

A HY5 és HYH transzkripciós faktorok szerepe a növényi cirkadián óra szabályozásában

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: Dobos Orsolya Katalin

Témavezetők:

Dr. Kozma-Bognár László

Dr. Nagy Ferenc

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológia Intézet

Foto- és Kronobiológiai Csoport

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2019

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés	4
1.1. A biológiai ritmusok élettani jelentősége	4
1.2. A cirkadián ritmusok definíciója, jellemzőik és paramétereik.....	5
1.3. A cirkadián óra molekuláris modellje	7
1.3.1. A központi oszcillátor	8
1.3.2. A kimeneti ág	9
1.3.3. A bemeneti ág	10
1.3.3.1. Zeitgeberek.....	10
1.3.3.2. Fotoreceptorok.....	11
1.3.3.2.1. Fitokrómok.....	11
1.3.3.2.2. Kriptokrómok.....	12
1.3.3.2.3. A ZTL család tagjai: a ZTL, FKF1 és LKP2.....	13
1.3.3.2.4. Az UVR8.....	13
1.3.3.3. A fény jelátvitel további elemei	13
1.3.3.3.1. COP1.....	13
1.3.3.3.2. A HY5 mint lehetséges közvetlen bemeneti elem	14
2. Célkitűzések	17
3. Anyagok és módszerek	18
3.1. Kísérleti anyagok és organizmusok	18
3.1.1. Tápoldatok, táptalajok, antibiotikumok.....	18
3.1.2. Plazmidok	19
3.1.3. Baktériumok.....	19
3.1.4. Növények	20
3.2. Növényeken alkalmazott eljárások	20

3.2.1. Növények előkészítése és nevelése	20
3.2.2. Fénykezelések	20
3.2.3. Transzformált növények létrehozása	21
3.2.4. Lumineszcencia mérés élő növényben	21
3.3. Molekuláris biológiai módszerek	21
3.3.1. Riportergén konstrukciók előállítása	21
3.3.2. Agrobacterium konjugáció	22
3.3.3. Kromatin immunoprecipitáció (ChIP)	22
3.3.3. Növényi DNS tisztítás	22
3.3.4. Növényi RNS tisztítás.....	23
3.3.5. mRNS-szint meghatározása valós idejű PCR-al.....	23
3.3.6. Növényi összfehérje tisztítás.....	24
3.3.7. Fehérjeszint meghatározás Western blottal.....	24
3.3.8. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	25
3.3.9. Alkalmazott szoftverek és weboldalak.....	25

4. Eredmények 27

4.1. A HY5 és HYH fény- és cukorfüggő módon képes szabályozni az óra ritmusát	27
4.2. A HY5 kékfény-specifikusan a legtöbb óragén és óra-asszociált gén promoteréhez kötődik	30
4.3. A HY5 képes az óragének promotereinek konzervált, cisz-ható elemeihez kötni <i>in vitro</i>	34
4.4. A HY5 és HYH szintje kék fényben megemelkedik.....	36
4.5. A HY5 és HYH több központi oszcillátor elem expresszióját szabályozzák	41
4.6. Matematikai modellek alapján a HY5 egyéb óragének transzkripciójára is hatással lehet	43
4.7. A HY5 akkumulációját és kromatin asszociációját a szacharóz nem befolyásolja.....	46

5. <u>Eredmények megvitatása</u>	49
5.1. A HY5 és HYH óraszabályozó hatása függ a fényminőségtől	49
5.2. A HY5 célgénjeinek és hatásmechanizmusának megállapítása	50
5.3. A HY5 és HYH cirkadián fenotípusának kékfény-specifitása.....	52
5.4. A HY5 és HYH óraszabályozó hatása cukorfüggést mutat	52
6. <u>Idézett közlemények</u>	54
7. <u>Saját közlemények</u>	58
8. <u>Összefoglaló</u>	59
9. <u>Summary</u>	64
10. <u>Köszönetnyilvánítás</u>	68
11. <u>Mellékletek</u>	70

1. Irodalmi áttekintés

„It is not the strongest of the species that survives,
not the most intelligent that survives.
It is the one that is the most adaptable to change.”

Charles Darwin

1.1. A biológiai ritmusok élettani jelentősége

A Földi organizmusok életének elsődleges célja a túlélés és a szaporodás, melyek meglehetősen energiaigényes folyamatok. A megfelelő energiaszint fenntartásához elengedhetetlen a környezettel való kapcsolattartás, és a környezeti paraméterek változásaihoz való alkalmazkodás, ugyanis csakis így érhető el az adott pillanatban elérhető legnagyobb energiafelvétel, és a legalacsonyabb energiavesztés. Az élettani szempontból kiemelkedően fontos környezeti tényezők közül – legyen szó a nappalok és éjszakák, vagy a hőmérséklet váltakozásáról - több ritmikus jellegű. Ez a jelenség óriási jelentőséggel bír, ugyanis azon organizmusok, amelyek a számukra kedvező/kedvezőtlen paraméterekre – akár már azok bekövetkezése előtt – fel tudtak készülni anyagcseréjük, viselkedésük, energia-gazdálkodásuk áthangolásával, megkerülhetetlen szelekciós előnyre tettek szert. Ezen folyamatok tükrében korántsem meglepő, hogy az organizmusok élettani jelenségeinek kritikus hányada ritmikus ismétlődést mutat.

A biológiai ritmusokat ismétlődésük gyakorisága szerint több csoportba sorolhatjuk: az ultradián ritmusok (a latin *ultra diem* kifejezésnek megfelelően) egy napon belül, akár másodpercek alatt is végbemennek; ilyen ritmus többek között a szívverés, a tücsökciripelés, a kisbabák óránkénti ásítása. Az időskála másik oldalán az infradián (*infra diem*, azaz egy napon túli) ritmusok állnak; ide tartozik az emlősök menstruációs ciklusa, a vándormadarak vándorlása, a különböző párzási időszakok. Dolgozatomban a biológiai ritmusok egy további csoportjával, a cirkadián ritmusokkal szeretnék részletesebben foglalkozni.

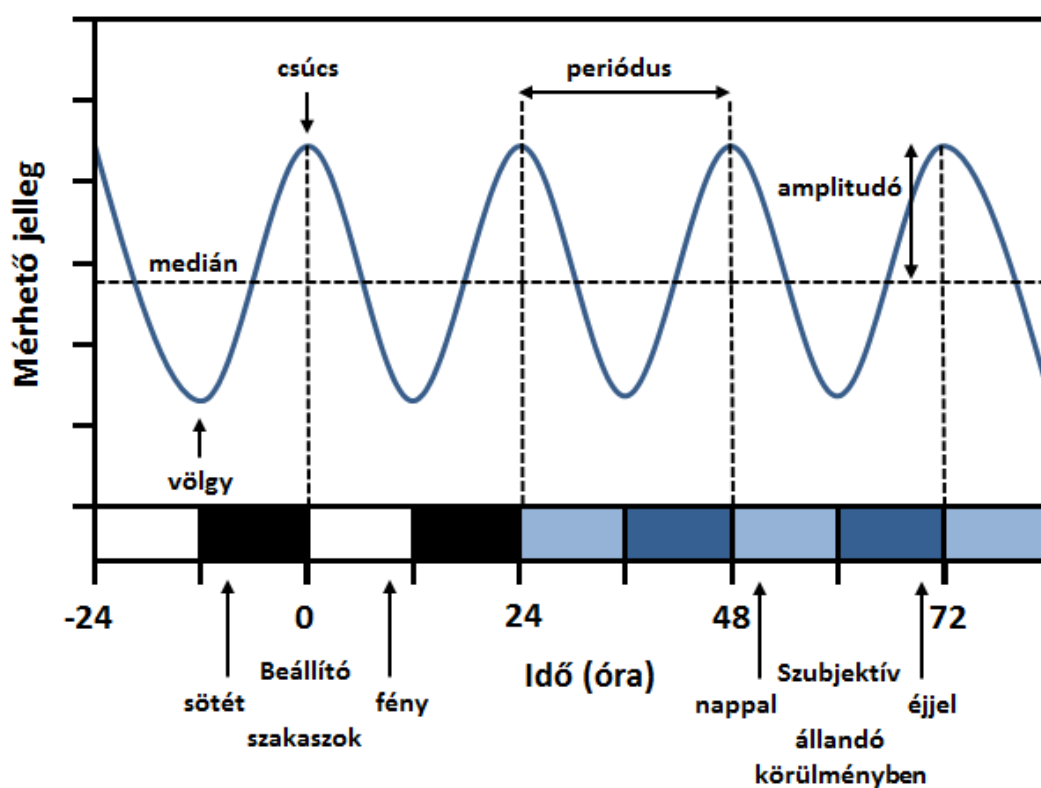
1.2. A cirkadián ritmusok definíciója, jellemzőik és paramétereik

Mint azt a latin *circa diem* kifejezés is mutatja, a cirkadián ritmusok olyan biológiai ritmusok, melyeknek ismétlődési gyakorisága, ún. periódusa megközelítőleg egy nap (20-28h). Ahhoz, hogy egy élettani jelenségről kijelenthessük, cirkadián szabályozás alatt áll, több kritériumnak is meg kell felelnie:

1. Az egyszerű napszakos ritmusok a környezeti változások elmaradásakor megszűnnek, míg a cirkadián ritmusok változatlan körülmények között is tovább működnek, „szabadon futnak”. Eme tulajdonságukat a kronobiológiai kutatásokban sokszor előnnyel használhatjuk fel: modellszervezeteinket állandó fény- vagy hőmérsékleti viszonyok közé helyezve csak az organizmus független, belső „cirkadián órája” diktálja az anyagcsere-folyamatok ritmusát, a környezet befolyása ilyenkor elhanyagolható.
2. Mivel a cirkadián periódus nem pontosan 24 óra, az óra által generált „szubjektív időnek” szinkronizálhatónak kell lennie a külső környezeti változások által kialakított „objektív idővel”. Ezt a finomhangolást nevezzük beállításnak/”entrainment”-nek.
3. A ritmus sebessége nem hőmérsékletfüggő, ezt jól mutatja a cirkadián ritmusok ún. Q_{10} -es értéke. A Q_{10} -es érték az a mérőszám, ami megadja, hogy egy adott kémiai folyamat sebessége hányszorosára gyorsul fel 10 °C -kal magasabb hőmérsékleten. A kémiai reakciók többségénél ez az érték 2-4, a cirkadián rendszereknél viszont csak 0.8-1.2.

A cirkadián ritmusoknál egy kvantitatív jelleg kifejeződését vizsgáljuk az idő függvényében, mely egy hullámmintázatot ad (1. ábra). Ilyen típusú kísérleteinkben minden növényi vonal ritmusát több egyed ritmusának átlagából képezzük, ezért legelső feladatként szinkronizálni kell növényeink óráját fény-sötét ciklusok váltásával (fehér-fekete blokkokkal jelölve az X tengelyen), imitálva a természetben előforduló nappalt/éjjelt. Ezen ún. „beállító szakasz” alatt a növények felveszik környezetük ritmusát, és életfolyamataikat ehhez a ritmushoz igazítják. Ezután a vizsgált egyedeket állandó fény- és hőmérsékleti körülmények közé helyezzük (kék bloksáv). Ilyenkor modellorganizmusunkat megfosztjuk minden külső ingertől, amellyel mérni tudja a valós, más néven „objektív nappalokat/éjszakákat”, és csak

biológiai órájának ritmusára hagyatkozhat. „Szubjektív nappalnak/éjjelnek” nevezzük azon időablakokat, amikor az organizmus cirkadián órája szerint nappali/éjjeli napszak történik. A vizsgálat kronológiai jegyzésénél 0. órának nevezzük el azt az időpontot, amikor az utolsó beállító sötét - fény átmenet történik. A mintázat két azonos pontja közötti időtávolság a már említett periódus, értékét több ciklus átlagából állapítjuk meg. A fázis az a pont, ahol a rendszer a cikluson belül tartózkodik egy adott vonatkozási ponthoz képest. Ez rendszerint a hullám csúcsidőpontjának és az utolsó beállító sötét-fény átmenet időpontjának különbsége (esetünkben az 1. ábrában szereplő ritmus fázisa 0 vagy 24). A kitérés vagy amplitudó a hullám maximális pozitív és negatív értékeinek különbségének fele.



