk:

- Fehérje-fehérje kölcsönhatásban szerepet játszó doméneket tartalmaznak (pl. PAS domén).
- mRNS és/vagy fehérjeszintjük napi ritmust mutat.
- Negatív visszacsatolás útján szabályozzák saját kifejeződésüket.
- Szabályozott sejtmagi transzlokációt mutatnak.
- A génjeik nullmutációja vagy a kódolt fehérje túltermelése aritmiát, részleges funkcióvesztést eredményező mutációjukat pedig periódushossz-változást okoz.

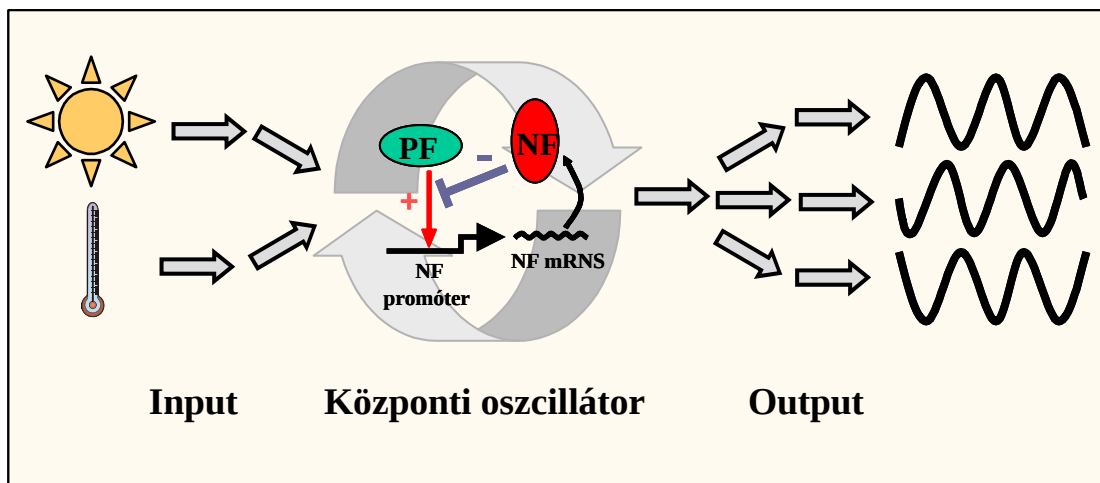
Eleinte ezt a sémát próbálták meg alkalmazni annak eldöntésére, vajon az azonosított cirkadián mutánsok a központi oszcillátor elemei-e. Később kiderült, hogy a ritmus fenntartásához elengedhetetlenül szükséges komponensek nem minden pontban elégítik ki ezeket a feltételeket, a ritmust létrehozó mechanizmus összetettebb.

A jelenleg rendelkezésre álló adatok azonban még nem lesznek lehetővé a cirkadián óra működésének pontos leírását.

A cirkadián rendszerek egyszerűsített, klasszikus modellje három fő részre tagolható. A cirkadián óra „szíve” a **központi oszcillátor**. Ennek feladata a ritmus létrehozásán túl a cirkadián jel továbbítása egy több ágon futó jelátviteli lánc segítségével - amelyeket összefoglalóan **output**nak vagy kimenetnek neveznek - az általa szabályozott folyamatokhoz. Az órát beállító mechanizmusban résztvevő molekulák, az **input** vagy bemeneti elemek közvetítik a környezeti jeleket a központi oszcillátorhoz (2. ábra).

Az output olyan folyamatokat foglal magába, melyek cirkadián szabályozás alatt állnak. Az oszcillátor elsődlegesen a génkifejeződést regulálja, viszont az így továbbított napi ritmus megjelenik molekuláris, biokémiai és élettani szinten is. Bármelyik szinten megjelenő ritmikus jelenség ebbe a csoportba tartozik. A klasszikus óramodell szerint a kimeneti elemek nem befolyásolják az óra működését, nincs közöttük visszacsatolás. Mivel az output elemek

átveszik a központi oszcillátor által generált ritmust, így kísérletek során kitűnő markerként használhatóak az óra jellemzésére.



2. ábra A klasszikus cirkadián óra modell

Az ábrán az NF a negatív faktort, a PF a pozitív faktort jelöli.

Az input folyamatok a környezeti jeleket közvetítik a központi oszcillátorhoz. A legfontosabb periodikus beállító tényezők a napi fény- és hőmérséklet-változás. A hőmérséklet hatását közvetítő elemeket még nem sikerült azonosítani.

A fényszignált fotoreceptorok érzékelik, majd specifikus jelátviteli utakat indítanak el. A fényreceptorok nemcsak a fény detektálásában, hanem a szignál-transzdukció lépéseiben is aktívan részt vesznek.

Mivel a központi oszcillátor elemei a sejtmagban fejtik ki hatásukat, ezért az input folyamatok egyik fontos állomása a környezeti jel továbbítása a sejtmagba. Egyes szervezetekben kimutatták, hogy a fotoreceptorok önmaguk is képesek szabályozott módon a sejtmagba vándorolni. A *Drosophila* cirkadián rendszerében a kriptokróm fotoreceptorok egyszerre közvetítik a fényszignált, tehát input elemek és feltehetően a központi oszcillátor részei is (Krishnan és mtsai., 2001; Reppert and Weaver, 2002). A *Neurospora* óraelemei már régóta ismertek, de csak nemrég tudták igazolni, hogy egyikük, a WHITE COLLAR 1 a fény érzékelésért felelős receptor is egyben (Froehlich és mtsai., 2002; He és mtsai., 2002). Ezekben az esetekben nem lehet elválasztani az input elemeket az óraelemektől, ami árnyaltabbá teszi a klasszikus óra-modellt.

Különböző szervezetekben is azonosítottak a fotoreceptorokon túl több faktort is, melyek valószínűleg közreműködnek az óraelemek fényfüggő, poszt-transzlációs módosításában,

illetve degradációjában. Ezek génkifejeződése és/vagy fehérjeszintje napi ritmust mutat. Így ezek az input elemek egyszerre output elemeknek is tekinthetők (Somers és mtsai., 2000; Heintzen és mtsai., 2001). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az óra szabályozza saját beállító folyamatait.

A bemutatott példák is tükrözik, hogy az óra egyes részei között nem lehet egyértelmű választóvonalat húzni.

2.1.4 Az *Arabidopsis* cirkadián rendszere

A különböző szervezetek cirkadián rendszerei párhuzamos evolúcióval alakultak ki, felépítésük és működésük mégis azonos alapelveket követ. Folyamataik hasonlóképpen zajlanak le az állatokban, növényekben és gombákban is, viszont az azonos funkciót betöltő elemek csak ritkán mutatnak homológiát. Az emlős és *Drosophila* cirkadián rendszer a legrészletesebben jellemzett, míg a magasabb rendű növények, ezen belül az *Arabidopsis thaliana* cirkadián órájának modellje az elmúlt évek eredménye (3. [ábra](#)).

A központi oszcillátor

Az *Arabidopsis* cirkadián óra modelljében 3 sejtmagi fehérje alkotja a központi oszcillátor negatív visszacsatolási körét. A pozitív faktor valószínűleg egy pszeudo-reszponz regulátor, a TIMING OF CAB 1 (TOC1) más néven APRR1 (Strayer és mtsai., 2000). A TOC1 mRNS szintje napi ritmust mutat, esti maximummal. Nullmutációját még nem izolálták, viszont erős pont mutánsa valamint RNS interferenciával létrehozott TOC1 hiányos növények hosszan tartó folyamatos fényben vagy sötétben aritmikusak (Mas és mtsai., 2003). Gyenge mutációjuk periódushossz-rövidülést okoz (FRP=21 óra), megváltoztatva az összes ismert kimenet ritmusát (Somers és mtsai., 1998b). Túlermelése folyamatos fényben a cirkadián ritmusok gyors, teljes lecsengéséhez vezet (Makino és mtsai., 2002).

A negatív faktor szerepét két Myb-rokon transzkripciós faktor tölti be, a CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) és a LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY). Mindkettő mRNS- és fehérjeszintje azonos fázisban oszcillál, a fehérjék legnagyobb mennyiségben hajnalban halmozódnak fel. Egyszeres mutációjuk minden output folyamat ritmusában kb. 2-3 órás rövidülést idéz elő, a dupla mutánsban viszont ez a rövidülés kétszeres (Wang és Tobin, 1998; Alabadi és mtsai., 2002). Funkcióvesztéses mutánsuk külön-külön nem, de együttesen a ritmusok erőteljes csillapodását eredményezi állandó fényben

(Mizoguchi és mtsai., 2002), továbbá bármelyik folyamatos túltermelése aritmiát okoz állandó fényviszonyok mellett (Schaffer és mtsai., 1998). Ez a két jelenség arra utal, hogy a *CCA1* és az *LHY* azonos vagy nagyon hasonló feladatot lát el a központi oszcillátorban, s az egyik elvesztését a másik részben képes kompenzálni.

A három fehérje által alkotott negatív visszacsatolás a következőképpen vázolható fel. A pozitív faktor, a *TOC1* indukálja a *CCA1* és az *LHY* gének transzkripcióját, tehát ahogy a *TOC1* szintje nappal emelkedik, úgy fokozódik a negatív faktorok termelődése. Viszont a megjelenő *CCA1* és *LHY* fehérjék kötődnek a *TOC1* promóterben található ún. „evening element”-hez (AAATATCT), és gátolják a gén átíródását (Alabadi és mtsai., 2001), így a pozitív faktor szintjét csökkentve saját indukciójukat is leállítják. A negatív faktorok mennyisége addig csökken, amíg a *TOC1* promóter fel nem szabadul a gátló hatás alól, ekkor a ciklus előlről kezdődik.

A fenti modellt számos megfigyelés támasztja alá, de még sok ismeretlen paramétert is tartalmaz. A *CCA1* és *LHY* fehérjeszintjének cirkadián fázisa szinte egybe esik az mRNS-szintjük maximumával, így a többi rendszerben már leírt késleltetést esetleg a *TOC1* fehérje megjelenésében várhatnánk, azonban az még nem ismert. Továbbá a *TOC1* fehérjének nincs DNS-kötő aktivitása, ami további faktorok jelenlétét feltételezi.

A központi oszcillátor negatív és pozitív elemekből álló egyszeres visszacsatolási köre meglehetősen leegyszerűsített modell. A legújabb eredmények azt mutatják, hogy a *Drosophila*-ban nem csak egy negatív visszacsatolási kör szükséges a ritmus előállításához, hanem két, egymást is szabályozó körfolyamat (Zhao és mtsai., 2003). Egyes kísérleti eredmények *Arabidopsis*-ban is arra utalnak, hogy a fent említett 3 faktor nem elégséges a napi ritmus generálásához és állandó körülmények közötti fenntartásához. Például a *cca1 lhy* dupla mutáns fény/sötét cikluson még mindig – bár kis amplitúdóval - ritmikus marad, folyamatos fénybe téve pedig az első 24 órában még folytatja a gyenge oszcillációt, s csak aztán válik aritmikussá (Mizoguchi és mtsai., 2002; Alabadi és mtsai., 2002). Ez arra enged következtetni, hogy ez a két elem inkább a ritmus fenntartásához szükséges, mintsem a kialakításához. Így feltételezhetjük, hogy több központi jelentőségű elem vár még felfedezésre, melyekkel tovább finomítható a cirkadián óra oszcillátor funkciójának leírása.

Az output elemek

Arabidopsis-ban számos élettani folyamat az óra szabályozása alatt áll, például a levélmozgás, a hipokotilmegnyúlás, a sztómanyílás mutat napi ritmust (Somers, 1999). Morfogenikus

folyamatokra is hatása van az órának, legismertebb példa erre a virágzás fotoperiódikus indukciója (Mouradov és mtsai., 2001). A biokémiai folyamatok közül cirkadián oszcilláció jellemzi többek között a nitrát reduktáz működését (Lillo és mtsai., 2001), valamint az antocianin termelődését (Thain és mtsai, 2002).

A génexpresszió szintjén megjelenő napi oszcillációról áll a legtöbb adat a rendelkezésünkre. Ez azzal is magyarázható, hogy a központi oszcillátor közvetlenül az output elemek transzkripcióját módosítja. A CCA1 és az LHY funkciója nem korlátozódik a ritmus fenntartására. Az „evening element” nemcsak a *TOC1*, hanem számos kimeneti elem promóterében is megtalálható, így azok transzkripcióját is gátolják a negatív faktorok. Másrészt képesek kötődni az ún. „morning element”-hez, s ennek segítségével az azt hordozó gén átíródását viszont indukálják (Alabadí és mtsai, 2002). Ilyen szekvencia található például a legrészletesebben jellemzett output elem, az egyik fotoszintetikus antenna-fehérje, a klorofill a/b kötő fehérje (CAB) génjének promóterében (Wang és mtsai., 1997). Így a CCA1 és az LHY kimeneti oldal kezdeti lépéseiben is részt vesznek.

Microarray technikával megvizsgálva az mRNS-mennyiség napi változását, számos génről sikerült kimutatni, hogy az óra kisebb-nagyobb mértékben befolyásolja kifejeződésüket (Schaffer és mtsai., 2001; Harmer és mtsai., 2000). Ezeknek a kísérleteknek alapján azt feltételezik, hogy az *Arabidopsis* gének körülbelül 2-6%-a áll cirkadián kontroll alatt. Egy adott biokémiai folyamatban részt vevő faktorok génkifejeződésének fázisa túlnyomó részben azonos, továbbá ez a fázis a folyamat napi megjelenésével is egybeesik vagy pár órával megelőzi azt. Mivel a cirkadián ritmus szerint átíródó gének száma sokkal kisebbnek adódott, mint az output folyamatok összes elemének száma, így feltételezhető, hogy az óra az általa vezérelt folyamatoknak nem minden mozzanatát, csak egyes, kulcsfontosságú elemeit szabályozza közvetlenül. Másrészt a napi ritmus megjelenhet a fehérje mennyiség valamint a fehérjeaktivitás szintjén is, ami a microarray módszerrel nem mutatható ki.

A fény és a hőmérséklet nemcsak környezeti jel lehet az élőlények számára, hanem bizonyos határokon túl károsító tényező is. Az óra az ilyen környezeti tényezők elleni védekezést is elősegíti. Az UV és látható fény általi károsodás ellen védő vegyületek, mint például az antocianin, a sötét periódus végén halmozódnak fel. Az ezeket létrehozó fenilpropanoid bioszintetikus út egyes enzimeinek, például a csalkon szintáznak a génkifejeződése cirkadián jellegű, napkelte előtt 4 órával éri el a maximumát. Így a növény előkészül a napsugárzás káros hatásának kivédésére. Az éjszaka folyamán megnövekedett hidegtoleranciával összefüggésbe hozható a membrán lipid deszaturáció napi ritmusa (Rikin és

mtsai., 1993). Másrészt egy központi szerepű transzkripció faktor, a DREB1a/CBF3, mely számos hideg-indukált, ciklikusan termelődő gén promóteréhez képes kapcsolódni, maga is cirkadián szabályozás alatt áll, ami arra utal, hogy a belső óra több úton is befolyásolja a hideg-toleranciát.

A cirkadián óra ezeken túl metabolikus utakat is regulál. A fotoszintézis során termelődött cukrok transzportjának, további metabolikus átalakulásának egyes kulcsenzimeit nappal, azaz ZT8 körül jelennek meg legnagyobb mennyiségben; míg a keményítő-mobilizáció folyamat ritmikusan termelődő elemeinek mRNS-e éjszaka (ZT16 és 20 között) halmozódik fel. Az óra a fotoszintézis során megkötött szén felhasználásának több irányát is befolyásolja, ezáltal számos ponton módosíthatja a növények szénháztartását. Ásványi anyagok, mint a nitrogén és a kén asszimilációjára is azok egy-egy fontosabb komponensének szabályozásával hat (Harmer és mtsai., 2000).

Míg a cianobaktériumoknál a sejtszétválás napi oszcillációt követ (Golden és mtsai., 1997), a fejlett növényekben hasonló regulációt alátámasztó bizonyítékok nem ismertek. A fejlődési folyamatok közül a sejtmegnyúlás cirkadián szabályozását leginkább a hipokotil növekedés napi ritmusában figyelhetjük meg.

A legjobban jellemzett óra-regulált folyamat a CAB2 génexpressziója (Millar és mtsai., 1991), melynek a végleges kifejeződési mintázatát a cirkadián óra szabályozó szerepe mellett a fényindukció alakítja ki. A ritmus reggel, a fény megjelenése után 2 órával éri el a maximumát, folyamatos fényben magas amplitúdóval oszcillál, ellenben folyamatos sötétben gyorsan lecseng. Egy másik általánosan vizsgált output elem a CCR2 (COLD, CIRCADIAN REGULATED 2), egy hideg-indukált, glicin-gazdag RNS-kötő fehérje (Carpenter és mtsai., 1994). A CCR2 gén szabályozásába egy negatív visszacsatolási lépés is beiktatódik, ami nem hat vissza az óra működésére (Heintzen és mtsai., 1997). A cirkadián óra által szabályozott génexpresszió vizsgálata során e két kimeneti elem egyikét szokták markerként alkalmazni az óra működésének leírására.

Az input elemek

A növényi óra számára a legfontosabb beállító tényező a fény. A hőmérséklet inkább moduláló hatású, vagy olyan körülmények között kerül előtérbe, amikor a fény valamilyen rendkívüli esemény folytán nem alkalmas a szabályozás pontos irányítására.

A fény kétféleképpen is regulálja a cirkadián óra működését. Egyrészt a sötét-fény átmenet beállítja a pontos időt, azaz az órát a napkeltének megfelelő állapotba igazítja. Ez a

folyamat a nap során - természetes körülmények között - csak egyszer játszódik le. Ennek laboratóriumi megfigyelésére az ún. resetting kísérletet használják, melyben megfigyelik, hogy a növényben a sötét fázist megszakító fénykezelés hatására bekövetkezik-e fáziseltolódás. Ez a jelenség azt mutatja, hogy az adott hullámhosszú fény képes-e újraindítani az órát.

A beállítást a fénykörülmények változása vezérli, de a folyamatos fénynek is van hatása a cirkadián ritmusok kialakítására. A cirkadián óra működését jellemző Aschoff szabály leírja, hogy a diurnális szervezeteknél (ilyen például az *Arabidopsis*) a fényintenzitás növelése szabadon futó körülmények között rövidíti a cirkadián ritmus periódushosszát. A nocturnális szervezeteknél pont fordítva van, a fényintenzitás növelése periódushossz-növekedést okoz (Aschoff, 1979). E szabály alapján igazolták, hogy mind a folyamatos vörös, mind a folyamatos kék fény hatásos a cirkadián óra beállításában (Millar és mtsai., 1995a). A szabadon futó ritmus periódushosszának fényfüggését úgy határozzák meg, hogy különböző intenzitású folyamatos megvilágítás mellett megméri a cirkadián ritmus periódushosszát. Ezt az értéket a fényintenzitás függvényében ábrázolva az ún. FRC görbét kapjuk (*fluence rate curve*).

Az órát szabályozó bemeneti oldal a fényt detektáló fotoreceptorokkal kezdődik. A fényreceptorok fényintenzitás-érzékenységek, valamint elnyelési spektrumuk kisebb eltéréseinek köszönhetően kiegészítik egymást, mintegy hálózatot alkotva képesek leképezni bármilyen fényviszonyokat. Ez lehet az oka annak, hogy számos fényreceptor szükséges az input folyamatokhoz, mivel a fényszignál nagyon fontos az óra pontos beállításában.

Növényekben 3 fényérzéklő receptorcsalád ismert: a vörös és távoli vörös fényt elnyelő fitokrómok, a kék és UV-A tartományban érzékelő kriptokrómok, valamint ugyanezt a hullámhossz-spektrumot lefedő fototropinok. *Arabidopsis*-ban ezek közül egyes fitokrómok (phyA, B, D, E) illetve a kriptokrómok (cry1, 2) részvételét igazolták a cirkadián input folyamatokban (Somers és mtsai., 1998a; Devlin és Kay, 2000; Yanovsky és mtsai., 2001), a fototropinok működése azonban nem érinti a cirkadián folyamatokat (Harmer és mtsai., 2000). Mivel a jelen dolgozat témája a fotoreceptorok kifejeződésének cirkadián regulációja, így a fitokrómok és kriptokrómok jellemzésével a következő fejezetben részletesebben foglalkozunk.

A fény elnyelése után a fotoreceptorok elindítják a szignált a jelátviteli láncon. A fény a fotoreceptorokon keresztül számos folyamatot szabályoz, közülük egyik a cirkadián óra, s ennek megfelelően több szálon futó, elágazó jelátviteli utat használ. Mind a beállításhoz, mind pedig a periódushossz szabályozásához ugyanazon fotoreceptorok közvetítik a fény jelét,

viszont e két folyamathoz vezető fény szignáltranszdukciós utak elemei csak részben egyeznek meg.

Eddig fény jelátviteli láncok néhány eleméről igazolták, hogy a cirkadián input folyamatokban is részt vesznek. A távoli vörös tartományban aktív fitokróm A hatását közvetítő faktorok közül a SPA1 (Martinez-Garcia és mtsai., 2000), valamint az FHY1 és FHY3 szerepe bizonyított (Yanovsky és mtsai., 2001). Mutánsaikban az óra nem állítható be távoli vörös fénnel, viszont más fényviszonyok között ez a jelenség nem tapasztalható. Folyamatos fényen tartva a periódushosszuk nem tér el a vad típusétól.

A PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) a fény jelátviteli út egyik eleme (Ni és mtsai., 1999), sem a hiányának, sem a túlermelésének a cirkadián folyamatokat módosító hatását nem mutatták még ki. Ez a transzkripció faktor csíranövényben képes specifikusan kapcsolódni a fényindukált promóterekre jellemző ún. G-box szekvenciához (CACGTG), majd a phyB fényfüggő módon kötődik a promóterhez kapcsolt PIF3 fehérjéhez. A G-box szekvenciát mind a *CCA1*, mind pedig az *LHY* gén promótere is hordozza (Martinez-Garcia és mtsai., 2000), így ez a folyamat része lehet egy, a fotoreceptoroktól közvetlenül az óraelemekre irányuló input útnak. Valószínűleg a PIF3 egészen szorosan együttműködik a három óraelemmel, mivel élesztő két-hibrid rendszerben kimutatták, hogy a TOC1 és a PIF3 fehérje-fehérje kölcsönhatásra képes (Makino és mtsai., 2002). Ezek az adatok egy sötétben kialakuló, PIF3-TOC1-et (is) tartalmazó transzkripcionális komplex meglétét vetítik előre, mely a központi oszcillátor pozitív faktorainak promóterén gátolja azok átíródását; majd fény hatására, melyet egyes fitokrómok közvetlenül közvetítenek, a PIF3 gyorsan degradálódik (Diana Bauer, Viczián András és Nagy Ferenc szóbeli közlése), így elindulhat a nagyobb mértékű transzkripció.

A ZEITLUPE (ZTL) fehérje valószínűleg valamelyik óra elem fényfüggő lebomlásában vesz részt (Somers és mtsai., 2000). Ezt a feltevést egyrészt az támasztja alá, hogy a tartalmaz egy F-box domént, mely a fehérjedegradáció során az ubiquitinációs komplex fehérjéinek speciális célszekvenciája; a 6 Kelch-repeat pedig a lebomlásra ítélt fehérje megkötésére szolgálhat. Kísérletesen azonban még nem sikerült igazolni ezeket a predikciókat. Az viszont bizonyított, hogy a ZTL mutációja fényintenzitás-függően változtatja meg az óra működését, ami azt jelenti, hogy a ZTL a fény input út egyik eleme; továbbá élesztő két-hibrid rendszerben képes fehérje-fehérje kapcsolatot létesíteni két fotoreceptorral, a phyB-vel és a cry1-gyel (Jarillo és mtsai., 2001).

A környezeti körülmények nemcsak szabályosan, hanem gyakran rapszódikusan is változhatnak. Annak elkerülésére, hogy egy nem kívánt környezeti hatás (hirtelen lehűlés,

villámlás) megváltoztathassa az óra működését, azaz átállítsa, a cirkadián óra szabályozása alá vonta az input elemeket. Ezt úgy éri el, hogy a bemeneti oldal érzékenységét a nem megfelelő időpontokban lecsökkentve, máskor növelve napi ritmust biztosít a beállító folyamatoknak. Ezt a szabályozást a szakirodalomban „gating”-nek nevezik. A szabályozás nem közvetlenül az óraelemeken keresztül történik, hanem egy output elem, az ELF3 (EARLY FLOWERING 3) segítségével. Az ELF3 mutációja sötétben periódushossz rövidülést, folyamatos fényben aritmiát okoz (Hicks és mtsai., 1996). Az *elf3* növényben folyamatos fényben a nem szabályozott fény input leállítja az órát az utolsó hajnal után 8-10 órával. Bármely fázisban indítják újra működését egy sötét periódussal, az óra mindig azonos fázisból kezdi el a ritmust (Covington és mtsai., 2001). Az ELF3 a ritmus létrehozásához nem szükséges, így a szorosan értelmezett központi oszcillátornak nem eleme, viszont fontos eleme a cirkadián rendszernek. Az ELF3 in vitro kölcsönhatásba lép a phyB-vel (Liu és mtsai., 2001). A fotoreceptorral való közvetlen kapcsolódás lehet az ELF3 fehérje fény input utat reguláló működésének az alapja. McWatters és munkatársai kimutatták (2000), hogy az ELF3 specifikus a fény inputra, mivel hiánya más beállító tényező, például a hőmérséklet ingadozás hatását nem befolyásolja.

2.1.5 A cirkadián óra szervezet szintű szabályozása

Eddig a cirkadián rendszerek sejtszintű folyamatait tekintettük át. Minden eddig vizsgált élőlényre vonatkozóan igaz állítás, hogy a cirkadián óra sejt-autonóm módon működik, azaz a szervezet minden sejtjében lejátszódhatnak cirkadián folyamatok. Másként fogalmazva, minden sejtben működik egy külön cirkadián óra. Számos eredmény született, amely ezt az állítást alátámasztja; ezeket Andrew Millar egy 1995-ben megjelent könyvfjezetben nagyszerűen összefoglalta. Az egysejtű élőlények (például a prokarióta cianobaktériumok, vagy az eukarióta *Neurospora*, *Chlamydomonas*, *Euglena*) minden egyedében önállóan működik egy oszcillátor. A többsejtű, viszont szervekkel nem rendelkező élőlényekből (pl. *Acetabularia*) izolált különálló sejtek is mutatnak napi folyamatokat. A fejlettebb növények sztóma zárósejtjeiből nyert protoplasztokat cirkadián turgorváltozás jellemzi.

Az idegrendszerrel rendelkező állatok cirkadián rendszere már bonyolultabb felépítésű. Egyrészt a testi sejtek rendelkeznek az ún. perifériális órával, ami az idegrendszertől függetlenül megjelenő napi folyamatokat (például a májenzimek cirkadián termelődése) szabályozzák. Ezen túl az idegrendszer egy meghatározott sejtcsoportjában (szuprakiazmatikus nukleusz) működő órák pacemaker funkciót töltenek be, amelyek az állatok ritmikus viselkedését irányítják (például alvás/ébredés). A két fajta óra között szoros

kapcsolat áll fenn. Egérben a szemből érkező fény, mint input jel a szuprakiazmatikus órát gyorsan átállítja, amely ezután a perifériális órák beállítását végzi el (Yamazaki és mtsai., 2000). A pacemaker szövetekben az egyedi sejtek cirkadián órái szorosan kapcsolnak, valószínűleg azért, hogy a beállítás pontos legyen (Liu és Reppert, 2000). Ezzel ellentétben a szuprakiazmatikus és a perifériális órák között egy gyengén összekapcsolt út szabályoz, ezáltal biztosítva még nagyobb flexibilitást a perifériális órák fázisának beállításához (Yamazaki és mtsai., 2000). A köztük fennálló kölcsönhatás ellenére az ectomuslicából izolált szervekben a cirkadián ritmus fennmarad, sőt fényrel továbbra is beállítható (Plautz és mtsai., 1997), ami arra utal, hogy a szuprakiazmatikus órák beállító szerepe nem kizárólagos.

A növényi cirkadián rendszer szupracelluláris folyamatairól kevesebb adat áll rendelkezésre. A növényekben az állatokhoz hasonló pacemaker szerepű sejteket nem mutattak ki. Habár néhány hormonnál megfigyelték, hogy a szintjük napi ritmus szerint változik, például az etilénszint a cirokban (Finlayson és mtsai., 1999) vagy az auxin szintje az *Arabidopsis* első internódiumában (Jouve és mtsai., 1999), az nem ismert, hogy ezeknek van-e bármilyen jelentősége a celluláris órák szinkronizációjában. Ezzel szemben Thain és munkatársai (2000) igazolták, hogy az *Arabidopsis* izolált leveleiben a *CAB* gének ritmikus átíródása folyamatos fényben fennmarad, valamint fény/sötét periódusokkal újraállítható. Emellett intakt csíranövény két sziklevele beállítható ellenkező fázisú ritmusra, ami folyamatos körülmények között is megőrzi fázisát, nem igazodnak egymáshoz. Sőt akár egy sziklevel két felében is végrehajtható az ellenkező beállítás. Ez a kísérlet arra enged következtetni, hogy a növényekben nincsen egy egész növényre kiterjedő, szisztémás szinkronizáló endogén faktor, hanem valószínűleg a külső, beállító faktorok szinkronizálják a sejt-autonóm órákat. Másrészt ez az eredmény nem zárja ki egy olyan intracelluláris jel létét, ami csak lokálisan (például szövetspecifikusan), illetve a levélen kívül más szervekben hangolja össze az egyes sejtekben működő cirkadián órákat. A levél azért kiemelt jelentőségű a fénybeállítás szempontjából, mivel ez a szerv a fényérzékelés legfőbb helye, így talán itt nagyobb szerepe lehetne a közvetlen beállító faktornak, azaz a fénynek, mint egy szinkronizáló faktornak.

2.2 Növényi fotoreceptorok

A természetes fényviszonyok intenzitásban, spektrális eloszlásban - akár egy adott növény esetében is - igen nagy különbséget mutathatnak, mind térben, mind időben. Ezért nem meglepő, hogy a magasabb rendű növények több fényreceptort is használnak a környezet

fényviszonyainak leírására, és az azoknak megfelelő fényválaszok kialakítására. A fényreceptorok funkciója részben átfedő, részben egymást kiegészítő. Egy fényindukált folyamatot nemcsak egy receptor irányít, és ez visszafelé is igaz, egy fotoreceptor számos fényválaszban játszik kisebb-nagyobb szerepet; így egymással együttműködve irányítják a megfelelő folyamatokat. Az adott körülményektől függően ez az együttműködés lehet serkentő, de akár gátló jellegű is. Ebből is látszik, hogy a fotoreceptorok egy bonyolult hálózatot alkotva igen pontosan képesek leképezni a fénykörülményeket, és ennek megfelelően vezérelni számos élettani jelenséget.

Mivel a dolgozat témája az Arabidopsis fényreceptorok vizsgálata, így arra törekszem, hogy elsősorban ebből a növényből származó adatokat ismertessek. Amennyiben Arabidopsisból származó eredmények nem állnak rendelkezésre, a vizsgált szervezet nevét külön megemlítem.

2.2.1 Arabidopsis fitokrómok

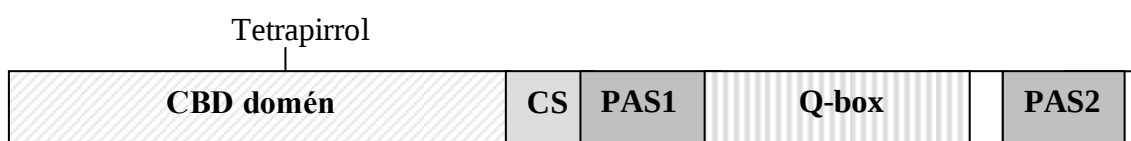
A vörös és távoli vörös fényt érzékelését a fitokróm receptor-család látja el, amelynek Arabidopsisban 5 tagja ismert : fitokróm A-E (Sharrock és Quail, 1989; Clack és mtsai., 1994).

A fitokrómok homodimer formában aktívak. Monomerjük egy közel 125 kDa-os apoproteinből és egy kovalensen kötött lineáris tetrapirrol kromofórból áll. Egyes fitokróm molekulák különböző mértékű aminosav-szekvencia hasonlóságot mutatnak, amellet, hogy szerkezeti felépítésük azonos.

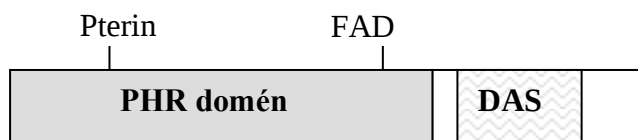
A molekula három fő egységre tagolható (4 ábra). Az N-terminális részen található kromofórkötő domén (chromophore binding domain, CBD), mely tartalmazza a kromofór kötő helyet, azaz egy konzervált helyzetű ciszteint, melyhez tio-észter kötéssel kapcsolódik a lineáris tetrapirrol lánc. A kromofór a fényérzékelésért felelős. A kromofór környezetében található 60 aminosavnyi szakasz, amelynek funkciója a kromofór mikrokörnyezetének kialakítása, nagyfokú variabilitást mutat. Feltételezhetően ez a régió eredményezi – az azonos kromofór ellenére - a fitokrómok részben eltérő fényabszorpciós spektrumát. A következő szakasz az úgynevezett csuklórégió, mely az N-terminálist köti össze a C-terminális résszel. A csuklórégió fontos szerepet játszik a fényindukált konformáció-változásban, egy konzervált szerin aminosav a biológiai aktivitáshoz szükséges foszforilációs helyet szolgáltatja. Míg a fehérje N-terminálisa valószínűleg a fény érzékelés funkcióját látja el, a C-terminális szakasz szerepe az érzékelt jel továbbítása (Quail és mtsai, 1995). Ezen belül található egy regulátor

domén, vagy más néven Q-box (Quail-box), mely erősen konzervált a fitokróm családon belül. Ebben a doménben egyes aminosavak cseréje teljes funkcióvesztést okoz, a fényérzékelés képessége viszont megmarad, ami bizonyítja az N- és C-terminális szakasz eltérő funkcióját. Másik fontos része a két dimerizációs domén, más néven PAS domén, melyek kapcsolódása egy azonos típusú másik fehérjével a homodimer kialakulását eredményezi. Továbbá a C-terminális szakaszon szekvencia-analízissel azonosítottak több lehetséges nukleáris lokalizációs szignált (NLS) (Sakamoto és Nagatani, 1996), ami arra utal, hogy a fitokróm molekulák a sejtmagban is megtalálhatók.