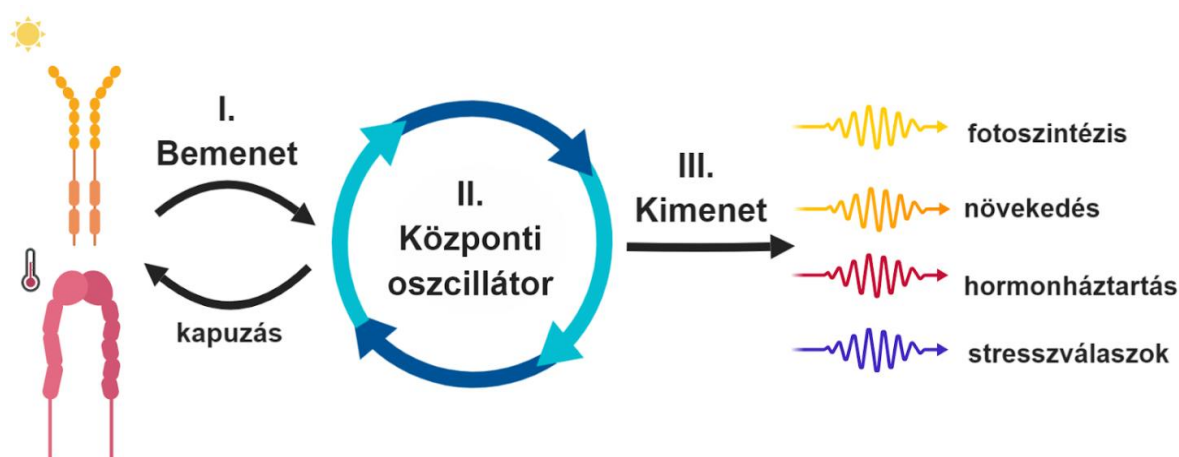
1. ábra. A cirkadián ritmusok főbb paraméterei.

A különböző növényi vonalak cirkadián ritmusának meghatározásához a legtöbbször riporter gén konstrukciókat fejeztetünk ki az adott vad típusú vagy mutáns növényben. A génkonstrukcióban a szentjánosbogár luciferáz génje (*LUC*) egy olyan gén promoterével van fúzionálva, melyet a növény cirkadián órája vezérel. A kísérlet során a növényeket luciferin nevű szubsztráttal látjuk el, melyet a ritmikusan termelődő luciferáz enzim fényjelenség

kíséretében bont le. A kibocsátott fény erősségének detektálásával és ábrázolásával kapjuk meg az említett cirkadián görbéket.

1.3. A cirkadián óra molekuláris modellje

Mint a legtöbb összetett élettani folyamat, a cirkadián óra is számos molekuláris kölcsönhatás eredője. Három fő egységből tevődik össze (2. ábra); az ún. „központi oszcillátor” felelős a környezettől független ismétlődési mintázat kialakításáért, a generált ritmusnak alárendelt jelenségeket „kimenetnek” nevezzük, míg a szinkronizációhoz szükséges környezeti stimulusok monitorozását és információvá alakítását az ún. „bemeneti ág” végzi.



2. ábra. A cirkadián óra vázlatos felépítése.

A cirkadián óra három egysége a „bemeneti egység”, a „központi oszcillátor” és a „kimeneti egység”. Bár a központi oszcillátor által létrehozott belső ritmus alapvetően külső stimulusok nélkül is képes fennmaradni, fontos, hogy az összhangban legyen a külső környezeti változások ritmusával. Ennek érdekében az oszcillátor egy bemeneti egységgel van összekapcsolva, mely több fontos környezeti paraméter (pl. fény, hőmérséklet) monitorozásával, s a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli hálózatokkal hatást gyakorol az oszcillátor működésére. A kapuzás, mint a bemenet felé történő visszacsatolás garantálja, hogy a bemenet érzékenysége kisebb legyen a napközben történő jelentéktelenebb környezeti ingadozásokra (pl. felhős ég), így a szükségtelen szinkronizációk elkerülhetők. Az óra által létrehozott ritmus a kimeneti jelátviteli utakon át számos fontos élettani folyamat elemének génkifejeződését ritmizálja (pl. fotoszintézishez szükséges fehérjék, hormonok stb.).

Fontos megemlíteni, hogy míg a kimeneti elemek expressziójában bekövetkező változások nem hatnak vissza az óra működésére, addig a bemenet és a központi oszcillátor között van

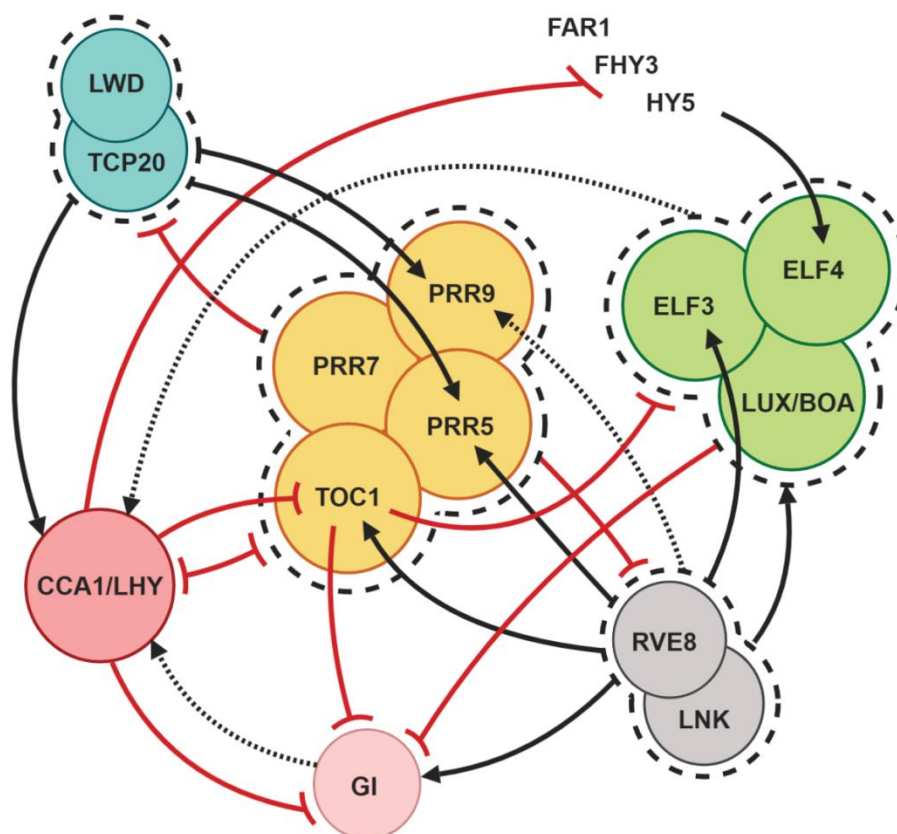
egy visszacsatolás. Az oszcillátor ugyanis számos bemeneti elem kifejeződését ritmizálja, aminek eredményeként a növény órája a nap folyamán más-más mértékben válik érzékenyebbé ugyanazon környezeti jelre, s így a beállíthatósága is változik. Ezt a jelenséget „kapuzásnak” (gating) nevezzük. A továbbiakban a három alrendszer elemeit, működését és jelentőségét szeretném kifejtetni.

1.3.1. A központi oszcillátor

Az óra magjaként is emlegetett központi oszcillátor egészen változatos szerkezetű a különböző organizmusokban [1], de alapjaiban véve mindegyik egy pozitív és negatív folyamatokból álló, késleltetett visszacsatolós rendszer, melyben „órágének” és az általuk termelt „órafahérjék” hatnak egymás termelődésére. A növények órája különleges: mivel helyhez kötött életmódjuk miatt nem tudnak az őket érő káros környezeti körülményekre meneküléssel reagálni, az óra stabil működtetése érdekében egy robusztus, többszörösen összetett központi oszcillátorral rendelkeznek (3. ábra).

A központi oszcillátor működési láncolata a következőképpen zajlik; a reggeli órák első aktív óragénjei a *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) és az *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*). Ezek Myb-motívumot tartalmazó DNS-kötő fehérjéket kódolnak, melyek úgynevezett esti promoter-elemekhez (evening element, EE) kötve gátolják számos óragén és kimeneti elem kifejeződését [2], [3]. Ilyen óragén a *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR* (PRR) családba tartozó *PRR9*, *PRR7*, *PRR5* és *PRR1* (másik nevén *TOC1*), de gátolják a *GI* (*GIGANTEA*) működését és az ún. „esti komplex” tagjait kódoló géneket is, ahova a *LUX* (*LUX ARRHYTHMO*), a *BOA* (*BROTHER OF LUX ARRHYTHMO*), az *ELF3* (*EARLY FLOWERING3*) és az *ELF4* (*EARLY FLOWERING4*) óragének tartoznak [2]. A *CCA1* és *LHY* működését a nap további részében a PRR család fehérjéi gátolják, míg - a PRR gének transzkripció gátlásán keresztül - az esti komplex fel nem szabadítja őket a késő esti és hajnali órákban [4]–[6].

Az ily módon egymásra lapolt negatív visszacsatolások mellett aktiváló elemeket is találunk az órában. Ilyenek többek között a REVEILLE család fehérjéi (RVE8, RVE6, RVE4), a TCP transzkripció faktorok két tagja (TCP20, TCP22), az LWD koaktivátorok két képviselője (LWD, LWD2), továbbá az LNK1 és LNK2 (NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED1, 2) transzkripció koaktivátorok [7]–[13].



3. ábra. A cirkadián oszcillátor hálózata.

A funkcionális egységnek tekinthető óraelemek azonos színű háttérrel és fekete szaggatott körvonallal vannak ellátva. A FAR1, FHY3 és HY5 transzkripció faktorok az oszcillátor működési hálózatának teljeskörű bemutatása érdekében lettek jelölve, azonban nem tekinthetők óragéneknek/órafelhérjéknek, így nem kaptak körvonalat. A közvetlen aktiváló hatást normál fekete nyíllal, a közvetett aktiváló hatást szaggatott fekete nyíllal, a gátlást vörös talpas nyíllal jelöltem. Amennyiben az adott hatás az egész funkcionális egységre érvényes, úgy az aktiválást/gátlást jelző nyíl a funkcionális egység szaggatott körvonalaig/körvonalatól terjed. Ha a kölcsönhatás csak a funkcionális egység egy tagjára korlátozódik, a nyíl az óraelem körének belsejében kezdődik vagy végződik.

1.3.2. A kimeneti ág

A kimenethez tartozó géntermékek (és az általuk előidézett anyagcsere-folyamatok, viselkedési mintázatok) nem hatnak vissza a központi oszcillátor ritmusára. Közös jellemzőjük, hogy folytonos expressziójuk hatalmas erőforrás pazarlás lenne, mert géntermékeik hasznosulásának van egy optimuma a nap folyamán, amelyen kívül a termelés megtérülési rátája elmaradna a maximumtól. A génkifejeződés megfelelő időablakra való

korlátozásával mindezen energia megtakarítható. Itt sok olyan jelenségekről beszélhetünk, amely egy egyszerűbb fényfüggő génexpressziós szabályozással is kivitelezhető volna a növény számára. Ilyen jelenség lehet többek közt az egymást zavaró termelési fázisok időbeli szeparációja (pl.: a CAM-növények CO₂-kötésének lépéseinél, ahol a fixáció éjjel, a dekarboxiláció és regeneráció viszont nappal zajlik). Azonban a termelés, mint ív rávilágít arra, hogy sok esetben miért is kifizetődőbb egy óra ritmusához igazítani az génkifejeződést. Példaként, a növények fénybegyűjtő komplexeinek a megtermelése több órát vesz igénybe. Ha a szükséges gének expressziója egy egyszerű fényfüggő jelátvitellel indulna meg, az egyed több órája rendelkezésre álló fényenergia hasznosításától esne el, s így hátrányba kerülne olyan társaihoz képest, melyek az óra segítségével a termelést már a fény megjelenése előtt is el tudják indítani. Ez a szabályozási újítás adja a cirkadián óra igazi evolúciós előnyét.

Mindezek tekintetében egyáltalán nem meglepő adat, hogy a lúdfű genomjának mintegy harmada áll cirkadián szabályozás alatt[14], s ez olyan más, gazdaságilag hasznosított növények esetében is megfigyelhető, mint a nyárfa, a rizs, és a mustárnövény [14]–[16].

1.3.3. A bemeneti ág

Azokat a géneket soroljuk a cirkadián óra bemeneti ágához, amelyek elrontása esetén a belső ritmus ugyan fennmarad, de annak a környezeti változásokkal levő összhangja sérül. Ezt a ritmus valamely paraméterének megváltozásában észleljük. Hogy a cirkadián ritmus a lehető legtokéletesebb összhangban legyen a környezeti változások ritmusával, a növények több, környezeti paramétert monitorozó jelátviteli rendszerrel kötötték össze cirkadián órájukat, melyek a szerzett információk alapján képesek annak ritmusában változást (és így szinkronizálást) előidézni. Hogy pontosan melyek ezek a környezeti jelek és jelátviteli útvonalak, az alábbiakban kerülnek felsorolásra és rövid jellemzésre.

1.3.3.1. Zeitgeberek

A német nyelvből átvett „zeitgeber” (jelentése: „időadó”) névvel illetjük azon exogén/endogén környezeti paramétereket, amelyek ritmikus változásaihoz szinkronizálja az organizmus biológiai ritmusát. A növények esetében a fotoszintézisből származó cukrokról is bizonyították, hogy zeitgeberként funkcionálhatnak [17], de a két legfontosabb környezeti jel

a hőmérséklet és a fény. Utóbbi a növények életében hatványozott fontossággal bír, hiszen számukra a fény nemcsak információ-, hanem éltető energiaforrás is, így a továbbiakban a fényérzékeny bemeneti ág elemei kerülnek bemutatásra.

1.3.3.2. Fotoreceptorok

Mint minden jelátviteli rendszerben, itt is a receptorok az első lényeges komponensek. Több mint tíz óra-asszociált fotoreceptort ismerünk, melyekkel a növények dózis-függő módon érzékelik a különböző hullámhosszú fénysugarakat. A növényi cirkadián óra felé négy csoportjuk képes jelátvitelt indítani:

- a vörös/távoli vörös fényt érzékelő fitokrómok (PHYA-E),
- az UV-A és kék tartományban érzékeny kriptokrómok (CRY1 és CRY2),
- a szintén kék fényt monitorozó ZEITLUPE (ZTL)/ FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX1 (FKF1)/ LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) receptorok,
- végül az UV-B tartomány receptora, az UVR8.

A továbbiakban ezen csoportok legfontosabb jellemzői és cirkadián órával kapcsolatos vonatkozásaik kerülnek bemutatásra.

1.3.3.2.1. Fitokrómok

A fitokrómok elsődlegesen vörös fényt érzékelnek, abszorpciós maximumuk 600-700 nm-es hullámhosszon található. Az *Arabidopsis thaliana* öt fitokróm génnel rendelkezik: PHYA, B, C, D és E. A fitokrómok homo- vagy heterodimerekként vannak jelen a növényi sejtben, és két izoformát vehetnek fel. Az inaktív Pr forma, fitokromobillin kromofórjának köszönhetően gerjesztési energiát nyel el az érkező vörös fénysugarakból (λ_{\max} = 660 nm), ezt felhasználva egy konformációs változást szenved el, így veszi fel biológiailag aktív Pfr formáját [18]. Ezek a sejtmagba vándorolva „sejtmagi testeknek” nevezett képleteket formálnak, melyek fényindukált gének expresszióját végző multiprotein komplexek [19]. Az aktív Pfr forma távoli vörös fénnel történő gerjesztéssel (λ_{\max} = 730 nm) inaktiválható, de létezik egy fényfüggetlen, ám hőmérsékletfüggő spontán visszaalakulás is, melyet a szakirodalom „dark reverzióként” fémjelez. Erősebb fényintenzitáson az aktív állapotba került dimerek nagyobb arányban vannak jelen, és a sejtmagba vándorolva erőteljesebb génexpressziós változást

képesek indukálni. E jelenség adja meg a molekuláris hátterét annak, hogy a növényi cirkadián ritmus az úgynevezett Aschoff-szabály szerint működik [20]: ennek értelmében „diurnális” (nappal aktív) élőlényekként a növények cirkadián ritmusa erősebb intenzitású fényben felgyorsul (paraméterben kifejezve: a periódusa csökken), gyengébb intenzitású fényben viszont lassabb ritmusra vált (periódusa megnő).

A PHYA alacsony intenzitású vörös fény, illetve rövid idejű fényimpulzusok érzékelésével állítja be a cirkadián órát; mutációja periódus-változást idéz elő gyenge vörös fényben [21]. Az óra felé ható jelátviteli rendszere még nem ismert.

A PHYB-t főleg a nagy intenzitású vörös fény receptoraként ismerjük, de távoli vörös fény érzékelésére is képes. A PHYB óra-asszociált szerepköre már feltérképezettebb: az ELF3 órafelhérjével kölcsönhatva közvetlenül is képes az órát szabályozni [22]. A közvetlen ELF3 interakcióra ugyan a PHYC és PHYE is képes [23], de esetükben még nem mutatták ki, hogy az interakciónak óraszabályozó hatása lenne. A *phyC* mutáció hőmérsékletfüggő módon hosszú periódust eredményez, ami alapján úgy tűnik, a PHYC a fény mellett a hőmérsékleti paramétereket is képes zeitgeberként használni az óra szabályozásához [24]. A PHYD és PHYE órabeállító képességét meglehetősen nehéz feladat tanulmányozni, mivel funkcióikat a PHYB redundáns módon képes ellátni [25]. Az ötszörös fitokróm mutáció a cirkadián ritmust ugyan nagymértékben károsítja, de az óra nem válik teljesen működésképtelenné [26].

1.3.3.2.2. Kriptokrómok

A kriptokrómok kék fény (390-500 nm) és UV-A (320-390 nm) tartomány érzékelésére képes receptorok. Ehhez N-terminálisukon levő fotoliáz-szerű doménjüket használják, melyek FAD (flavin adenine nucleotide) és MTHF (flavin plus either methenyltetrahydrofolate) kromofórokat kötnek. A CRY1, nagyobb stabilitásának köszönhetően egy magasabb fényintenzitáson funkcionáló fehérje, míg az instabilabb CRY2 gyenge fényintenzitáson fejti ki hatását [27], így egy kifinomultabb szabályozási rendszer érvényesülhet fényintenzitástól függően azon gének esetében, melyek kék fényben aktiválódnak.

A *cry1* mutáns hosszú periódust mutat kék fényben, míg túltermeltetése hiperszenzitivitást és rövid periódust okozott, vagyis a CRY1 szerepet játszik az óra kék fény általi beállításában [28]. A *cry2* mutáció önmagában nincs hatással az órára [29], azonban a CRY1 és CRY2 együttes túltermeltetése tovább növeli a növény gyenge kék fényre való érzékenységét [30].

1.3.3.2.3. A ZTL család tagjai: a ZTL, FKF1 és LKP2

E receptorok a kriptokrómokhoz hasonló tartományban aktiválódnak. Az ő kromofórjuk egy FMN (flavin-mononukleotid) redoxfesték, mely LOV-motívumukhoz (LIGHT, OXIGENE OR VOLTAGE) kötődik (utóbbi egy másik jelentős fotoreceptor családnál, a fototropinoknál is megtalálható elem).

Kék és fehér fényben a *ztl* mutáns hosszú periódust mutat, de fényerősség függő módon [31], ami az óra bemeneti oldalán szereplő komponensekre jellemző tulajdonság. A ZTL több óragénnel is kölcsönhat. Bár a ZTL mRNS konstitutív expressziót mutat, fehérjeszinten mégis ritmikus a kifejeződése. Ez a GIGANTEA (GI) órafehérje hatásából adódik, mely kék fényben HSP90 chaperonokhoz kötődve növeli a termelődő ZTL fehérjék megfelelő konformáció-felvételének sebességét[32]. A GI fehérje degradációjának elősegítése útján az ELF3 is közvetett hatással bír a ZTL-ra [33]. A ZTL emellett részt vesz a TOC1 és a PRR5 proteoszomális degradációjának szabályozásában [34] [35].

Az FKF1 és LKP2 esetében is bizonyítottak óra-asszociált funkciót: az *fkf1* mutációja lassította a cirkadián ritmust [36], az LKP2 túltermelése pedig aritmiát vont maga után [37].

1.3.3.2.4. Az UVR8

Az UV-B fény (280-315 nm) jelátvitel fotoreceptorát sikerült a legkésőbb azonosítani [38]. Ennek részben az UVR8 különleges természete az oka: a fent említett fotoreceptorokkal ellentétben nem rendelkezik külön prosztetikus kromofórral, hanem meghatározott elhelyezkedésű triptofán aminosavak gerjesztődnek a fehérjében. Ezen kívül a receptor – szintén egyedi módon – inaktív állapotában dimer, biológiailag aktív állapotában monomer formájú. Az *uvr8* növények periódusa különbözik a vad típustól UV-B kezelés hatására, vagyis az UVR8 az UV-B fény bemeneti eleme az oszcillátor felé [39].

1.3.3.3. A jelátvitel további elemei

1.3.3.3.1. COP1

Az egyik legjobban feltérképezett jelátviteli intermedier a COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1), mely természetét tekintve egy E3 ubiquitin ligáz. Leginkább a skotomorfogenezis névvel illetett fejlődési programban betöltött szerepéről ismert, melynek

célja, hogy a csírázó növény képes legyen utat törni a föld felszínére. Ennek érdekében a növény hipokotilja intenzív megnyúlást mutat, a sziklevelek zárt állapotban vannak, a hipokotil kampó nevű képlet pedig védi az apikális merisztémát a mechanikai sérülésektől. Mikor a növény eléri a földfelszínt, átváltja fejlődési programját az ún. fotomorfogenezisre, mely során a hipokotil kampó kiegyenesedik, a sziklevelek szétterülnek, és a növény megkezdzi energiagyűjtését, a fotoszintézist. A COP1 feladata abban áll, hogy sötétben E3 ubiquitin ligáz-komplexek tagjaként degradációra jelölje ki azon transzkripciós faktorokat a sejtmagban, melyek jelenlétükkel túl korán indítanak el a fotomorfogenezist (sötétben nőtt *cop1* mutáns növények fenotípusa olyan, mintha a növények fényben nevelkedtek volna). Fény hatására azonban a COP1 funkciója gátlódik, másrészt maga a COP1 fehérje transzportálódik a sejtmagból a citoszolba, így a sejtmagban a COP1 célfehérjék felhalmozódhatnak és képesek elindítani a két fejlődési program közötti váltást.

A COP1 szerepét a fény által történő órabeállításban már bizonyították, például a *cop1* mutáns növény ritmusa - hasonlóan az *uvr8* mutánséhoz – elveszti az UV-B fényvel történő beállítás képességét [39]. Mivel azonban a COP1 rendkívül sokféle fehérje stabilitását befolyásolja, úgy az óra felé is több jelátviteli úton hathat. Ennek megismerése jelenleg is zajlik.

1.3.3.3.2. Lehetséges közvetlen bemeneti elemek: a HY5

Napjainkban ez egyik legintenzívebben kutatott területnek számít azon jelátviteli komponensek azonosítása, melyek képesek az óragének működésére közvetlenül hatni. Ezek közül szeretném az alábbiakban bemutatni a HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) nevű transzkripciós faktort, mely dolgozatom tárgyát képezi.