Fitokróm



Kriptokróm



4. ábra A növényi fitokrómok és kriptokrómok vázlatos szerkezete

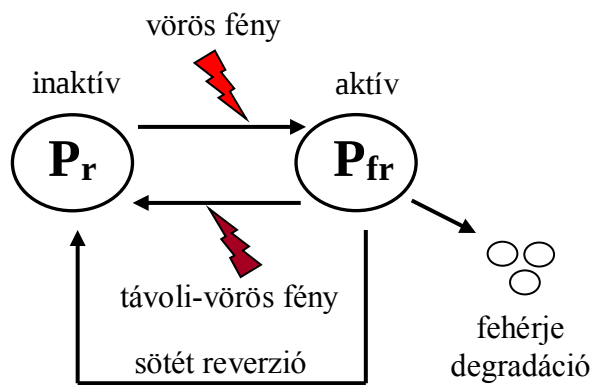
Az ábrán a csíkozott vagy színezett sávokkal a konzervált vagy körülírt funkcióval rendelkező doméneket jelöltük. CBD-kromofór-kötő domén, PAS-Per-Arnt-Sim homológ domén, CS-csuklórégió, Q-box- Quail-box, PHR- fotoliáz-homológ domén, DAS- DQXVP-acidic-STAES konzervált aminosavakat tartalmazó domén.

A 90-es évek elején különböző szervezetek szignál-fehérjéin végzett szekvencia-analízis azt a felfedezést hozta, hogy a fitokrómok regulátor doménje feltűnő hasonlóságot mutat a két komponensű jelátviteli rendszerek transzmitter egységének hisztidin-kináz doménjéhez (Schneider-Poetsch és mtsai., 1991). Ez a bakteriális rendszer két, egymást felismerő fehérjéből áll. Az első komponens a szenzor, melynek N-terminális régiója érzékeli az adott környezeti jelet, majd ez aktiválja a C-terminálisán elhelyezkedő transzmitter domént. A transzmitter kináz aktivitással rendelkezik: autofoszforilálja a benne található konzervált helyzetű hisztidin aminosavat. A második komponens a válasz-regulátor. A transzmitter az autofoszforilált hisztidinről a foszfát csoportot a válasz-regulátor fogadó moduljában lévő aszparaginsav aminosavra továbbítja. Az ilyen módon aktivált komponens kimeneti modulja

pedig közvetve vagy közvetlenül a célgénnek működését szabályozza (Parkinson és Kofoid, 1992). Később kimutatták, hogy a phyA Ser/Thr kináz aktivitással rendelkezik *in vivo* (Fankhauser és mtsai., 1999), ami kísérletesen is alátámasztja a fent vázolt hipotézist.

A filogenetikai elemzés azt mutatja, hogy a magasabb rendű növények evolúciójának korai fázisában duplikációval két kezdeti fitokróm vonal jött létre: a PHYA/C, valamint PHYB/D/E a vonal. Ezeken belül további duplikációkkal szétváltak a PHYA, PHYC, PHYB/D és PHYE oldalágak (Alba és mtsai., 2000). Ezen vonalak képviselői a legtöbb zárwatermőben megtalálhatók, kivéve a PHYE családot, mely csak a kétszikűekben fordul elő (Mathews és Sharrock, 1997). Az Arabidopsis fitokrómok közül a PHYB és a PHYD áll a legközelebbi rokonságban (80%-os aminosav-szintű szekvencia-azonosság). A családfa azonos ágán található még a PHYE is (55%). A PHYA csak kisebb fokú hasonlóságot mutat (48-52%), inkább más növényekben talált PHYA-homológokkal egyezik meg. A PHYC pedig egy önálló csoportot alkot, közeli homológjait még nem találták meg más szervezetekben sem, így távol esik a családfán (52%) mind a PHYB csoporttól, mind a PHYA-tól (Clack és mtsai., 1994).

A fitokróm fehérjék vörös fény ($\lambda_{\max}=660$ nm) abszorpciójára képes ún. P_r formában szintetizálódnak, mely biológiailag inaktív (5. ábra). Foton-abszorpció után konformáció-változás következtében aktív, ún. P_{fr} formába kerülnek, melynek elnyelési maximuma a távoli vörös fénytartományban ($\lambda_{\max}=730$ nm) van. A P_{fr} forma távoli vörös fény hatására visszaalakul P_r formává, azaz inaktiválódik. Ezt a jelenséget a fitokrómok fotokonverziójának nevezik. A visszaalakulás ugyan lassabban, de sötétben is végbemehet, ezt a folyamatot sötét reverzióknak nevezik (Furuya, 1993).



5. ábra Fitokróm fehérjék fotokonverziója

A egyes fitokrómok fényelnyelési tartománya nem teljesen megegyező, bár többé-kevésbé átfedő. A klasszikus fotokonverzió a phyA-n kívül pontosan leírja a család több tagjának biokémiai viselkedését, mivel azok elnyelési spektruma elválik a P_{fr} -t indukáló fény spektrumától. A phyB esetében a folyamatot a következőképpen írhatjuk le: egy etiolált növényben az összes jelenlévő fitokróm P_r formában található. Telítő vörös megvilágítás után 95%-uk P_{fr} formába kerül, mely mennyiség elegendő a phyB-indukált fényválasz elindítására.

Ha a megvilágítást sötét periódus követi, kb. 10 percen belül a P_{fr} molekulák 80-95%-a sötét reverzióval visszaalakul inaktív formába, a megmaradt P_{fr} mennyiség viszont kevés a jelátviteli út aktiválásához. A P_{fr} - P_r átalakulás még nagyobb mértékű és másodpercek alatt lejártszódik a vöröst követő távoli vörös megvilágítás folyamán. A phyA P_r formájának elnyelési spektuma sokkal szélesebb: lefedi a teljes látható fény skáláját, kisebb csúccsal a kék tartományban; a vörös-maximuma viszont eltolódott a távoli vörös irányába (700-710 nm), ami azt jelenti, hogy átfed P_{fr} indukáló tartománnyal (Quail és mtsai., 1995). Tehát a legnagyobb mértékű fotokonverzió távoli vörös fénnel érhető el, de ennek mértéke nem haladja meg a 30%-os $P_{fr}/P_{összes}$ arányt, mivel visszaalakulás ezen a hullámhosszon is végbemegy, így alakulhat ki egy egyensúlyi állapot a két forma között. A phyA esetében sötét reverzió nem figyelhető meg az egyszikűekben, viszont egyes kétszikűekben, például Arabidopsisban és mustárban igen (Drumm és Mohr, 1974). A P_r formával ellentétben a P_{fr} forma nagyon labilis, így a megvilágítás során gyorsan lebomlik (Hennig és mtsai., 1999a). Érdekes megfigyelés, hogy a phyA-indukált élettani jelenségek teljes kiváltásához elég a 0,1% P_{fr} jelenléte, ami magyarázat arra, hogyan képes a phyA válasz nagyon alacsony intenzitású fény hatására is megjelenni (Shinomura és mtsai., 1996).

2.2.2 Arabidopsis kriptokrómok

A kék és UV-A fényt ($\lambda=390-530$ nm) érzékelő kriptokróm családnak Arabidopsisban 2 tagja van, a kriptokróm 1 (CRY1) és kriptokróm 2 (CRY2). A kriptokrómok nagyfokú hasonlóságot mutatnak a bakteriális fotoliázokhoz, melyeknek az UV-B és UV-C hatására létrejövő DNS károsodás kék/UV-A fényfüggő javításában van szerepe. A növényi és állati kriptokrómok viszont nem rendelkeznek fotoliáz aktivitással (Todo, 1999).

A növényi kriptokrómok 70-80 kDa-os fehérjék. A fehérje szerkezeti felépítésében két fontos rész különíthető el (4. ábra) (Lin, 2002). Az N-terminálison elhelyezkedő PHR (photolyase-related) régió, mely homológ a DNS-fotoliázokkal, két nem-kovalensen kötött kromofórt tartalmaz: egy fénybegyűjtő pterint és egy katalitikus aktivitású FADH₂-t. A C-terminálist elfoglaló, változó hosszúságú ún. DAS domén csak a növényi kriptokrómokra jellemző. A különböző fajokból izolált kriptokrómok e szakasza csak igen gyenge homológiát mutat (14-30%), viszont 3 konzervált helyű és szekvenciájú rövid szakaszt hordoz. A domén a nevét is a DQXVP-acidic-STAES konzervált aminosav-szakaszok rövidítéséből kapta. A STAES szekvencia valószínűleg foszforilációs helyeket tartalmaz. Csak a C-terminális rész túltermelése folyamatos fényválaszt okoz, ami azt jelzi, hogy sötétben a C-terminális

aktivitása gátolt, majd kék megvilágítás során az N-terminális a kromofórok fényabszorpcióján keresztül feloldja a gátlás alól a C-terminális jeltovábbító doménjét (Yang és mtsai., 2000).

2.2.3 A fotoreceptorok szövetspecifikus kifejeződése

A fitokrómok és kriptokrómok szövetspecifikus kifejeződésének jellemzése már a gének izolálása után elkezdődött. Kétféle vizsgálati módszert használtak: promóter- β -glükoronidázt (GUS) hordozó transzgénikus növény hisztokémiai festését, és mRNS-mennyiség vizsgálatát növényi extraktumokból.

GUS festés segítségével megvizsgálták a *PHYA*, *PHYB*, *PHYD* és *PHYE* promóter-aktivitásának helyét etiolált és fényen nőtt csíranövényben, valamint kifejlett növényekben is (Somers és Quail, 1995a, 1995b; Goosey és mtsai., 1997). Ezen kísérletek alapján elmondható, hogy mindegyik promóter működik az összes szervben, de intenzitásuk eltérő. A *PHYA* és *PHYB* kifejeződése az egész növényben meglehetősen egyenletes volt, míg a *PHYD* és *PHYE* jele leginkább a hajtás fiatal fotoszintetizáló szöveteiben volt jellemző. Egy másik publikáció (Clack és mtsai., 1994) a fitokróm mRNS-einek mennyiségét vizsgálta 2-4 hetes növények szerveiben. Ez a kísérlet azt az eredményt hozta, hogy a *PHYA* mRNS-e a gyökérben alacsonyabb szinten, míg a levélben, a szárban és a virágban azonos szinten termelődik. A *PHYD* és *PHYE* is hasonló mintázatot mutat. A *PHYB* mRNS-ből a levélben viszonylag kevesebb van, mint a gyökérben és a szárban; a *PHYC* mRNS-e pedig minden szervben egyforma szinten halmozódik fel.

A *CRY1* gén kifejeződését eddig csak Northern analízissel vizsgálták. 5 hetes növényben a *CRY1* mRNS a levélben kevesebb, a szárban és a virágban nagyobb mennyiségben fordul elő, viszont egyáltalán nem kimutatható a gyökérben (Ahmad és Cashmore, 1993). A *CRY2* gén szövetspecifikus kifejeződésére nézve még nem publikáltak adatokat.

Sajnos a jelenleg rendelkezésre álló adatok nemegyszer egymásnak ellentmondóak, és nem alkalmasak az átfogó összehasonlításra.

2.2.4 A fényreceptorok által irányított folyamatok

Mivel a természetes fehér fény magában foglalja a morfogénikusan aktív kék és vörös hullámhosszú tartományokat is, így a besugárzó fény hatására mindkét típusú receptor egyszerre aktiválódik, de a fény spektrális eloszlásától függően akár ellentétes hatást gyakorolhatnak az élettani jelenségek szabályozására. Mivel mindkét hullámhossz-tartomány és az ezeket érzékelő fitokróm és kriptokróm fotoreceptorok szinte ugyanazon élettani folyamatokat szabályozzák, így a funkciójukat érdemes együtt áttekinteni.

Különböző fényválaszokat különböztetünk meg a kiváltáshoz szükséges fény intenzitásától, valamint a megvilágítás frekvenciájától függően. A fitokrómok esetében a $P_{fr}/P_{összes}$ arányt igénylő, azaz a nagyon alacsony fényintenzitással kiváltható válaszokat VLFR-nek (very low fluence response), a gyenge fényre adott választ LFR-nek (low fluence response), az erős fényre adott választ pedig a HIR-nak (high irradiance response) nevezzük. A VLFR és a távoli vörösre adott HIR a phyA sajátja, míg a LFR és a vörös HIR a phyB-hez köthető (Yanovsky és mtsai., 1997). A phyD és a phyE is az LFR-típusú választ közvetítik (Devlin és mtsai., 1999). A phyC által közvetített fényválasz intenzitásfüggéséről nem áll rendelkezésre adat. Ez abból ered, hogy *phyC* mutánsa mai napig nem izoláltak, így jellemzése még várat magára.

A kriptokrómoknál szintén megfigyelhető a feladatok ilyen irányú szétválasztása: a *cry1* a nagyobb intenzitású kék fényen a domináns, míg az alacsonyabb intenzitáson a *cry2* tölti be a kék-fény receptor funkcióját. A *cry2* gyakran kiegészíti a *cry1* működését a nagyobb intenzitású tartományokban (Mockler és mtsai., 1999). Fontos megjegyezni, hogy egyes esetekben a phyA is közrejátszhat az alacsony intenzitáson a kék fényre adott válaszban, hiszen a phyA elnyelési spektrumának kék fényben is van egy kisebb maximuma. Továbbá a *cry1* mutánsok is sérültek ebben a válaszban, de csak a phyA jelenlétében (Ahmad és Cashmore, 1997). Ez azt mutatja, hogy a *cry1* ebben a tartományban nem mint fotoreceptor, hanem mint a phyA által elindított jelátviteli lánc egyik eleme van jelen.

A fotoreceptoroktól kiinduló jel sorsát általánosan a következőképpen írhatjuk le: a fényabszorpció után a fotoreceptorok konformáció-változást szenvednek, ezáltal aktiválódnak. Az aktív forma elindít egy vagy több jelátviteli láncot, melyek végső soron fényszabályozott célgénekre irányulnak. Mai ismereteink szerint a vörös fény receptorok többféle jelátviteli utat is aktiválnak (Kevei és Nagy, 2003). Az egyik lehetőség a citoplazmában a fotoreceptoroktól kiinduló foszforilációs folyamatok szabályozása. A foszforilált szignáltraszdukciós elemek több lépés után közvetítik a jelet a sejtmagba a

transzkripciós faktorokhoz. Egy másik jelátviteli út során a fotoreceptorok szállítják a sejtmagba a jelet, ahol akár közvetlenül kapcsolódhatnak transzkripciós faktorokkal. A kriptokrómok viszont eleve a sejtmagban halmozódnak fel sötétben, így a jelátviteli út nagyrészt a sejtmagra korlátozódik. A célgének transzkripciós szintű szabályozása lehet indukció vagy represszió is. Ezek együttes hatása fogja végül az élettani fényválaszt eredményezni.

A növényi fotoreceptorok számos morfogénikus átalakulást irányítanak, melyeket összefoglalóan fotomorfogenezisnek nevezünk. Az élettani folyamatokban játszott szerepüket a mutáns vonalaik analízisével vizsgálják, a közöttük létrejövő kölcsönhatást pedig dupla, vagy többszörös mutánsok összehasonlításával. A következőkben a fényreceptorok összefonódó szerepét mutatjuk be néhány fotomorfogénikus folyamatban.

Csírázás

A csírázást különböző fényviszonyok mellett más és más fitokróm indukálja. Vörös fényben a phyB segítségével kezdődik meg a csírázás, de a phyA is kiegészíti a hatását. Ezt a folyamatot a phyD kis mértékben gátolja. Távoli vörös fényben viszont a phyA indukciót a phyB jelenléte gátolja (Shinomura és mtsai., 1996). Ezen túl fontos szerepe van a phyE receptornak, mely meglepő módon ebben a hullámhossz tartományban is aktív, s hatását bizonyítottan nem a phyA jelátviteli úton keresztül éri el, mint a phyB. A csírázást kék fényben is a phyA és a phyE jelenléte biztosítja, míg a kriptokrómok nem, vagy csak nagyon kis mértékben befolyásolják a folyamatot (Hennig és mtsai., 2002).

De-etioláció

A de-etioláció azoknak a fotomorfogénikus átalakulásoknak az összefoglaló neve, melyek fény hatására a sötétben nőtt növény habitusát megváltoztatják. A sötétben nőtt, azaz etiolált csíranövényeket a megnyúlt hipokotil, görbült hipokotilkampó, zárt, nem fotoszintetizáló, így sárgás sziklevelek jellemzik. A természetben a földben növekvő és a fény, valamint a föld felszíne felé törekvő csíranövények rendelkeznek az etiolált csíranövényekre jellemző morfológiával. A zárt, kisméretű sziklevelek a talajban való haladást segítik, a visszahajolt hipokotilkampó pedig a legfontosabb részt, a hajtásmerisztémát óvja a mechanikai behatásoktól. A hipokotil addig nyúlik, míg a szikleveleket a felszín fölé nem emeli. Azután viszont a fény leállítja a hipokotil növekedését, a hipokotilkampó kiegyenesedik, a sziklevelek kinyílnak, a felületük gyorsan növekszik és elkezdene fotoszintetizálni, tehát összeségében felveszik a fényen nőtt csíranövényre jellemző megjelenést, de-etiolálódnak. A legkönnyebben mérhető folyamat ezek közül a hipokotilhossz változása, ezért leginkább ezen keresztül szokták vizsgálni a de-etiolációt,

olyannyira, hogy hipokotilhossz-mutánsként izolálták a főbb fotoreceptorokat (phyA, phyB, cry1), valamint a fény jelátviteli út legtöbb elemét is ilyen tulajdonság alapján találták meg.

Vörös fényben a phyA és a phyB külön-külön úton serkentik a hipokotil-megnyúlás gátlását, közben viszont a phyA gátolja a phyB pozitív hatását (Canton és Quail, 1999). A többi fitokóm szerepe elhanyagolható ebben a válaszban, egyszeres mutánsuk nem mutat eltérést a vad típushoz képest. Távoli vörös fényben a phyA az egyedüli aktív fotoreceptor, a phyE csírázás során megfigyelt pozitív hatása itt nem tapasztalható. Kék fényben egymástól függetlenül 3 fényreceptor is irányítja a folyamatot: a cry1, cry2 és a phyA. Továbbá, ha rövid kék vagy távoli vörös kezelés előzi meg a vörös megvilágítást, úgy még erőteljesebb megnyúlás gátlást kapunk. Ebben az esetben a cry1 kékben, illetve a phyA távoli vörösben elősegíti a phyB hatását (Casal és Sanchez, 1998). Ezen felül *phyAphyB* dupla mutáns háttérben a vörös előkezelést követő kék fénykezelés alapján kimutatták, hogy a phyD-nek szintén hasonló szerepe van a cry1 aktivációjára (Poppe és mtsai, 1998; Hennig és mtsai., 1999b). A fehér fényben, ahol az összes fényreceptor aktivizálódik, a phyB által közvetített válasz a meghatározó.

Árnyék elkerülés

Kifejlett Arabidopsis növények közül az árnyékban nőttek jellegzetesen más habitust mutatnak, mint a fényen nőtt növények. A növények levelei a rajtuk áteső fény spektrális eloszlását erősen megváltoztatják: távoli vörös fényben gazdagabb az árnyékuk. Így az árnyékot alacsony vörös/távoli vörös hullámhossz arány jellemzi, mely körülmény kiváltja az úgynevezett árnyék-elkerülési válaszokat. Mivel a növények nem tudnak elmozdulni a nem megfelelő környezetből, megpróbálnak a növekedés irányát vagy gyorsaságát befolyásolva „kinőni” belőle. Ha ez nem sikerül, akkor az életciklust lerövidítve létrehozzák az utódnemzedéket. Az árnyékre jellemző megvilágítás hatására az Arabidopsis a rozetta-internódiumok és a levélszárak megnyúlásával, valamint korai virágzással válaszol. Ebben a fényválaszban a phyB, phyD és phyE aktiválódik. Ezek közül a phyB a domináns, a másik kettő csak kiegészítő szerepet játszik, mivel hatásuk csak phyB hiányában észlelhető, valamint nem is hatnak az összes árnyék-elkerülési válaszra (Devlin és mtsai., 1998; 1999). Ezen túl a phyA antagonisztikus a phyB hatásával, azáltal, hogy csökkenti a a phyB P_{fr} formájának mennyiségét, akárcsak a hipokotil-megnyúlás gátlása esetén (Casal, 1995). A sűrűn egymás mellett növő növényekről visszaverődő fény az árnyék fényviszonyaihoz nagyon hasonló környezetet hoz létre. A szomszédos növények érzékelése az árnyék-elkerülési válaszokkal megegyezik. Ebben az esetben is a phyB irányítja a növekedést, a phyA és a cry1 pedig a phyB érzékenységet változtatja (Devlin és mtsai., 1998).

Virágzás

A növények életében a következő fontos morfogénikus változás a virágzás. A virágzás indukcióját szintén eltérő módon szabályozzák a különböző fotoreceptorok (Guo és mtsai., 1998). Az Arabidopsis virágzását a hosszú nappalos környezet, azaz a napi 12 óra vagy annál hosszabb megvilágítás indukálja, de képes rövidebb napi megvilágítás mellett is virágozni. A virágzás idejét a fényreceptorok csak hosszú nappalos körülmények között befolyásolják, nem-induktív rövid nappalon nem játszanak szerepet (Mouradov és mtsai., 2001).

A virágzás indukciójának fotoperiódikus szabályozását az ún. externál koincidencia modell írja le (Yanovsky és Kay, 2002), mely kimondja, hogy ha a cirkadián ritmus szerint termelődő központi jelentőségű fehérje, a CONSTANS (CO) mennyisége elér egy kritikus értéket és ez egybeesik a fotoreceptorok aktiválásával, akkor a CO és a fény jelátviteli út bizonyos elemei együttesen hatva megnövelik egyes virágzás elindításáért felelős gének átíródását. Tehát a modell szerint a fényreceptorok egyrészt a cirkadián óra beállításán keresztül, másrészt közvetlenül a CO-aktivációt szabályozva kettős szerepet játszanak a virágzásban.

A fény különböző hullámhosszú spektrális komponensei eltérő hatást gyakorolnak a CO aktiválására: a vörös fény gátolja, a távoli vörös és a kék fény pedig serkenti. A gátlást a phyB közvetíti, melyet a phyD és phyE kis mértékben kiegészít; a fő serkentők pedig a cry2, a cry1, valamint a phyA. A köztük lévő bonyolult kapcsolatot 22°C-on a következőképpen lehet jellemezni: vörös fényben a phyB jelátviteli útja gátolja a virágzást kiváltó gének indukcióját, ebben kis mértékben támogatja a phyD és phyE. Távoli vörös fényben a phyA egyrészt ennek a gátlásnak a megszüntetésén keresztül is, másrészt közvetlenül is kifejti serkentő hatását. Kék fényben pedig a cry2 a többi receptor jelátviteli útjától függetlenül gátolja a phyB-t, míg az indukciót a phyA és a cry1 fotoreceptorral közösen közvetítik (Mockler és mtsai., 2003). Viszont ha alacsonyabb hőmérsékleten jelentkezik (16°C) az induktív körülmény, úgy a phyB-ről a hangsúly eltolódik a phyD és phyE irányába, valamint a kék fényben a cry2-ről a phyA-ra (Halliday és Whitlam, 2003). Ez a megfigyelés is azt mutatja, hogy a fényreceptorok jelentősége - akár egy adott folyamat szabályozásában is - a környezeti körülményektől függően megváltozhat.

Fototropizmus

Oldalirányú kék fényű megvilágítás hatására a sötétben nőtt Arabidopsis növények hipokotilja a fényforrás felé fordulva növekszik. Mivel ebben a folyamatban a növekedés irányának a megváltoztatásáról van szó, a folyamatot vezérlő faktorok a hajtás osztódási zónájában koncentrálnak. Ezt a folyamatot a harmadik fotoreceptor-család egyik tagja, a

kék/ UV-A hullámhossz-tartományban elnyelő fototropin, a phot1 irányítja (Liscum és mtsai., 1995). Habár a fitokrómok és a kriptokrómok nem szükségesek a fototropizmus indukciójához, mégis módosítják a fényválaszt (Janoudi és mtsai., 1997; Lascève és mtsai., 1999). A cry1 vagy cry2 hiányában az elhajlás mértéke csökken. Bár a vörös fény nem idéz elő a hipokotilban fototropikus változást, a kék megvilágítás előtti vörös előkezelés erősíti a fényválaszt, ami azt mutatja, hogy a phyA és phyB pozitívan befolyásolja az elhajlás mértékét. Kimutatták, hogy alacsony intenzitású vörös fényben a phyA által közvetített trofikus jelátviteli út egyik eleme, az *nph4*, ami egyben egy auxin indukált faktor is (Stowe-Evans és mtsai., 1998). Ez lehet a fototropizmus szabályozásában az egyik kapcsolódási pont a fényreceptorok és az auxin jelátviteli utak között.

A gyökérben is megfigyelhető, hogy a kék fény pozitív elhajlást idéz elő, de a gravitropizmus hatása elnyomja ezt a jelenséget. Gyökérben mind a fény, mind pedig a gravitáció érzékelése a gyökérsüveghez köthető (Mullen és mtsai., 2000).

2.2.5 A fitokrómok és kriptokrómok a cirkadián óra input elemei

Mivel munkánk a fotoreceptorok cirkadián óra általi szabályozását vizsgálja, ezért lényegesnek tartjuk hangsúlyozottan tárgyalni a fotoreceptorok cirkadián input útban betöltött szerepét.

Az egyes fotoreceptorok szerepét az input útban, mint más fényindukált folyamatokban is, a mutánsok analízisén keresztül tárták fel. Az input útban helyet foglaló elemek működésképtelenné válása megváltoztathatja a szabadon futó periódus hosszát, illetve az óra fény általi beállíthatóságának elvesztését okozhatja. A szabadon futó ritmus periódushosszának fényfüggését FRC görbével jellemezhetjük. Amennyiben a vizsgálandó mutáns FRC görbéje nem párhuzamosan fut a vad típuséval, hanem valamelyik tartományban szétnyílik, akkor a mutációt szenvedett gén az adott intenzitás jelét közvetítő input útban aktív. Ha viszont minden intenzitásnál azonos mértékben különböznek egymástól, azaz a két görbe meredeksége megegyezik, úgy a periódushossz fény-független módon változik. Ez egy indikáció arra nézve, hogy a mutáns nem a fény input útban sérült. A beállíthatóság folyamatát az ún. „resetting” kísérlettel megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy az adott hullámhosszú fény képes-e újraindítani az órát a mutáns vonalban, azaz a fény hatását közvetítő jelátviteli út sérült-e. A fáziseltolódás mértéke pedig az jelzi, hogy mekkora szerepet játszik a vizsgált faktor az óra fény általi beállításában.

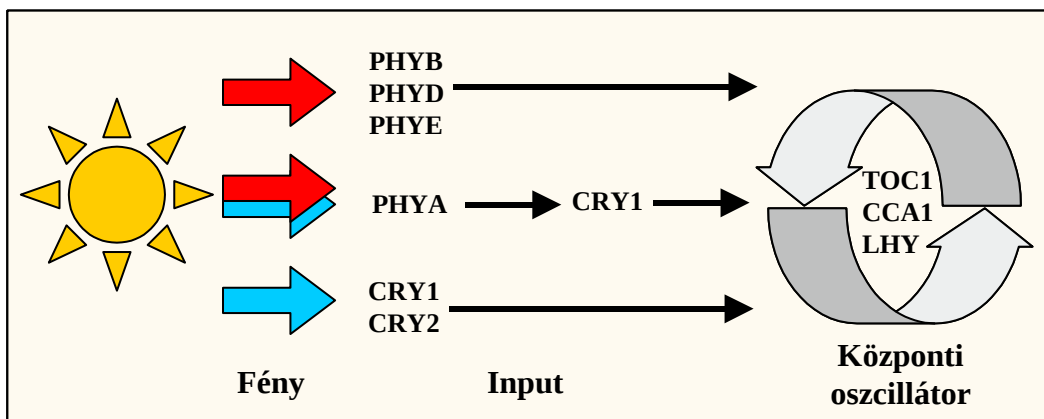
Először a legismertebb fotoreceptorokról bizonyították be, hogy közvetíthetik a fényszignált az óra felé (Somers és mtsai., 1998a). A kísérletekben a *CAB2* promóter által vezérelt szentjánosbogár luciferáz (*CAB2::LUC*) transzgén segítségével követték nyomon a cirkadián órára gyakorolt hatást. A *phyB* nullmutáns periódushossz-növekedést eredményezett nagy intenzitású vörös fényen vizsgálva, míg kék fényen nem mutatott eltérést. A fényintenzitás alacsony tartományában a *phyA* mutáns cirkadián folyamatai különböztek a vad típusétól, a spektrum vörös és kék tartományában. A *cry1* hatása megnyilvánul mind az alacsony, mind a magas intenzitású kék fény alkalmazása mellett, valamint alacsony intenzitású vörös fényben. Mivel a *cry1* alacsony intenzitású fénnel kiváltható válaszokat nem indukál, az eredmény azt sugallja, hogy ebben az intenzitás-tartományban a *cry1* nem fotoreceptoroként működik, hanem mint a *phyA* jelátviteli láncában szerepet játszó faktor.

Később további fotoreceptorok szerepét is bizonyították az órát beállító folyamatokban, valamint az eddig ismert elemekről még több információ született (Devlin és Kay, 2000). A *phyAphyB* dupla mutáns vonalakban erősebb periódushossz növekedés figyelhető meg, mint a egyszeres mutánsokban, tehát a *phyA* és *phyB* hatása összeadódik. A *phyD* és *phyE* közreműködését is sikerült kimutatni a *phyAphyB* dupla mutáns háttérben: a *phyB*-hez hasonlóan a nagy intenzitású vörös fényt jelét közvetítik a cirkadián óra felé. A *cry2* hatása csak *cry1* hiányában volt detektálható, ebből következik, hogy a *cry2* redundánsan hat a *cry1* fotoreceptorral a kék fény input útban.

Meg kell említeni, hogy nem áll rendelkezésre adat a *phyC* cirkadián rendszerben játszott szerepével kapcsolatban. Ennek az a magyarázata, hogy csak ebben az évben azonosítottak *phyC* hiányos mutánst, aminek jellemzése még folyamatban van (Peter Quail szóbeli közlése). Másik megközelítési lehetőség a négy másik fitokróm nélküli nullmutáns növény vizsgálata vörös fényben. Ilyen mutáns létezik, de csak kék fény jelenlétében csírázik és növekszik megfelelően, valamint életképessége meglehetősen lecsökkent (Mazella és mtsai., 2001), ami megnehezíti a cirkadián óra jellemzését.

Összegezve a fotoreceptorok szerepét az input folyamatokban (6. ábra): a legfontosabb fényreceptorok vörös fényben a *phyB*, távoli vörös fényben a *phyA*, kék fényben pedig a *cry1*. A *phyB*, *phyD* és *phyE* a magas intenzitású vörös fény szignált, a *cry1* és a *cry2* a nagy intenzitású kék fényt, a *phyA* pedig mindkét hullámhosszú fény alacsony intenzitással kiváltott jeleit közvetíti a központi oszcillátor felé. A *phyA* által mediált folyamatokban pedig a *cry1* későbbi szakaszban szerepet játszó jelátvivő elem.

Ezen a ponton érdemes visszatérni még egyszer a fotoreceptorok szerepére az állatok cirkadián órájának működésében. Az ecetmuslica kriptokróm-homológja a *cry^b*, melynek



6. ábra A cirkadián fény input útban szerepet játszó fotoreceptorok

hiányában a központi óraelemek ciklikus kifejeződése megszűnik, valamint jelentősen csökken az óra kék fénnel való beállíthatósága (Emery és mtsai., 1998). Ez arra enged következtetni, hogy a *cry^b* egyrészt a központi oszcillátor része, mivel mutánsa aritmikus; másrészt egyike a fény beállító jelét közvetítő fényreceptoroknak. Ezt az indokolja, hogy a mutációja hatására az óra fényérzékenysége nem szűnik meg teljesen. Az állatokban valószínűleg a vörös fényreceptorok szerepét betöltő rodopszinok lehetnek a kriptokróm kiegészítő partnerei az input útban. Egérben és emberben két kriptokróm-homológot azonosítottak. Ezek közül az egyik mutációja a vad típusétól alig különböző szabadon futó periódushosszt eredményez, míg mindkettő hiánya állandó körülmények között a ritmicitás teljes elvesztéséhez vezet, azaz az állatok oszcillátorának elengedhetetlen elemei, viszont nem input elemek (van der Horst és mtsai., 1999).