A HY5 a bZIP transzkripciós faktorok családjába tartozik. Homológjával, a HYH-al (HY5 HOMOLOG) mintegy 49%-os szerkezeti hasonlóságot mutat: leginkább a DNS-kötő doménjuk felépítésében egyeznek, de több, fontos kölcsönható partnerek kötéséhez szükséges motívum is fellelhető mind a HY5-ban, mind a HYH fehérjében [40]. A HY5 és HYH leginkább olyan gének promoteréhez köt, melyek ACGT szekvenciát, más néven „ACE-motívumot” tartalmaznak. Sokféle *cis*-elem tartalmaz ACE-motívumot: ide sorolhatók a G- (CACGTG), C- (GACGTC) és Z-box elemek (TACGTG), vagy ezek változatos hibridjei, úgy mint a G/C-

(CACGTC), A/C- (TACGTC) és T/G-box elemek (AACGTG) [41]–[43]. Mindezen cisz-elemek rendkívül sok helyen megtalálhatóak a növényi genomban, nem köthetőek csupán egy adott jelátviteli folyamathoz. A HY5 transzkripció faktor azonban nem csupán azért képes sokféle anyagcsere folyamatra hatást gyakorolni, mert a kötődéséhez szükséges motívum általános előfordulása. A HY5 nem sorolható a klasszikus transzkripció faktorok közé, ugyanis nem rendelkezik transzkripció változást indukáló doménnel [44], [45]. Ahhoz, hogy szabályozó hatását kifejtse, kofaktorokra van szüksége, amelyek a gén transzkripció aktiválását/gátlását elvégzik, ennél fogva a HY5 komplexek tagjaként vesz részt megannyi gén szabályozásában [40]. Ezen komplexek összetétele feltételezhetően akár szövettípusonként és a környezeti hatások függvényében is eltérhet, ami szintén lehetőséget ad arra, hogy a HY5 egy kiemelkedően sokoldalú szerepkört tölthessen be. Genomszintű vizsgálatok alapján a HY5 mintegy 1200 *Arabidopsis* gén kifejeződését szabályozza, ezek 20%-a esetében mutattak ki direkt HY5-kötést [43]. Érdeemes megjegyezni, hogy bár homológjával nemcsak felépítésük, hanem funkcióik listája is átfedést mutat, a HY5 befolyása, fontossága dominánsabbnak mutatkozik az egyes folyamatokban.

A HY5 szerepe kulcsfontosságú a fotomorfogenezisben. Sötétben a HY5-t a COP1 26S proteasóma általi lebontásra ítéli, de fény hatására (mely lehet vörös, távoli vörös, kék, és UV-B fény is) a HY5 mRNS mennyisége 2-3x-os, a HY5 fehérje mennyisége pedig mintegy 15-20-szorosára emelkedik, jól mutatva, hogy a HY5-szint szabályozása elsősorban poszttranszkripció szinten történik (a COP1-komplex jelenlétének függvényében) [46]. A HY5 egy általános pozitív faktor a fényfüggő génszabályozásban: olyan gének transzkripcióját segíti, melyek antocianin szintézisben (pl.: *CHALCONE SYNTHASE* /*CHS*/, *FLAVONOL SYNTHASE* /*FLS*/), klorofill szintézisben (pl.: *LIGHT HARVESTING CHLOPHYLL A/B 1.3* /*LHCB1.3*/, *PHYTOENE SYNTHASE* /*PSY*/) szacharóz anyagcserében (pl.: *SUCROSE TRANSPORTER 11* /*SWEET11*/) vesznek részt, ám represszor hatást is kifejthet, különösképp a sejtmeinyúlásért felelős gének esetében (pl.: *EXPANSIN2* /*EXP2*/, *XLYOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 5* /*XTH5*/) [47].

A HY5 a hormonháztartás egyensúlyában is aktív szerepet tölt be, képes befolyásolni az auxin, etilén, brassinoszteroid és abszcizinsav jelátvitelt. Emellett olyan területeken is bizonyították hatását, mint a flavonoid- és terpenoid szintézis indukciója, a növény hideghez való akklimatizációja, a nitrogén asszimiláció serkentése [47].

Transzkripciósfaktorként és a fény-jelátvitelben betöltött megkerülhetetlen szerepéből adódóan a HY5 ideális jelöltnek bizonyult arra, hogy bizonyos óragének expressziójának megváltoztatásával közvetlen szabályozója legyen az óra fény általi beállításának, szinkronizációjának.

2. Célkitűzések

A HY5 óra-asszociált szerepkörének meghatározásával kapcsolatban több egymásnak ellentmondásos eredmény lelhető fel a szakirodalomban:

- A HY5 több óragén promoteréhez is (*TOC1*, *CCA1*, *LHY*, *ELF4*) kötődött fehér fényben *in vivo* [43].
- Andronis és mtsai eredményei alapján a HY5 nem képezi az oszcillátor részét, mivel – bár direkt kölcsönhatásba lép a CCA1 fehérjével - hiánya csak bizonyos kimeneti elemek expressziójára van hatással [48].
- Li és mtsai 2011-ben bizonyították, hogy az FHY3 (FAR-RED ELONGATED 3), FAR1 (FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1) és HY5 transzkripció faktorok az *ELF4* promoteréhez kötve aktiválják annak transzkripcióját [45].
- Ezzel szemben Fehér és mtsai eredményei szerint a *hy5 hyh* mutáns periódusa nem tért el jelentősen a vad típusétól. [39].

Dolgozatom célja volt, hogy az említett kísérletekben használt körülmények és eljárások alapos vizsgálata és összehasonlítása után, egy árnyaltabb kísérleti elrendezésben határozzam meg, hogy

- a HY5 és homológja képesek-e hatni a növényi cirkadián óra működésére,
- és amennyiben van óra-asszociált funkciójuk, úgy milyen molekuláris mechanizmus által és környezeti feltételek mellett töltik azt be?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti anyagok és organizmusok

3.1.1. Tápoldatok, táptalajok, antibiotikumok

Bakteriális táptalajok	
LB (Luria-Bertani medium) (pH=7,0)	<ul style="list-style-type: none"> • 1% (w/v) tripton (Molar Chemicals, Budapest, Magyarország) • 0,5% (w/v) élesztő kivonat (Molar Chemicals) • 1% (w/v) NaCl (Molar Chemicals) • szilárd táptalajhoz: 1,5% (w/v) agar (Molar Chemicals)
YEB (Yeast Extract Beef) (pH=7,0)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5% (w/v) Difco™ beef extract (Fisher Scientific, Hampton, NH, Egyesült Államok) • 0,5% (w/v) szaharóz (Molar Chemicals) • 2 mM MgSO₄ (sterilre szűrve) • szilárd táptalajhoz: 1,5% (w/v) agar (Molar Chemicals)

Növényi táptalajok	
½MS1 (Murashige-Skoog Medium) (pH=5,6)	<ul style="list-style-type: none"> • 2,15 g/l MS por (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) • 1% (w/v) szaharóz • 0,8% (w/v) agar (Molar Chemicals)
MS0/0,5/1/2/3 (Murashige-Skoog Medium) (pH=5,6)	<ul style="list-style-type: none"> • 4,3 g/l MS por (Sigma-Aldrich) • 0/0,5/1/2/3% (w/v) szaharóz • 1% (w/v) agar (Molar Chemicals)
AM (Arabidopsis Medium) (pH=5,6)	<ul style="list-style-type: none"> • 2,15 g/l MS por • 1% (w/v) szaharóz • 0,2% (w/v) fitagél (Sigma-Aldrich)

Antibiotikumok		
Modellszervezet	Szelekciós ágens	Végkoncentráció (60°C-ra hűtött tápoldatba keverve)
<i>Escherichia coli</i>	Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Karbenicillin (Cb)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
	Rifampicin (Rf)	25 µg/ml
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Higromicin (Hyg)	15 µg/ml
	Klaforán (Cf) *	200 µg/ml
	BASTA **	20000x

*nem szelektáláshoz, hanem a növényi táptalajok bakteriális fertőzésének visszaszorítása érdekében használtuk

** nem antibiotikum, hanem gyomirtó. Az EgrEvo (Bad Soden, Németország) cég által forgalomba hozott oldatot permetszerként alkalmaztuk virágföldön csíráztatott *Arabidopsis* magvak szelektálásához a fent feltüntetett hígításban.

3.1.2. Plazmidok

A génkonstrukciók építéséhez általában pBluescript II KS/SK plazmidot használtunk, vagy egyből a célplazmidban, pPCV-ben (Plant Cloning Vector) szerkesztettük a szükséges géndarabokat. A pPCV BASTA-rezisztens változatát (pPCVB) Dr. Szekeres Miklós készítette el.

3.1.3. Baktériumok

A molekuláris klónozási munkák során *Escherichia coli* (E. coli) XL-1 Blue törzset használtunk (Stratagene). A növényi transzformáláshoz elkészített plazmidokat *E. coli* S17-1 törzsbe transzformáltuk. Ez a törzs volt képes a plazmidját átadni az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM90RK) (Rif, Kan) törzsnek, mely később a növénybe juttatta a határoló elemek közötti idegen DNS darabot (T-DNS).

3.1.4. Növények

Minden kísérletünkben használt vad típusú, mutáns illetve transzgenikus növény *Arabidopsis thaliana* Wassilevskija (Ws) ökotípusú növény volt. A *hy-ks50*, *hyh-1* szimpla mutáns, valamint a *hy5-ks50 hyh-1* dupla mutáns vonalak leírása az alábbi cikkekben tekinthető meg: [39], [40], [49]. A *CAB2:LUC*, *CCR2:LUC*, *CCA1:LUC* és *GI:LUC* riportergén-konstrukciók jellemzését a következő közlemények tartalmazzák:[50]–[52]. Ezen konstrukciókat vad típusú Ws növényekbe transzformáltuk. A későbbiekben kiválasztott homozigóta, a transzgént egy kópiában tartalmazó T3 vonalakat *hy5*, *hyh* és/vagy *hy5 hyh* növényekkel kereszteztük annak érdekében, hogy az adott markergén minden genetikai háttérben azonos legyen. A sikeres „F1” keresztezéseket luciferáz-aktivitásuk alapján azonosítottuk, az önbeperzással létrejött „F2” generációban allélspecifikus primerpárok alkalmazásával válogattuk ki azon *hy5/hyh* homozigóta egyedeket, melyek luciferáz-aktivitást mutattak. A riportergén-konstrukciók lókuszainak vizsgálatához nem állt rendelkezésünkre megfelelő primerpár, így az említett egyedek önbeperzással létrejött „F3” nemzedékében hasadási vizsgálattal szelektáltunk a riportergén-konstrukciót homozigóta formában hordozó vonalakra.

3.2. Növényeken alkalmazott eljárások

3.2.1 Növények előkészítése és nevelése

Az *Arabidopsis* magvakat 3 napon keresztül duzzasztottuk desztillált vízben 4 °C-on, majd 8-15 percen keresztül sterilizáltuk azok felszínét 30%-os Domestos oldatban való áztatással. A magvakat ezután öt körben mostuk át csíramentes desztillált vízzel, majd a megfelelő AM vagy MS táptalajokra szélesztettük őket. A pozitív egyedek kiválasztása előtt vagy a kísérleti fénykezelések előtt egy hétig inkubáltuk őket 22 °C-on 12-12 órás fény ($80 \mu E = \mu mol m^{-2} s^{-1}$) és sötét ciklusok váltakoztatásával.

3.2.2. Fénykezelések

Monokromatikus fénykezeléseinkben a Quantum Devices Inc. (USA) Snaplite™ LED-fényforrásait használtuk. A monokromatikus kék fény ($\lambda = 455-485$ nm) és vörös fény ($\lambda = 645-675$ nm) erőssége $15 \mu E$, a távoli vörös fény ($\lambda = 715-745$ nm) erőssége $5 \mu E$ volt.

3.2.3. Transzformált növények létrehozása

Az *Agrobacterium*-mediált transzformációt Clough és Bent 1998-ban leírt virágmártogatásos technikájával végeztük el [53]. A transzformált növények magjait a várt rezisztenciától függően klaforánnal és higromicinnel kiegészített AM táptalajon, vagy BASTA gyomirtóval permetezett üvegházi földön csíráztattuk ki, így kiválasztva a sikeresen transzformált egyedeket (T1 nemzedék). Kellő fejlettségük elérése után friss földbe átültetve neveltünk fel 20-30 független T1 vonalat. Kísérleteinket a T3 nemzedéknek idegen génre nézve homozigóta egyedein végeztük. A komplementáló vonalak esetében Western-blottal ellenőriztük a kérdéses fehérjék kifejeződését.

3.2.4. Lumineszcencia mérés élő növényben

A mérés megindítása előtt 6 órával 96 zsebes lemezeket készítettünk, melyek mindegyikébe 0,25 ml MS táptalajt, egy hét napja csírázott, luciferáz riportergént kifejező csíranövényt és 20 µl 2,5 mM-os luciferin oldatot tettünk. A méréseket TopCount NXTTM luminométerrel (Perkin Elmer) végeztük el. A 2-7 napos mérés során a műszer 1-2 óránként rögzítette a csíranövények által kibocsájtott fény mennyiségét. A mérési eredményeket Microsoft Excel TopTemp makróval dolgoztuk fel. A kiértékelés során a mért értékek az összes mért érték átlagával kerültek elosztásra, majd az utolsó sötét/fény átmenettől (ZT0) számított idő függvényében ábrázoltuk őket.

3.3. Molekuláris biológiai módszerek

3.3.1. Riportergén konstrukciók előállítás

Minden restriktációs emésztést és plazmid DNS-szerkesztési lépést a Thermo Fisher Scientific enzimjeivel, a gyártó által szállított pufferekben, a javasolt körülmények között végeztük el. A kapott DNS-termékeket elektroforézissel választottuk el agaróz gélben (SeaKem LE, Cambrex), majd a gélből kivágva fenolozással tisztítottuk. A T4 DNS ligázal történő ligálást szintén a Thermo Fisher Scientific előírása alapján végeztük el. A DNS-ligátumot Inoue-módszerrel [54] előkészített XL-1 Blue kompetens sejtekbe transzformáltuk hősokk-kezeléssel [55]. A plazmidot felvett egyedek szelekcióját a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezekon végeztük el 16 órán át 37 °C-on. A plazmidokat az *E.coli* sejtekből

módosított lúgos feltárás segítségével izoláltuk [56], majd restrikciós emésztéssel ellenőriztük.

3.3.2. *Agrobacterium* konjugáció

A megszerkesztett pPCVB vektorokat *E.coli* S17-1 törzsébe transzformáltuk, majd a plazmidokat hordozó baktériumokat 1,5 ml ampicillinnel kiegészített LB tápoldatban neveltük 16 órán át 37 °C-on. Ezt megelőzően 3 ml *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 kultúra nevelését is megkezdjük YEB tápoldatban, mely 30 °C-on 24 óra alatt nőtt fel. A két baktérium szuszpenzióból 1-1 ml-t összekevertünk és szelektáló ágens nélküli YEB táplemezen inkubáltuk egy napon át, majd a tenyészetből rifampicin, karbenicillin és kanamicin tartalmú YEB lemezre oltottunk át kis mennyiséget. A lemezen életképes *Agrobacterium*-telepeket 5 alkalommal passzáltuk ugyanilyen lemezeken, ezután használtuk fel őket *Agrobacterium*-mediált virágtranszformálásra.

3.3.3. Kromatin immunoprecipitáció (ChIP)

A Werner Aufsatz által kidolgozott ChIP protokollt (<http://www.epigenome-noe.net/researchtools/protocol.php?protid=13>) az alábbi módosításokkal alkalmaztuk: 10 napos növényeket fixáltunk 1%-os (v/v) formaldehid oldatban. Sejtmag izolálást, majd lízist követően a kromatinállományt 6x10 másodpercig szonikáltuk 10%-os teljesítményen, Vibra Cell szonikátor (SONICS & MATERIALS Inc., Danbury, CT, USA) alkalmazásával. A szonikált kromatint felhígítottuk, majd tisztítási lépésként 20 µl térfogatú kontroll agaróz gyönggyel inkubáltuk (Chromotek GmbH, Németország) 1 órán keresztül, 4 °C-on („pre-clearing”). Az ily módon „tisztított” kromatin oldatból egy adag aliquot-ot „input” kontrollként félretettünk, majd a maradékot 12,5 µl GFP-kötő agaróz gyöngyökön engedték át 16 órán keresztül, 4 °C-on. A precipitált kromatint leoldottuk, s ezek után az input kontrollal megegyező kezeléseknek vetettük alá: a keresztkötéseket feloldottuk és a DNS-t Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) oszlopon tisztítottuk meg. A tisztított DNS végtérfogata megközelítőleg 45 µl volt. 1,5 µl eluátumot qRT-PCR reakciókkal analizáltunk, melyek részletei az adott kísérlet leírásában találhatóak meg. A ChIP-qPCR-hoz használt primerek listáját az 1. melléklet tartalmazza. A ChIP adatok értékelését az „input %” módszerrel végeztük el [57].

3.3.4. Növényi DNS tisztítás

10-100 mg tömegű levélmintát folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, majd 1,5 ml-es Eppendorf-csövekben elporítottuk azt. A mintára 500 µl CTAB puffert (összetétele: 1% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH=8,0), 20 mM EDTA, 1,42M NaCl, 1% PVP40, 0,5% β-merkaptóetanol) mértünk, majd 30 percen át 65 °C-on inkubáltuk. 10 perc centrifugálás után (22 °C, 13000g) a felülúszót új csőbe mértük át, s megegyező térfogatú kloroformmal elegyítettük. 10 perc centrifugálással elválasztottuk a szerves fázist a vizes fázistól. Utóbbit új csőbe mértük át és 0,75x-es térfogatban hozzáadott 2-propanollal kicsaptuk a DNS-t. Az egy órás szobahőmérsékleten történő inkubáció alatt kicsapódott DNS-t újabb 10 perces centrifugálással ülepitettük, majd 70%-os etanollal átmostuk, légszivattyúval szárítottuk és 100 µl desztillált vízben feloldottuk. A minta RNS-tartalmát 10 µg RNáz-A enzimmel távolítottuk el 1 órás 37 °C-os inkubáció alatt. Ezt követően a mintát fenol és kloroform 1:1-es elegyével, 5 perces centrifugálásokkal két körben extraháltuk, majd a vizes fázis DNS-tartalmát az előzőekkel megegyező módon 2-propanollal kicsaptuk, szárítottuk, és feloldottuk 50-50 µl steril desztillált vízben.

3.3.4. Növényi RNS tisztítás

A növényi össz-RNS tisztítását 100 mg folyékony nitrogénben porított növényi mintából vontuk ki Qiagen RNeasy Plant Mini Kittel, a gyártó által megadott protokollt követve. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét a minta 260 nm-en és 280 nm-en mért fényelnyeléséből határoztuk meg.

3.3.5. mRNS-szint meghatározása valós idejű PCR-ral

A növényi mintákból izolált össz-RNS 1 µg-jából cDNS-t készítettünk a Thermo Fisher Scientific RevertAid™ First-Strand cDNA Synthesis Kitjének használatával, a gyártó útmutatásainak megfelelően. A kapott termékeket térfogatuk ötszörösére hígítottuk RNáz-mentes vízzel. A kérdéses mRNS-ek szintjét valós időben mért PCR-ral, ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) gépen határoztuk meg, POWER SYBR Green PCR Master Mix alkalmazásával (Applied Biosystems), 15 µl végtérfogatban. Reakciónként 1,5 µl hígított cDNS templátot használtunk.

Az mRNS szintek meghatározásánál a „Standard Curve” módszer szerint jártunk el. Ehhez a különböző napszakokból származó, de összességében egy teljes napot lefedő növényi

mintahalmaz cDNS mintáiból egy keveréket képeztünk, melyet 1, 10, 100 és 1000x-es térfogatra hígítottunk. Ezekben a standard mintákban az egyes gén-specifikus primerek alkalmazásával képesek voltunk meghatározni az adott amplifikációs küszöbértékhez tartozó ciklusszámot. A kapott értékekre egyenest illesztettünk, amelynek definiáltuk a segédváltozóit. Az ismeretlen minták mRNS szintjeit e hitelesítő egyenes alapján állapítottuk meg. A kapott értékeket (melyek mérését háromszor végeztük el) ezután a minták *TUB2/3* mRNS szintjével normalizáltuk. A sokszorozáshoz használt primereket 0,3 μ M töménységben alkalmaztuk, szekvenciáik listáját az 1. melléklet tartalmazza. A PCR az alábbi paraméterekkel zajlott le: 94 °C 2,5 perc, 40X (95 °C 15 mp, 60 °C 1 perc).

Minden kísérletben ugyanazt a standard cDNS sort használtuk, ennél fogva a különböző ábrákon az expressziós szintek összemérhetőek egymással.

3.3.6. Növényi összfehérje tisztítás

100-150 mg növényi mintát folyékony nitrogénnel lefagyasztottunk és 2 ml-es Eppendorf csőben porrá őröltünk. Az elporított mintára 200-300 μ l 95 °C-ra előmelegített feltáró puffert mértünk (4M urea, 5% (w/v) SDS, 5% (w/v) β -merkaptoetanol, 16,67% glicerin). A minta és a puffer homogén állagra keverése után a csöveket 95 °C-os termosztátban inkubáltuk 3 percig, majd centrifugálással (20 perc, 22 °C, 13000g) elkülönítettük a törmeléket, s a felülúszót új csövekbe mértük át. A minták azonnal alkalmazhatók voltak poliakrilamid gélen történő futtatáshoz.

3.3.7. Fehérjeszint meghatározás Western blottal

Mintánként 20 μ g összfehérjét futtattunk meg 7%-os SDS-poliakrilamid gélen Tris/glicin/SDS futtató pufferben. A kifuttatott gélből 2x15 percig transzfer pufferrel (12 mM Tris-HCl pH=8,3, 96 mM glicin, 20% (w/v) metanol) öblítettük ki az SDS és urea maradványokat. A gélből az elválasztott fehérjéket elektroblot készülékkel (BioRad, 80V, 3h) Immobilon-P polivinilidén-difluorid műanyag membránra vittük át (Millipore). Ezután a lapot TBST pufferrel (20 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl, 0,05% (w/v) Tween20) öblítettük át. A szabadon maradt kötőhelyeket 4 °C-on semlegesítettük éjszakán át blokkoló pufferrel (5% (w/v) sovány tejpor, 1% (w/v) TBST pufferben feloldva). Ezt követően a membránt GFP elleni elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (Clontech, Living Colors A.v. Monoclonal Antibody JL-8, 2000x-es hígításban), melyet blokkoló pufferben feloldva, 1,5 órán keresztül hagytunk a

membránon. Ezután 3x5 percig TBST pufferes mosással távolítottuk el a felesleges ellenanyag maradványokat. Végül blokkoló pufferben 5000x-esre hígított, torma peroxidáz kapcsolt egér-IgG elleni másodlagos ellenanyagot adtunk a membránhoz és 1 órán át inkubáltuk, majd újabb TBST pufferes mosás következett 3x15 percen át. A felesleges folyadék leitatása után a membránt pár másodpercig Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate Peroxidáz és Luminol reagensének 1:1 arányú oldatában áztattuk, s CCD kamerával detektáltuk a kemilumineszcens jeleket.

3.3.8. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

A kettős szálú próbákat komplementer oligonukleotidok (IDT) hibridizálásával állítottuk elő a megfelelő pufferben (10 mM Tris-HCl (pH= 7,5), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl). Az eljárásban azonos mennyiségű komplementer oligót kevertünk össze 40 µM végkoncentrációban, azt blokkmelegítőben 95 °C -on 5 percen át hevítettük, majd éjszakán át hűlni hagytuk szobahőmérsékletre. A forward oligonukleotidok 5' végét biotinnal jelöltük (IDT). Az N-terminálison 6xHis-jelölt HY5 fehérjét BL21 *E.coli* törzsben termeltettük, s azt Ni-NTA agaróz mátrixon (Qiagen) tisztítottuk a gyártó által megadott protokollt követve (Qiagen, QIAexpressionist). A kötési reakcióelegy 40 fmol próbát és 100 ng tisztított HY5 fehérjét tartalmazott 20 µl végtérfogatban, az alábbi összetételű pufferben: 10mM Tris-HCl (pH= 7,5), 85 mM KCl, 5% (v/v) glicerol, 0,1 µg/µl poly (dI•dC). A reakcióelegyet 20 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 4%-os poliakrilamid gélekre vittük fel. A géleket 0,5x TBE pufferben futtattuk 70 percen át, majd az elválasztott fehérjéket HyBond-N + (Amersham) nylon membránra vittük át. A biotinnal jelölt fragmentumok detektálására a kemilumineszcens nukleinsavdetektáló modult (Thermo Scientific) használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően. A kemilumineszcens jeleket a Western-blot leírással megegyező módon végeztük el.