Felmerült a kérdés, hogy növényekben a legfontosabb input elemek hiányában fennmarad-e a ritmus, vagyis az állatokhoz hasonlóan kettős, a fényérzékelésen túlmutató funkciójuk is lehet-e a fényreceptoroknak. Akkor tudnánk egyértelműen eldönteni a kérdést, ha az összes fényreceptort kiiktatnánk a rendszerből. Legnagyobb valószínűség szerint ez a növény nem lenne életképes, hiszen az előbbieken áttekintett fontos élettani folyamatok indukálójaként és szabályozójaként a fényreceptorok esszenciálisak a növények fejlődésében. Feltehetően a legfontosabb vörös és kék fény receptorok elvesztése (*phyA*, *phyB*, *cry1*) okozhatja a legsúlyosabb változást, hiszen -mai ismereteink szerint- a többi receptor inkább csak kiegészítő szereppel bír. Ezért Yanovsky és munkatársai 2000-ben a fotoreceptor mutánsok különböző kombinációjának (*phyAphyB*, *cry1cry2*, *phyAphyBcry1cry2*) ritmikus levélmozgását vizsgálták meg fehér fényben. A kísérletben mindegyik növény határozott napi

ritmust mutatott. Ezen túl a cirkadián órájuk fénnel továbbra is átállítható volt. Ez utóbbi adat meglepő, hiszen a négyszeres mutáns a de-etioláció folyamatában szinte vaknak tekinthető. Ezek alapján feltételezhetjük további fontos cirkadián óra specifikus fényérzékelő fehérjék létét. Erre jelölt lehet például a ZTL és családja, mely szerkezeti hasonlóságot mutat a harmadik fényreceptor családdal, a fototropinokhoz (Somers, 2001). Összegezve ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *ecetmuslica*- és emlős-rendszerrel ellentétben, a növényekben a kriptokrómok és a fitokrómok nem szükségesek a ritmus előállításához és/vagy fenntartásához, csak a fény-beállításhoz.

2.2.6 A fényreceptorok mennyiségének és aktivitásának szabályozása

Egy folyamat lefolyásának irányítására számos lehetőség adódik, akár egyetlen résztvevő fehérjén keresztül is. Ez történhet a fehérje mennyiségének vagy biológiai aktivitásának megváltoztatásával, termelődésének és működésének több pontján. Legelső lépésként a fehérjét kódoló gén átíródása és/vagy a fehérje termelődése lehet a szabályzás célpontja. A transzkripció elindítása vagy leállítása, illetve a transzkripció szintje befolyásolhatja a fehérje mennyiségét. A transzkripció során termelődött mRNS-mennyisége is változhat valamilyen szabályozó faktor hatására: a változás eredhet a stabilitás növekedéséből vagy csökkenéséből. Az mRNS-ről történő fehérje-átírás elindítása valamint sebessége is hat a fehérjemennyiségre. Legtöbb fehérje inaktív formában termelődik, így aktivációjuk szükséges a biológiai funkció betöltéséhez. Az aktiváció sokféle fehérjemódosítás lehet. Csak a legelterjedtebbeket említve: fehérje-fehérje kölcsönhatás, ami lehet homo- vagy heterodimerizáció; enzimatis hasítás; foszforiláció. Gyakran ezek közül több módosítás is szükséges az aktív forma létrejöttéhez. A fehérje sejten belüli elhelyezkedése is befolyásolja az adott sejtben a fehérje részvételével zajló folyamat aktivitását. Az aktív fehérje akár újra inaktiválódhat, és ilyen formában tárolódhat az újabb felhasználásig. A fehérje akár aktív, akár inaktív formában degradálódhat, s gyakran a két forma eltérő érzékenységgel a lebomlást kiváltó különböző hatásokra.

A növényi fotoreceptorok igen intenzíven tanulmányozott fehérjék, így a többi fehérjéhez képest viszonylag sok adat áll rendelkezésre a szabályozásukat illetően. A leggyakrabban tanulmányozott szempont a fény hatása a fotoreceptorok kifejeződésére és aktivitására. A fotoreceptorok fény általi regulációja több úton is létrejöhet. Ha a receptorfehérjék a fényabszorpció után saját tulajdonságaikat változtatják meg, akkor autoregulációs folyamatról beszélhetünk. Feltételezhetjük olyan folyamat létét, ahol egy aktivált fényreceptor közvetlenül kapcsolódva egy másik típusú fényreceptorhoz, módosítja annak aktivitását. Ezen kívül a

fotoreceptoroktól elinduló fény jelátviteli út tagjai indirekt módon is visszahathatnak a kezdeti elemekre, azok átíródását vagy a fehérje sajátságait megváltoztatva. Ezekre a kapcsolatokra közvetve a fényszabályozott folyamatokban a különböző fényviszonyok egymásra hatásából is következtethetünk.

A fény szabályozó hatása a génexpresszió szintjén is megjelenik. Korai kísérletekben a fitokróm promóter- β -glükuronidáz (GUS) riportergén konstrukciók segítségével írták le a transzkripció erősségét. Etiolált csíranövényben a *PHYA* promóter-aktivitása megvilágítás után csökken, a *PHYB* promóteré viszont megnő (Somers and Quail, 1995a), míg a *PHYD* és *PHYE* promóterek működését nem befolyásolja a fény (Goosey és mtsai., 1997). A kriptokrómok promóterének regulációjáról nem áll rendelkezésre adat.

A fényindukált génkifejeződés vizsgálata során azonosítottak konzervált promóter-szakaszokat, melyek a fényhatás közvetítéséért felelősek. Ezeket összefoglaló néven fény-reszponzív elemeknek (light-responsive element, LRE) nevezzük. Ezeknek több típusa van, például a GATA motívum, a GT motívum és a cirkadián óra központi elemeinél már említett G-box. Az LRE szekvenciák általában megtalálhatók a fényszabályozott transzkripciót mutató gének promóterében (bár ez nem általános érvényű) és ez fordítva is igaz: az LRE jelenléte nem feltétlenül jelenti azt, hogy a promóter fényszabályozott (Arguello-Astorga és Herrera-Estrella, 1996). Az egyes motívumok nem specifikusak egy adott hullámhosszra, illetve egy-egy fényreceptorra. Kimutatták, hogy a különböző LRE motívumok kombinációja biztosítja a promóterek megfelelő válaszadási képességet. Egy LRE jelenléte gyökeresen más kifejeződést biztosít egy adott típusú megvilágításban, mint két különböző LRE kombinációja (Chattopadhyay és mtsai., 1998). Valószínűleg a különböző LRE motívumokhoz a fény jelátviteli útban elhelyezkedő specifikus transzkripciós faktorok kapcsolódnak, ami lehetőséget nyújt több fényreceptortól elinduló jel integrációjára, bár nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget sem, hogy ez már egy korábbi lépésnél végbemegy.

Számos gén promóterében azonosították az LRE szekvenciák jelenlétét, például a cirkadián óra által is szabályozott *CAB* gének, az *LHY* és *CCA1*, a csalkon szintáz (*CHS*) és számos fotoszintézissel kapcsolatos gén promóterében. A fitokrómok közül a *PHYA* génjéről már igen korán kimutatták, hogy a gén-terméke, azaz a phyA fehérje, pontosabban az általa aktivált jelátviteli út gátolja a kifejeződését. Ezzel összhangban az egyszikűekben, például a rizs és a zab esetében is, a *PHYA* promóterben 3 funkcionálisan aktív DNS szekvencia található: két konstitutív, szinergikusan ható GT-box típusú pozitív elem, melyek az aktív fitokróm hiányában magas szintű transzkripciót eredményeznek; valamint egy negatív elem, amelyre a kapcsolódó represszor fehérje a fényaktivált fitokróm hatására meggátolja a pozitív

elemekre kötődő faktorok hatását, ezáltal megszüntetve az átíródást (Bruce és mtsai., 1991). Kétszikű növényekben *PHYA* génjeinek promóterében e három elem homológjai nem találhatóak meg, továbbá a többi fitokróm és kriptokróm gének promóterében sem mutattak ki specifikus fényszabályozott szekvenciákat.

Az mRNS-felhalmozódás szintjén hasonló fényérzékeny viselkedést mutattak a fotoreceptorok. Northern analízissel kapott adatok azt mutatták, hogy a 7 napos etiolált csíranövény *PHYA* mRNS szintje mind vörös mind fehér fénykezelés után is jelentősen csökkent, míg a többi fitokróm mRNS-mennyisége változatlan maradt (Clack és mtsai., 1994). Még jobban megmutatkozik a különbség a sötétben és a folyamatos fehér fényen nőtt csíranövények összehasonlításakor. A *PHYB* mRNS viselkedése a két kísérletben nem teljesen egyezik meg. Az összehasonlítás azonban nem teljesen megbízható, mivel a Northern analízisből származó adatokat nincsenek számszerűsítve, a szerzők a megközelítőleg 10-szeres eltérést tekintették különbségnek. Kétszikűekben (pl. *Arabidopsis*-ban) a *PHYA* fehérjét kódoló gén sajátosága, hogy 3 aktív transzkripcionális start-hellyel rendelkezik (Canton és Quail, 1999). Ezekről kiindulva különböző hosszúságú mRNS-ek íródnak át, ezek viszont transzláció után megegyező szekvenciájú fehérjéket eredményeznek. Sötétben a legnagyobb méretű transzkriptum (mRNS1) a meghatározó, fényben viszont ennek legnagyobb része gyorsan lebomlik. A két kisebb transzkriptum (mRNS2, mRNS3) sokkal kevésbé fényérzékeny, de mennyiségük csak hosszabb fénykezelés után közelíti meg az mRNS1 szintjét. Különbség mutatkozik a szöveti eloszlásukban is. Habár sötétben a hajtásban és a gyökérben is az mRNS1 van jelen legmagasabb szinten, a gyökérben az mRNS1 aránya a másik két transzkriptumhoz képest sokkal kisebb, mint a föld feletti részekben. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a két növényi rész össz *PHYA* mRNS-mennyisége eltérő intenzitással válaszol a fényre. A fényben nevelt csíranövények hajtása a sötétben nőttek *PHYA* mRNS-ének csak 20%-át tartalmazza, míg ez az arány a gyökérben majdnem 80%. A kriptokrómok mRNS-szintje állandónak tekinthető, nem változik lényegesen semmilyen fénykezelés hatására (Ahmad és Cashmore, 1993; Lin és mtsai., 1998). Ezen adatok alapján a kriptokrómok gének kifejeződésére a fény nem gyakorol jelentős hatást.

A fotoreceptor fehérjék mennyiségének fényfüggő változását már évtizedekkel ezelőtt leírták. E tulajdonságuk alapján megkülönböztethetünk fény-labilis és fény-stabil fitokrómokat (Quail és mtsai., 1973). Az első csoportba a *phyA* tartozik. Etiolált növényben a szintje meghaladja a többi fitokróm együttes mennyiségét, de a fehérje fényen igen gyorsan degradálódik. Vörös fénykezelésre 3 óra alatt a fehérje mennyisége az etioláltnak közel 5%-ára esik vissza. Távoli vörös kezelésre lassabban csökken: 5 óra folyamatos megvilágítás után

a kezdeti mennyiség 25%-ára csökken, ami a további kezelés folyamán már nem változik (Hennig és mtsai., 1999a). Ebből arra következtethetünk, hogy maga a phyA, valamint más fitokrómok is szerepet játszanak a fehérje degradációjának indukálásában. A fény-stabil csoportba tartozik a további 4 fitokróm fehérje. Ezen belül is további két alcsoportot találunk. Az első alcsoportba tartozó phyB és phyC fehérje mennyisége ötödére csökken folyamatos vörös fény hatására. Ezzel ellentétben a másik alcsoport tagjai, a phyD és phyE fehérjeszintje nem, illetve kis mértékben változik fényen tartva (Sharrock and Clack, 2002). Etiolált csíranövényben az összes fitokróm aránya a következőképpen alakul: phyA:B:C:D:E=85:10:2:1,5:1,5. A folyamatos fényen nőtt csíranövényekben ez az arány: 5:40:15:15:25 (Sharrock and Clack, 2002). Ez az eloszlás alátámasztja azt a megfigyelést, miszerint az etiolált növények meghatározó vörös fényreceptora a phyA, míg a fényen nőtt növényeké a phyB.

A két kriptokróm fehérje is eltérő módon viselkedik kék fénykezelés során. A cry1 fehérjeszintje nem változik lényegesen erős kék fény hatására (Ahmed és mtsai., 1998), míg a cry2 mennyisége egy óra alatt tizedére csökken. A cry2 kék fényfüggő degradációjáért felelős szekvencia a fehérje N-terminálisán található (Guo és mtsai., 1999). Úgy tűnik, hogy a cry2 saját lebomlását irányítja, mivel a folyamat cry1 hiányában is lejátszódik (Lin és mtsai., 1998).

A Western analízissel mérhető fehérje össz mennyiség tartalmazza az aktív és inaktív fehérjéket is. Más vizsgálati módszerekkel, melyek kihasználják a fehérje biokémiai tulajdonságait, megállapítható az aktív forma aránya az össz mennyiségből. A fitokrómok esetében a már említett P_r és P_{fr} forma arányát eltérő spektroszkópiai sajátságuk alapján választhatjuk szét (Schäfer és mtsai., 1972). Számos fotoreceptor fényfüggő fehérje-módosításon esik keresztül, melynek intenzíven kutatott területe a foszforiláció, mivel egy fehérje működését, élettartamát nagymértékben meghatározhatja a foszforilációs állapota. A fitokrómok és a kriptokrómok is hordoznak több konzervált foszforilációs helyet. A zab phyA fehérjén három *in vivo* foszforilációs helyet azonosítottak: a Ser7, Ser17 és a Ser599 aminosavakat (Lapko és mtsai., 1997). Az N-terminális legelején elhelyezkedő szerin konstitutívan foszforilált, funkcióját illetően még csak találgatások láttak napvilágot. A 17. aminosav foszforilációja P_r formában a legnagyobb mértékű. A csukló régióban található Ser599 viszont fényfüggő módon foszforilálódik, ami a fehérje aktivitásában játszott szerepére utal. Ez az aminosav valószínűleg intramolekuláris mechanizmussal autofoszforilálódik. Mivel a fitokrómok homodimert képeznek, így elképzelhető, hogy a két fehérje egymást foszforilálja (Yeh és Lagarias, 1998).

A múlt évben Shalitin és munkatársai (2002) elegáns kísérletben bizonyították, hogy a cry2 kék fényfüggő módon foszforilálódik. Sötétben a fehérje nem foszforilált, inaktív és stabil, míg kék fény abszorpciója után konformáció-változást szenved, ami lehetővé teszi a foszforilációt. A foszforilált receptor ezután képes fotomorfogenikus folyamatokat elindítani majd igen gyorsan degradálódik. Az adott pillanatban a jelen lévő fehérjéknek azonban csak bizonyos százaléka esik át ezen a módosításon, így a fényben nőtt növényben egyszerre megtalálható a receptor aktív és az inaktív formája. Összhangban a fehérjedegradációnál tapasztaltakkal, a reguláció cry1 hiányában is változatlanul működik, így valószínűleg a cry2 önmagát foszforilálja. Ez a poszt-transzlációs módosítás köthető mind a fehérje funkciójához, mind a szabályozásához.

Érdekes megfigyelés, hogy a kriptokrómok a fitokrómok kináz aktivitásának szubsztrátjai lehetnek. *In vitro* a cry1 interakcióba lép a phyA-val és általa foszforilálódik (Ahmad és mtsai., 1998). *In vivo* ez a regulációs lépés még nem bizonyított, viszont közvetve alátámasztja az a tény, hogy a cry1 foszforilációját a vörös fény indukálja. Ez a szabályozás lehet az egyik kapocs a két fotoreceptor-család szoros együttműködésében a fényindukált folyamatok során; továbbá magyarázatot ad a cirkadián input útban megfigyelt jelenségre, miszerint a phyA jelátviteli útban a cry1 nem receptorként, hanem szignál elemként vesz részt.

Habár a foszforilációs lépésekről egyre több információ áll rendelkezésünkre, a defoszforiláció folyamata és az abban részt vevő fehérjék még nem ismertek. Egyetlen kivétalként nemrég izoláltak egy protein foszfatáz 2A családba tartozó fehérjét, az ún. FyPP-t, annak alapján, hogy élesztő két-hibrid rendszerben a phyA fehérjével kölcsönhatásba lép (Kim és mtsai., 2002). Mivel az FyPP hiányában csak a virágzás fotoperiódikus szabályozása sérült, így feltételezhetően léteznek további foszfatázok, melyek specifikusan más fényválaszban működnek közre a fényreceptorok aktivitásának szabályozásában.

A fitokrómok által szabályozott molekuláris folyamatok között megtalálható a heterotrimerikus G protein aktivációja és a Ca^{2+} -felszabadulás (Neuhaus és mtsai., 1997), melyek a jelátviteli utak citoplazmához köthető jellegzetes lépései, emellett számos gén transzkripcióját is befolyásolják a sejtmagban. A fitokrómok nem képesek közvetlenül kapcsolódni a DNS-hez, így közvetve indukálják vagy gátolják a génkifejeződést; viszont kapcsolódni képesek transzkripciós faktorokhoz *in vitro* (Martinez-Garcia és mtsai., 2000), mely azt sugallja, hogy a gén-szabályozásig vezető jelátviteli út akár igen rövid is lehet.

Az elmúlt pár évben sikerült kimutatni zöld fluoreszcens fehérje (GFP) segítségével, hogy a fitokrómok specifikus sejten belüli elhelyezkedést mutatnak (Kircher és mtsai., 1999;

Kim és mtsai., 2000). A citoplazmában termelődnek szabad riboszómákon, majd ugyanitt halmozódnak fel inaktív állapotban. Megfelelő megvilágítás hatására aktív P_{fr} formává alakulnak, mely képes a sejtmagba vándorolni. Az inaktív P_r forma ezzel ellentétben nem képes résztvenni a sejtmagi transzlokációban. A sejtmagban a fitokrómok bizonyos része speciális sejtmagi foltokat alkot. A fitokrómok fotokonverziójára jellemző sajátságok a foltformálás jelenségére is igazak, azaz vörös fény hatására képződnek, vöröst követő távoli vörös megvilágítás hatására a foltok eltűnnek, sötétben tartva számuk csökken. Ez arra utal, hogy a sejtmagi importnak és a foltképzésnek a fitokrómok biológiai aktivitásában van jelentősége. A különböző fitokrómok sejtmagi transzlokációjának dinamikája jelentős eltéréseket mutat a megvilágítás hullámhosszának, intenzitásának és időtartalmának függvényében (Kircher és mtsai., 2002). A fitokrómok viszont nemcsak a sejtmagban, hanem a citoplazmában is jelen vannak, nem is elhanyagolható mennyiségben. A dohány PHYB esetében a sejtmagi frakcióban legjobb esetben is az össz-fehérjemennyiség 30%-a található, hasonló vagy ennél kisebb arányt feltételezhetünk a többi fitokróm esetében is (Nagy és Schäfer, 2002). Tehát mind a sejtmagban, mind pedig a citoplazmában jelen van az aktív P_{fr} formájú fitokróm. Feltételezhetjük, hogy a sejtmagban és az azon kívül elhelyezkedő fitokrómok a fény szignál-transzdukciójának külön-külön ágait szabályozzák.

Ellentétben a fitokrómokkal, mindkét kriptokróm leginkább sejtmagi fehérje. A cry2 konstitutívan a sejtmagban található (Guo és mtsai., 1999), viszont a sejtmagon belüli eloszlása vitatott kérdés. Egy kutatócsoport GFP-CRY2 fúziós fehérje segítségével kimutatta, hogy a cry2 kromoszómákhoz kötődhet, a C-terminális része pedig az összes kromoszómával képes kapcsolódni (Cutler és mtsai., 2000). Egy másik csoport viszont ugyanezt a módszert használva úgy találta, hogy dohány protoplasztban, sötétben homogén leoszlást mutat a sejtmagban; fény hatására pedig sejtmagi foltokat alkot, melyek egybeesnek a phyB által alkotott foltokkal (Mas és mtsai., 2000). A cry1 sötétben a sejtmagban halmozódik fel, fényben pedig a citoplazmába vándorol (Cashmore és mtsai., 1999; Yang és mtsai., 2000).

A fotoreceptorok szabályozását eddig csak a fényreguláció szempontjából elemeztük. Sajnos más vonatkozásban, például a hormonok szerepét tekintve csak hiányos ismeretekkel rendelkezünk. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a fény jelátviteli útra ható faktorok legtöbbször nem közvetlenül a fotoreceptorokra fejtenek ki hatást, hanem a szignáltranszdukciós út egy távolabbi elemére, mely nem hat vissza a fényérzékelő fehérjékre.

A microarray technikának köszönhetően az elmúlt pár évben rengeteg adat vált hozzáférhetővé a különböző külső és belső hatások következtében fellépő mRNS-szint változásokról. Ezek az adatsorok, például különböző hormonok hatását leíró kísérletek

általában tartalmazzák a fotoreceptorokat reprezentáló mintát is. Azok a hormonok, melyek egyes élettani folyamatokban együttműködnek a fényreceptorokkal (Halliday és Fankhauser, 2002), például a giberellinsav a csírázásban, az auxin a fototropizmusban, az auxin és a citokinin a hipokotil-megnyúlásban, valamint a brassinoszteroid egyes morfogénikus lépésekben, nem hatnak jelentősen a génkifejeződésük szintjére (Goda és mtsai., 2002; Ogawa és mtsai., 2003; Sawa és mtsai., 2002). Természetesen meg kell jegyezni, hogy ez a szabályozásnak csak egyik lehetséges szintje, ennek hiánya még nem jelenti, hogy az adott tényezők más szinten nem befolyásolhatják a fényreceptorokat. Továbbá ez a technika a magas szinten termelődő mRNS esetében igazán megbízható. Minél alacsonyabb szintű egy génről az átíródás, annál nagyobb a szórás a mérések között, ami esetleg a mérési hibát növelheti, márpedig az általunk vizsgálandó gének aktivitása meglehetősen alacsony.

Az egyetlen eddig azonosított fehérje, mely által a hormonok szabályozhatják egy fotoreceptor aktivitását, az ARR4, egy reszponz regulátor, mely a citokinin jelátviteli út egyik eleme. Az ARR4 specifikus interakcióba lép a phyB N-terminálisával *in vitro*. Ez a kapcsolódás megváltoztatja az aktív P_{fr} formájú phyB fehérje stabilitását: lelassítja, túltermelése esetén pedig meggátolja a sötét-reverzió folyamatát, ezáltal a növény vörös fény érzékenységét megnöveli (Sweere és mtsai, 2001). A citokinin - a többi említett hormonhoz viszonyítva - kisebb mértékben működik közre a fény által is szabályozott folyamatok irányításában, de például a kloroplaszt-differenciálódásban illetve a hipokotil-megnyúlásban játszott szerepe már régóta ismert. Ezek alapján ennek az interakciónak a jelentőségét még nem lehet igazán felmérni, viszont felveti azt a lehetőséget, hogy más hormonok is közvetlenül befolyásolhatják a fényreceptorok aktivitását.

3. KÖZVETLEN ELŐZMÉNYEK, CÉLKITŰZÉSEK

A cirkadián óra képes modulálni a fény input utat, például az ELF3 faktor segítségével. Van azonban más lehetőség is a ritmikus bemeneti jel megteremtésére, például ha az óra közvetlenül befolyásolja az input elemek mennyiségét és/vagy aktivitását.

Korai kísérletekben (Clack és mtsai., 1994) azt állapították meg, hogy a cirkadián input út fontos elemeinek, a fitokrómoknak a génkifejeződése egy nap folyamán nem változik. Northern analízissel vizsgálták meg 3 hetes növényekben az öt fitokróm receptor mRNS szintjét fény-sötét ciklusban. Ez a kísérlet azt sugallta, hogy a fitokrómok kifejeződése nem diurnális. Márpedig a fény és a cirkadián óra együttes szabályozó folyamataira alapozva feltehetjük, hogy az a folyamat, mely fény-sötét perióduson nem mutat ritmikus jelleget, az állandó körülmények között is híján van annak, azaz a cirkadián órának nincs befolyása rá. Ebből vonták le azt a sokáig dogmaként kezelt következtetést, hogy a fitokrómok kifejeződése nem áll cirkadián reguláció alatt. A kísérlet gyenge pontja az volt, hogy csak két időpontban, a napkelte és a napnyugta utáni 5. órában, azaz ZT 5-kor és ZT 17-kor vettek mintát, melyek segítségével csak kivételes esetben lehet kirajzolni egy görbe lefutását.

A kriptokrómok diurnális illetve cirkadián kifejeződését a mai napig nem vizsgálták meg.

Pár évvel ezelőtt munkacsoportunkban született meg az a felfedezés (Kozma-Bognár és mtsai., 1999), hogy az *Arabidopsis* és a dohány *PHYB* génexpressziója a cirkadián óra kontrollja alatt áll. A kísérletekben kettéválasztva az mRNS-felhalmozódás és a promóter-aktivitás szintjének vizsgálatát, a Northern analízisen túl a luciferáz riporter gén használatával a napi változások az eddigieknél sokkal finomabb felbontásban voltak nyomon követhetők. Megállapították, hogy a *PHYB* mindkét szinten cirkadián ritmust mutat, melyeknek fázisa csaknem megegyezik.

Más szinten újra megjelenik a cirkadián szabályozás: a phyB és a phyA sejtmagi transzlokációja főképp a fény által, de a belső óra által is vezérelt folyamat (Kircher és mtsai., 2002; Nagy Ferenc szóbeli közlése).

A fenti eredmények birtokában munkánkban azt kívántuk részletesen megvizsgálni, hogy hogyan alakul a fotoreceptorok kifejeződése egy nap során, különböző fényviszonyok mellett. Az összes olyan fényreceptort meg kívántuk vizsgálni, mely bizonyítottan a cirkadián input útban található. A regulációs folyamatokat a promóter-aktivitás és az mRNS-akkumuláció szintjén kívántuk nyomon követni. Továbbá ha a fotoreceptorok génkifejeződése cirkadián

kontroll alatt áll, úgy egyik kiválasztott fotoreceptor-promóter napi aktivitásának részletesebb jellemzését tűztük ki célul, elsődlegesen a kor- és szövetspecifitás szempontjából.

A tervezett munka főbb lépései a következők voltak:

1. Transzgénikus *Arabidopsis* növények előállítása, melyekben egy-egy fitokróm (*PHYA-E*) vagy kriptokróm (*CRY1,2*) promóter által termelt luciferáz enzimet fejeztetjük ki.
2. A transzgénikus növényekben a fotoreceptorok szövetspecifikus kifejeződésének leírása, ezáltal annak igazolása, hogy a promóterek az eddig leírt adatoknak megfelelően fejeződnek ki, azaz funkcionálisan működnek.
3. Promóter-aktivitás jellemzése a luciferáz-aktivitás követésével különböző fotoperiódusokon.
4. A fotoreceptorok mRNS-akkumulációjának vizsgálata állandó fényviszonyok mellett.
5. Ritmikus kifejeződés esetén egy kiválasztott fotoreceptor cirkadián ritmusának analízise felnőtt növény különböző szerveiben.

Kísérleteink várhatóan választ adnak majd arra a kérdésre, vajon a *PHYB* esetében tapasztalt szabályozás egy általános, az összes input fotoreceptorra érvényes regulációs sémát követ, vagy az egyes fitokrómok és kriptokrómok kifejeződésének esetleges cirkadián irányítása az adott fehérjére specifikusan jellemző mintázatot mutat.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti anyagok, organizmusok

Vegyszerek

A kísérletek során használt vegyszereket a következő gyártóktól/szállítóktól szereztük be: Reanal/Molar Kft. (Budapest), Merck (Merck Kft., Budapest), Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Kft., Budapest), Amesham-Pharmacia AB (HVD Kereskedelmi és Szolgáltató Kft., Budapest). A radioaktív izotóppal jelölt nukleotidokat ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ és $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dUTP}$) az Izinta Kft. (Budapest), a luciferin szubsztrátot a Biosynth AG (Svájc, Staad) szállította.

Tápanyagok és táptalajok

LB (Luria-Bertani Medium) pH: 7.0

1 % (w/v) tripton

0.5 % (w/v) élesztő kivonat

1 % (w/v) NaCl

[1.5 % (w/v) agar]

YEB pH: 7.0

0.5 % (w/v) "beef extract"

0.1 % (w/v) élesztő kivonat

0.5 % (w/v) pepton

0.5 % (w/v) szaharóz

[1.5 % (w/v) agar]

sterilizálás után

2 mM MgCl_2

MS (Murashige-Skoog Medium) pH: 5.6

4.3 g/l MS "Basal Salt Mixture"

3 % (w/v) szaharóz

1 % (w/v) agar

AM pH: 5.6

2.15 g/l MS "Basal Salt Mixture"

1% (w/v) szaharóz

0.2 % (w/v) fitagél

CIM (Callus-Inducing Medium) pH: 5.8

0.5 g/l MS "Basal Salt Mixture"

2 % (w/v) szaharóz

0.8 % (w/v) agar

sterilizálás után:

5mg/l $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$

0.5 mg/l 2,4-D

0.05mg/l kinetin

Antibiotikumok

Az antibiotikumokat a Sigma-Aldrich cégtől szereztük be. A készítmények általunk alkalmazott végkoncentrációját, valamint az organizmusok nevét, amelyek esetében az adott antibiotikumot használtuk, az alábbi táblázat foglalja össze.

Antibiotikum	Végkoncentráció	Organizmus
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml	<i>Escherichia coli</i>
Streptomycin (Sm)	100 µg/ml	<i>Escherichia coli</i>
Tetraciklin (Tet)	25 µg/ml	<i>Escherichia coli</i>
Karbenicillin (Cb)	100 µg/ml	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Kanamycin (Km)	25 µg/ml	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Higromicin (Hyg)	15 µg/ml	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Klaforán (Cf)	200 µg/ml	<i>Arabidopsis thaliana</i>

4.1. táblázat. A kísérletekben használt antibiotikumok jegyzéke.

Enzimek

A kísérletek során használt restrikciós endonukleázokat, T4 DNS-ligázt, T4 polinukleotid-kinázt (T4 PNK), Klenow-polimerázt, Taq-polimerázt, a dA,G,T,CTP nukleotidokat, valamint az enzimreakciókhoz szükséges valamennyi pufferoldatot az MBI Fermentas (Litvánia, Vilnius) szállította.

Plazmidok, cDNS- és egyéb klónok

A pBluescript®II KS/SK (pKS/pSK) plazmid vektort (2964 bp, Amp^R, (R = rezisztencia) kék/fehér színszelekció) a Stratagen-től (La Jolla, California, USA) vásároltuk. A pPCV (plant cloning vector) bináris plazmidot (Koncz és mtsai, 1994) Koncz Csaba csoportjától kaptuk (Max-Planck Intézet, Németország, Köln). A vektor tartalmazta az eredeti Ti plazmid T-DNS szakaszából származó jobb és bal oldali határoló szekvenciákat (RB és LB), valamint ezek közé építve a bakteriális replikációs origót (ORI_{colE1}), az ampicillin/carbenicillin rezisztenciagént (Amp^R), és a növényi sejtekben megnyilvánuló konstitutív nopalinn-szintáz promóterrel (P_{nos}) vezérelt higromicin-foszfotranszferáz (higromicin-rezisztenciáért felelős) gént (*hpt*). A két rezisztenciagén között egy szintetikus polilinker található, amely nagyszámú

egyedi restrikciós hasítóhelyet tartalmaz, elősegítve a kívánt génkonstrukciók beépítését. A polilinker a nopalín szintáz gén 3' poliadenilációs szignál-szekvenciáit tartalmazó (T_{nos}) rövid szakasszal zárul, amely segíti az elé épített cDNS-ről képződő mRNS molekulák megfelelő processzálódását a növényi sejtekben. A módosított luciferáz riporter gén cDNS klónját ($LUC+$) a Promega cégtől vásároltuk.

Baktériumok

A munkánk során használt valamennyi baktériumtörzset a Stratagene-től szereztük be. A molekuláris klónozás során a rekombináns plazmidok felszaporítására az *E. coli* XL-1 Blue törzset (Tet^R) használtuk. Az elkészült génkonstrukciókat *E. coli* S17-1 sejtekbe (Sm^R) transzformáltuk, mivel ezek a sejtek képesek konjugációra az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzsével (Rif^R), aminek során az adott génkonstrukciót tartalmazó bináris vektor az *Agrobacterium* sejtekbe jut át. A fenti *Agrobacterium* törzs hordozza a pMP90RK plazmidot (Km^R), amelyen az eredeti Ti plazmid *vir* (*virulence*) génjei találhatóak. E gének által kódolt fehérjék szükségesek a bináris vektor T-DNS szakaszának (a jobb és bal oldali határszekvenciák közötti rész, amely esetünkben a génkonstrukciókat is tartalmazta) a növényi sejtekbe történő transzferéhez (Koncz és mtsai, 1994). A különböző baktériumtörzsek tisztaságát, ill. a bináris vektor jelenlétét megfelelő antibiotikum-kombinációk alkalmazásával ellenőriztük.

Növények

Transzgénikus növények előállítása és össz-RNS izolálása során az *Arabidopsis thaliana* Wassilevskija (Ws) ökotípusát használtuk. A magokat 5%-os $CaCl_2O_2$ oldatban 5 percig sterilizáltuk, ezután háromszor steril desztillált vízzel mostuk, majd 3% szaharózt tartalmazó MS táptalajra szélesztettük és steril körülmények között neveltük. A magokat - a csírázás elősegítésének érdekében - 2 napig 4°C-on, sötétben tartottuk, majd nevelő kamrába (Sanyo, MLR-350) helyeztük őket, ahol 12 óra fény (60-70 $\mu mol/m_2s$, fehér fény)/ 12 óra sötét fotoperiódus mellett, 22°C-on nőttek 7 vagy 21 napos korukig.