3.3.9. Alkalmazott szoftverek és weboldalak

A disszertáció „Irodalmi áttekintés” című fejezetében szereplő illusztrációkat a www.biorender.com oldalon található programmal készítettem el. A 4. mellékletben található génlisták összevont génontológiai analízisét a www.pantherdb.org oldalon

fellelhető PANTHER13 program segítségével végeztük el. Az *in vivo* lumineszcencia mérésből származó eredményeket Microsoft Excel TopTemp makróval dolgoztuk fel.

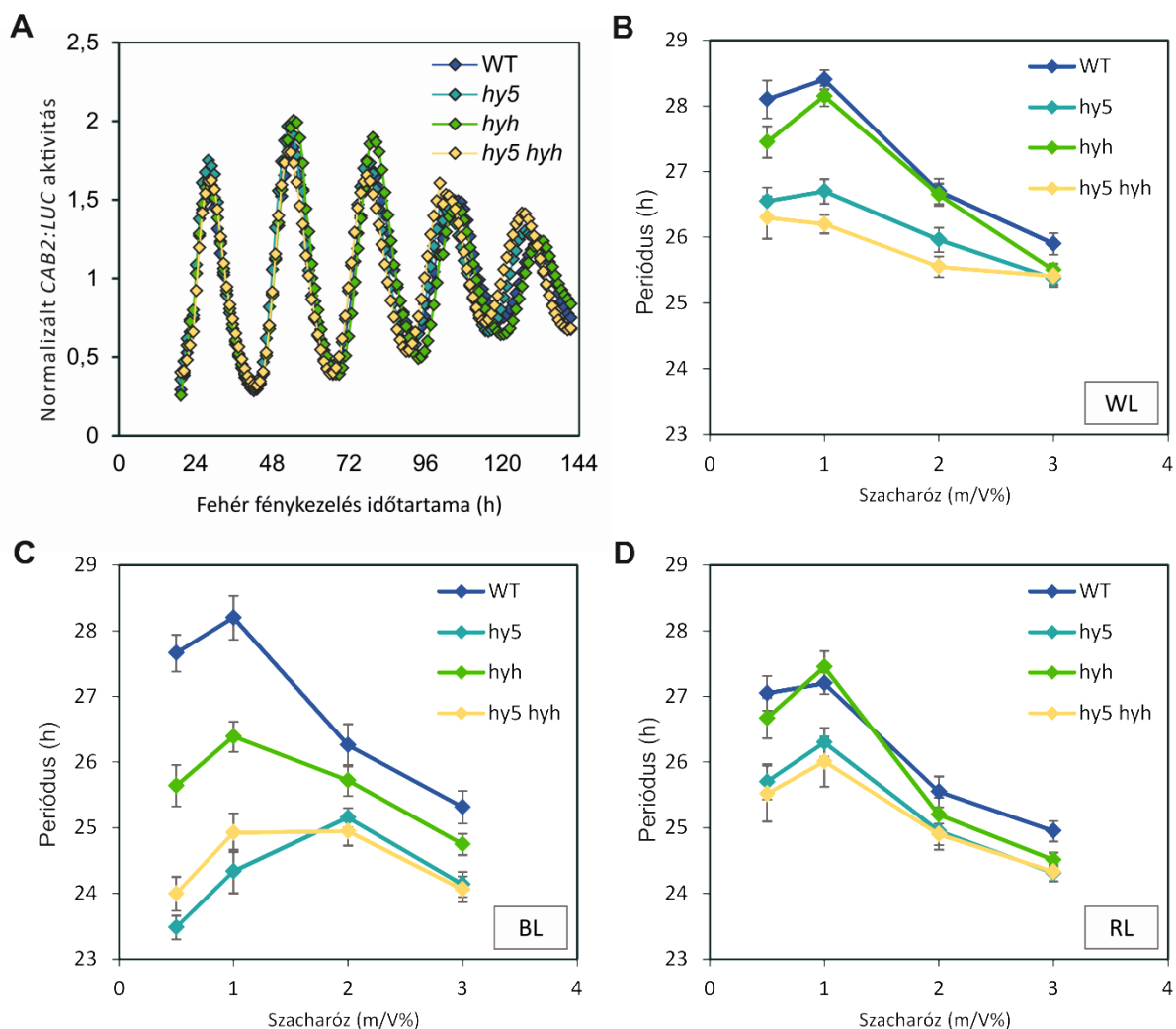
4.Eredmények

4.1. A HY5 és HYH fény- és cukorfüggő módon képes szabályozni az óra ritmusát

A munkánkat megelőző kísérletek során a *hy5* mutáns és vad típusú vonalak periódusának meghatározásakor a növényeket folyamatos fehér fénykezelésnek vetették alá a konstans környezeti körülmények megteremtése érdekében. Mint tudjuk, a fehér fény többféle hullámhosszú fény keverékeként számos növényi receptort és jelátviteli folyamatot is képes aktiválni. A HY5 mindezen jelátviteli utak szabályozásában egyidejűleg részt vesz [44], képes azok információit integrálni, s ennek megfelelően hangolni a növényi válaszreakciókat a fehér fénykezelésre. Mindemellett a különböző tanulmányok során használt növényi táptalajok cukortartalma sem volt azonos mértékű, márpedig a növények szacharóz ellátottságát jelző szignálok zeitgeberként szolgálhatnak a cirkadián óra felé.

Mindezen ismereteink alapján azt feltételeztük, hogy a *hy5* és *hyh* mutánsok periódusával foglalkozó kísérletekben az alkalmazott fehér fény hullámhossz-összetételének, valamint a növényi táptalaj szacharóz-tartalmának különbségei miatt mutathattak lényeges eltéréseket a kapott eredmények. Ennek bizonyításához – az óra kimeneti elemeként ritmikusan termelődő - *CAB2:LUC* (*CHROLOPHILL A/B- BINDING PROTEIN 2*) riportergén-konstrukciót hordozó növényeket kereszteztük *hy5 ks-50* (*hy5*) és *hyh-1* (*hyh*), valamint *hy5 ks-50 hyh-1* (*hy5hyh*) genetikai háttérű növényekkel. Ezek cirkadián ritmusát *in vivo* luciferáz imaging technikával követtük. A kísérleti elrendezést oly módon árnyaltuk, hogy

- az egy hétig tartó 12h fény/12h sötét ciklusokkal történő külső óra-szinkronizálás után a kísérlet szabadon futó fázisában a növények periódusát a korábban alkalmazott fehér fénykezelés mellett monokromatikus kék (BL), vörös (RL), és távoli vörös (FRL) fényben is megmértük,
- valamint a kísérletet különböző (0,5, 1, 2 és 3%-os) szacharóz-koncentrációjú médiumon nevelt növényekkel is elvégeztük. Fontos megjegyezni, hogy luciferáz enzim csak a növény megfelelő mértékű cukor-ellátottsága esetén képes funkcionálni, ezért kísérletsorozatunkban nem alkalmaztunk szacharózmentes médiumot.



4. ábra. A *hy5* és *hyh* mutánsok fény- és cukorfüggő periódust mutatnak.

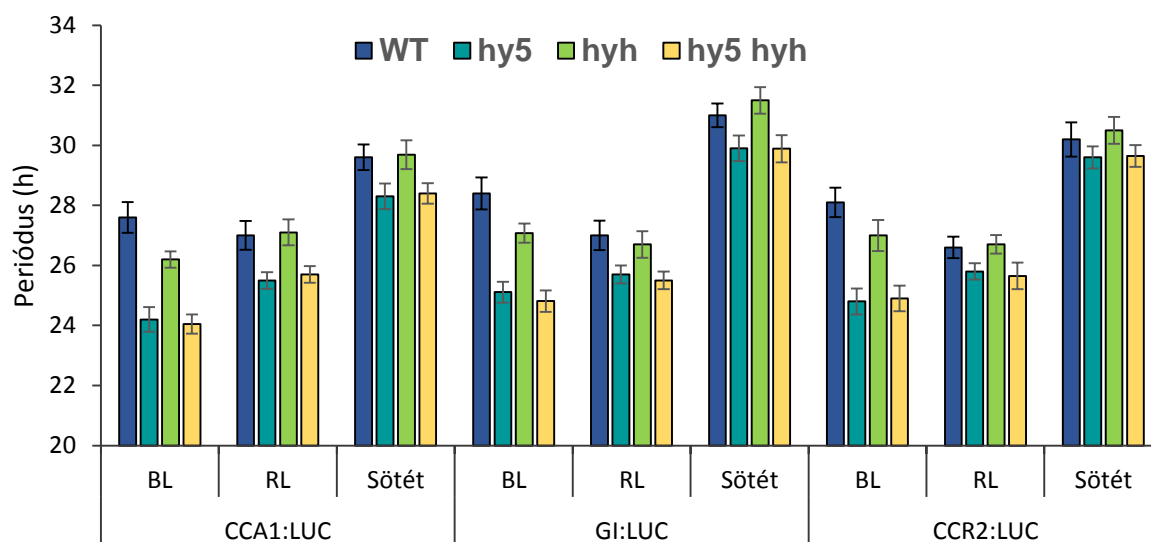
(A) Vad típusú Wassilewskija (WT), *hy5*, *hyh* és *hy5 hyh* növények *CAB2:LUC* expressziós értékei. A növényeket 12 h fehér fény / 12 h sötét ciklusokból álló hosszúnappalos (12:12 LD) körülmények között növesztettük 2% szacharózt tartalmazó médiumon egy héten keresztül, majd $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényerősségű folyamatos fehér fénykezelésnek vetettük alá lumineszcenciájuk monitorozásához.

(B, C,D) A növények szabadon futó periódusát a folyamatos fénykezelés során mért *CAB2:LUC* ritmusok alapján becsültük meg. A fénykezelésekhez $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű (B) fehér fényt, (C) kék fényt, vagy (D) vörös fényt használtunk. A hibasávok 24 egyedi növény adatainak átlagából számolt standard hibát jelzik.

A 4A ábrán látható, hogy a *CAB2:LUC* marker ritmikusan fejeződik ki az egyes genetikai hátterekben. Folyamatos fehér fénnel történő megvilágítás esetén (4B ábra) láthatjuk, hogy a vad típusú növény és a *hyh* szimpla mutáns periódusértékei nem különböznek szignifikánsan egymástól. A *hy5* szimpla és *hy5 hyh* dupla mutáns esetében a periódus megközelítőleg egy órával lecsökkent a vad típushoz képest, mi több, a különbség a médium

szacharóz tartalmának csökkentésével egyre fokozódott. A kísérletet megismételtük a fehér fénnel megegyező fényerősségen ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kék és vörös fényben (4C és 4D ábra), valamint $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényerősségen távoli vörös fényben is (2. melléklet). Kék fénykezelés hatására a *hy5* és *hy5 hyh* vonalak még hangsúlyosabb periódus csökkenést adtak, mint fehér fénykezeléskor, továbbá ilyen körülmények között már a *hyh* periódusa is rövidebb lett a vad típuséhoz képest (4C ábra). A vörös fénykezelésben mutatott eltérések ugyan gyengébbek, de hasonlítanak a fehér fénykezelésben tapasztaltakra: a *hy5* és *hy5hyh* mutánsok periódusa kismértékben megrövidült, ám a *hyh* a vad típussal megegyező értékeket adott (4D ábra). Ismert jelenség, hogy a távoli-vörös fény egy eddig fel nem térképezett mechanizmuson keresztül zavarja az óraelemek expresszióját [58]: hatására az óragének, valamint az óra által ritmikusan szabályozott kimeneti elemek, így a *CAB2:LUC* expresszió-amplitudója is oly mértékben lecsökkent, hogy a különböző növényi vonalak periódusát lehetetlenné vált megbecsülni, s érdemben összehasonlítani (2. melléklet).

A HY5 és HYH különböző óragének ritmikus expressziójára gyakorolt hatásának megállapításához *CCA1:LUC*, *GI:LUC* vagy *CCR2:LUC* (*CIRCADIAN-REGULATED2*) riportergéneket alkalmaztunk a megfelelő mutáns hátterekbe keresztezve (a *CCR2* ugyan nem óragén, hanem kimeneti elem, azonban ritmusa kiválóan nyomonkövethető sötét körülményben tartott növényeknél is). Ezen vonalakat az előző bekezdésben taglalt kísérleti elrendezéssel azonos kezeléseknek vetettük alá.