4.2. Molekuláris biológiai módszerek

Plazmid DNS tisztítás (Sambrook és mtsai, 1989)

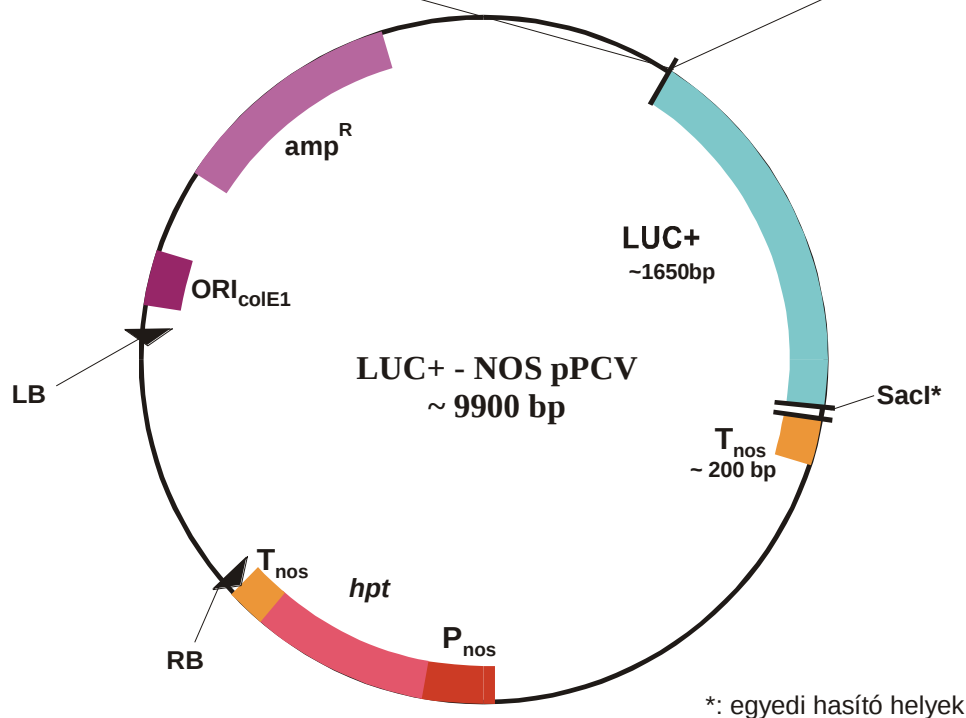
A megfelelő plazmidot hordozó baktériumsejteket szelektív antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban növesztettük 37°C-on 12 órán át, állandó rázatással. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd lizozimes emésztés után alkalikus SDS kezeléssel feltártuk őket. A fehérjéket savas 3 M kálium-acetát oldattal csaptuk ki. A tisztítást fenolos extrakcióval folytattuk, végül a plazmid DNS-t alkohollal kicsaptuk. 70%-os alkohollal való mosás és szárítás után a csapadékot TE pufferben (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH: 8.0) oldottuk fel. Az így nyert plazmid DNS alkalmas volt restrikciós emésztésre.

Génkonstrukciók készítése

Első lépésként a start kodon nélküli *LUC+* cDNS-t megfelelő orientációban (az átíródás

polilinker szekvencia:

EcoRI* HindIII HindIII XbaI BglII* PstI Sall* XbaI BamHI* SmaI*
GAATTCCAAGCTTGGCCAAGCTTCTAGAGATCTGCAGGTCGACTCTAGAGGAT CCCC GGG ATG...



7. ábra A LUC+-NOS pPCV vektor vázlatos szerkezete.

iránya a T_{nos} szignál-szekvenciák felé mutat) a pPCV bináris vektor polilinker régiójába építettük a 7. ábrán látható módon. A továbbiakban a LUC+-NOS pPCV az egyes *PHY* promóter::LUC+ konstrukciók alapjaként szolgált.

Az egyes *PHY* gének promóter-szakaszait Wassilewkija ökotípusból származó genomiális templát DNS-en végzett PCR (polimerase chain reaction) során amplifikáltuk, majd izoláltuk. A PCR primereket úgy terveztük, hogy a kapott fragmentumok tartalmazzák a teljes 5' nem-transzlálódó régiókat (a kódoló régió első tripletjét már nem), valamint minden olyan cisz-aktív elemet, amely korábbi kísérletek alapján a megfelelő szintű és regulált kifejeződéshez szükségesnek bizonyult (Somers és Quail, 1995b; Goosey és mtsai., 1997, Clack és mtsai., 1994;). A PCR primerek 5' végére egyedi restrikciós hasítóhelyeket terveztünk a klónozás egyszerűsítése céljából. Az izolált fragmentumokat restrikciós enzimekkel emésztettük, majd az azonos enzimekkel felnyitott LUC+-NOS pPCV vektorba építettük a LUC+ cDNS 5' vége elé, megfelelő orientációban. A *CRY1* promóter fragmentumot Antony Cashmore-tól (University of Pennsylvania Health System, Philadelphia, USA) kaptuk. Az egyes promóter-szakaszok fontosabb adatait a 2. táblázat tartalmazza.

A gén neve	Az izolált promóter-szakasz mérete	Beépített hasítóhely	
		az 5' végen	a 3' végen
<i>AtPHYA</i>	2357 bp	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>
<i>AtPHYB</i>	2292 bp	<i>HindIII</i>	<i>BamHI</i>
<i>AtPHYC</i>	2683 bp	<i>EcoRI</i>	<i>SmaI</i>
<i>AtPHYD</i>	2582 bp	<i>SalI</i>	<i>SmaI</i>
<i>AtPHYE</i>	2704 bp	<i>HindIII</i>	<i>BamHI</i>
<i>AtCRY1</i>	1004 bp	<i>EcoRI</i>	<i>StuI</i>
<i>AtCRY2</i>	3522 bp	<i>HindIII</i>	<i>BamHI</i>

2. táblázat. A kísérletekben használt promóter-fragmentumok fontosabb jellemzői

Northern hibridizáció, RNáz protekciós analízis

Növényi össz-RNS tisztításhoz 1-1.5 g növényi anyagot (csíranövényeket, hajtásokat) folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és dörzsmozsárban homogenizáltunk. Az elporított mintát 15 ml-es Corex centrifugacsőben 5 ml extrakciós pufferrel [50 mM Tris-HCl pH:8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 % SDS, 0,1 % (v/v) β-merkaptoetanol, 2 mM ATA (aurin-

trikarboxilsav)] 37 °C-on inkubáltuk 30 percig. Ezt követően 1 ml 2 M KCl oldatot adtunk a mintához, majd összerázás után jégen tartottuk 30 percig. A sejt- és szövettörmelékot centrifugálással (Sorwall SS34 rotor, 10000 rpm, 10 perc, 4°C) ülepitettük. A felülúszót új csőbe mértük át, majd 2.5 ml 8 M LiCl oldat hozzáadásával (4°C, 16 h) csaptuk ki az RNS molekulákat. A centrifugálás (Sorwall SS34 rotor, 10000 rpm, 20 perc, 4°C) után kapott csapadékot 400 µl steril desztillált vízben vettük fel, 1.5 ml-es Eppendorf csőbe mértük át, fenolos extrakcióval tisztítottuk, majd 1/10 térfogatnyi 5 M NaCl és 2.5x térfogatú absz. etanolt adtunk hozzá és -20 °C-on inkubáltuk 1-2 óráig. Centrifugálást követően a csapadékot 70 %-os etanollal mostuk, vákuum alatt szárítottuk, majd 80-100 µl steril desztillált vízben oldottuk fel. Az RNS molekulák mennyiségét a minta 260 nm-en mért optikai denzitásából határoztuk meg.

Az RNS izolálás során használt üvegeszközöket 3 %-os H₂O₂ oldatban áztattuk 30-60 percig, DEPC (dietil-pirokarbonát)-kezelt desztillált vízzel átöblítettük, majd megszáritottuk. A steril desztillált vizet, valamint a KCl, NaCl és LiCl oldatokat DEPC kezeléssel RNáz mentesítettük (a kész oldathoz DEPC-t mértünk 0.1 % (v/v) végkoncentrációban, 37 °C -on inkubáltuk 16 óráig, majd autoklávoztuk).

A viszonylag nagy mennyiségben termelődő *CAB* mRNS molekulákat Northern hibridizációval, a kis mennyiségben előforduló *PHY* és *CRY* mRNS molekulákat, valamint a *PHYA* gén 3 eltérő méretű transzkriptumát RNáz protekciós analízissel mutattuk ki (Sambrook és mtsai, 1989).

Northern analízishez 50% formamid jelenlétében denaturált 15 µg RNS-t elektroforézissel frakcionáltunk 1% formaldehid-agaróz gélen. Az RNS-eket a gélből S&S NYTRAN[®]-N nylon membránra transzferáltuk a Schleicher-Schuell cég utasításai alapján. A hibridizációhoz próbaként használt DNS fragmentumot (az *Arabidopsis CAB2* cDNS 800 bp vagy az UBQ10 143 bp hosszúságú fragmentumát) random primer meghosszabbításával jelöltük [α -³²P]-dCTP jelenlétében. A jelölő reakcióhoz az Amersham cég Megaprime[™] RPN 1606 jelölő kitjét használtuk a mellékelt leírás alapján. A be nem épült nukleotidokat a próbától Sephadex G50 oszlopon történő gélszűréssel választottuk el.

A NYTRAN[®]-N filtereket 2 órán át előhibridizáltuk 65°C-on 5x SSPE (1x SSPE: 0.18 M NaCl, 10 mM NaPO₄ pH: 7.7, 1 mM EDTA), 1% SDS, 5x Denhardt's [1x Denhardt's: 0.02% (w/v) fikoll, 0.02% (w/v) polivinil-pirrolidin, 0.02% (w/v) BSA], és 100 µg/ml denaturált csirkevér DNS tartalmú elegyben. A denaturált próba hozzáadása után a hibridizációt 65°C-on

16-24 órán át folytattuk. Ezt követően a filtereket csökkenő sókoncentráció mellett mostuk (2x SSC - szobahőmérsékleten, 1x SSC - 65°C-on, 0.1x SSC - 65°C-on) 0.1% SDS jelenlétében (1x SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM Na₃-citrát pH: 7.2). A filtereket speciális kazettákban exponáltuk egy napig, majd a radioaktív jeleket a PhosphorImager (Molecular Dynamics) készülék segítségével tettük láthatóvá. A jeleket az ImageQuant 1.1 (Molecular Dynamics) szoftver használatával kvantitáltuk. Ezután a filtert 0.1%-os SDS oldatban 10 percig forraltuk, majd kihűlés után az UBQ10 próbával a fent leírt módon újra hibridizáltuk a filtert. Végül az CAB2 jelének értékeit az azonos időponthoz tartozó UBQ10 értékeivel korrigáltuk.

RNáz protekciós analízishez szükséges próbák előállításához a fotoreceptor gének kódoló régiójának kiválasztott 140-350 nukleoid hosszú, specifikus szakaszát PCR-ral amplifikáltuk, majd Bluescript plazmidba építettük. A fotoreceptor gének génbank szerinti megfelelő hivatkozási számait valamint ennek megfelelően a próba-fragmentumok 5' és 3' végének pozícióját leíró nukleotidok számát a 3. táblázat tartalmazza.

A megfelelő gén neve	Génbanki hivatkozási szám	A próba-fragmentum 5' és 3' végének pozíciója
<i>AtPHYA</i>	X17341	3,108- 3,347
<i>AtPHYB</i>	X17342	3,348 -3,565
<i>AtPHYC</i>	X17343	291-565
<i>AtPHYD</i>	X76609	2,888-3,177
<i>AtPHYE</i>	X76610	804-1,126
<i>AtCRY1</i>	AL161513	111,223-111,397
<i>AtCRY2</i>	U43397	1,261-1,542
<i>AtUBQ10</i>	L05361	1,008-1,151

3. táblázat Az RNáz protekciós próbák helyzete

A *PHYA* transzkriptumok kimutatásához egy 430 nukleotid hosszúságú próbát használtunk, melynek fragmentuma a promóterből indult (–259) és az 5' nem transzlálódó régióban ért véget (+125). Mivel a próba lefedte mindhárom transzkripció starthelyet, így három különböző méretű védett fragmentum keletkezett. Ezek mérete a következőképpen alakult: mRNA1 - 121 nukleotid, mRNA2 - 204 nukleotid, és mRNA3 - 380 nukleotid.

A plazmidokból izolált fragmentumokból (α - ^{32}P)UTP jelenlétében radioaktívan jelölt antiszensz RNS próbát szintetizáltunk a T7 RNS polimeráz segítségével a T7 Transcription Kit (Fermentas) instrukciói alapján. A jelölt RNS fragmentumot 6%-os poliakrilamid gélen választottuk el, majd autoradiográfia alapján izoláltuk a gélből. A jelölt próbát RNS extraháló pufferrel (0.5 M $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$, 0.01 M $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) eluáltuk a gélből. Mintánként 30 μg növényi RNS-t hibridizáltunk a megfelelő fotoreceptor próbájának és a kontroll UBQ10 próbának elegyével (50-50000 cpm) 10 μl hibridizáló pufferben (80% formamid, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.7). A reakciót 46°C-on 16 órán keresztül végeztük, majd RNáz oldatot (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM LiCl, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNáz A és 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNáz T1) adtunk a hibridizációs elegyhez. A mintákat 1 órán át emésztettük 30 °C-on, majd proteináz K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) és 10%-os SDS-t hozzáadva 37 °C-on inkubáltuk az elegyet 15 percig. Ezután fenol és kloroform 1:1 arányú keverékével extraháltuk a fehérjéket, majd a vizes fázisból tRNS jelenlétében hideg etanollal kicsaptuk az RNS-t. A mintákat két 70%-os etanos mosás után beszárítottuk és 5 μl formamidos festékkoldatban [80 % (v/v) formamid, 1x TBE (90 mM Tris, 90 mM bórsav, 2 mM EDTA), 0.05 % (w/v) xilén-cyanol, 0.05 % (w/v) brómfenolkék] oldottuk fel. A mintákat 5 percig 100 °C-on denaturáltuk, majd ureát tartalmazó 6%-os poliakrilamid gélen futattuk és szárítás után a Northern analízisnél ismertetett módon detektáltuk a radioaktív jelet. Az egyes minták értékét a megfelelő ubiquitin kontroll értékeivel korrigáltuk. A kísérleteket legalább kétszer megismételtük. A dolgozatban egy-egy reprezentatív adatsor kerül bemutatásra.

4.3 Transzgénikus növények előállítása, kallusz képzés

Transzgénikus növények előállítása

Az *Arabidopsis* növények transzformációja során a Clough és Bent (1998) által kifejlesztett virág-infiltrációs módszert alkalmaztuk. A megfelelő *Agrobacterium* törzset karbenicillinnel kiegészített YEB tápoldatban (300 ml) növesztettük szobahőmérsékleten 2 napig. A baktériumokat centrifugálással (3500 rpm, 20 perc, 25°C) összegyűjtöttük. A baktérium-csapadékot óvatosan felfuszpendáltuk 2 ml 5%-os (w/v) szacharóz oldattal, majd ezt követően lassan, folyamatos keverés mellett további 200 ml cukoroldattal hígítottuk, végezetül pedig 40 μl Silwet L-77 oldatot adtunk a baktérium-szuszpenzióhoz. Ez utóbbi vegyület fokozza a növényi szövetek nedvesíthetőségét, így növeli az *Agrobacterium*-közvetítette géntranszfer hatékonyságát. Üvegházban nevelt *Arabidopsis* növények 5-10 cm-

es virágzárát és a rajta lévő virágokat a fentiek alapján elkészített szuszpenzióba merítettük 10 másodpercig, majd fóliával letakarva, magas relatív páratartalom mellett tartottuk egy napig. A transzformációt követően a növényeket tovább neveltük az üvegházban és magot gyűjtöttünk róluk. A magokat higromicinnel kiegészített MS táptalajon csíráztattuk, amelyen csak a transzformáns egyedek képesek megfelelően fejlődni, így kiválasztásuk viszonylag egyszerű. A kiválasztott csíranövényeket (T1 nemzedék) friss táptalajra helyeztük, majd miután megerősödtek és megfelelő gyökérzetet fejlesztettek, földbe ültettük és magérlelésig üvegházban neveltük őket.

A növényi transzformációs kísérletek során minden konstrukció esetében 15-20 független transzgénikus vonalat állítottunk elő. A transzgének működését minden esetben a T2 nemzedék egyedeiben vizsgáltuk.

Kalluszképzés

A kalluszt a *CAB2::LUC+* valamint *PHYA::LUC+* inszerciót hordozó transzgénikus növények felnőtt leveleiből hoztuk létre Clarke és munkatársainak (1992) leírása alapján. A megfelelő *Arabidopsis* magokat a fent leírt módon sterilizáltunk, majd a kikelt növényeket AM táptalajon neveltünk 16 napos korukig. A fiatal leveket levágtuk, majd a levélérrel párhuzamosan bemetszéseket ejtettük, majd a levelek kallusz-indukáló CIM táptalajra helyeztük. A kallusztelepet leválasztottuk a levéldarabról és a mérésig CIM táptalajon neveltük.

4.4. *In vivo* luciferáz enzimaktivitás-meghatározás

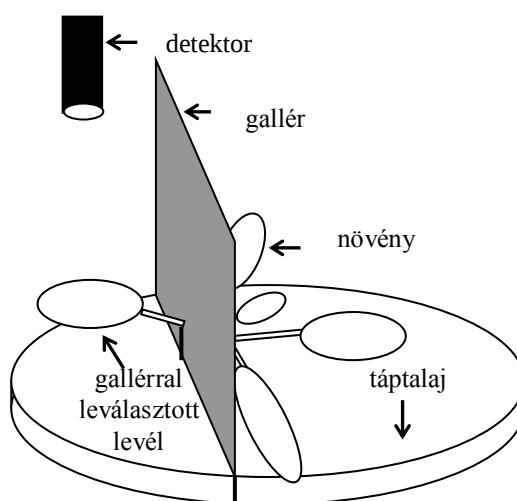
In vivo lumineszcencia mérés CCD kamerával

A transzgénikus növényeket 7 vagy 21 napig neveltük steril MS táptalajon 12 óra fény (60-70 $\mu\text{M}/\text{m}^2\text{s}$) / 12 óra sötét fotoperiódus mellett, 22 °C-on. A szövetspecifikus kifejeződés vizsgálatához a növényeket a táptalajból kiemelve szentjánosbogárból származó D-luciferin 1mM-os oldatába (Biosynth AG, Svájc) áztattuk 5 percen keresztül, majd 2 órával később digitális felvételeket készítettünk nagy érzékenységű, folyékony nitrogénnel hűtött CCD kamerával (LN/CCD-512-TKB, Princeton Instruments, USA). A különböző transzgéneket hordozó vonalak esetében eltérő expozíciós időket alkalmaztunk a jel erősségétől függően, melyeket a 4. táblázat foglal össze.

Transzgénikus növény neve	Expozíciós idő (perc)		
	7 napos, fényen nőtt csíranövények (8. ábra)	7 napos, etiolált csíranövények (9. ábra)	21 napos növények (10. ábra)
<i>AtCAB2::LUC+</i>	10	20	5
<i>AtPHYA::LUC+</i>	5	1	5
<i>AtPHYB::LUC+</i>	5	10	-
<i>AtPHYC::LUC+</i>	15	15	-
<i>AtPHYD::LUC+</i>	30	30	-
<i>AtPHYE::LUC+</i>	30	30	-
<i>AtCRY1::LUC+</i>	10	10	-
<i>AtCRY2::LUC+</i>	15	15	-

4. táblázat Expozíciós idő a szövetspecifikus luciferáz-aktivitás mérések során

A kísérletek során a promóter-aktivitás cirkadián vizsgálatához kétféle, a luciferáz enzim aktivitását mérő műszert használtunk. A 21 napos transzgénikus növények luciferáz-aktivitás mérését a fent ismertetett CCD kamerával követtük nyomon. A növények steril MS táptalajon, 12 óra fény ($60\text{--}70\text{ }\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, fehér fény)/ 12 óra sötét fotoperiódus mellett, 22°C -on nőttek a nevelőkamrákban 21 napos korukig. 6 órával a mérés kezdete előtt elvégeztük a szükséges beavatkozásokat. Az intakt növények kiválasztott szerve köré nagy méretű, átlátszatlan hajlékony műanyaglemezt helyeztünk (8. ábra), amit a továbbiakban gallérnak nevezünk. A gallér megakadályozza a fény átszivárgását más szervekből (még a táptalajon keresztül is). A gallér felhelyezése és használata nem okoz sérülést a növényi szövetekben. A sebzés vizsgálatokor a levélrel párhuzamosan bemetszéseket ejtettünk vagy csipesszel megszúrtuk a levéllemez, majd gallért helyeztünk a levélnyél köré. A szervek izolálásakor a gyökeret gyökértőnél, a leveleket a levélnyél alapjánál választottuk le a növényről, a megmaradt részből



8. ábra A gallér használatának vázlatos képe

vágtuk a hipokotildarabokat. Minden izolált növényi darabot steril MS táptalajra fektettünk. A beavatkozások után azonnal 5mM luciferin oldattal lepermeteztük a mintákat, s a mérés kezdetéig visszahelyeztük az eredeti nevelési körülmények közé. A mérés során 2 óránként, 4-5 napon keresztül digitális felvételeket készítettünk a mintákról. A mérések során a mintákat végig a kamera sötét mérőkamrájában tartottuk. Folyamatos vörös fényben történt mérésnél a mérőkamrába szerelt, időzítővel ellátott LED-sor ($\lambda=660\pm 15\text{nm}$) biztosította a fényt, mely az expozíció kezdete előtt 5 perccel kikapcsolódott. 25 perces expozíciós időt alkalmaztunk, így a minták 2 óránként maximum 30 percet töltöttek sötétben, amit a irodalmi adatok szerint (Millar és mtsai., 1995a) a cirkadián óra szabályozása szempontjából a növény folyamatos fénynek tekint. A digitális felvételeken a MetaView program (Universal Imaging, USA) segítségével meghatároztuk és kvantitáltuk a mintákból származó fény mennyiségét, amely a luciferáz-aktivitás adott időpontban mérhető szintjével arányos érték. A CCD chip háttérzajával korrigált relatív aktivitásértékeket az idő függvényében ábrázolva kaptuk meg az egyes konstrukciók kifejeződésének időbeli mintázatát a különböző fényviszonyok között. A méréseket konstrukciónként 3 független transzgénikus növényvonalon is elvégeztük többszöri ismétléssel. Valamennyi kísérlet során hasonló eredményeket kaptunk, a dolgozatban egy-egy reprezentatív ábraszorozat kerül bemutatásra.

A nagyfelbontású lumineszcens felvétel készítésére egy Axioplan2 motorizált fénymikroszkópot (Zeiss, Jena, Németország) összekötöttük a CCD kamerával oly módon, hogy a mikroszkópon keresztül érkező lumineszcens jelet a CCD chip detektálta. A *PHYA::LUC+*-t hordozó transzgénikus növényeket 14 napos korukig 12 óra fény/12 óra sötét fotoperióduson neveltük MS táptalajon, majd 2 napig folyamatos sötétben tartottuk. A sötétben tartott minták előkészítését biztonsági zöld fényben ($\lambda=540\text{-}550\text{ nm}$) végezzük, mely bizonyítottan nem indukál fotoreceptorok által közvetített folyamatot (Andrew Millar és Anthony Hall szóbeli közlése). Biztonsági zöld fényben gyökereket izoláltunk a táptalajból, melyeket egy csepp MS táptalajt hordozó tárgylemezre fektettük, 10 μl 5mM-os D-luciferin oldattal átitattuk a táptalajt, majd fedőlemezrel lefedtük. 5-10 percig vártunk a luciferin oldat felszívódására, miközben beállítottuk a megfelelő fókusz-távolságot, majd 1 percig exponáltunk. Ezt követően elkészítettük azonos fókusz-állásban a valós képet. A felvételeket MetaMorph szoftverrel értékeltük ki.

In vivo lumineszcencia-mérés luminométerrel

A csíranövényeken végzett kísérleteket Topcount[®] automatizált luminométerrel (Packard) végeztük. A csíranövényeket a mérés kezdete előtt 6 órával steril körülmények között egy 96 zsebes mérőlemezbe helyeztük. Egy növény került minden zsebbe, melyek egyenként 0.25 ml MS táptalajt tartalmaztak. 20 µl 2 mM-os luciferin oldattal lepermeteztük a növényeket, végül sterilen védőfóliával lefedtük, s a mérés kezdetéig visszahelyeztük a nevelő kamrába. A mérés valamennyi esetben a csíráztatást követő 7. napon indult, a fényfázis vagy a sötétfázis kezdetén (ZT0 ill. ZT12). A luminométer 3-5 napon keresztül 1-2 óránként rögzítette a zsebekben található növényekből származó fényjelet. A fény/sötét perióduson történő, azaz LD (light/dark) mérések során a nevelés alatt fennálló fény/sötét körülményeket tartottuk fenn továbbra is. A folyamatos sötét, röviden DD (dark/dark) mérések során a növényeket a fényfázis végének megfelelő időpontban (ZT 12) folyamatos sötétbe helyeztük. Folyamatos fényben történő, röviden LL (light/light) mérések során a minták az első fényfázis kezdetén (ZT0) kerültek folyamatos fehér vagy vörös fénybe. A fényszakaszok alatt a mérés előtt a megvilágított nevelőkamrából a luminométer sötét belső mérőterében helyeztük a növényeket tartalmazó lemezeket, majd 5 perc múlva indult a detektálás, annak érdekében, hogy a klorofill autokemilumineszcenciája ne zavarja a mérési eredményeket. Egy mérési pont összesen 9 perc fényhiányt jelentett, ami nem elegendő a cirkadián óra átállításához. A sötét szakaszok alatt a lemezek végig a sötét mérőkamrában maradtak.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Szövetspecifikus kifejeződés vizsgálata

Vizsgálataink első részében az Arabidopsis fitokróm (*PHYA-E*) valamint a *CRY1* és *CRY2* gének promóter-aktivitásának időbeli és térbeli feltérképezést céloztuk meg a napi ritmikus kifejeződés szempontjából. Ehhez a gének promóteréből és a szentjánosbogár luciferáz génjét kódoló cDNS-ből (*LUC+*) álló kiméra konstrukciókat hoztunk létre az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett módon. A promóterek minden esetben tartalmazták a start-kodon előtti teljes hosszúságú 5' nem-transzlálódó régiót és azokat a cisz elemeket, melyek - irodalmi adatok alapján - biztosítják a specifikus kifejeződést.

Az összes regulátor-szekvenciát hordozó promóter a saját génjének térbeli és időbeli expressziós mintázatát kölcsönzi az általuk vezérelt riporter gén számára, legtöbb esetben függetlenül a genomba való beépülés helyétől. Ennek megfelelően a mi kísérletünkben a luciferáz enzim aktivitása a fotoreceptor promóterek működését tükrözi. Mivel a luciferáz fehérje kifejezetten bomlékony, így alkalmas nemcsak a térbeli, hanem az időbeli változások pontos detektálására is, híven követve az aktuálisan lejátszódó folyamatokat.

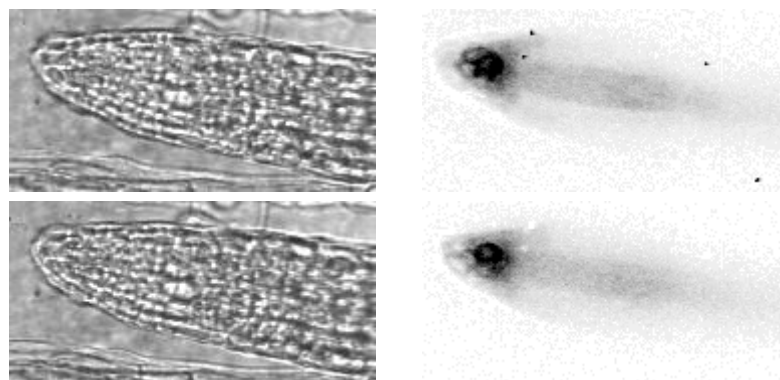
A konstrukciókat *Agrobacterium tumefaciens* segítségével Arabidopsis növényekbe transzformáltuk, majd a homozigóta T2 nemzedék különböző körülmények között nevelt csíranövényeiben vizsgáltuk a transz gének szövetspecifikus kifejeződését. Olyan nevelési körülmények között jellemeztük a szövetspecifitást, melyek között a későbbi kísérletekben a génkifejeződés időbeli, napi sajátságait tanulmányoztuk.

12 óra fény/12 óra sötét fényperióduson nőtt 7 napos csíranövények szövetspecifikus luciferáz-aktivitását figyelhetjük meg a [9. ábrán](#). Általánosságban elmondható, hogy a csíranövények minden szervében detektálható volt a fotoreceptorok promóter-aktivitása. A föld feletti szervekben lényegesen erősebb a kifejeződést tapasztaltunk, mint a gyökérben, ahol az aktivitás leginkább a gyökércsúcsba koncentrált. Kivételt képez a *CRY1* fényreceptor, melynek nem volt gyökérspecifikus megjelenése. A *PHYA::LUC+* és a *CRY2::LUC+* lumineszcens képe nagyon hasonló: magas szintű aktivitás mérhető a hajtás- és a gyökércsúcsban, valamint kisebb, de szignifikáns a jel a sziklevelben, a hipokotilban és a gyökérben is (9/B, 9/H ábra). A *PHYB* promóter-aktivitása az összes szervben kimutatható, legmagasabb szintet a hajtás- valamint a gyökércsúcsban érte el (9/C. ábra). A *PHYD* és *PHYE* gén térbeli kifejeződése a *PHYB* génére hasonlított, azzal a különbséggel, hogy a hajtáscsúcsban mérhető aktivitásuk alacsonyabb (9/E, 9/F ábra). A *PHYC* gén promóterét

jellemző luciferáz-aktivitás legintenzívebben a sziklelevélben és a gyökércsúcsban jelentkezett, bár az elsődleges levelekben, a hipokotilban és a gyökérben is detektálható volt (9/D ábra). A *CRY1* valamint a kontrollként használt *CAB2* promóter kifejeződése a föld feletti szervekre korlátozódott (9/A, 9/G ábra).

4 napos, sötétben nőtt csíranövényekben is megvizsgáltuk a promóter-aktivitás térbeli eloszlását (10. ábra). Alapjában hasonló kifejeződési mintázatot mutattak, mint a fénycikluson nőtt csíranövények: föld feletti részekben sokkal hangsúlyosabb volt a fotoreceptor-promóterek aktivitása, mint a gyökérben. A hajtáson belül is a hipokotilkampó és a sziklevél a fő megjelenési hely, míg a hipokotil alsó felében minden esetben drasztikusan lecsökkent a kifejeződés. A gyökérben ismét a gyökércsúcsra koncentrált az aktivitás, de messze elmaradt a fényen nőtt növényekétől. Szinte kizárólag a sziklelevélben termelődött a *CRY1* és a *PHYD* receptor (10/F, 10/D ábra). A *PHYB* és *PHYC* promóter a sziklelevélben a legaktívabb, de a hipokotil-kampó régióban is magas szinten működnek (10/B, 10/C ábra). A *PHYA* és a *CRY2*, melyek a nagyon alacsony intenzitású vörös illetve kék fény érzékeléséért felelősek, a hipokotil felső szakaszán termelődtek legnagyobb mennyiségben (10/A, 10/G ábra).

Az eddigi kísérletekben a gyökércsúcsban is megjelent a fotoreceptor-promóterek aktivitása, viszont a képek alapján nem lehet megállapítani, hogy van-e kitüntetett sejtszövet, melyre jellemző a fotoreceptorok jelenléte. A nagyobb felbontás létrehozása érdekében egy folyékony nitrogénnel hűtött CCD kamerát összeépítettünk egy fénymikroszkóppal. Ezzel a kombinációval akár sejtszintű felbontás is elérhető. A *PHYA::LUC+* konstrukciót hordozó növény sötét-adaptált gyökeréről készítettünk felvételeket (11. ábra). Azért ezt a transzgént



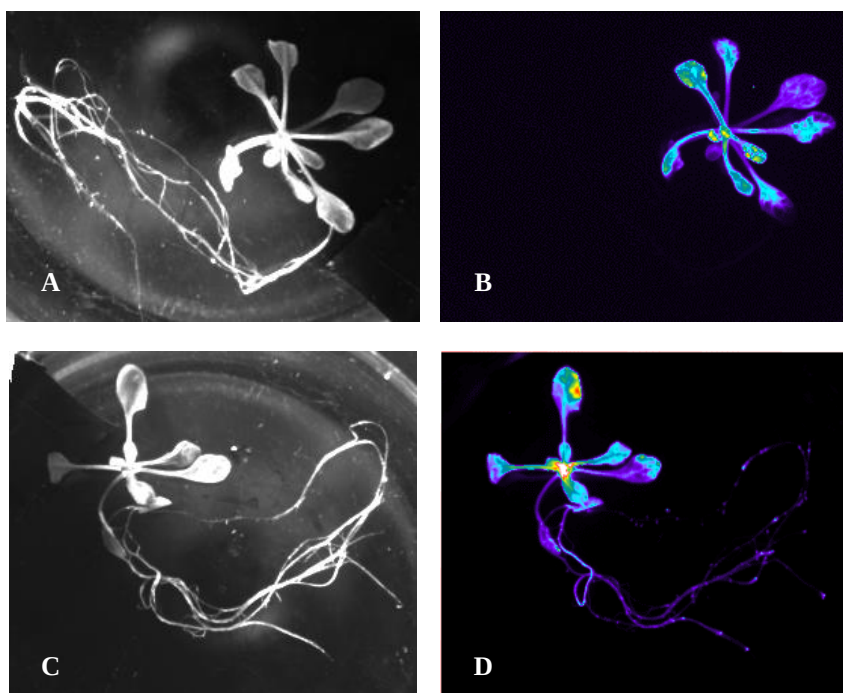
11. ábra A *PHYA* gén kifejeződése a gyökércsúcsban

Sötét-adaptált csíranövények gyökércsúcsáról készült lumineszcens képek (jobbra) és a nekik megfelelő valós felvételek (az azonos sorban balra). A felső és alsó képsor ugyanazon gyökér egymáshoz közel eső fokális síkját mutatja. A lumineszcens felvételen a sötétebb árnyalat az erősebb intenzitást jelenti. ([vissza](#) az összefoglalásba)

választottuk, mert a továbbiakban a *PHYA* promóter szerv- és szövetspecifikus kifejeződésével részletesebben is foglalkozni kívántunk.

A legintenzívebb lumineszcens jelet jól körvonalazhatóan a gyökérsüveg sejtjeiben detektáltuk; továbbá gyengén kirajzolódott a vaszkuláris szövet körvonala. Ezzel ellentétben a gyökérmerisztéma szinte alig mutatott aktivitást. A gyökérsüveg feladata a gyökér növekedési irányának kijelölése, melyet döntő módon a gravitáció befolyásol, de a fénynek is van kisebb módosító szerepe: a kék fény negatív fototropizmust indukál, mely sokkal jelentősebb, mint a vörös fény által előidézett pozitív fototropizmus (Kiss és mtsai, 2003). Ez az élettani folyamat megmagyarázhatja a fotoreceptorok termelődését a gyökérsüvegben.

A *PHYA* termelődésével részletesebben kívántunk foglalkozni mind az egyedfejlődés korai, mind a későbbi szakaszában, ezért a promóter-aktivitásának térbeli eloszlását 3 hetes korban is jellemeztük. A 12 óra fény/12 óra sötét fényperióduson nőtt 21 napos *PHYA::LUC+*



12. ábra A *PHYA* gén kifejeződése fejlett növényben

3 hetes *CAB2::LUC+* (B) és *PHYA::LUC+* (D) transzgénikus *Arabidopsis* növények lumineszcens képe, valamint velük egy sorban a nekik megfelelő valós fényképek, *CAB2::LUC+* (A) és *PHYA::LUC+* (C). A lumineszcens képek színei nem valós színek, hanem a jel intenzitását mutatják: fehértől a feketéig csökkenő értékekkel.

és *CAB2::LUC+* transzgénikus növény luciferáz-aktivitása a csíranövény-korban megfigyelhető eloszlást tükrözi (12. ábra). A *CAB2* csak a föld feletti szövetekben, azon belül a különböző korú és fejlettségű levelekben egyenletesen termelődik. Ezzel szemben a *PHYA* az egész növényben termelődik, bár nem egyenletesen: a hajtáscsúcsban és a fiatal levelekben nagyobb mennyiségben jelenik meg, mint a fejlett levelekben. A gyökérben továbbra is detektálható az expresszió, de ebben a korban már a gyökércsúcsban kevésbé hangsúlyos a jelenléte, viszont a gyökér más részeiben felerősödik.

5.2 Fotoreceptor promóterek diurnális szabályozása

Először arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a fotoreceptorok kifejeződése mutat-e napi fluktuációt fény/sötét (LD) ciklusokon tartva. Ilyen ritmusok megjelenésének oka lehet a ritmikusan változó környezeti jel közvetlen indukáló illetve gátló hatása; vagy más esetekben a cirkadián szabályozás. Amennyiben a környezeti tényező, jelen esetben a fény közvetlenül idézi elő a diurnális ritmust, úgy a kifejeződés változó tendenciája köthető a fény megjelenéséhez és megszűnéséhez. Ha a cirkadián óra vezérli a génátíródást, akkor az emelkedő szakasz már a környezeti tényező változása előtt elkezdődik. Olyan eset is elképzelhető, amikor a két szabályozó tényező együtt alakítja ki a kifejeződés mintázatát. Ebben az esetben a mintázat a következőképpen alakul ki: a fény ki- vagy bekapcsolása időpontjában egy erőteljes változást mutat, ami pár óra múlva belesimul a cirkadián görbe vonalába. A fény hatásának megfelelően ez lehet az indukció okozta expresszió növekedés, vagy gátlás következtében megjelenő csökkenés.

Ilyen szempontok alapján fitokróm illetve kriptokróm promóter-luciferáz konstrukciókat hordozó transzgénikus növényekben követtük nyomon a transzkripció időbeli mintázatát. Kontrollként a már alaposan jellemzett *CAB2::LUC+* transzgént hordozó csíranövényeket használtuk. A mérési adatok három független transzformáns vonalban mért adatokat reprezentálnak.

Az összes vizsgált promóter diurnális ritmust mutatott, de eltérő amplitúdóval és fázissal, bár a maximumot minden esetben a fényszakaszban érték el. A *PHYA* tipikus bifázisos görbét mutat ([13/A ábra](#)). Az első csúcs rögtön a fény bekapcsolása után jelenik meg, amelyet a fény közvetlen gátló hatása alakít ki. A sötét fázis előtt pár órával megfigyelt második csúcs pedig a cirkadián óra hatását mutatja. Ez a görbe a cirkadián óra és a fény regulációjának együttes jelenlétét tükrözi. A *PHYB::LUC+* ritmusának amplitúdója nagyon hasonló a *PHYA*-hoz, de körülbelül 4 órával korábbi fázisban ritmizál (13/A ábra). A *PHYD*

és *PHYE* promóter esetében kisebb mértékű diurnális expresszió volt megfigyelhető, a *PHYB*-hez hasonlóan korai maximummal (13/C ábra). A *PHYC* ritmikus jellege kevésbé kifejezett a többi fényreceptoréhoz képest (13/B ábra): kis amplitúdójú, egyenletes emelkedést mutat a fényfázisban, melynek végén eléri a maximumot, majd a fény megszűnése után azonnal leesik a szintje, s állandó értéken marad a következő fényfázis kezdetéig. A fázisok egybeesése a fény ki- és bekapcsolásával az sugallja, hogy ebben az esetben fény vezérlő szerepe az elsődleges. A *CRY1::LUC+* aktivitása a kontroll *CAB2* promóteréhez hasonlóan robusztusan ritmizál a fényfázis közepén megfigyelhető fázisban (13/D ábra). A *CRY2* viszont sokkal gyengébb periódicitást mutat, a sötétszakasz előtti csúccsal (13/D ábra). A *PHYC*-t kivéve a fitokrómok és kriptokrómok fény/sötét perióduson tapasztalható ritmikus expresszióváltozása nem köthető szorosan a fény ki- illetve bekapcsolásához, ami a cirkadián óra által kontrollált napi ritmusú folyamatokra jellemző.

5.3 Fotoreceptorok promótereinek cirkadián szabályozása

Miután a vizsgált fotoreceptorok génátíródása diurnális jellegű, azt szeretnénk volna tanulmányozni, hogy ez a mintázat a cirkadián óra hatásának köszönhető-e. A cirkadián ritmusok jellemző tulajdonsága, hogy állandó körülmények között is fennmaradnak. Ezért a kérdés eldöntésére megvizsgáltuk a fitokróm és kriptokróm promóterek aktivitását konstans fényviszonyok mellett, miközben minden más cirkadián órát beállító faktort állandó szinten tartottunk.

12 óra fény/12 óra sötétben, állandó hőmérsékleten nőtt 7 napos csíranövények luciferáz-aktivitását először folyamatos fényben (LL) követtük nyomon. A cirkadián kísérletek nulla időpontja (ZT0) megegyezés szerint az állandó környezetbe helyezés előtti utolsó beállító szignál, esetünkben az utolsó sötét-fény átmenet.

Ilyen körülmények között a legtöbb gén ritmikus kifejeződést mutatott, ami arra utal, hogy a cirkadián óra kontrollja alatt állnak. Ez alátámasztja az LD cikluson mért adatokat, bár azokhoz képest kisebb eltérések is megfigyelhetők, ami leggyakrabban a fázis 1-2 órás csúszását jelenti. Például a *PHYA* és *PHYB* később éri el a maximális aktivitását LL-ben, mint LD cikluson (13/A és [14/A ábra](#)), míg a *PHYD* és *PHYE* kicsit korábbi fázisban ritmizál (13/C és 14/C ábra). A *PHYA*-ra emellett jellemző egy kis mértékű amplitúdó-csökkenés is, míg a többi fotoreceptor esetében ez nem szignifikáns. A kriptokrómok kifejeződésében viszont nem volt látható eltérés a fény/sötét perióduson mérthez képest (14/D ábra). Egyedül a

PHYC::LUC+ görbéje változott drasztikusan: nem mutat napi ritmust (14/B ábra), így megállapíthatjuk, hogy az LD-ben látható periódicitását a fényreguláció alakítja ki.

A cirkadián ritmusok megfigyelésére alkalmas másik kísérleti felállás a fény/sötét ciklust felváltó állandó sötét (DD), állandó hőmérsékleten. Régebbi megfigyelés, hogy számos cirkadián ritmus sötétben gyorsan lecseng, erre jó példa a *CAB2* promóter-aktivitása (Millar és mtsai, 1991). Ezekben az esetekben a ritmikus jelleg megfelelő amplitúdójú fenntartásához a fény indukáló hatására is szükség van.

A csíranövényeket az előző kísérletekben leírt körülmények között neveltük, majd az utolsó sötét-fény átmenet után kezdődött a mérés, azaz a folyamatos sötétbe 12 órával a mérés kezdete után kerültek. A folyamatos fényben tapasztalt ritmusokkal összevetve a fázisokban nincs eltérés, viszont szembeötlő az amplitúdók jelentős csökkenése és ezzel párhuzamosan a fokozatosan emelkedő vagy süllyedő expressziós szintek. A *PHYA::LUC+* és a *PHYB::LUC+* aktivitása az első szubjektív nappal alatt hirtelen megnőtt, majd a továbbiakban ezen az emelt szinten ritmizált, az LL-ben mérthez képest kisebb, egyre csökkenő amplitúdóval (15/A ábra). Enyhébb expresszió-ugrás tapasztalható a *PHYE* esetében is (15/C ábra), de itt nem párosul fokozatos amplitúdó-csökkenéssel, mint az előbb említett fitokrómoknál. A *PHYD* gén kifejeződésre nincs hatással a fényviszonyok változása, a DD-ben kapott görbe szinte megegyezik az LL-ben mérttel (14/C és 15/C ábra). A fitokrómok közül egyedül a *PHYC* képez kivételt, mivel ezen csak a sötét-represszióból származó gyors aktivitás-csökkenés látható, a cirkadián szabályozás jele nélkül (15/B ábra). A *CRY1::LUC+* ritmus amplitúdója enyhén lecseng, miközben magasabb aktivitási értéket ér el (15/D ábra). A *CRY2* erős sötétindukciót mutat, s ennek köszönhető a folyamatosan növekvő aktivitás, melyre ráépül a cirkadián reguláció (15/D ábra).

5.4 A fitokrómok és kriptokrómok mRNS molekuláinak cirkadián jellegű akkumulációja

Miután megállapítottuk, hogy a fotoreceptorok zömének transzkripciója a cirkadián óra szabályozása alatt áll, továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ez a hatás érvényesül-e az mRNS-felhalmozódás szintjén is, illetve újabb szabályozó lépések megváltoztatják-e a kifejeződés ritmikus jellegét.

A fenti kísérletekben leírt módon neveltünk vad típusú csíranövényeket, majd folyamatos fénybe helyeztük és nyomon követtük bennük a különböző fotoreceptorok mRNS-mennyiségének alakulását RNáz protekció segítségével.

Az összes fitokróm és kriptokróm mRNS-szintje jól detektálható cirkadián ritmust mutatott (16. ábra), melyek fázisa azonos, vagy 2-4 órával korábbi a megfelelő lumineszcens adatokhoz képest. A *PHYA*, *B* (16. ábra A) és a *CRY1, 2* (16. ábra D ábra) mRNS szintje közel hasonló amplitúdóval ritmizál, mint a transzkripciójukat leíró a promóter-luciferáz transzgének. Ez arra utal, hogy a transzkripció cirkadián regulációjának hatása áttevődik az mRNS-akkumulációra is, viszont ezen a szinten további szabályozó lépés nem jelenik meg. A *PHYD* és *PHYE* mRNS szintje viszont a transzkripciónál erősebb cirkadián jelleget mutat (16. ábra C ábra), 3-4-szeres amplitúdóval rendelkezik a promóter-aktivitáshoz viszonyítva. Így esetükben feltételezhetünk egy olyan óra-szabályozott folyamatot, mely befolyásolja az mRNS szintézisét vagy stabilitását, emelve ezzel a ritmus amplitúdóját, viszont nem változtatja meg a fázisát. Meglepő eredményt hozott a *PHYC* vizsgálata: míg a promóter-aktivitás szintjén nem tapasztaltunk napi ritmust, ez annál kifejezettebben jelenik meg az mRNS-akkumulációban (16. ábra B ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a cirkadián óra a *PHYC* expresszióját inkább poszt-transzkripciós szinten irányítja, mint a promóter-aktivitás szintjén.

5.5 A *PHYA* gén három különböző méretű mRNS molekulájának cirkadián ritmusa

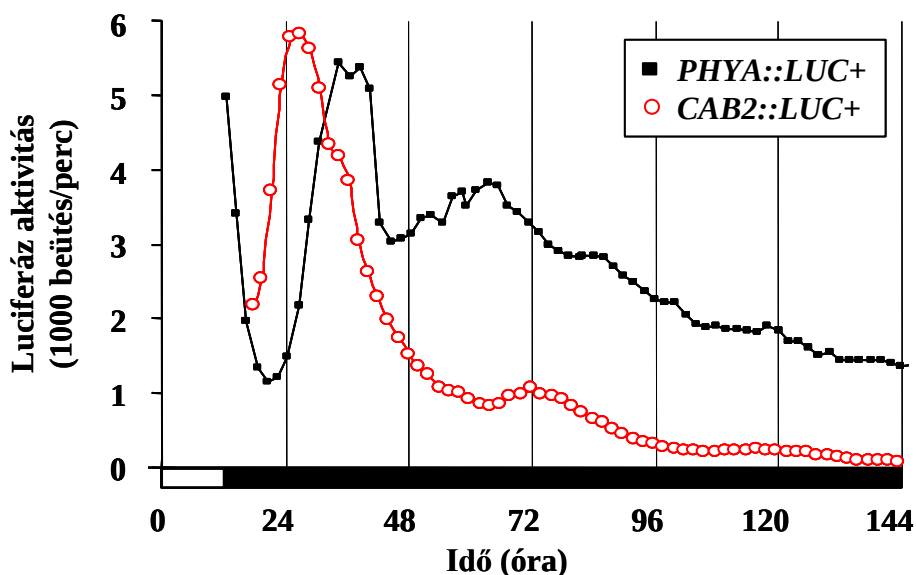
Arabidopsisban a *PHYA* gén transzkripciója 3 különböző méretű mRNS molekulát eredményez. Mivel ezek fény hatására lényegesen eltérően viselkednek, érdemesnek tartottuk megvizsgálni, mutatkozik-e különbség a 3 transzkriptum cirkadián szabályozásában, vajon mindegyik megjelenése ritmikus-e, s ha igen, van-e közöttük fázis- vagy amplitúdóbeli különbség.

2 hetes vad típusú növényeket állandó megvilágítási körülmények közé (LL, DD) helyeztünk, majd a 4 óránként vett mintákból specifikusan meghatároztuk a három mRNS szintjét. Mind a három transzkriptum közel azonos fázisú ritmust mutatott állandó fényen (17. ábra). Állandó sötétben - a promóter-aktivitás adatokkal összhangban - egységesen viselkednek: az első 24 óra után mennyiségük jelentősen megemelkedik, elfedve ezzel a görbe cirkadián jellegét.

5.6 A *PHYA* transzkripció ritmicitásának eltérő mértékű kifejeződése intakt növényekben és izolált szervekben

Az előző kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a csíranövényekben kisebb-nagyobb eltéréssel mindegyik fotoreceptor cirkadián módon fejeződik ki, melyet a fény szabályozó hatása hol felerősít, hol gyengít. A továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon az egyedfejlődés során fennmarad-e a szabályozás, azaz fejlett növényekben is megfigyelhető-e ez a napi periódikus kifejeződés. Részletesebb vizsgálatra a *PHYA* promóter választottuk ki, mivel ez a fehérje különösen fontos és egyedülálló szerepet tölt be a fényérzékelésben, így részletes jellemzése érdekes adatokat szolgáltat.

12 óra fény/12 óra sötétben, állandó hőmérsékleten nőtt 21 napos növényeket folyamatos sötétbe helyeztünk, miközben CCD kamerával rögzítettük az egyes növények luciferáz-aktivitását. Az 18. ábrán megfigyelhetjük, hogy a *PHYA* promóter szabályozásában még mindig felismerhető a napi ritmus, a csíranövényekben tapasztalt fázissal, a szubjektív éjszaka kezdetén. Azonban a csíranövényre jellemző görbével szemben (15/A ábra) több eltérés is tapasztalható. A felnőtt növényekben az első sötétben megjelenő csúcs (kb. ZT36) után a kifejeződés mértéke fokozatosan csökken, míg a csíranövényben állandó magas szinten



18. ábra A *PHYA* gén kifejeződése 21 napos intakt növényben folyamatos sötétben

Az X tengely felett a fehér sáv a fényszakaszt, a fekete a sötétszakaszt mutatja.

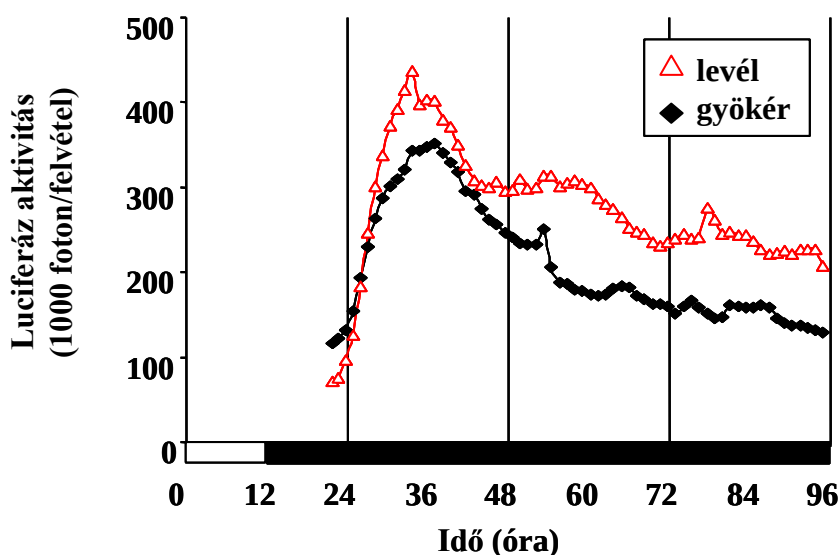
maradt. Másrészt a ritmicitás kevésbé határozott, gyorsan lecseng a 21 napos növényekben, több esetben a második cirkadián maximum már nem észlelhető.

A görbe alakja azt sugallja, hogy a fejlett növényekben - a csíranövénytől eltérően - a sötét-indukció után a szabályzó folyamatok (melyek lehetnek: a fényviszonyokból származó elnyújtott hatás, vagy a cirkadián reguláció) nem képesek biztosítani a magas szintű kifejeződést, így az első cirkadián csúcs után fokozatosan csökken az aktivitás szintje.

Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a cirkadián óra szövetspecifikusan hat-e a *PHYA* gén kifejeződésére. Egyes szervek luciferáz-aktivitását úgy szeparáltuk az egész növényből származó jeltől, hogy - a szövetek megsértése nélkül - gallért helyeztünk el a vizsgálandó rész köré, ezzel kizárva a más szervből származó jel zavaró hatását.

Ez a kísérlet annak eldöntésére is lehetőséget nyújt, hogy az egész felnőtt növényben megfigyelt csökkenő amplitúdót és gyors lecsengést vajon a szabályozás általános változása okozta-e vagy az egyes szervekben megjelenő esetleges fáziscsúszás és/vagy eltérő erősségű cirkadián kontroll eredményeként állt elő.

21 napos *PHYA::LUC+* transzformáns növények intakt, de gallérral szeparált elsődleges leveleiben, valamint gyökerében a promóter-aktivitása (19. ábra) mind fázisában, mind lefutásában megegyeztetett a felnőtt növényben detektálttal (18. ábra), habár a gyökér amplitúdója még a galléros levélben mérthez képest is csökkent. Ez arra enged következtetni, hogy intakt növény különböző szerveiben a *PHYA* termelődése egységes időbeli mintázatot követ.



19. ábra *PHYA* gén kifejeződése gallérral elválasztott levélben és gyökérben folyamatos sötétben

Az X tengely felett a fehér sáv a fényszakaszt, a fekete a sötétszakaszt mutatja.

5.7 A *PHYA* és a *CAB2* gének kifejeződése levágott levélben

Az előző kísérlet eredménye felveti azt a kérdést, hogy vajon az azonos kifejeződés sejt illetve szövet szinten kódolt, vagy egy intercelluláris jel uniformizálja a növény egyes részei között.

A kérdés megválaszolására 12 óra fény/12 óra sötét fényperióduson nevelt 21 napos *PHYA::LUC+* transzformánsok levágott vagy gallérral szeparált elsődleges leveleinek luciferáz-aktivitását hasonlítottuk össze folyamatos vörös fényben és folyamatos sötétben.

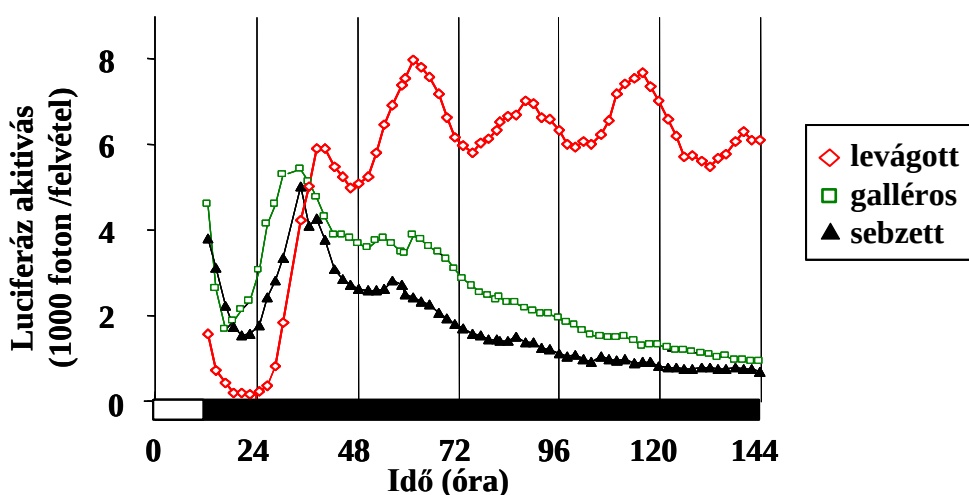
Meglepő módon szignifikáns eltérés mutatkozott az intakt és a levágott levelek aktivitásában ([20. ábra](#)). Mindkét mérési körülményben a *PHYA::LUC+* ritmusa a levágott levelekben lényegesen nagyobb amplitúdójú, tovább fennmaradó cirkadián görbét mutat; továbbá az expresszió nem csökkent radikálisan az idő előrehaladtával. A *CAB2* promóter-aktivitását is megvizsgáltuk abból a szempontból, hogy változik-e az izolált szervben a cirkadián kifejeződés erőssége, vagy ez csak a *PHYA* promóter sajátja. Folyamatos sötétben a *CAB2* esetében is sokáig fennmaradó, lényegében nem csillapodó amplitúdójú a ritmus. Folyamatos fényben viszont éppen ellenkezően viselkedik: a galléros levél ritmusához képest kisebb amplitúdójú, lassan lecsengő aktivitás-görbét kapunk. Eközben egyik promóter-aktivitásának mértéke sem tér el lényegesen az intakt levélétől, valamint a fény- illetve sötét-indukált direkt aktivitásváltozások - úgymint a *PHYA* kifejeződésének emelkedése és a *CAB2*-ének drasztikus csökkenése sötétben –a szerv izolálása után is megjelentek.

Úgy tűnik, hogy a levél levágása után a görbék leginkább a cirkadián regulációt tükrözik, a ritmikusan szabályozott fényindukció nélkül, ami a cirkadián ritmusok amplitúdójának erősségét meghatározó fontos tényező.

5.8 A sebzés és kalluszosodás hatása a *PHYA* kifejeződésre

Az izolált szervben megfigyelt viselkedésre több magyarázat is adódik. Lehetséges, hogy az intakt növényben a levélnyélén keresztül a növény más részeiből olyan szignál érkezik, mely befolyásolja a *PHYA* és a *CAB2* gén átíródását. Viszont az is elképzelhető, hogy a vágás ejtette sebzés indukálta a megfigyelt változást.

Ennek eldöntésére összehasonlítottuk a 21 napos növény gallérral szeparált, levágott, valamint sebzett levelében mérhető *PHYA*-luciferáz aktivitását sötétben. A sebzést egy gallérral szeparált levélen ejtettük, kétféle módon: 1. csipesszel megszúrkáltuk; 2. a főérrel párhuzamosan metszéseket ejtettünk.



21. ábra A *PHYA* gén kifejeződése gallérral elválasztott, levágott és sebzett levélben, folyamatos sötétben

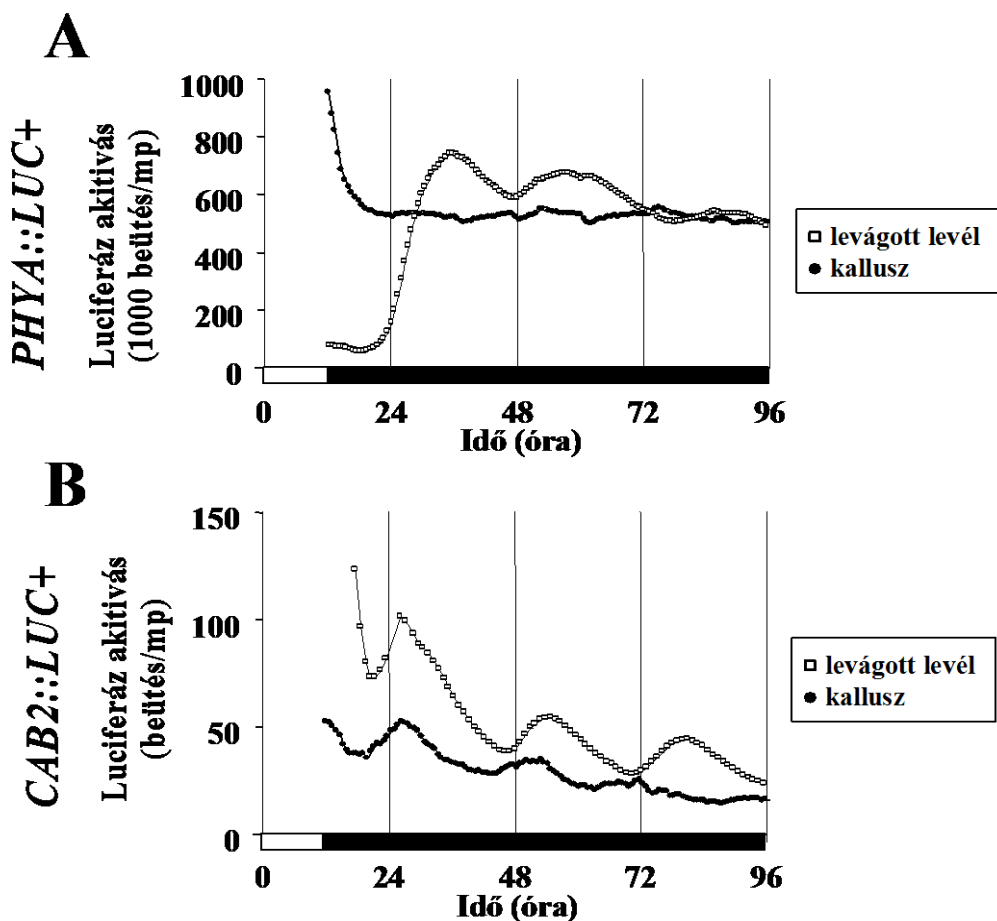
Az X tengely felett a fekete sáv a sötétszakaszt, a fehér sáv a fényszakaszt mutatja.

A ritmus gyors lecsengését figyelhetjük meg mind az intakt, mind a sebzett levél görbében, míg a levágott levélben nem csillapodik az amplitúdó még a 4. nap után sem (21. ábra). A grafikon reprezentálja mindkétféleképpen sebzett levélben mért eredményt. Ebből levonható az a következtetés, hogy a cirkadián ritmus erősödését nem a sebzési stressz indukálta.

A vágott felületeken gyakran megindul a differenciálatlan osztódás: a kallusz-képzés. Elképzelhető, hogy az lehet a magyarázata a tapasztalt különbségnek, hogy a kallusz megjelenése, azaz a sejtciklus programjának „felpörgése” megváltoztathatja a cirkadián szabályozást. Ennek vizsgálatára a *PHYA::LUC+* és a *CAB2::LUC+*-t hordozó transzgénikus *Arabidopsis* leveleiből kalluszt hoztunk létre, és ezek cirkadián viselkedését vizsgáltuk meg folyamatos sötétben.

A 22. ábra A paneljén megfigyelhető, hogy a kalluszban a *PHYA* promóter-aktivitása nem mutat semmilyen cirkadián jelleget. Összehasonlítás érdekében a levágott levél görbáját is ábrázoltuk a grafikonon. Ezzel ellentétben a *CAB2* kalluszban is az óra szabályozása alatt áll, bár az amplitúdó még a levágott levélben tapasztalhatónál is jelentősen kisebb (22/B ábra).

Ezt az eredményt az előző kísérlettel összegezve megállapíthatjuk, hogy sem a sebzés, sem a kallusz-képzés nem idézhette elő a cirkadián szabályozás változását a levágott levélben. Valószínűbbnek tűnik, hogy a növény más részéből származó, a fény hatását közvetítő endogén jel hiánya okozta a változást.



22. ábra A *PHYA* és *CAB2* gének cirkadián kifejeződése levágott levélben és kalluszban, folyamatos sötétben

Az X tengely felett a fekete sáv a sötétszakaszt, a fehér sáv a fényszakaszt mutatja.

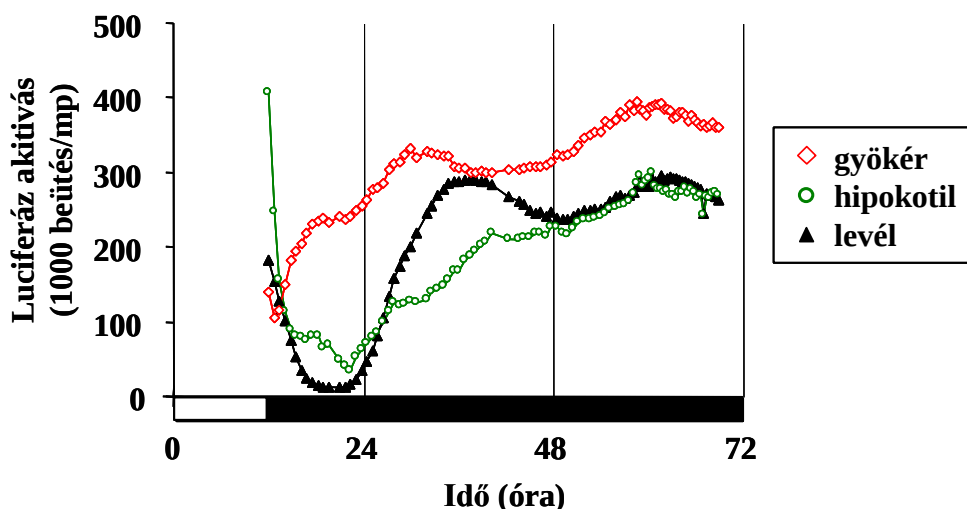
5.9 A *PHYA* cirkadián kifejeződésének szövetspecifikus megjelenése

Mivel a *PHYA* promóter az egész növényben aktív (12. ábra), arra kérdésre kerestük a választ, hogy a levágást követő eltérő viselkedés minden szervre jellemző jelenség-e, vagy a növény bizonyos részei nem egységesen szabályozottak ebből a szempontból.

21 napos növények szerveit (levelet, gyökeret és hipokotilt) 6 órával a mérés kezdete előtt levágtuk, majd folyamatos sötétben CCD kamerával nyomon követtük a luciferáz-aktivitás napi változását.

Az izolált szervekben a kifejeződés mintázata nagymértékben különbözött (23. ábra). A levél az előző kísérletben is leírt módon az első szubjektív nappal alatt egy magasabb aktivitási szintet ért el, majd ezen a szinten kis amplitúdóval oszcillált. Ezzel szemben a gyökérdarabok folyamatosan emelkedő görbéjének cirkadián jellege gyengébb; a hipokotildarabok pedig aritmásnak tekinthetők. Az amplitúdót érintő változáson túl megfigyelhető, hogy a gyökér ritmusának fázisa 3-4 órával korábbra tolódott.

Ez a kísérlet egyértelműen megmutatja, hogy egy adott gén átíródására kifejtett cirkadián hatás nem egységes az egész növényben, hanem különböző módon érvényesül az egyes szervekben vagy szövetekben.



23. ábra *PHYA* gén kifejeződése levágott szervekben folyamatos sötétben

Az X tengely felett a fekete sáv a sötétszakaszt, a fehér sáv a fényszakaszt mutatja.

6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Régóta ismert az a tény, hogy a cirkadián órát beállító fénykörülmények jelét a fotoreceptorok közvetítik a központi oszcillátor felé. A kriptokrómok (*cry1* és *cry2*), valamint a fitokróm receptorcsalád legtöbb tagja (*phyA*, *B*, *D*, *E*) kisebb-nagyobb mértékben szerepet játszik az input folyamatokban.

Jelen dolgozat célja az *Arabidopsis* fitokrómok és kriptokrómok kifejeződésének, ezen belül azok napi mintázatának különböző expressziós szinteken és különböző megvilágítási körülmények között történő vizsgálata. Mindezek mellett jellemezni kívántuk a promóter-aktivitás szövetspecifitását a luciferáz vizsgálati rendszer segítségével.

6.1 A fotoreceptorok szövetspecifikus kifejeződése

A fitokrómok és kriptokrómok szövetspecifitásáról a szakirodalomban eddig közölt adatok nem tették lehetővé a teljes körű összehasonlítást, mivel a különböző cikkek más-más korú, eltérő körülmények között nevelt növényeket használtak (Somers és Quail, 1995a, 1995b; Goosey és mtsai., 1997; Clack és mtsai., 1994; Ahmad és Cashmore, 1993; Hoffman és mtsai., 1996).