5. ábra: A *hy5* és *hyh* mutánsok fényfüggő rövid periódust mutatnak.

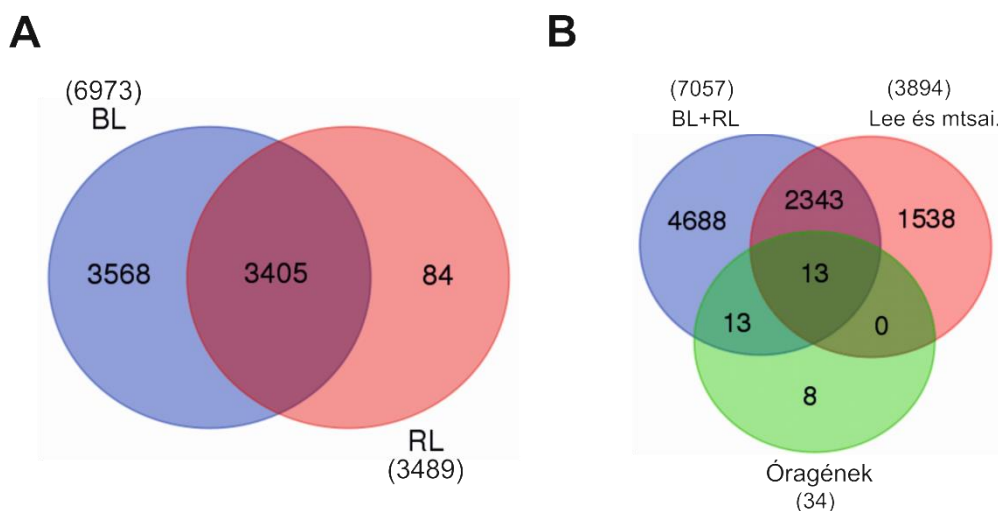
A *CCA1:LUC*, *GI:LUC* vagy *CCR2:LUC* riportergént kifejező növényeket 12:12 órás hosszúnappalos körülményben

neveltük egy hétig, majd folyamatos kék fénybe (BL), vörös fénybe (RL), vagy sötétbe helyeztük őket. A szabadon futó periódusokat a hat napon át tartó lumineszcencia ritmusokból becsültük meg. A hibasávokat 24 növény értékeinek standard hibájából állapítottuk meg.

A *CCA1:LUC*, *GI:LUC* és *CCR2:LUC* növények a *CAB2:LUC*-hoz hasonlóan rövid periódust adtak (5. ábra). A kék és vörös fényben tapasztalt *hy5* és *hy5 hyh* perióduscsökkenés szintén megmutatkozott. A *hyh* háttérű riportervonalak periódusa csak kis mértékben, és kizárólag kék fényben csökkent. Sötétben csupán a *hy5* és *hy5 hyh* mutánsokban történt érzékelhető mértékű perióduscsökkenés. A távoli vörös fényben – a *CAB2:LUC* reporterhez hasonlóan – alkalmatlanok voltak a *LUC* aktivitások ritmusai a megfelelő nyomonkövetésre. Mindezen adatok alapján elmondhatjuk, hogy a HY5 és HYH valóban részét képezik a cirkadián óra fény-bemeneti útjának, s leginkább kék fényben, alacsony cukorkoncentráción képesek az órára hatást gyakorolni.

4.2. A HY5 kékfény-specifikusan a legtöbb óragén és óra-asszociált gén promoteréhez kötődik

Terveink között szerepelt annak felderítése, hogy a HY5 kék és vörös fényben milyen óragénekhez képes kötődni. E kérdés megválaszolásához ChIP-seq (kromatin immunoprecipitációt követő újgenerációs szekvenálás) technikát alkalmaztunk olyan *hy5* növényeken, melyek natív HY5: promoterrel ellátott HY5-YFP fúziós proteint expresszálnak. A 12:12 órás fény-sötét ciklusokon nevelt növényi egyedeket 52 órára folyamatos kék vagy vörös fénykezelésnek vetettük alá, majd GFP-ellenanyaggal kicsaptuk kromatinállományukat. DNS-tisztítás és szekvenálás után az azonosított fragmentumokat az Arabidopsis genomra illesztettük, de csak azokat tartottuk meg, amelyek fehérjekódoló gének 5' szabályozó régiójába térképeződtek. Ugyanezt az eljárást elvégeztük kék fényben szedett mintákon úgy is, hogy a kromatin kicsapáshoz nem használtunk GFP ellenanyagot. Az így létrejött kontroll minta mutatta meg a módszer "háttérzaját", vagyis azokat a genomi fragmentumokat, amelyek nem a HY5-kötés miatt, hanem aspecifikus interakciók miatt jelentek meg a tisztított DNS frakcióban. A HY5 kötését olyan fragmentumok esetében nyilvánítottuk szignifikánsnak, amelyek legalább 4-szeres dúsulást mutattak a GFP ellenanyaggal kicsapott mintákban a kontrol mintához viszonyítva.



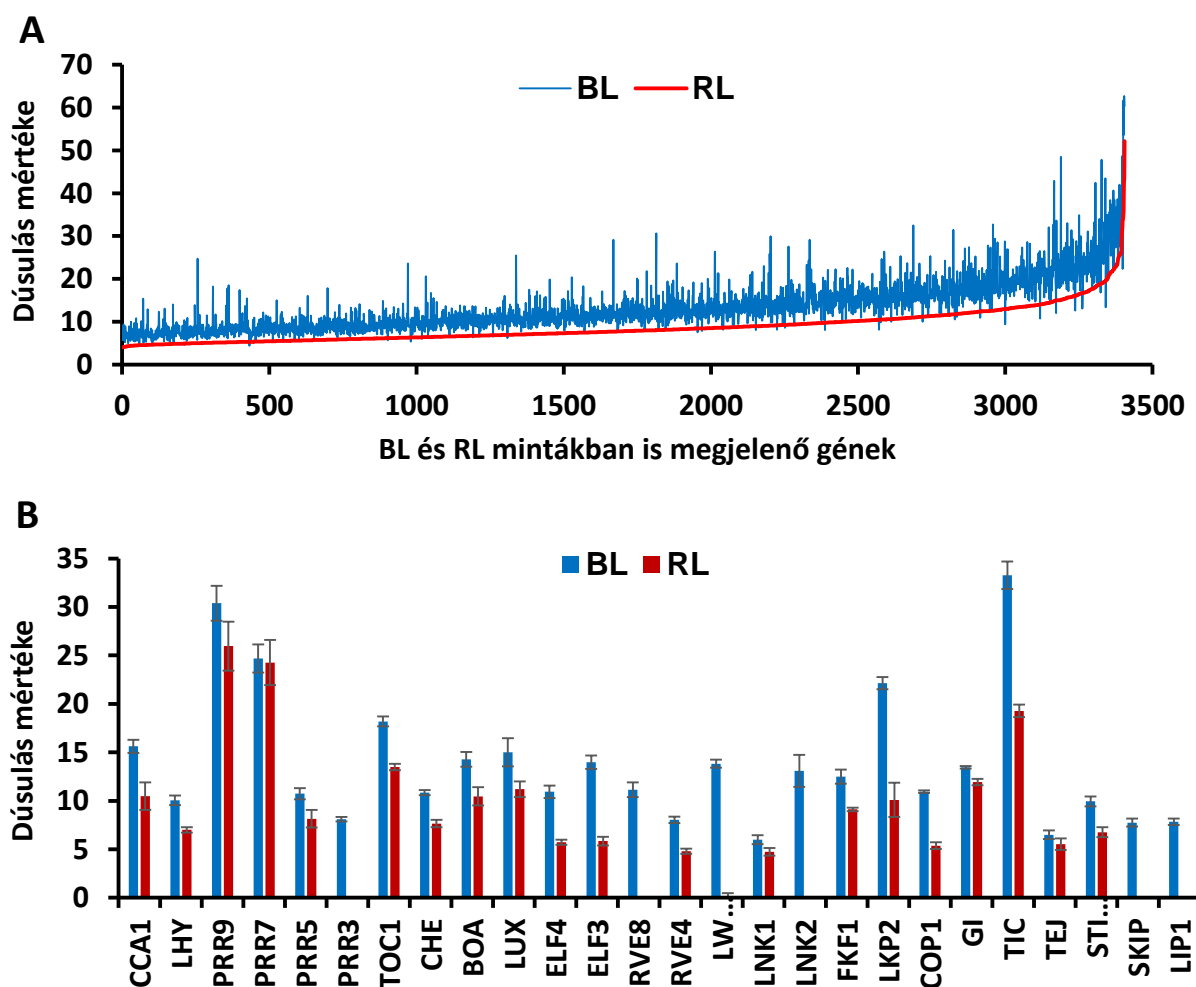
6. ábra. A HY5 fényminőség-függő kromatin asszociációja I.

A *HY5:HY5-YFP* konstrukciót hordozó *hy5* mutáns növényeket 12:12 órás hosszúnappalos körülmények között neveltük 7 napon át, majd folyamatos kék (BL) vagy vörös (RL) fénykezelésnek vetettük alá őket. A mintákat 52 órával később begyűjtöttük. A keresztkötött és szonikálással darabokra tört kromatinállományt α -GFP antitesttel kicsaptuk. A minták DNS-ét megtisztítottuk és újgenerációs szekvenálásnak vetettük alá. A HY5-kötő promotereket/géneket a szövegben leírtak alapján azonosítottuk. A dúsulás mértékét az antitest-specifikus kicsapást nélkülöző (kontroll) minták dúsulási értékeivel normalizáltuk.

(A) A BL+RL körülményekben feldúsult gének száma. (B) A BL+RL körülményekben feldúsult gének száma, összehasonlításban a Lee és mtsai (2007) által közölt HY5-kötő gének listájával, valamint Hsu és Harmer (2014) óra- és óra-asszociált génjeinek listájával.

Hozzávetőlegesen 7000, a HY5 feltételezet célpontjának tartott gént sikerült azonosítanunk a kék fényvel kezelt mintákból, valamint 3500-at a vörös fényvel kezelt mintákból (6A ábra). Figyelemreméltó eredmény, hogy a vörös fényen nőtt minták adatsorában található gének csaknem mindegyike a kék fényen nőtt minták adatsorában is megtalálható. A két adatsor együttese a különböző kísérleti elrendezések és módszerek ellenére is jelentős átfedést mutat a Lee és mtsai által jegyzett, HY5-kötésre képes gének listájával [43] (6B ábra). Ezzel összhangban a két tanulmányban szereplő génontológiai kategóriák (különböző gének funkciói szerint történő csoportosítása, rövidítve: GO) eloszlási mintázatai is nagyban hasonlítanak (3. melléklet). A GO analízis alapján a cirkadián ritmus kialakításában szerepet játszó gének felülreprezentáltak a BL+RL együttes génlistában, mint ahogy azon gének is, melyekkel kapcsolatban a HY5-nak már jól körülhatárolt szerepe van (pl.: ozmotikus/sóstressz jelátvitel génjei) (4. melléklet). Emellett a 6B ábra adatai arra engednek

következtetni, hogy az óragének és óra-asszociált gének nagy többségének –melyből 13 szerepel Lee és mtsai 2007-es adatsorában – szabályozásában a HY5 is részt vehet. Ezen adatok alapján valószínűsíthető, hogy a HY5 kötődése a genomi célpontjaihoz erősebb mértéket ölt kék fényben és hogy a HY5 az óragének és óra-asszociált gének döntő többségének működésére hatással lehet *in vivo*.



7. ábra. A HY5 fényfüggő kromatin asszociációja II.

A szükséges kísérleteket a 6. ábránál leírtakkal megegyező módon végeztük el.