Munkánk első szakaszában ezt az hiányt szerettük volna pótolni. Egyrészt képi adatokat kívántunk nyújtani a kriptokrómok valamint a *PHYC* szövetspecifikus kifejeződésével kapcsolatban; másrészt egy kísérletben akartuk ábrázolni a két receptorcsalád tagjainak promóter-aktivitását különböző nevelési körülmények között, ami segíthet az eddig megismert funkciójuk térbeli összekapcsolásában. Vizsgálataink során a hét fotoreceptor (*PHYA-E*, *CRY1,2*) szövetspecifikus promóter-aktivitását jellemeztük 7 napos, fényen nőtt *Arabidopsis* csíranövényekben promóter-luciferáz transzgének segítségével (9. ábra). Megfigyeltük, hogy a fotoreceptorok transzkripciója az összes szervben detektálható. A föld feletti részekben erősebb a kifejeződés; a *CRY1* kivételével a gyökérben is megjelenik, főképp a gyökércsúcsba koncentrálódva. A gyökércsúcsban detektálható jelért a gyökérsüveg-sejtekben erősen kifejeződő promóter-aktivitás a felelős (11. ábra). A gyökérsüveg feladata a gyökér növekedési irányának kijelölése. Ebben döntő tényező a Föld gravitációs vonzása, mely pozitív gravitropikus elmozdulásra serkenti a gyökércsúcsot. A gravitáció érzékelésére a gyökér egy iránytűhöz hasonló rendszert alakított ki, ahol a „mutató” mindig a Föld középpontja felé mutat. A „mutató” nem más, mint a gyökérsüveg-sejtek citoplazmájában

szabadon elmozduló amiloplasztok, melyek viszonylag nehéz keményítőszemcséket tartalmaznak. Az amiloplasztokat minden oldalról körülveszi az endoplazmatikus retikulum hálózata. A szemcsék a gravitáció hatására a Föld középpontja felé eső endoplazmatikus retikulumra süllyednek, így abból mechanikus ingerléssel Ca^{2+} kiáramlást eredményeznek, ezzel megadva a növekedés irányát (Kiss és mtsai., 1989). De ezen a mechanizmuson túl más környezeti tényezők is módosíthatják a gyökérnövekedés irányát. Így megfigyelték a gyökér fototropikus növekedését is. A kék fény indukálta negatív fototropizmus sokkal jelentősebb, mint a vörös fény által előidézett pozitív fototropizmus, de mindkettő csak mérsékelten képes változtatni a gravitáció által kijelölt irányon. A harmadik fotoreceptor-család tagjai, a kék fényt érzékelő fototropinok a fő irányítói a trofikus folyamatoknak, így a fototropizmusnak is (Vitha és mtsai., 2000), viszont a többi receptor is befolyásolja a hatásukat. Konkrétan a *phyA* és *phyB* szerepét igazolták ezekben a folyamatokban (Ruppel és mtsai, 2001). Keményítőhiányos mutáns háttérben vizsgálták *phyA*, *phyB* és a dupla mutánsok gyökérnövekedését oldalirányú vörös fényben. Minden esetben csökkent a pozitív fototropikus válasz, ami azt bizonyítja, hogy mindkét vörös fényreceptor részt vesz a folyamatban. A többi fitokróm szerepét még nem tanulmányozták részletesen.

A fotoreceptorok etiolált növényekben megfigyelt kifejeződési mintázat (10. ábra) némileg eltér a fényen nőtt növényekben tapasztaltaktól (9. ábra). Míg a fényen nőtt növényekben a sziklevél és a hajtáscsúcs volt az aktivitás kitüntetett helye, addig az etiolált növényekben ez a hipokotil felső részébe illetve a sziklevélbe tolódott.

A tapasztalható különbségek a nevelési körülményekből származó morfogénikus sajátságokból adódnak. Az etiolált csíranövényeknek arra kell felkészülnie, hogy amikor hajtás kibukkan a föld felszínén, azonnal meginduljon az de-etioláció folyamata. Így érthető, hogy a fotoreceptorok nagy mennyiségben a hajtás legfelső részében jelennek meg: a hipokotilkampóban termelődő fotoreceptorok a növekedés leállításában, a sziklevélben termelődők pedig a fotoszintézis beindításában és a sziklevél felületének növelésében játszhatnak nagyobb szerepet. A fényen nőtt csíranövényben a fotoreceptorok a további levelek kifejlődéséhez és a fotoszintézis irányításához szükségesek, ezért a fejlődő szervekben legnagyobb a promóter-aktivitásuk.

Érdemes megemlíteni, hogy a természetben a fényen nőtt növények gyökere továbbra is sötétben nő a talajban, tehát feltételezhetjük, hogy bennük a fotoreceptorok az etiolált csíranövényben látott alacsonyabb szinten fejeződnek ki. A kísérleti körülményeink között a fényen nőtt csíranövények gyökerét is érte a napi 12 órás fénykezelés, így a gyökércsúcsban tapasztalt megnövekedett aktivitás a fényreceptor-gének állandó indukciójának eredménye

lehet. Ennek mértékét viszont az általuk használt vizsgálati módszer segítségével nem lehet megállapítani.

6.2 A génexpresszió diurnális szabályozása

A fitokrómok és a kriptokrómok promóter-aktivitását diurnális ritmus jellemezi, mely a fényfázis alatt éri el a maximumát. Mégsem egységes a szabályozás, mert a fázisuk kisebb, az amplitúdójuk jelentősebb eltéréseket mutat (13. ábra). A *PHYC* kivételével cirkadián jelleg is megjelenik LD cikluson, mivel az aktivitás emelkedése még a fény megjelenése előtt, a sötétszakaszban megkezdődik.

A promóter-aktivitás cirkadián regulációját állandó fényviszonyok között vizsgálva megállapítottuk, hogy a *PHYC* kivételével mindegyik vizsgált fotoreceptor expressziója ritmikus (14., 15. ábra). Folyamatos fényben (14. ábra) és folyamatos sötétben (15. ábra) a cirkadián szabályozás nem különbözött az LD-n tapasztaltaktól, viszont az egyes fotoreceptorok fényindukciója/repressziója megváltoztatta a görbék lefutását. Általánosan elmondható, hogy az oszcilláció erőssége, azaz amplitúdója elmarad a fény/sötét perióduson mérttől, viszont a fázisukban nincs eltérés. Ez arra enged következtetni, hogy a cirkadián szabályozás és a fény hatása egymást erősítve hozzák létre a diurnális ritmust.

6.3 Fényregulált promóter-aktivitás

A fény promóter-aktivitásra gyakorolt hatását tükrözi a DD-ben és LL-ben kapott görbék közötti eltérés (14. és 15. ábra). Ennek alapján a *PHYA*, *PHYB*, valamint a *CRY2* gén fény által represszált, a *PHYC* és a *CRY1* fényindukált, a *PHYD* és *PHYE* promóter-aktivitását pedig a fény nem szabályozza. Ezeket a megfigyeléseket alátámasztja a két kísérletben mért adatok átlagának összehasonlítása is.

Eredményeink megegyeznek a korábbi promóter-GUS adatokkal (Somers és Quail, 1995b; Goosey és mtsai., 1997), viszont a *PHYC*, *CRY1* és *CRY2* esetében a fény hatását mRNS-szinten leíró közlemények látszólag ellentmondanak (Clack és mtsai., 1994; Ahmad és Cashmore, 1993; Lin és mtsai., 1998). Ennek oka lehet egyrészt az eltérő kísérleti körülmények, másrészt a különböző vizsgálati szintek alkalmazása. Az általunk mért mRNS-mennyiség adatokból nem tudunk a fény direkt szabályozó hatására vonatkozó következtetéseket levonni, hiszen csak a *PHYA* esetében vizsgáltuk meg az mRNS-

akkumulációt mindkét állandó fénykörülményben, ezért nem tudjuk összevetni a saját mRNS-szintű adatainkat a korábbiakkal.

6.4 A kifejeződés cirkadián szabályozása

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy az összes vizsgált fotoreceptor cirkadián szabályozás alatt áll. Ennek hatása, azaz a napi ritmus megjelenik a promóter-aktivitás (14., 15. ábra) és az mRNS-felhalmozódás szintjén is (16. ábra). Kivételt képez a *PHYC*, melynél a regulációt csak az mRNS-szint oszcillációja jelzi.

A kifejeződés különböző szintjein tapasztalt ritmusok fázisa lényegében megegyezett, ebből arra következtethetünk, hogy a transzkripciót irányító regulációs lépés hatása érvényesül az mRNS-mennyiség változásában. Tehát a poszt-transzkripcionális folyamatokat és az mRNS stabilitását a cirkadián óra nem szabályozza olyan módon, hogy az a fázis megváltozását eredményezné.

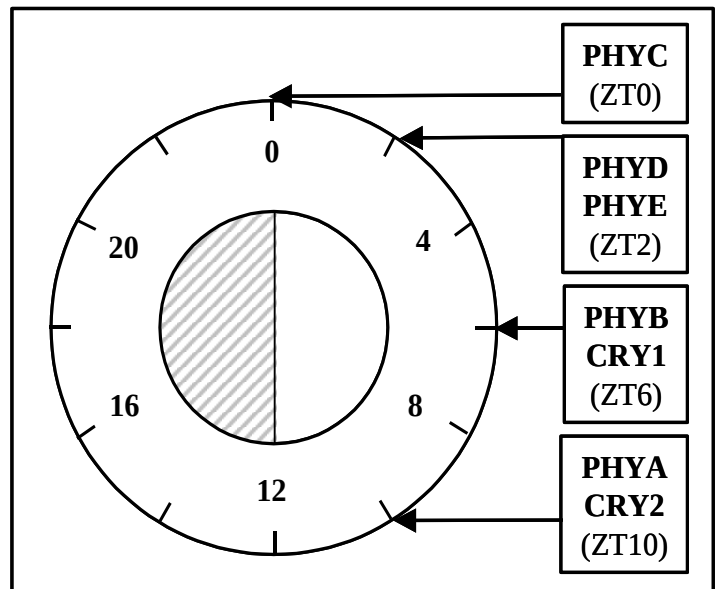
A promóter-aktivitás és az mRNS-mennyiség ritmusának amplitúdója, azaz a szabályozás „erőssége” egyes fotoreceptoroknál kisebb-nagyobb eltérést mutat. Részletesen: a *PHYA*, *PHYB* és *CRY1* esetében, melyek transzkripciójának a leghatározottabb cirkadián jellege van, az oszcilláció nem különbözik a két szinten. Sőt a *PHYA* 3 különböző méretű transzkriptumának mennyisége egymáshoz viszonyítva nagyon hasonló amplitúdóval és közel azonos fázisban ritmizál (17. ábra). A *CRY2* oszcillációja az előzőknél kisebb, de változatlan amplitúdóval rendelkezik. Megfigyelhető, hogy a *PHYD* és *PHYE* amplitúdója mRNS-szinten többszörösére emelkedik. Meglepetésre a *PHYC* promóter-aktivitása nem ritmizál, viszont az mRNS-mennyisége ritmikusan halmozódik fel. Ez arra utal, hogy a *PHYC* kifejeződését lényegesen először az mRNS-akkumuláció szintjén regulálja a cirkadián óra. A *PHYA*, *PHYB*, *CRY1* és *CRY2* esetében mRNS-szinten nem tapasztalható további cirkadián szabályozás vagy legalábbis nem jelentős. Ezzel ellentétben *PHYD* és *PHYE* esetében feltételezhetünk egy további, óra által irányított lépést, mely az oszcillációjuk amplitúdóját megnöveli.

Ezekből az eredményekből következik, hogy a génexpresszió során több szinten is megjelenik a cirkadián szabályozás. Először a promóter-aktivitást vezérli a cirkadián óra, aminek hatása mRNS-szinten is detektálható. Ez azonban a különböző fotoreceptorok esetében eltérő mintázattal rendelkezik, így az óra várhatóan egy újabb szabályozó lépéssel befolyásolja a ritmicitás “erősségét”, miközben nem módosítja annak fázisát.

Mivel a cirkadián hatás a génexpresszió szabályozásán keresztül érvényesül, az óra-regulált génkifejeződés és mRNS-felhalmozódás széleskörű jellemzésére nagy erőfeszítéseket

tettek. Az elmúlt években két publikáció is megjelent, melyekben microarray analízissel nagy számú gén expresszióját karakterizálták a cirkadián szabályozás szempontjából (Schaffer és mtsai., 2001; Harmer és mtsai., 2000). A vizsgált gének egy részét, elsősorban a cirkadián órával összefüggésbe hozhatókat, köztük természetesen a fotoreceptorokét is mindkét kísérletben elemezték. Általánosságban megállapították, hogy a vizsgált gének 2 illetve 6 %-a mutat szignifikáns cirkadián ritmust. Mindkét munka leírta a *PHYB*, a *CRY1* és a *CRY2* mRNS szintjének oszcillációját, viszont a *PHYA* kifejeződését csak az egyik csoport (Schaffer és mtsai., 2001) találta cirkadián szabályozottnak. E négy fotoreceptor esetében tapasztalt fázis azonos volt a kísérleteinkben leírt ritmusokéval (15. ábra). Megállapíthatjuk tehát, hogy a microarray analízis adatai részben igazolják megfigyeléseinket. Mint azonban azt a *PHYA* példája mutatja, eltérések adódhatnak. Ennek oka lehet egyrészt a különböző mintavételi intervallumok alkalmazása, másrészt az eltérő körülmények között nevelt, eltérő korú növények használata.

A fitokrómok és kriptokrómok génexpressziós ritmusának relatív fázisát a 24. ábra foglalja össze. A cirkadián szabályozott fotoreceptorok fázisuk alapján 4 csoportba oszthatók. A *PHYC* a sötét-fény átmenetkor (ZT0), a *PHYD* és *PHYE* a fényfázis 2. órájában (ZT2), a *PHYB* és a *CRY1* 4 órával később, azaz a fázis közepén (ZT6), a *PHYA* és a *CRY2* a sötét fázis előtt 2 órával (ZT10) éri el a maximumát.



24. ábra Az mRNS-felhalmozódás cirkadián ritmusának fázisa, állandó fényben

A vizsgált fehérjék fénystabilitása adhat magyarázatot erre az eloszlási mintázatra. A *PHYD* és *PHYE* fehérje nem degradálódik fényen, a *PHYB* és a *CRY1* fehérje is viszonylag fénystabil (Sharrock és Clack, 2002; Ahmad és Cashmore, 1993). Ennek megfelelően ezek a fényreceptorok játszanak szerepet a nagy fényintenzitás által kiváltott fényválaszokban, melyeket a fényfázis folyamatainak is tekinthetünk. Ezért logikusan ebben a napszakaszban, nappal kell a legnagyobb mennyiségben rendelkezésre állniuk, amit a korai transzkripció biztosíthat.

Ezzel ellentétben a PHYA és CRY2 fehérje kifejezetten fény-érzékeny (Sharrock és Clack, 2002; Lin és mtsai., 1998). Funkciójukat tekintve mindkettő elsődlegesen az alacsony intenzitású fényválaszokat közvetíti, melyek a fény/sötét átmenetet vagy a sötét környezetet jellemző folyamatok; ezért előnyös, hogy természetes fotoperióduson a transzkripció fázisa miatt a megjelenésük a sötét szakasz kezdetére tehető. Mivel sötétben ezek a fehérjék sem bomlanak le, így reggel a nagy mennyiségben jelenlévő phyA és cry2 biztosíthatja a legkisebb intenzitású fényválaszok kialakulását.

A fitokróm fehérjék cirkadián regulációjáról közölt legújabb eredmények tovább árnyalják a képet (Sharrock és Clack, 2002). A kísérletekben az egyes fitokróm fehérjék teljes mennyiségét követték nyomon specifikus ellenanyaggal. Kimutatták, hogy LD körülmények között diurnális ritmust mutat a PHYA és a PHYC fehérjeszintje. Állandó fényen a PHYA oszcillációja továbbra is megmarad, míg a PHYC ritmusa alig detektálható. Ezek az eredmények megkérdőjelezhetik a fenti gondolatmenetet, mely a fehérje szintjére áttevődő ritmust feltételez. Az ellentmondás mégis látszólagos, hiszen az itt jellemzett fehérjeszint magába foglalja mind az aktív, mind az inaktív formákat, nem tesz különbséget a különböző poszt-transzlációs módosításon átesett fehérjék között. A fitokrómoknak különböző foszforilációs állapotai ismertek. A foszforilált molekula lehet az egyik jelátviteli lánc funkcionális alakja, vagy akár a lebomlásra szánt forma. Ezek az adatok is bizonyítják, hogy a fitokrómok poszt-transzlációs szinten többszörösen szabályozottak. Így az összfehérjeszintjük számos reguláló folyamat összegeként alakul ki, mely nem feltétlenül mutatja az aktív formák mennyiségét. Különösen, ha figyelembe vesszük, hogy az aktív P_{fr} forma gyorsabban degradálódik, mint az inaktív P_r forma. Ezekből az adatokból nyilvánvalóan következik, hogy a fitokróm fehérjék regulációja többszintű, összetett folyamat. Így a cirkadián jellegek megjelenését elsősorban a biológiai aktivitás szintjén várhatjuk, de ez az információ még várat magára.

A dolgozatban bemutatott kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a cirkadián óra különböző mértékben és eltérő szinteken, többszörösen is regulálja a fitokrómok és kriptokrómok génexpresszióját. Az egyes gének szabályozására nem lehet egységes sémát alkotni, mindegyik specifikus regulációs mintázatot követ.

A génkifejeződés szabályozásán túl a fehérje biológiai aktivitásának cirkadián szabályozását is bizonyították közvetett módon. Az összes fitokrómról bebizonyosodott, hogy sejtmagi transzlokációjuk diurnális ritmust mutat (Kircher és mtsai., 2002). Sőt a phyA és phyB foltformálása folyamatos sötétben még két cikluson keresztül folytatja az oszcillációt, ami már a cirkadián óra hatásának tulajdonítható (Nagy és Schäfer, 2002). Az viszont

egyértelmű, hogy a sejtmagba vándorlás diurnális folyamatában a fény a fontosabb vezérlő faktor, az óra segítséget nyújt a mechanizmus elindításához. Mivel az elmúlt évek eredményei arra világítottak rá, hogy a fitokrómok sejtmagi funkciója, a transzkripciót szabályzó szerepe meghatározó a fény jelátviteli utakban, a sejtmagi import regulálása a receptor-molekulák biológiai aktivitását befolyásolja. Mindezek tükrében megállapítható, hogy a cirkadián óra a fényreceptorok megjelenését és aktivitását számos ponton regulálja, gyakran a fényindukálta szabályozó lépésekkel együttesen kialakítva a végső megjelenési mintázatot.

6.5 A *PHYA* promóter cirkadián szabályzásának eltérései

Munkánk második részében a *PHYA* gén promóterének cirkadián regulációjának részletesebb vizsgálatát végeztük el. A *phyA* különleges szerepet tölt be a fotoreceptorok között. Az egyetlen fényszenzitív fitokrómként egyedül felelős a vörös fény kiváltotta alacsony intenzitású válaszokért, valamint elnyúló abszorpciós spektrumának köszönhetően a távoli vörös fény jelének kizárólagos közvetítője. Mindezek mellett a kék tartományban is aktív, ami egyetlen másik fitokrómról sem mondható el. Azért választottuk a részletes jellemzéshez ezt a fényreceptort, mivel kiemelt jelentőségű a fotoreceptorok között.

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a *PHYA* kifejeződése felnőtt, 21 napos növényben is cirkadián jellegű (18. ábra). Sötétben az aktivitása az első szubjektív nappal folyamán jelentősen megnövekszik, ami valószínűleg a sötét-indukció hatásának köszönhető. A csíranövényben mért luciferáz-aktivitástól eltérően (15/A ábra) a megemelkedett szinten nem alakul ki a stabil oszcilláció, hanem az aktivitás folyamatosan csökken, miközben a ritmus gyorsan lecseng. Ez azt bizonyítja, hogy a cirkadián óra korfüggő módon regulálja a *PHYA* promóter-aktivitását.

Folyamatos sötétben a cirkadián ritmusok egy részére jellemző a lecsengés. Habár ezt a jelenséget már régen megfigyelték, ennek magyarázatára csak kevés eredmény áll rendelkezésre. Úgy tűnik, hogy különböző célgének esetében más és más faktorok illetve szabályozó folyamatok jelennek meg, vagy azok jelentősége nem egyenlő. A lecsengés valószínűleg nem a cirkadián óra mechanizmusában bekövetkező változásból ered, hiszen egyes gének (például a *CCR2*) ritmusának amplitúdója sötétben 5 napig sem csökken jelentősen.

A méréseink során is megfigyelhettük, hogy a *CAB2* gén ritmikus kifejeződése alacsony szintre áll be, azaz a harmadik napra szinte teljesen „leül”. A fényben indukált fitokrómok P_{fr} formája sötétbe kerülve hosszabb életidejű, mint folyamatos megvilágítás

mellett. Ezzel magyarázható, hogy a fotoreceptorok fényből sötétbe kerülve is kifejthetik hatásukat, amíg az aktív formájú fehérjék le nem bomlanak vagy nem inaktiválódnak. A lassan kifogyó P_{fr} formájú fitokrómok okozta indukció-csökkenés a felelős a fényindukált *CAB2* gén cirkadián ritmusának lecsengéséért sötétben (Millar és Kay, 1991). A *CAB2*-éhez hasonló mintázatot mutat az egyik kataláz gén, a *CAT2* cirkadián görbéje is (Zhong és mtsai., 1994). Zhong és munkatársai (1997) egy másféle példát is leírtak: a *CAT3* gén kifejeződése esetében, amely ritmusának fázisa sötét szakasz elején van diurnális körülmények, folyamatos sötétben az első szubjektív nappal elért maximum-értéken elhal az oszcilláció, azaz magas szinten cseng le.

A csíranövény és a 21 napos növény *PHYA* promóter-aktivitási mintázatában tapasztalt eltérésnek kétféle magyarázata lehet: 1, a változást az óra csökkent vezérlő hatása okozza; 2, a cirkadián óra önmagában ugyanolyan amplitúdójú ritmust biztosítana felnőtt korban is, de ennek érvényesülését a kimeneti oldalon egy másik reguláló hatású tényező (például a megvilágítási viszony) gátolja. Erre a problémára jelenthet választ az intakt, viszont gallérral szeparált és a levágott levélben mért promóter-aktivitási adatok összehasonlítása. A *PHYA* esetében az izolált levelek a csíranövényekben mérthez hasonló, nem lecsengő oszcillációt mutatnak, eltérően az intakt levelektől (20. ábra). A *CAB2* promóter-aktivitását pedig úgy módosította az izolálás, hogy folyamatos fényben és sötétben is egyaránt hosszan fennmaradó, nagyon hasonló lefutású ritmust teremtett, habár ez az amplitúdó fényben elmarad az intakt növényben mért értékektől. Ezt a jelenséget nem a sebzés, vagy a kalluszosodás kiváltotta stresszfolyamatok eredményezték (21., 22. ábra). A kísérletek azt igazolják, hogy a növény többi részéről leválasztott levelekben a cirkadián szabályozás eltér. Így a más szervektől független levél sejtjeiben a cirkadián reguláció a csíranövényhez hasonló kifejeződést biztosítana, viszont ezt egy, a növény más részeiből származó intercelluláris jel módosítja.

A kísérleti adatainkhoz, azaz a levágott levélben tapasztalt ritmus fennmaradásához (20. ábra) hasonló folyamatot írtak le, amikor a *CAT2* és a *CAT3* kifejeződését különböző fotoreceptor mutáns hátterekben vizsgálták sötétben (Zhong és mtsai., 1997): a ritmus több napon keresztül azonos, nagy amplitúdóval oszcillált. A *phyA* illetve a *cry1* hiánya előidézte ezt a változást, míg a *phyB* nem befolyásolta a görbe lefutását, továbbá a *phyAphyB* dupla mutáns háttér a *phyA* növényben detektált változást mutatta. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a cirkadián ritmus lecsengését a *phyA* illetve *cry1* fényreceptorok által mediált folyamat okozza. Mint azt már említettük az irodalmi áttekintésben, a *cry1* alacsony fényintenzitáson a *phyA* jelátviteli lánc eleme, ami azt is jelentheti, hogy ebben az esetben a két mutáns

fenotípusa ugyanazon regulációs folyamat elrontásából fakad. A fotoreceptorok két úton is megváltoztathatják egy gén expresszióját: közvetlenül, vagy a cirkadián reguláción keresztül. Mivel a *CAT3* gén expresszióját a fény közvetlenül nem befolyásolja, így a szabályozás valószínűleg a cirkadián óra output elemei felé vezető úton keresztül érvényesül. Az input folyamatok szerepét kizárhatjuk, hiszen abban az esetben az összes cirkadián output folyamatra azonos módon hatna a változás, ami ebben az esetben nem valósul meg. Tehát ezen a jelátviteli úton a *phyA* és a *cry1* fotoreceptorok a ritmus lecsengését, nem pedig a fenntartását regulálják.

Jelenlegi ismereteink alapján még nem tudunk magyarázatot adni erre a jelenségre, de a fenti eredményeket a kísérleteinkkel összevetve elképzelhető, hogy egyes szervek izolálása az említett fény jelátviteli út módosítását eredményezhette. E hipotézis azt feltételezi, hogy az egyes cirkadián kimeneti folyamatokat módosító fényjel egy másik szervből érkezik, vagy a szerv izolálása olyan szignált hoz létre, mely a fényindukált folyamatok valamely jelátviteli elemével kölcsönhatásba lép.

Megfigyeltek már olyan jelenséget, amelyben a szervek izolálásának fényregulációval kapcsolatos folyamatokra volt hatása. A sziklevél-növekedés folyamata *cry1* mutáns növényben kisebb mértékű, mint a vad típusban; viszont levágott levelekben a két genetikai háttér közötti különbség megszűnik (Blum és mtsai., 1994). Ez arra utal, hogy a levágás a fényreguláció mechanizmusával is kölcsönhatásban lépő folyamatokat indukál.

Érdekes lenne a továbbiakban megvizsgálni, hogy a *phyA* illetve a *cry1* receptorok hiánya szintén előidézi-e a lecsengés elmaradását, illetve fordítva, a *CAT3* kifejeződését hogyan változtatja meg sötétben a levél levágása. E kísérletek igazolhatnák a cirkadián szabályozás vonatkozásában is a levél levágása és a fény jelátviteli útja közötti kapcsolatot.

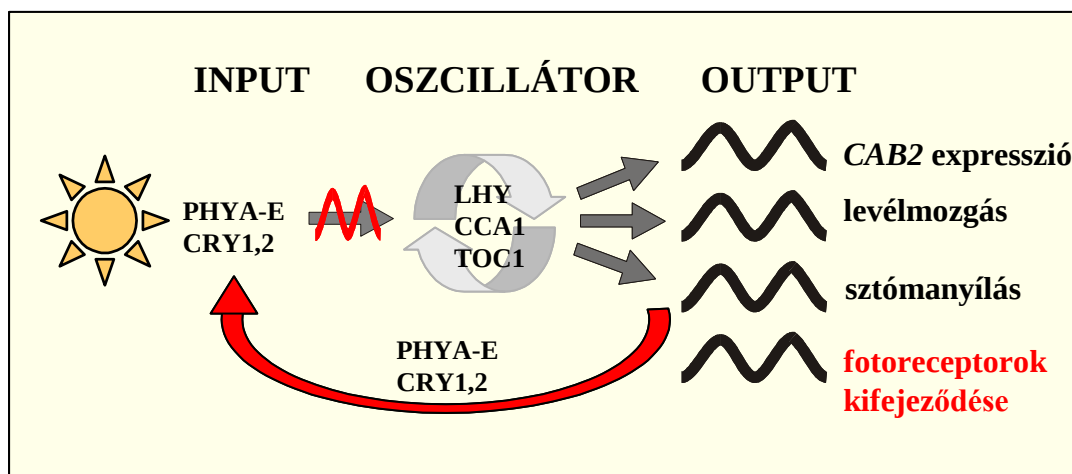
6.6 A *PHYA* promóter cirkadián szabályozásának szövetspecifitása

A felnőtt növény leveleivel végzett kísérletek után megvizsgáltuk, hogy a cirkadián ritmus fent leírt szabályozása a növény többi szervére is kiterjed-e. A levágott hipokotildarabokban, levelekben és gyökérben a *PHYA::LUC+* aktivitásának görbéje nem egyezett meg (22. ábra). Jelentős cirkadián szabályozás csak a levélben volt detektálható, a gyökérben jelentősen kisebb mértékű, a hipokotilban pedig nem jellemző annak hatása. Érdekes jelenség, hogy az izolált gyökér ritmusának fázisa pár órával korábbra tolódott az intakt gyökérben mérthez képest (19. és 23. ábra).

Ez az eredmény azt mutatja, hogy az óra egy általa vezérelt gén átíródását szerv- vagy szövetfüggően is különböző mértékben befolyásolja. Fontos megemlíteni azt a mérés-technikai ténytet, hogy az intakt csíranövényekkel vagy felnőtt növényekkel végzett luciferáz mérések során a legnagyobb felületű szervekből, azaz a levelekből származó jelet detektáljuk, valószínűleg a hipokotil nem bocsát ki számottevő fényjelet, a táptalajba ágyazott gyökér fényemissziója pedig szinte elhanyagolható. Ez a magyarázata annak, hogy míg a növényben nem egységes a cirkadián ritmus megjelenése, a méréseink mégis a határozott ritmust mutató levelek mintázatát tükrözik. Mindezek ellenére az intakt növényekből származó adatok nem tekinthetők műterméknek, hiszen a fényérzékelésben a fotoszintetizáló szövetek, így elsősorban a levelek játszik a legnagyobb szerepet; továbbá az eddigi cirkadián ritmusokat leíró kísérletekben szintén ezeket a módszereket alkalmazták, így az eredményeik összevethetők az eddigi megfigyelésekkel. A növény egyes részeiben leírt különböző erősségű reguláció viszont tovább árnyalja a cirkadián szabályozásról kialakult képet.

6.7 Következtetések, új modell felállítása

Megállapítottuk, hogy az Arabidopsis fotoreceptorok génexpressziója több szinten is (promóter-aktivitás és mRNS-akkumuláció) cirkadián szabályozás alatt áll. A fényreceptorok kifejeződésének napi mintázatát együttesen alakítja ki egy belső és egy külső szabályozó tényező: a cirkadián óra és a fény. E két tényező hatása nem azonos mértékben érvényesül a különböző fotoreceptorok esetében, így a fitokróm és kriptokróm gének kifejeződése egyedi mintázatot mutat. A kifejeződés cirkadián jellege kor- és szövetspecifikusan változhat.



25. ábra A módosított klasszikus cirkadián óra modell

Eredményeink tükrében a növényi cirkadián óra modelljét kiegészíthetjük egy újabb visszacsatolási lépéssel (25. ábra), melyben a központi oszcillátor ritmikus kifejeződést biztosít a vizsgált input elemeinek. Tehát az input útba sorolt fotoreceptorok egyben az output elemek kritériumait is kielégítik. Ez azt jelenti, hogy az cirkadián rendszerek részeinek hármas felosztása, az input-oszcillátor-output tengely nem tekinthető lineáris folyamatnak, hanem – sokkal inkább - belső szabályozó köröket tartalmazó rendszernek.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk fő célja az *Arabidopsis* fitokróm és kriptokróm fotoreceptorok kifejeződésének vizsgálata volt a cirkadián szabályozás szempontjából. Arra a kérdésre kerestük a választ, vajon a fotoreceptorok kifejeződése cirkadián kontroll alatt áll-e, s ha igen, milyen szinten vagy szinteken. Ezen túl kísérleteinkkel azt kívántuk eldönteni, hogy a cirkadián reguláció egységes-e a növény szerveiben, vagy szövet- illetve szervspecifikus eltéréseket mutat.

Eredményeinket a következő pontokba foglalhatjuk össze:

1. A fitokrómok és kriptokrómok promóter aktivitásának vizsgálatára transzgénikus *Arabidopsis thaliana* növényeket hoztunk létre, melyek a különböző fotoreceptorok promóterei által vezérelt luciferáz riporter gént hordozták. A transzgénikus növényekben *in vivo* luciferáz enzimaktivitás mérésével megfigyeltük a promóter-aktivitás szövetspecifikus megjelenését. A csíranövényekről készült felvételek megmutatták, hogy - a CRY1 kivételével - a gének kifejeződése az összes szervben detektálható szintű volt. A 7 napos, fény/sötét perióduson nőtt csíranövényekben a promóter-aktivitás a levélben és a hajtáscsúcsban volt domináns, míg az ugyanilyen korú etiolált növényekben az aktivitás a sziklevélre és a hipokotil felső harmadára tevődött át. A gyökérben tapasztalható expresszió a gyökércsúcsban volt a legjelentősebb. Az etiolált PHYA gyökérről nagy-felbontású CCD kamera segítségével készült felvételek tanúsága szerint a gyökérsüveg sejtek termelték a fotoreceptorok nagy részét. A felvételek lehetőséget nyújtanak az egyes fényreceptorok szervezet szintű megjelenésének összehasonlítására, ezáltal az azonos helyen és időben rendelkezésre álló receptorok egymásra hatásának, akár közvetlen interakciójának lehetőségét is alátámasztva.
2. A fotoreceptor promóter-luciferáz inszertet hordozó transzgénikus csíranövényekben a vizsgált öt fitokróm és két kriptokróm promóter-aktivitása diurnális jellegű volt fény/sötét perióduson. Cirkadián körülmények között, azaz állandó hőmérsékleten, állandó fehér fényben vagy folyamatos sötétben a PHYC kivételével mindegyik fényreceptor gén promóter-aktivitásában megfigyelhető volt a napi oszcilláció, de a ritmus lefutása és amplitúdója lényeges különbségeket mutatott. Erős ritmus jellemezte a PHYA, PHYB és CRY1 gének promóter-aktivitását, míg kisebb erősségű volt az oszcilláció a PHYD, PHYE és a CRY2 gének esetében. Mindegyik fényreceptor ritmusa a szubjektív nappal folyamán, pár órással eltolódással érte el a maximumát. Az amplitúdó és fázisbeli eltérések azt jelzik, hogy a

fotoreceptor gének promóter-aktivitását a cirkadián óra nem egységes séma szerint szabályozza, hanem egyedi kifejeződési mintázatot biztosít számukra.

3. A folyamatos fényben és folyamatos sötétben mért promóter-aktivitás összehasonlításával a fény szerepére is következtethetünk. A *PHYC* gén transzkripciója fény hatására fokozódott; a *PHYA*, *CRY2*, valamint kis mértékben a *PHYB* és a *CRY1* gének transzkripcióját negatívan szabályozta a fény; a *PHYD* és *PHYE* gének kifejeződése pedig fény-függetlennek bizonyult.

4. A fotoreceptorok kifejeződésének napi változásait az mRNS-felhalmozódás szintjén követtük nyomon folyamatos fényben RNáz protekciós analízis segítségével. Megállapítottuk, hogy a fotoreceptorok mRNS-felhalmozódása is napi oszcillációt mutat cirkadián mérési körülményben. Ebben az esetben az összes általunk vizsgált fényreceptort jellemezte ez a sajátosság. A promóter-aktivitás ritmusával azonos vagy attól egy-két órával később megjelenő fázissal oszcilláltak, ami arra utalhat, hogy az mRNS-felhalmozódás szintjén megfigyelt ritmus fázisát az óra a kifejeződés előző lépésénél, azaz az mRNS szintézisnél szabja meg. Azonban némely fotoreceptor esetében a ritmus amplitúdójában jelentős erősödést figyeltünk meg. Ebből arra következtethetünk, hogy a cirkadián óra az mRNS stabilitást is befolyásolja, ami eredményezheti a ritmus amplitúdójának változtatását, de fázis eltolódást nem. Ahogy a promóter-aktivitás esetében láttuk, a reguláció az mRNS-felhalmozódás szintjén sem egységes.

5. A *PHYA* gén promóter-aktivitásának cirkadián ritmusa a fejlettségi állapottól függően megváltozott. A *PHYA::LUC+* napi ritmusának amplitúdója felnőtt növényben gyorsan lecsengett folyamatos fényben, míg csíranövényben sokáig fennmaradt. A változás a ritmus fázisát nem érintette. A lecsengés a levél izolálásával megszűnt, viszont a sebzés illetve a kalluszosítás nem váltotta ki ugyanezt a hatást. Ez azt jelzi, hogy esetleg a növény másik szervéből érkező intercelluláris jel indukálja a fokozatos expresszió-csökkenést, elfedve ezzel a cirkadián oszcillációt.

6. A *PHYA* gén promóter-aktivitásának ritmusát a *PHYA::LUC+* transzgént hordozó növények egyes részeiben tanulmányozva megállapítottuk, hogy a cirkadián reguláció szervspecifikusan is változik. Az intakt növény levelében és gyökerében detektált ritmus hasonló volt az egész csíranövényből származó luciferáz-aktivitás görbéhez: fázisuk és lefutásuk megegyezett, viszont amplitúdójuk csökkent (mint azt fentebb említettük). A *PHYA* promóter-aktivitás napi ritmusa az izolált szervekben igen eltérő képet mutatott. A hipokotildarabokban a kifejeződés aritmikus, a gyökérben ugyan megjelenik az oszcilláció, de nagyon kis amplitúdóval és korábbi fázisban, ezekkel ellentétben a levágott levélben határozott napi ciklus jellemzi a promóter-aktivitást. Így megállapíthatjuk, hogy a cirkadián

óra egy általa vezérelt gén átíródását szerv- vagy szövetfüggően is különböző mértékben befolyásolja.

8. SUMMARY

8.1 Introduction

During their entire life cycle plants are very sensitive to their light environment. Light is a key factor influencing all major developmental transitions from seed germination to induction of flowering. Plants accurately perceive fluctuations in the intensity, spectral quality, directionality, and periodicity (day length) of the incoming light. Plants possess photoreceptors: UV-A and blue light absorbing cryptochromes (cry) and phototropins (phot), red and far-red light absorbing phytochromes (phy).

In *Arabidopsis thaliana*, phytochromes are encoded by a small multigene family, *PHYA* through *PHYE* (Sharrock and Quail, 1989; Clack et al., 1994). Phytochromes have a covalently linked chromophore, a linear tetrapyrrole. These photoreceptors exist in two interchangeable spectral forms: the inactive P_r form (red light absorbing) phototransforms into the active P_{fr} form (far-red light absorbing) upon absorption of red light. This reaction can be reversed when P_{fr} is converted to P_r upon absorption of far-red light (Furuya, 1993). *phyA* is a photolabile molecule degrading rapidly when exposed to light. It is the dominant phytochrome in etiolated seedlings and it mediates responses to very low fluences of red and far-red light. *phyB*, *C*, *D*, and *E* are relatively photostable molecules; in green seedlings, *phyB* is the dominant phytochrome photoreceptor. These molecules mediate responses to low and high fluences of red light (Furuya and Schäfer, 1996; Casal és Sanchez, 1998).

Plant cryptochromes have sequence homology to distinct types of photolyases in bacteria and animals, but lack photolyase activity and possess a distinctive C-terminal extension (Cashmore et al, 1999). They bind two chromophores, a pterin and FAD. Cryptochromes are clearly important for normal control of growth and development induced by blue light. *cry2* is particularly important in the response to low blue light intensities and *cry1* has a prevalent role in the response to strong blue light (Lin, 2002). In contrast to *cry2*, which is strongly down-regulated in response to blue light, *cry1* protein levels are not light-regulated (Cashmore et al. 1999; Lin et al, 1998). This presumably explains why *cry2* plays a major role in low light intensities and *cry1* in high light intensities.

Many light effects are induced by the co-action of several photoreceptors and most photoreceptors regulate multiple aspects of photomorphogenesis by forming an interacting network (Casal, 2000).

Many biological organisms possess internal molecular timekeeper mechanisms, circadian clocks allowing the anticipation of regular fluctuations in the availability of the most important resources, such as sunlight. The clock imposes a 24-hour rhythm on certain physiological processes so that they always occur at the optimal phase of the light–dark cycle. They range from leaf movement, growth processes and flower opening to photosynthesis and carbon metabolism (Harmer et al, 2000). Underlying many of these physiological rhythms there are endogenous rhythms in gene activity.

The circadian system can be divided into three main parts (Somers, 1999). The central oscillator generates an oscillation with a period of approximately 24 h, based on negative feedback loops formed by the clock genes and proteins. The oscillator regulates the expression of genes through the output pathway. For their proper function, the clocks are synchronized to the periodic environmental changes (e.g. day/night cycles) by specific stimuli. The entraining signals are transduced by input pathways. According to the classical model of circadian systems there is a one-way relationship between the input elements and the oscillator without feedback mechanisms.

For higher plants the most important entraining environmental factor is light. In *Arabidopsis* the light input pathway involves several photoreceptors. Both phytochromes (phyA, B, D, E) and cryptochromes (CRY1, 2) have been proven to play a role in setting the clock and maintaining the proper period length by transducing the light signal to the central oscillator (Somers et al., 1998a; Devlin and Kay, 2000).

Mutations on phytochrome (*PHYA* and *PHYB*) and cryptochrome (*CRY1* and *CRY2*) genes increase the period of rhythmic expression of a photosynthetic gene (CAB2-chlorophyll a/b binding protein 2) under certain fluence rates of red or blue light (Devlin and Kay, 2000; Somers et al., 1998a). The quadruple *phyAphyBcry1cry2* mutant still retains rhythmicity in *Arabidopsis*, indicating that these photoreceptors are not essential components of the clock (Yanovsky et al., 2000). Thus until now the photoreceptors have been considered as being elements only of the light input pathways.

8.2 Research objectives

The expression of photoreceptor genes was demonstrated to be regulated by light (Somers and Quail, 1995a, 1995b; Goosey és mtsai., 1997), but the effects of other endogenous or enviromental factors have been unknown. Our group previously reported that the *Arabidopsis* circadian clock controls the expression of the phyB photoreceptor (Kozma-Bognár et al.,

1999). Light input is mediated by multiple photoreceptors, it is unclear, however, how many of these photoreceptors are regulated by the clock.

The general goal of our research was to perform a detailed comparative analysis of the spatial, temporal, and long-term expression patterns of all phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis* with respect to their circadian regulation.

The main objectives of this work were:

1. To compare the spatial expression patterns of phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis* seedlings.
2. To determine whether the expression of phytochromes and cryptochromes is regulated by the circadian clock like that of *PHYB* and, if the answer is yes, at what level(s) of expression.
3. If their expression is rhythmic, to investigate the tissue- and age-specificity of the circadian expression of one selected photoreceptor.

8.3 Results and discussion

1.1 Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the luciferase gene (*LUC+*) under the control of photoreceptor promoters were constructed. In these transgenic plants luciferase enzyme activity reflects the activity of the photoreceptor promoter to which *LUC+* is fused. On this basis the promoter-luciferase system allows the identification of spatial patterns of expression, providing a possibility for comparative analysis of their tissue-specific promoter activities. In light-grown seedlings high promoter activities were detected for *PHYA* and *CRY2* in shoot meristems and root tips, and lower activities in cotyledons, hypocotyls and roots. *CRY1* were expressed in aerial tissues; *PHYB* in all tissues, in particular in shoot meristems and root tips, whereas *PHYC*, *PHYD* and *PHYE* were expressed in cotyledons and root tips. In etiolated seedlings *CRY1* expression was restricted to cotyledons and the upper part of the hypocotyl. This pattern supplemented with a weak activity in root tips was also characteristic for *PHYB*, *PHYC* and *CRY2* genes. The promoter activity for *PHYC* was most dominant in the folded cotyledons, in contrast to that for *PHYA* and *PHYE*, detected mostly in the hypocotyl. These results revealed new details of the tissue-specific expression and light regulation of the *PHYC* and *CRY1* and *CRY2* promoters.

2.1 Seedlings carrying the various promoter::LUC⁺ reporter constructs were entrained in 12h white light/12h dark (LD) cycles and were subsequently imaged under the same conditions. By detecting luciferase activity in the transgenic plants we demonstrated that the genes encoding the major photoreceptors are not uniformly active throughout the day. Rather, the promoter activities of phytochromes and cryptochromes is diurnally regulated in light/dark cycle, with peaks of expression at different time points during the light period.

One of the hallmarks of circadian rhythms is their persistence under constant conditions. In order to determine whether the diurnal rhythm of the promoter activity of photoreceptors was due to the regulatory effect of the circadian clock, LD-grown seedlings were transferred to circadian conditions: continuous light (LL) or continuous dark (DD). Upon transfer to constant conditions (light or dark), circadian regulation is maintained for all genes, with the exception of *PHYC*, indicating that – besides the effect of light - the circadian clock controls the transcription of the photoreceptor genes.

2.2 LD-grown wild-type seedlings were shifted to LL conditions. Total RNA was isolated from samples harvested in 4-h-intervals and the abundance of phytochrome and cryptochrome mRNA molecules was determined by Northern hybridization or RNase protection. In accordance with the results of luciferase activity, the mRNA accumulation of most photoreceptor genes followed the rhythmic pattern in similar phase. The only exception was *PHYC* gene, whose mRNA level displayed clear circadian oscillations unlike its promoter activity. This fact indicates that the circadian regulation of *PHYC* gene expression is exerted at the level of mRNA accumulation rather than at the level of promoter activity. Transcripts encoding the light-stable proteins phyB, phyC, phyD, phyE and cry1 peak during the early hours of the daily light period, whereas those encoding the light-labile phyA and cry2 reach their highest level close to dusk. The phase of rhythms reflects the importance of the photoreceptors for different light conditions.

3. We selected *PHYA* gene expression for the detailed analysis, because the function of phyA among the phytochromes is non-redundant, due to its light-labile nature. The expression pattern of *PHYA*::LUC⁺ was compared in seedlings and adult plants under DD conditions. *PHYA* expression was robust in seedlings, but dampened rapidly in

adult plants, indicating that circadian regulation is altered at different developmental stages. To investigate tissue-specific effects, the *PHYA* expression rhythm was determined in intact and excised organs of adult plants. High-amplitude rhythms were maintained for many days in isolated leaves in darkness, whereas the leaves of intact plants rapidly lost rhythmicity. The wounding of the leaves of intact plants and callus formation had no effect on rhythmic expression. In excised roots and hypocotyls, the oscillation of *PHYA* expression was different from that in leaves, indicating the existence of multiple factors responsible for organ-specific regulation and systemic regulation of the circadian clock.

The amplitude and damping of *PHYA* expression rhythms in light-grown *Arabidopsis* plants are variable, depending on the type and the age of tissue tested. The rhythmic pattern of *PHYA* expression is not organ-autonomous but depends on the physical continuity, consistent with the presence of a transmitted signal that controls the overt expression of circadian rhythms without necessarily affecting the underlying clock.

8.4 Conclusion

The circadian clock regulates the expression of all phytochromes and cryptochromes at both the levels of promoter activity and mRNA abundance with different efficiencies. The expression of photoreceptor promoters is controlled in a plastic manner by a network of endogenous clock and light, which presumably contributes to the adaptive regulation of light perception and light signalling.

The tissue-specific differences in photoreceptor gene expression could therefore contribute to the differential light responses of various tissues, including even differential regulation of circadian system. A circadian system might be present in most, if not all, plant cells, but its effect on intracellular rhythms can be controlled by supracellular signalling.

Photoreceptors, on the one hand, transduce light signals to the clock and thus are part of the input pathways on the other hand, they also have to be considered part of the clock output. The rhythmically produced photoreceptors can temporally restrict light input to the clock by feedback mechanism, so that resetting cues work most efficiently at the appropriate times of day.

Furthermore, photoreceptor genes can be used as new molecular markers to study circadian regulated gene expression in *Arabidopsis*, and the *PHY* and *CRY* genes form a

special subgroup of the circadian markers, because they can be placed in the input as well as the output pathways.

9. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozathoz a 2-es és 3-as számú cikket használtam fel.

1. Kim, L., Kircher, S., **Tóth, R.**, Ádam, É., Schäfer, E., Nagy, F. (2000) Light-induced nuclear import of phytochrome-A:GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis. *Plant J*, 22:125-33.
2. **Tóth, R.**, Kevei, É., Hall, A., Millar, A., Nagy, F., Kozma-Bognár, L. (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 127:1607-1616.
3. Hall, A., Kozma-Bognár, L., **Tóth, R.**, Nagy, F., Millar, A. (2001) Conditional circadian regulation of *PHYTOCHROME A* gene expression. *Plant Physiol*, 127:1808-1818.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahmad, M., Cashmore, A.R. (1993) HY4 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366:162-166.
- Ahmad, M., Cashmore, A.R. (1997). The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 11:421–427.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O., Cashmore, A.R. (1998) The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol Cell*, 1:939-48.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., Kay, S.A. (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 293:880-883.
- Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Mas, P., Harmer, S.L., Kay, S.A. (2002) Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 12(9):757-61.
- Alba, R., Kelmenson, P.M., Cordonnier-Pratt, M.M., Pratt, L.H. (2000) The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms. *Mol Biol Evol*, 17:362-73.
- Arguello-Astorga, G.R., Herrera-Estrella, L.R. (1996) Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. *Plant Physiol*, 112:1151-66.
- Aschoff, J. (1979) Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol*, 49(3):225-49.
- Blum, D.E., Neff, M.M., Van Volkenburgh, E. (1994) Light stimulated cotyledon expansion in the *blu3* and *hy4* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 105:1433–1436.
- Bruce, W.B., Deng, X.W., Quail, P.H. (1991) A negatively acting DNA sequence element mediates phytochrome-directed repression of *phyA* gene transcription. *EMBO J*, 10:3015-24.
- Canton, F.R., Quail, P.H. (1999) Both *phyA* and *phyB* mediate light-imposed repression of *phyA* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 121:1207-15.
- Carpenter, C.D., Kreps, J.A., Simon, A.E. (1994) Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol*, 104:1015-25.
- Casal, J.J. (1995) Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Planta* 196:23–29.
- Casal, J.J., Sanchez, R.A. (1998) Phytochromes and seed germination. *Seed Sci Res*, 8:317–329.
- Casal, J.J. (2000) Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem Photobiol.* 71:1-11.
- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284:760-765.

- Chattopadhyay, S., Ang, L.H., Puente, P., Deng, X.W., Wei, N. (1998) Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell*, 10:673-83.
- Clack, T., Mathews, S., Sharrock, R.A. (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes – the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.*, 25:413-427.
- Clarke, M.C., Wei, W., Lindsey, K. (1992) High-frequency transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol Rep*, 10: 178–189.
- Covington, M.F., Satchidananda, P., Liu, X.L., Strayer, C.A., Wagner, D.R., Kay, S.A. (2001) ELF3 modulates resetting of the circadian clock in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13:1305-1315.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffitts, J.S., Somerville, C.R. (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:3718-23.
- Devlin, P.F., Patel, S.R., Whitelam, G.C. (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10:1479–1487
- Devlin, P.F., Robson, P.R.H., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A., Whitelam, G.C. (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in Arabidopsis by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol*, 119:909-915.
- Devlin, P.F., Kay, S.A. (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell*, 12:2499-2510.
- Dunlap, J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*; 96:271-90.
- Drumm, H., Mohr, H. (1974) The dose response curve in phytochrome-mediated anthocyanin synthesis in the mustard seedling. *Photochem. Photobiol*, 20: 151–57.
- Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C., Rosbash, M. (1998) CRY, a Drosophila clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95:669-679.
- Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhan, g H., Elich, T.D., Chory, J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science*, 284:1539-41.
- Finlayson, S.A., Lee, I.J., Mullet, J.E., Morgan, P.W. (1999) The mechanism of rhythmic ethylene production in sorghum. The role of phytochrome B and simulated shading. *Plant Physiol*, 119:1083-9.
- Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., Dunlap, J.C. (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science*, 297(5582):815-9.
- Furuya, M. (1993) Phytochromes: their molecular species, gene family and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44:617–45.
- Furuya, M., E. Schäfer (1996) Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends Plant Sci.*, 1:301-307.
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., Yoshida, S. (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 130:1319-34.

- Golden, S.S., Ishiura, M., Johnson, C.H., Kondo, T. (1997) Cyanobacterial circadian rhythms. *Ann Rev Plant Physiol*, 48:327-354.
- Goosey, L., Palecanda, L., Sharrock, R.A. (1997) Differential patterns of expression of the Arabidopsis PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiol*, 115:959-69.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T. C., Lin, C.(1998) Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science*, 279:1360-1363.
- Guo, H., Duong, H., Ma, N., Lin, C. (1999) The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J*, 19(3):279-87.
- Halliday, K.J., Fankhauser, C. (2002) Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phytologist*, 157: 449–463.
- Halliday, K.J., Whitelam, G.C. (2003) Changes in photoperiod or temperature alter the functional relationships between phytochromes and reveal roles for phyD and phyE. *Plant Physiol*, 131:1913-20.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000) Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*, 290(5499):2110-3.
- He Q, Cheng P, Yang Y, Wang L, Gardner KH, Liu Y.(2002) White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*, 297:840-3.
- Heintzen, C., Nater, M., Apel, K., Staiger, D. (1997) AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:8515-20.
- Heintzen, C., Loros, J.J., Dunlap, J.C. (2001) The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, 104:453-64.
- Hennig, L., Buche, C., Eichenberg, K., Schafer, E. (1999a) Dynamic properties of endogenous phytochrome A in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol*, 121(2):571-7.
- Hennig, L., Funk, M., Whitelam, G.C., Schafer, E. (1999b) Functional interaction of cryptochrome 1 and phytochrome D. *Plant J*, 20: 289–294.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., Schafer, E. (2002) Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 128:194-200.
- Hicks, K.A., Millar, A.J., Carré, I.A., Somers, D.E., Straume, M., Meeks-Wagner, D.R., Kay, S.A. (1996) Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis early-flowering 3 mutant. *Science*, 274:790-792.
- Hoffman, P.D., Batschauer, A., Hays, J.B. (1996) PHH1, a novel gene from Arabidopsis thaliana that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol Gen Genet*, 253:259-65.
- Janoudi, A.K., Konjevic R., Whitelam, G.C., Gordon, W., Poff, K.L. (1997) Both phytochrome A and B are required for the normal expression of phototropism in Arabidopsis thaliana seedlings. *Physiol Plant*, 101:278-282.

- Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.H., Yang, H.Q., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Cashmore, A.R.. (2001) An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature*, 410(6827):487-90.
- 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*, 209:136-42.
- Kevei, E., Nagy, F. (2003) Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol Plant*, 117:305-313.
- Kim, D.H., Kang, J.G., Yang, S.S., Chung, K.S., Song, P.S., Park, C.M. (2002) A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in Arabidopsis. *Plant Cell*, 14:3043-56.
- Kim, L., Kircher, S., Toth, R., Adam, E., Schafer, E., Nagy, F. (2000) Light-induced nuclear import of phytochrome-A:GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis. *Plant J*, 22:125-33.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schafer, E., Nagy, F. (1999) Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell*, 11:1445-56.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adam, E., Schafer, E., Nagy, F. (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell*, 14:1541-55.
- Kiss, J. Z., R. Hertel, F. D. Sack (1989) Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 177:198-206.
- Kiss, J.Z., Mullen, J.L., Correll, M.J., Hangarter, R.P. (2003) Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots. *Plant Physiol*, 131:1411-7.
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J. (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In *Plant Molecular Biology Manual*, Gelvin, B.S., Schilperoot, R.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-22.
- Kozma-Bognar, L., Hall, A., Adam, E., Thain, S.C., Nagy, F., Millar, A.J. (1999) The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25):14652-7.
- Krishnan, B., Levine, J.D., Lynch, M.K., Dowse, H.B., Funes, P., Hall, J.C., Hardin, P.E., Dryer, S.E. (2001) A new role for cryptochrome in a Drosophila circadian oscillator. *Nature*, 411(6835):313-7.
- Lapko, V.N., Jiang, X.Y., Smith, D.L., Song, P.S. (1997) Posttranslational modification of oat phytochrome A: phosphorylation of a specific serine in a multiple serine cluster. *Biochemistry*, 36: 10595–10599.
- Lasceve, G., Leymarie, J., Olney, M.A., Liscum, E., Christie, J.M., Vavasseur, A., Briggs, W.R. (1999). Arabidopsis contains at least four independent blue-light-activated signal transduction pathways. *Plant Physiol*, 120:605–614.
- Lillo, C., Meyer, C., Ruoff, P. (2001) The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiol*, 125(4):1554-7

- Lin, C.T., Yang, H.Y., Guo, H.W., Mockler, T., Chen, J., Cashmore, A.R. (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:2686-2690.
- Lin, C. (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*, S207-S225.
- Liscum, E., Briggs, W.R. (1995) Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell*, 7:473-485.
- Liu, C., Reppert, S.M. (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 25:123-8.
- Liu, X.L., Covington, M.F., Fankhauser, C., Chory, J., Wagner, D.R. (2001) ELF3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell*, 13(6):1293-304
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T., Mizuno, T. (2002) The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol*, 43(1):58-69.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., Quail, P.H. (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, 288:859-63.
- Mas, P., Devlin, P.F., Panda, S., Kay, S.A. (2000) Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature*, 408:207-11.
- Mas, P., Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Oyama, T., Kay, S.A. (2003) Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:223-236.
- Mathews, S., Sharrock, R.A. (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ*, 20:666-671.
- Mazella, M.A., Cerdán, P.D., Staneloni, R.J., Casal, J.J. (2001) Hierarchical coupling of phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of *Arabidopsis* development. *Development*, 128:2291-2299.
- McWatters, H.G., Bastow, R.M., Hall, A., Millar, A.J. (2000) The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature*, 408:716-720.
- Millar, A.J., Kay, S.A. (1991) Circadian control of cab gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 3:541-550.
- Millar, A.J., Straume, M., Chory, J., Chua, N.H., Kay, S.A. (1995a) The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science*, 267(5201):1163-6.
- Millar, A.J. (1995b) The cellular organization of circadian rhythms in plants: not one but many clocks. *Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants*. BIOS Scientific, Oxford, pp 51-68
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A., Coupland, G. (2002) LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2(5):629-41.
- Mockler, T., Guo, H., Yang, H., Duong, H., Lin, C. (1999) Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in regulation in floral induction. *Development*, 126:2073-
- Mockler, T., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y.C., Dolan, S., Lin, C. (2003) Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:2140-

- Mullen, J.L., Wolverton, C., Ishikawa, H., Evans, M.L. (2000) Kinetics of constant gravitropic stimulus responses in *Arabidopsis* roots using a feedback system. *Plant Physiol*, 123: 665–670.
- Neuhaus, G., Bowler, C., Hiratsuka, K., Yamagata, H., Chua, N.H. (1997) Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J*, 16:2554-64.
- Ni, M., Tepperman, J.M., Quail, P.H. (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, 400:781-784.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell*, 15:1591-604.
- Parkinson, J.S., Kofoed, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 26:71-112.
- Pittendrigh, C.S. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu.Rev.Physiol.*, 55:17-54.
- Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C., Kay, S.A. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, 278:1632-1635.
- Poppe, C., Sweere, U., Drumm-Herrel, H., Schafer, E. (1998) The blue light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16:465–71.
- Quail, P.H., Schafer, E., Marmé, D. (1973) Turnover of phytochrome in pumpkin cotyledons. *Plant Physiol*, 52:128–131.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., Wagner, D. (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science*, 268:675-680.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901):935-41.
- Rikin, A., Dillwith, J.W., Bergman, D.K. (1993) Correlation between the circadian rhythm of resistance to extreme temperatures and changes in fatty acid composition in cotton seedlings. *Plant Physiol*, 101:31-36.
- Ruppel, N.J., Hangarter, R.P., Kiss, J.Z. (2001) Red-light-induced positive phototropism in *Arabidopsis* roots. *Planta*, 212(3):424-30.
- Sakamoto, K., Nagatani, A. (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J.*, 10:859-868.
- Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S., Koshiba, T. (2002) The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. *Plant J*, 32:1011-22.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A., Coupland, G. (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*, 93(7):1219-29.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V.V., Larson, M., Wisman, E. (2001) Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13(1):113-123.

- Schäfer, E., Marchal, B., Marme, D. (1972) In vivo measurements of phytochrome photostationary state in far-red light. *Photochem. Photobiol.*, 15:457-464.
- Schneider-Poetsch, H.A.W., Braun, B., Marx, S., Schaumburg, A. (1991) Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. *FEBS Lett.*, 281:245-249.
- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C., Lin, C. (2002) Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, 417:763-7.
- Sharrock, R.A., Clack, T. (2002) Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant Physiol*, 130(1):442-56.
- Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1989) Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev*, 3(11):1745-57.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., Furuya, M. (1996) Action spectra for phytochrome A and B-specific photoinduction of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:8129-8133.
- Somers, D.E. (1999) The physiology and molecular bases of the plant circadian clock. *Plant Physiol*, 121(1):9-20.
- Somers, D.E., Quail, P.H. (1995a) Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in Arabidopsis. *Plant J*, 7:413-427.
- Somers, D.E., Quail, P.H. (1995b) Phytochrome-mediated light regulation of PHYA- and PHYB-GUS transgenes in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Physiol.*, 107:523-534.
- Somers, D.E., Devlin, P.F., Kay, S.A. (1998a) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science*, 282:1488-1490.
- Somers, D.E., Webb, A.A., Pearson, M., Kay, S.A. (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, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., Kay, S.A. (2000) ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from Arabidopsis. *Cell*, 101(3):319-29.
- Somers, D.E. (2001) Clock-associated genes in Arabidopsis: a family affair. *Phil.Trans. R. Soc. Lond., B* 356:1745-1753.
- Stowe-Evans, E.L., Harper, R.M., Motchoulski, A.V., Liscum, E. (1998). NPH4, a conditional modulator of auxin-dependent differential growth responses in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 118:1265-1275.
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000) Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289:768-771.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schäfer, E., Harter, K. (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, 294:1108-11.
- Thain, S.C., Hall, A., Millar, A.J. (2000) Functional independence of circadian clocks that regulate

- plant gene expression. *Curr Biol*, 10:951-956.
- Thain, S.C.; Murtas, G., Lynn, J.R., McGrath, R.B., Millar, A.J. (2002) The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant Physiol*, 130: 102-110.
- Todo, T. (1999) Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat Res*, 434:89-97.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288:682-685.
- Yang, H.Q., Wu, Y.J., Tang, R.H., Liu, D., Liu, Y., Cashmore, A.R. (2000) The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell*, 103:815-827.
- Yanovsky, M.J., Casal, J.J., Luppi, J.P. (1997) The *VLF* loci, polymorphic between ecotypes Landsberg *erecta* and Columbia dissect two branches of phytochrome A signaling pathways that correspond to the very-low fluence and high-irradiance responses of phytochrome. *Plant J*, 12:659-667.
- Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A., Casal, J.J. (2000) A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr Biol*, 10(16):1013-5
- Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A., Whitelam, G.C., Casal, J.J. (2001) Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *J Biol Rhythm*, 16:523-530.
- Yanovsky, M.J., Kay, S.A. (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*, 419(6904):308-12.
- Young, M.W.; Kay, S.A. (2001) Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet*, 2: 702-715.
- van der Horst, G.T.J., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P.M., van Leenen, D., Buijsß, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H.J., Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398:627-630.
- Vitha, S., Zhao, L., Sack, F.D. (2000) Interaction of root gravitropism and phototropism in *Arabidopsis* wild-type and starchless mutants. *Plant Physiol*, 122:453-461.
- Wang, Z.Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S., Tobin, E.M. (1997) A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* Lhcb gene. *Plant Cell*, 9(4):491-507.
- Wang, Z.Y., Tobin, E.M. (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, 93(7):1207-17
- Zhao, J., Kilman, V.L., Keegan, K.P., Peng, Y., Emery, P., Rosbash, M., Allada, R. (2003) *Drosophila* clock can generate ectopic circadian clocks. *Cell*, 113:755-66.
- Zhong, H.H., Young, J.C., Pease, E.A., Hangarter, R.P., McClung, C.R. (1994) Interactions between light and the circadian clock in the regulation of CAT2 expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 104:889-898.

Zhong, H.H., Resnick, A.S., Straume, M., McClung, C.R. (1997) Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome1 on circadian clock-regulated catalase expression. *Plant Cell*, 9: 947–955.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

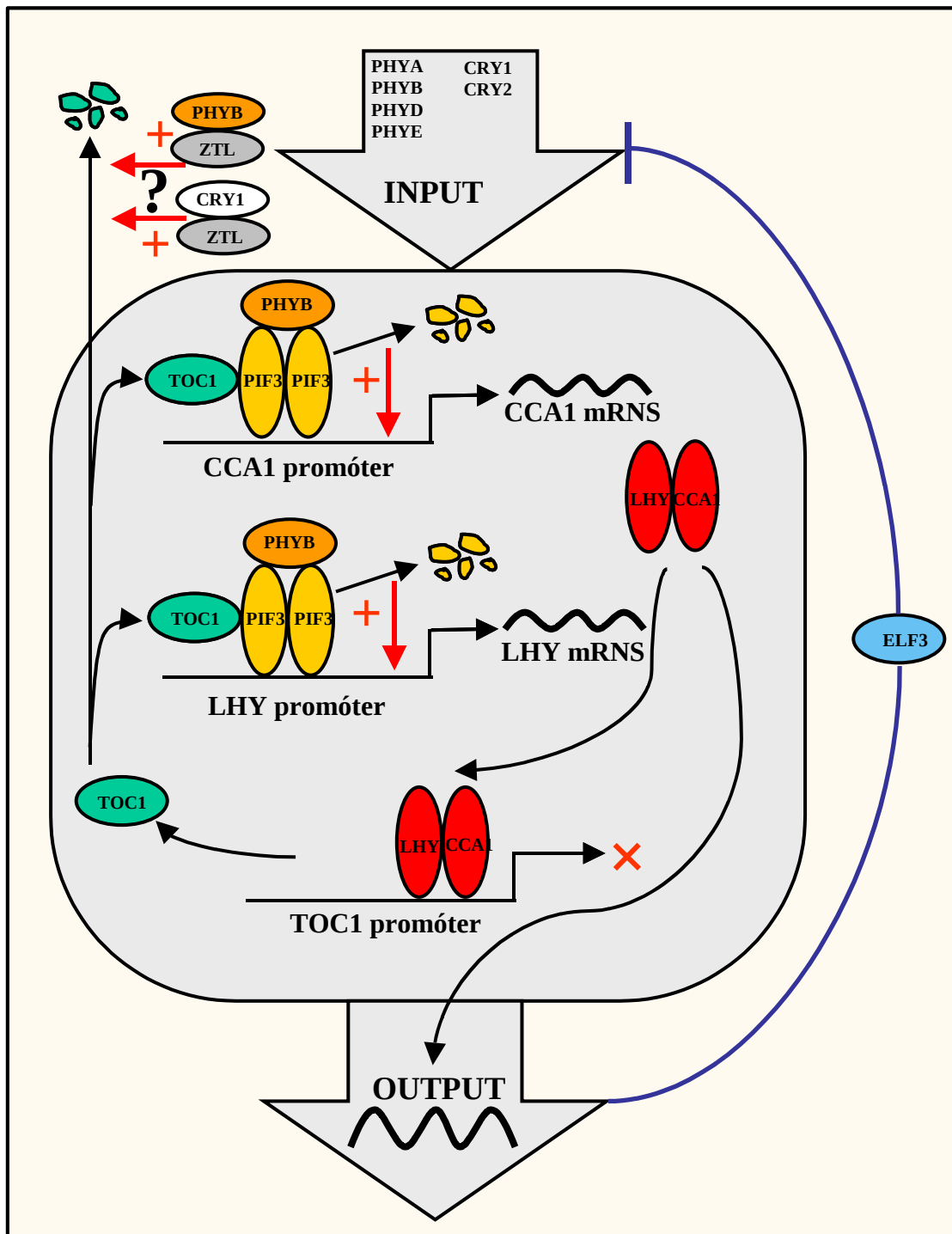
A dolgozatban bemutatott kísérleteket az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében, a Foto- és Kronobiológiai csoport munkatársaként végeztem el. Köszönettel tartozom téma- és csoportvezetőmnek, Dr. Nagy Ferencnek, hogy anyagi és szellemi téren is mindvégig támogatta munkámat, valamint Dr. Dudits Dénes főigazgató és Dr. Vass Imre intézet igazgató uraknak, hogy munkámat lehetővé tették.

Köszönet illeti Prof. Andrew Millar-t és munkatársait (University of Warwick, Nagy-Britannia) a több éves, eredményes kooperációs munkáért.

Köszönettel tartozom Kozma-Bognár Lászlónak és Kevei Évának a rengeteg segítségért és hasznos ötletért, továbbá a kísérletek kivitelezésében való aktív részvételért. Hálával tartozom nekik valamint Viczián Andrásnak és Fejes Erzsébetnek a dolgozat szövegéhez fűzött építő jellegű és kritikus megjegyzésekért. Továbbá köszönetet mondok a Foto- és Kronobiológiai Csoport minden tagjának a termékeny munkahelyi légkör megteremtéséért.

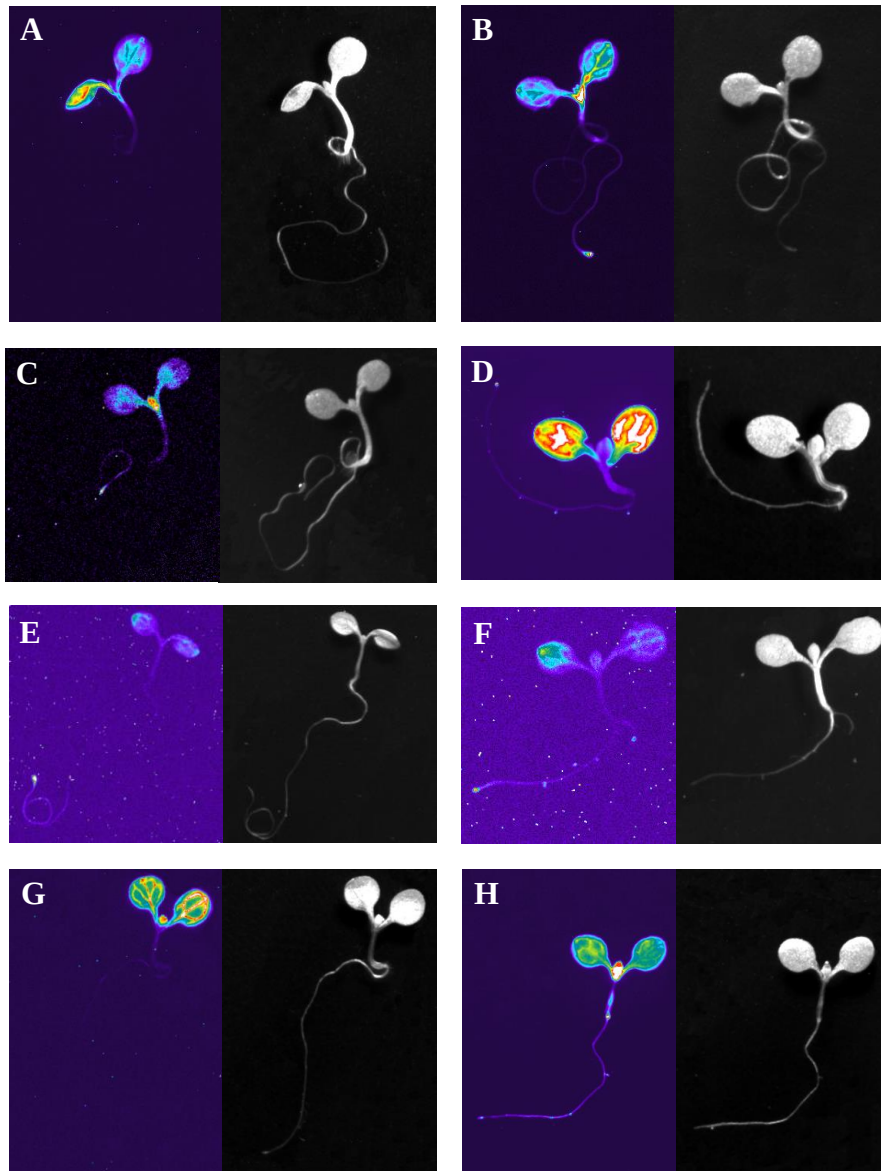
Szeretném megköszönni szüleimnek, nővéremnek és Kiss Istvánnak a rengeteg biztatást valamint a dolgozat megírásához nyújtott szellemi és technikai segítséget.

Ábrák



3.ábra Az Arabidopsis cirkadián óra működésének modellje

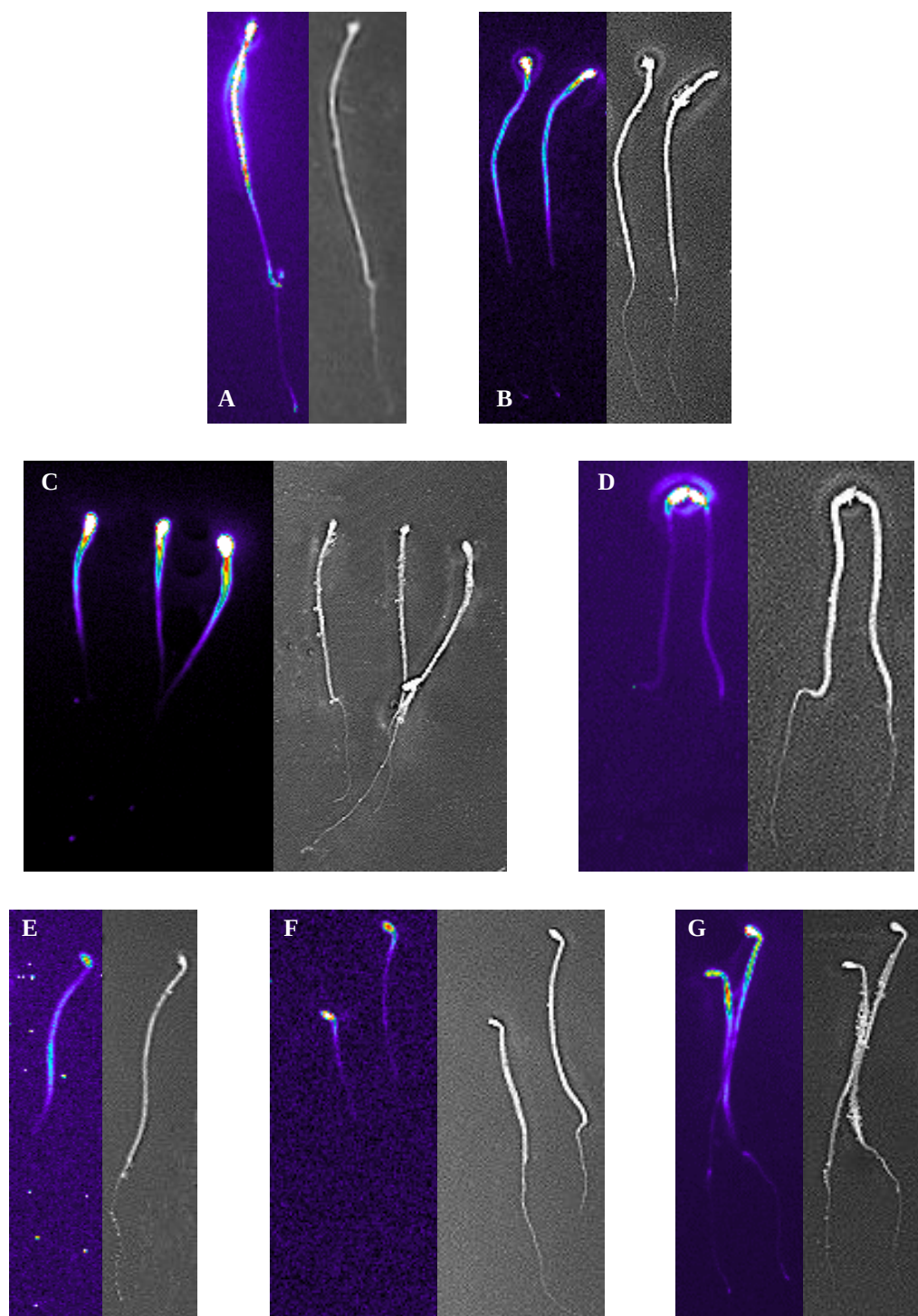
([vissza](#))



9. ábra Fotoreceptor-luciferáz transzgének szövet-specifikus kifejeződése

A panelek jobb oldalán a valós kép, bal oldalán a lumineszcencia kép látható, melyen a színek a lumineszcencia intenzitását jelölik (sötétkéktől a fehér felé növekvő szinttel). *CAB2::LUC+* (A); *PHYA::LUC+* (B); *PHYB::LUC+* (C); *PHYC::LUC+* (D); *PHYD::LUC+* (E); *PHYE::LUC+* (F); *CRY1::LUC+* (G); *CRY2::LUC+* (H) transzgént hordozó csíranövények reprezentálják 3-3 független transzformáns vonalban detektált luciferáz aktivitás szöveti eloszlását.

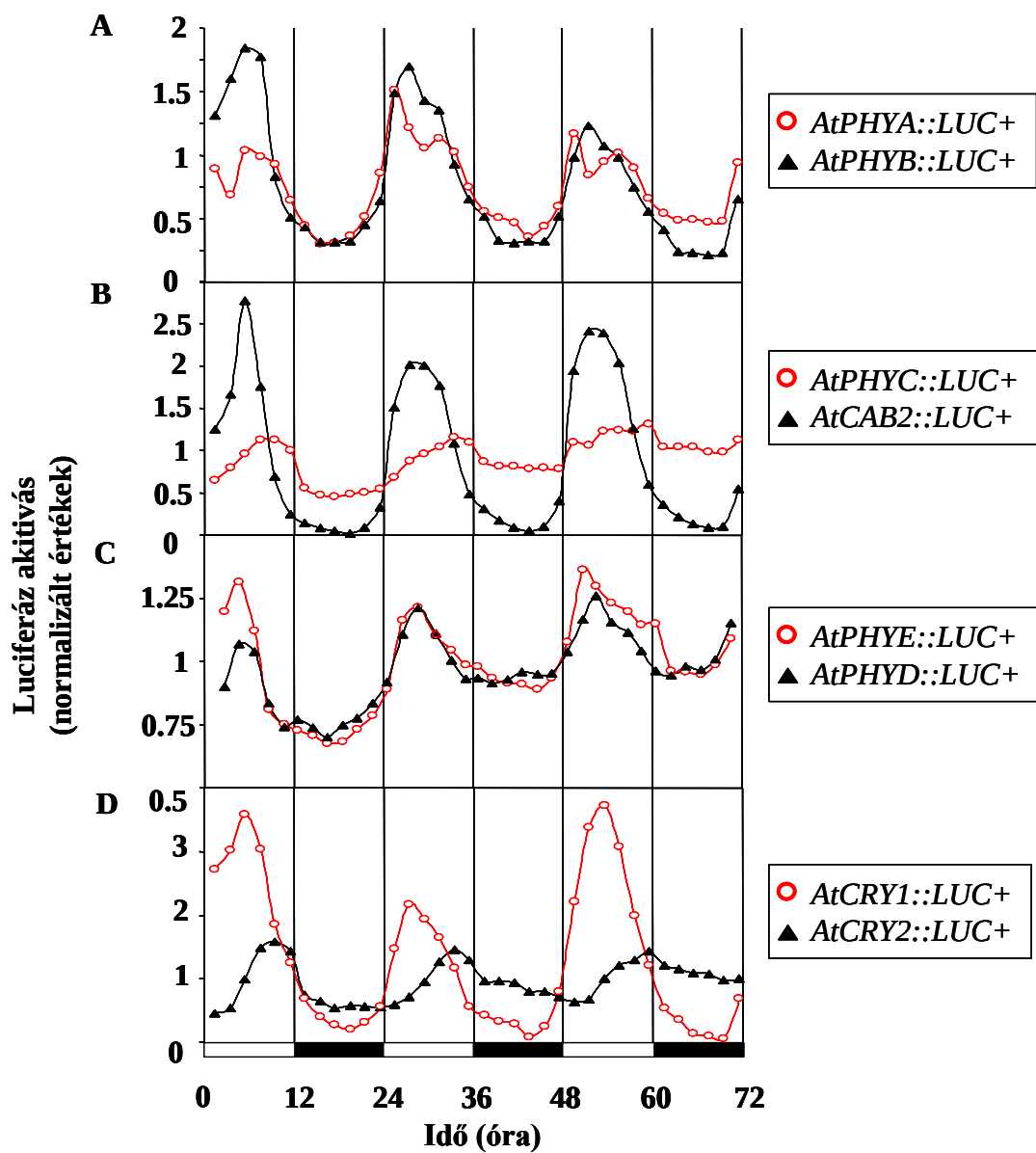
[vissza](#) a szövegbe



10. ábra Fotoreceptorok promóter-aktivitása etiolált csíranövényekben

A panelek bal oldalán a valós kép, jobb oldalán a lumineszcens kép látható, melyen a színek a lumineszcencia intenzitását jelölik (sötétkéktől a fehér felé növekvő szinttel). *PHYA::LUC+* (A); *PHYB::LUC+* (B); *PHYC::LUC+* (C); *PHYD::LUC+* (D); *PHYE::LUC+* (E); *CRY1::LUC+* (F); *CRY2::LUC+* (G) transzgént hordozó transzformáns etiolált csíranövények luciferáz aktivitását ábrázolják.

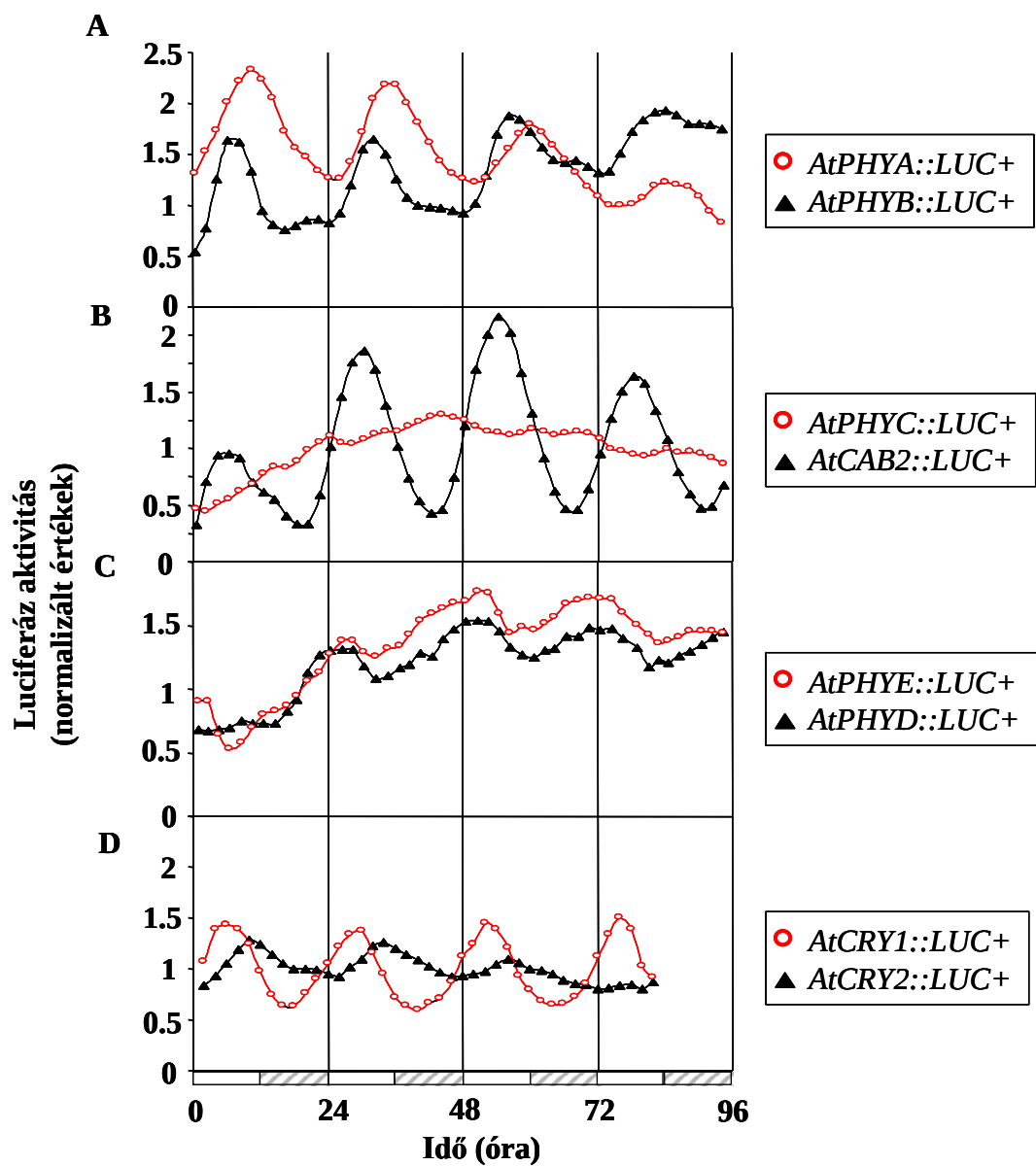
[vissza](#)



13. ábra Arabidopsis fotoreceptorok diurnális génexpressziója

Egy hetes 12 óra fény/12 óra sötét fotoperióduson, állandó hőmérsékleten nevelt csíranövények luciferáz aktivitása LD megvilágítási körülmények között tartva. Az X tengely felett a fehér sáv a fényszakaszt, a fekete a sötétszakaszt mutatja.

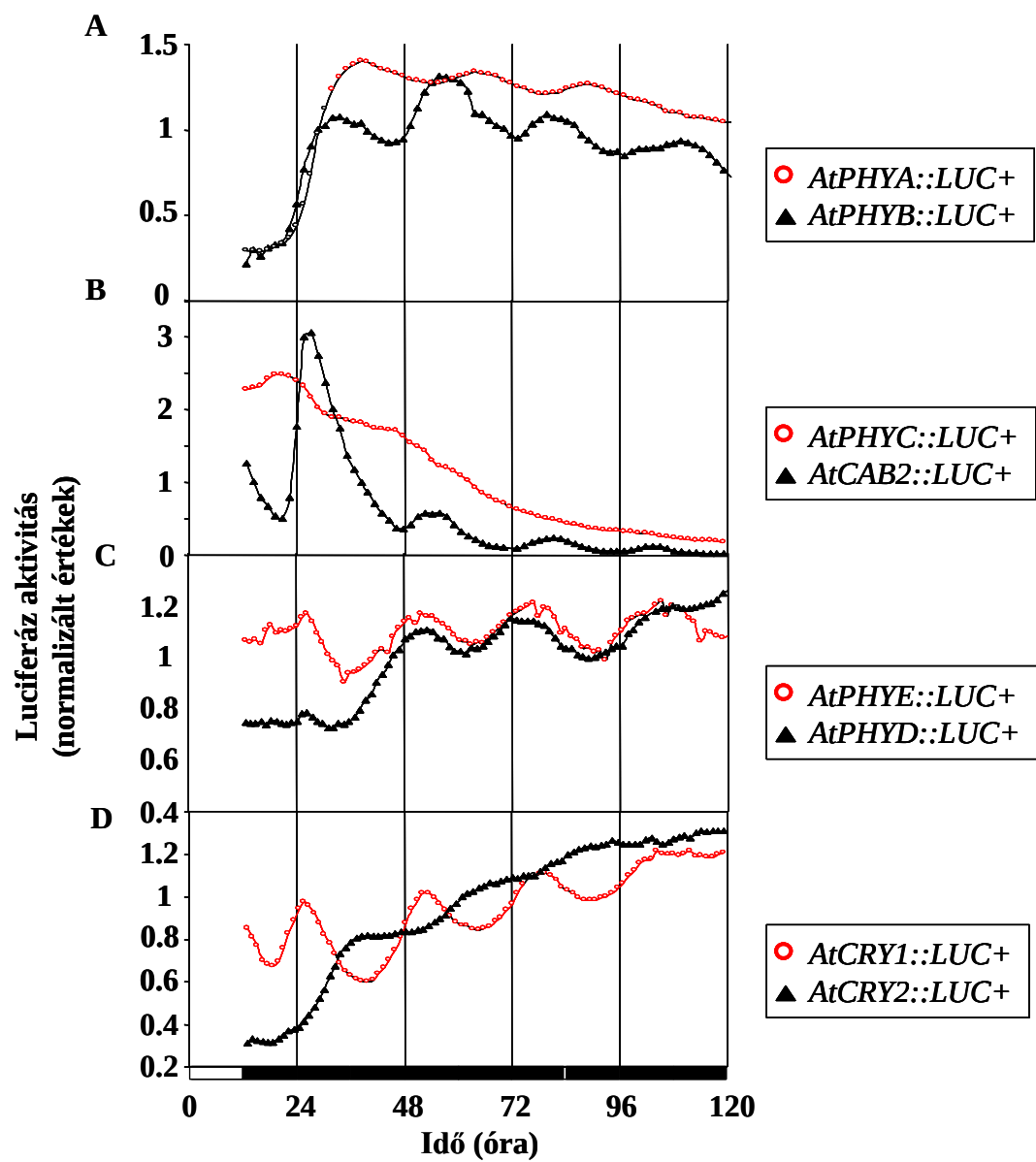
[vissza](#)



14. ábra A fotoreceptorok promóter-aktivitása folyamatos fényben

Az X tengely felett a fehér sáv a fényszakaszt, a szürke csíkozott sáv a szubjektív éjszakát mutatja

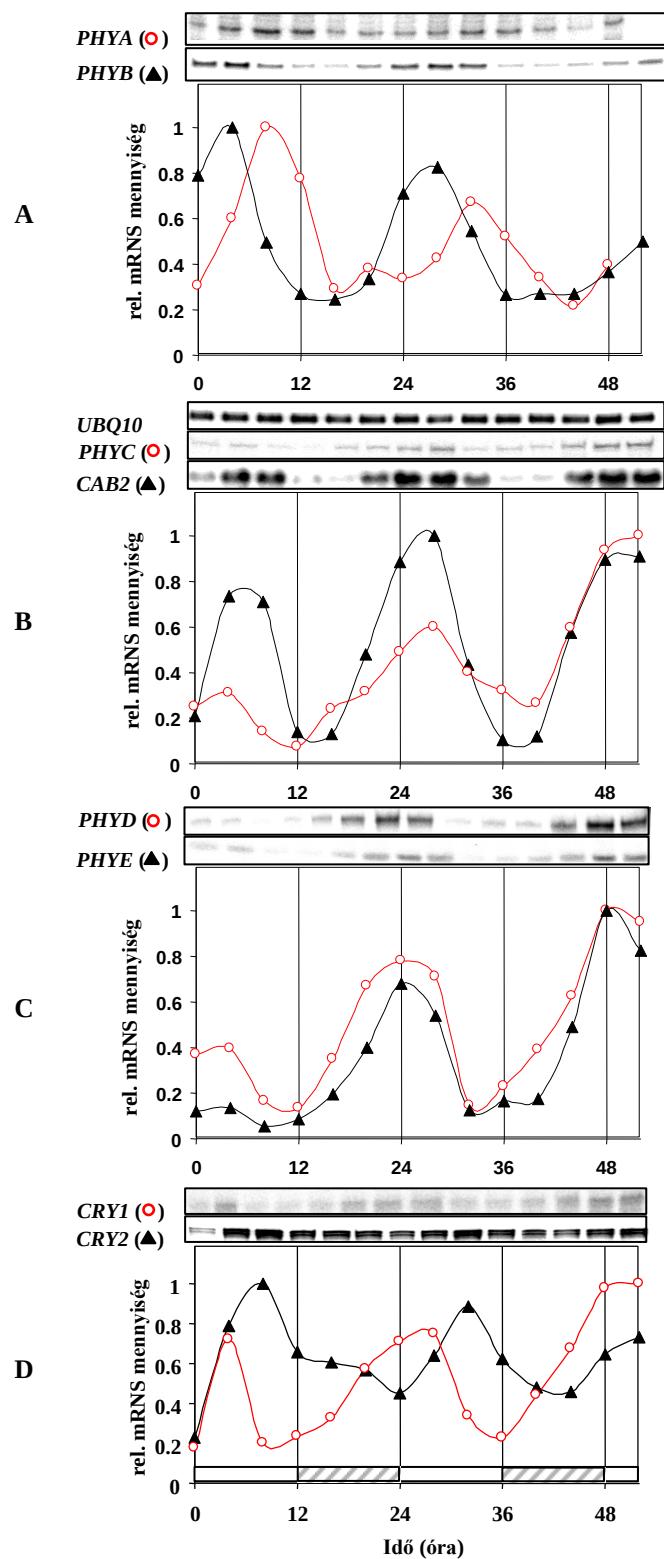
[vissza](#)



15. ábra A fotoreceptorok cirkadián kifejeződése folyamatos sötétben

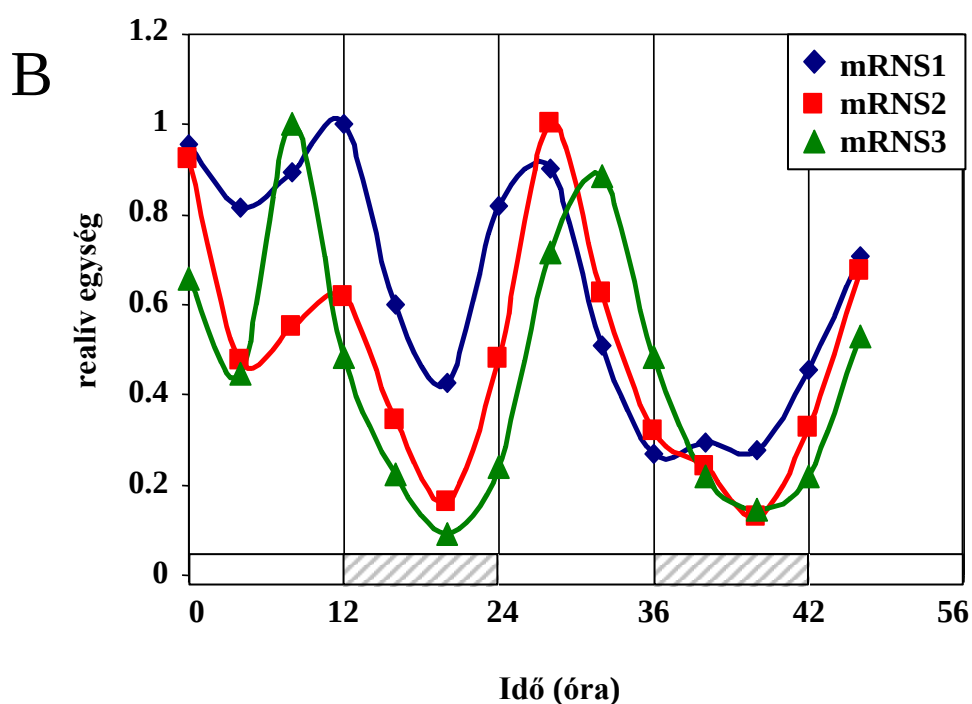
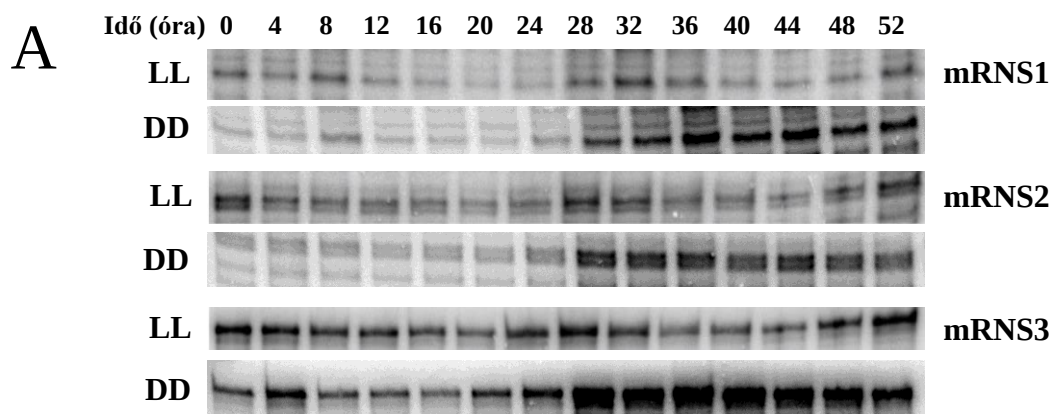
Az X tengely felett a fehér sáv a fényszakaszt, a fekete a sötétszakaszt mutatja.

[vissza](#)



16. ábra A fitokrómok és kriptokrómok mRNA-szintjének cirkadián változása folyamatos fényben

7 napos csíranövényeket folyamatos fehér fénybe helyeztünk, majd a 4 óránként vett mintákból RNáz protekció segítségével meghatároztuk az mRNA mennyiségét. A radioaktív jelet a konstans AtUBQ10 mRNA mennyiségére, mint belső kontrollra normalizáltuk. Az X tengely felett a fehér sáv a fényszakaszt, a szürke a szubjektív éjszakát mutatja. [vissza](#)

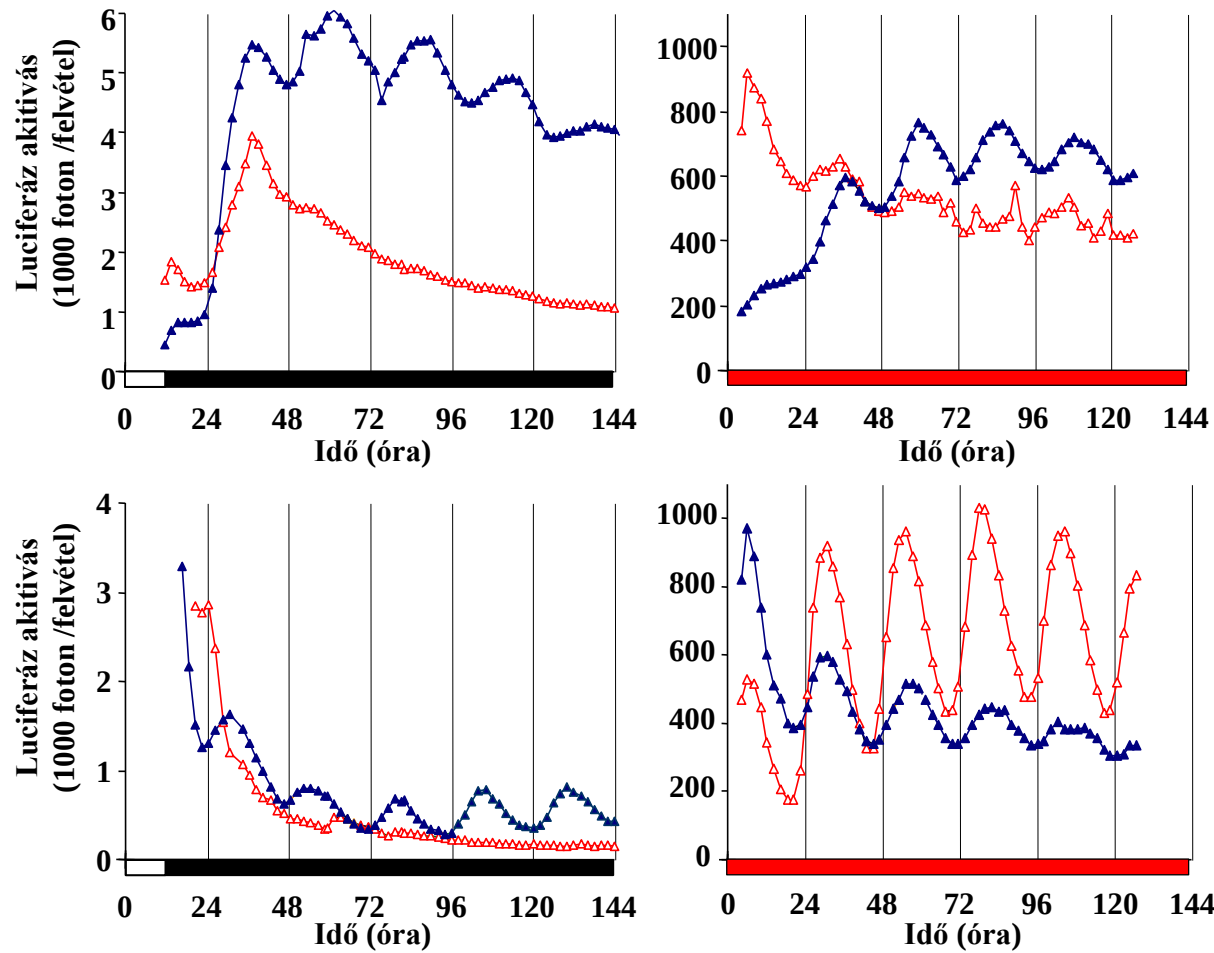


17. ábra *PHYA* különböző méretű mRNS molekuláinak ritmikus akkumulációja folyamatos fényben és folyamatos sötétben

A: a 14 napos növényeket LL vagy DD körülmények közé helyeztük, majd leveleikből 4 óránként mintát szedtünk. A mintákból készült RNS extraktumokból RNáz protekciós próbákkal specifikusan meghatároztuk a 3 transzkriptum mennyiségét.

B: LL megvilágításban detektált mRNS-mennyiség a konstitutív ubiquitin 10 próbával korrigálva, majd a legmagasabb értékre normalizálva. Az X tengelyen a fehér sáv a fényszakaszt, a szürke a szubjektív éjszakát jelenti.

[vissza](#)



20. ábra *PHYA::LUC+* és *CAB2::LUC+* ritmusok gallérral szeparált és levágott levelekben folyamatos sötétben és vörös fényben
 Az X tengely felett a fekete sáv a sötétszakaszt, a fehér vagy vörös sáv a megfelelő hullámhossz-tartományú fényszakaszt jelöli.

[vissza](#)