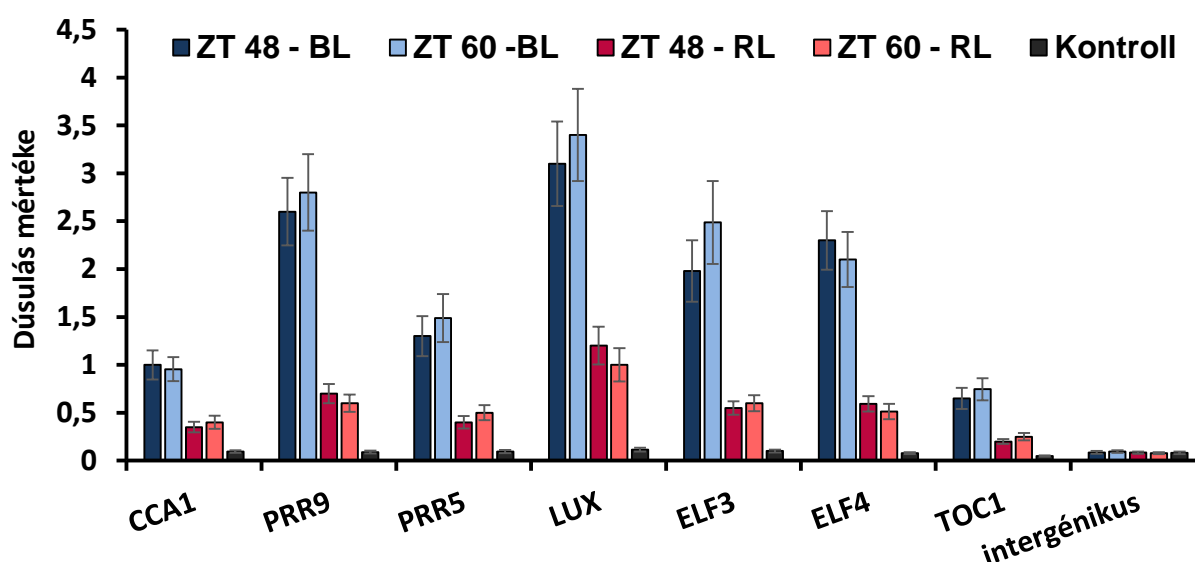
(A) A HY5-kötés erősségének mértékét azon gének esetében vizsgáltuk meg, melyek BL és RL körülmények esetén is HY5-kötést mutattak. Az oszlopok színe a kezeléshez használt fényével megegyezik. A gének RL-ben történő HY5-kötésük erőssége szerint növekvő sorrendben szerepelnek az X tengelyen.

(B) A Hsu és Harmer (2014) által összegyűjtött óra- és óraasszociált gének HY5-kötésének erőssége oszlopdiagramként ábrázolva. A gének sorrendjének nincs jelentősége. A hibasávok három független ismétlés standard hibáiból kerültek kiszámításra.

Hogy az erősebb jellegű HY5-kötést kvantitatívabb adatokkal is alá tudjuk támasztani, megmértük a feldúsulási értékeket a HY5-asszociált gének összességénél (7A ábra), illetve pusztán a HY5-kötő óragéneket figyelembe véve (7B ábra). Ezt az értékelést mind a kék, mind a vörös fénykezelés adatsoron elvégeztük.

Az 5. melléklet azt mutatja, hogy a gyenge HY5-kötést produkáló gének nem találhatók meg a vörös fényvel kezelt minták eredményeiben, míg az erős HY5-kötéssel operáló gének rendszerint kötést mutatnak azzal vörös fényben is. Összességében a kék és vörös fénykezelés génlistájában inkább egy mennyiségi, mintsem minőségi különbség jelenik meg. Másként fogalmazva, míg a kötés-specifitást valószínűleg nem befolyásolja a fény minősége, addig a vörös fénykezeléshez képest kék fényben egy erősebb kötés tapasztalható a HY5 és célgénjei promotere között.

Hogy a HY5-kötés fényfüggését és potenciális idő-függését tovább tesztelhessük, *HY5:HY5-YFP* növényekről gyűjtöttünk mintát, melyek (a megfelelő óra-beállítás után) 48-60 órája voltak folyamatos kék vagy vörös fénykezelésnek kitéve. A ZT48-as és ZT60-as időpontoknál figyelhetők meg a reggeli/esti gének expressziós csúcsai, így ezek a cirkadián görbe minimumjainak és maximumjainak is tekinthetők adott óragének esetében. A mintákon a ChIP-seq segítségével azonosított *CCA1*, *PRR9*, *PRR5*, *LUX*, *ELF3*, *ELF4* és *TOC1* genomi régiókat vizsgáltuk qPCR-el az adott DNS-mintákon.



8. ábra. A fény minősége modulálja a HY5 kötődését az óragének promoter-régiójához. A *HY5:HY5-YFP* konstrukciót hordozó *hy5* mutáns növényeket 12:12 órás hosszúnappallos körülmények között

neveltük 7 napon át, majd folyamatos kék (BL) vagy vörös (RL) fénykezelésnek vetettük alá őket, ennek kezdő időpontját ZT0-nak neveztük el. A mintákat a ZT48-as, illetve ZT60-as órában gyűjtöttük be. A keresztkötött és szonikálással darabokra tört kromatinállományt α -GFP antitesttel kicsaptuk. A kontroll minta olyan BL ZT60-as mintából származik, melynél a ChIP során nem végeztünk antitest-specifikus kicsapást. A minták DNS-ét megtisztítottuk és qPCR assay-ben templátként használtuk. A primerek segítségével 100-140 bp hosszúságú fragmenteket amplifikáltunk a CCA1, PRR9, PRR5, LUX, ELF3, ELF4 és GI promoter-régiók detektálásához. Az *At4g26900*-as és *At4g26910*-as gének közötti régióra tervezett primerpárra "intergénikus" néven hivatkoztunk. A dúsulás mértékét az antitest-specifikus kicsapást nélkülöző minták dúsulási értékeivel normalizáltuk. Minden kísérletet 3 független ismétlésben elvégeztünk, hasonló eredményekkel. A hibasávok a három ismétlés standard hibájából lettek kiszámolva.

A 8. ábra alapján elmondhatjuk, hogy az összes vizsgált promoternél emelkedett HY5-mennyiség volt mérhető kék fényben a vörös fénykezeléshez képest, mely alátámasztja a ChIP-seq eredményeit. Fontos azonban megjegyezni, hogy a HY5 jelenléte azonos mértékű volt a ZT48-as és ZT60-as mintákban is az egyes lókuszoknál, tehát a HY5-kötődést az óra nem befolyásolja, illetve az óragének kifejeződésének ritmikus jellegét a HY5 kötődése nem modulálja.

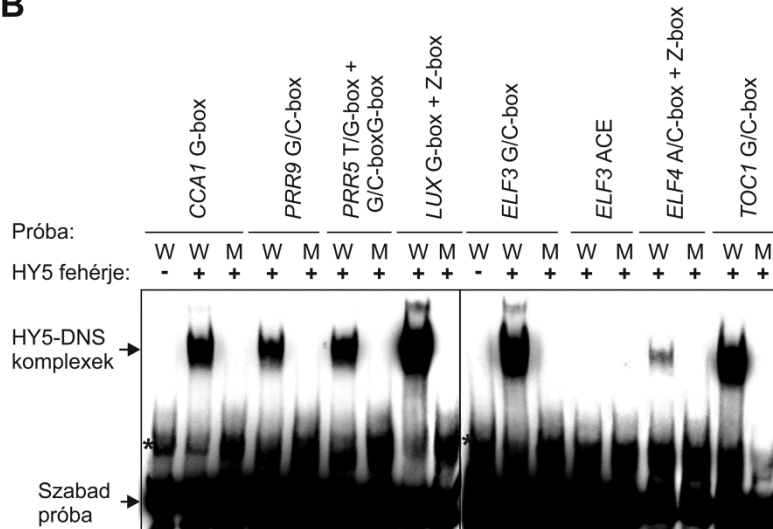
4.3. A HY5 képes az óragének promotereinek konzervált, cisz-ható elemeihez kötni *in vitro*

A HY5 génexpressziós szabályzása során fehérje-DNS komplexek alakulnak ki, amelyben a HY5 mellett legtöbbször ACGT szekvenciát tartalmazó (ACE) cisz-elemek vesznek részt. A 9A ábrában olyan ACE motívum-variánsokat gyűjtöttünk össze, melyeket a CCA1, PRR9, PRR5, LUX, ELF3, ELF4 és TOC1 gének proximális promoter-régiójában azonosítottunk.

A

cisz-elem		vad típusú szekvencia		mutáns változatok
<i>CCA1</i> G-box	-276	gaC ACGT Gtc	-267	gaA CATG Ttc
<i>PRR9</i> G/C-box	-125	gcC ACGT Cag	-116	gcA CATG Aag
<i>PRR5</i> T/G-box	*-321	caA ACGT Ggc	-312	caC CATG Tgc
<i>PRR5</i> G/C-box	*-313	gcC ACGT Cag	-304	gcA CATG Aag
<i>LUX</i> G-box	-223	tcC ACGT Ggc	-214	tcA CATG Tgc
<i>LUX</i> Z-box	-208	ctT ACGT Gcc	-199	ctG CATG Tcc
<i>ELF3</i> G/C-box	-87	tcC ACGT Cgt	-78	tcA CATG Agt
<i>ELF3</i> ACE	-178	ttt ACGT atc	-169	ttt CATG atc
<i>ELF4</i> A/C-box	-165	gaT ACGT Cta	-156	gaG CATG Agc
<i>ELF4</i> Z-box	-159	tcT ACGT Gag	-150	gaG CATG Tag
<i>TOC1</i> G/C-box	-161	tcC ACGT Cat	-152	tcA CATG Aat

B



9. ábra: A HY5 *in vitro* kötődése az óragének promoterében levő ACE-elemekhez.

(A) Az ACE-elemek szekvenciája és pozíciója a *CCA1*, *PRR9*, *PRR5*, *LUX*, *ELF3*, *ELF4* és *TOC1* gének promoterében. A pozíciókat az adott gén transzkripció-iniciációs pontjához viszonyítva adtuk meg, kivéve a *PRR5* esetében (*), ahol a transláció kezdőpontjához viszonyítva adtuk meg a pozíciót. A cisz-elemeket nagybetűkkel, az ACE-motívumokat félkövér betűkkel jelöltük. Fontos megjegyzés, hogy listánk nem tartalmazza a felsorolt óragének promoterében fellelhető összes ACE-elemet, csupán azokat, melyek a ChIP-seq eredmények által kijelölt HY5 által kötött genomi szakaszra esnek.

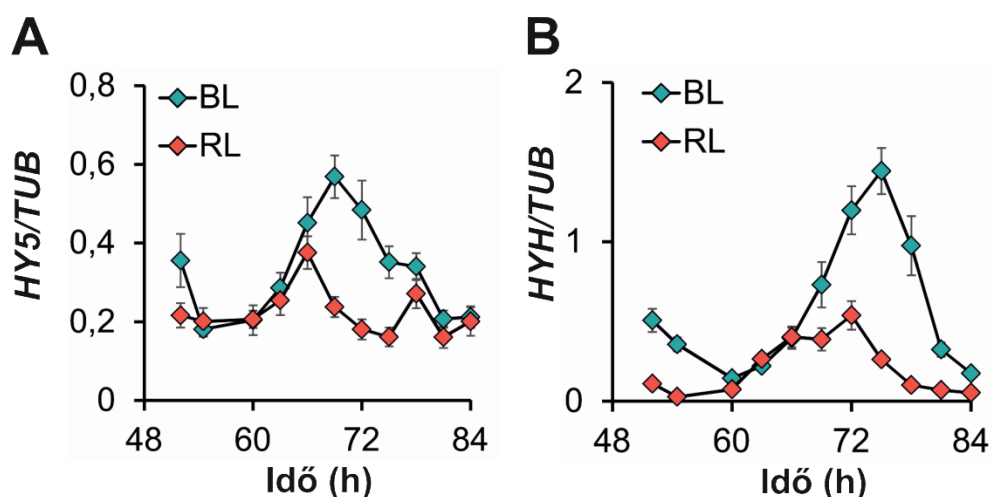
(B) Biotinnal jelölt kétszálú próbákat (40 fmol) inkubáltunk termeltetett és tisztított HY5 fehérjével (400 ng). A kötések létrejötte után a mintákat 6%-os natív poliakrilaid géltre vittük fel. Az 56 nukleotid hosszú, vad-típusú vagy mutáns szekvenciaváltozatot hordozó próbák teljes szekvenciáját az 1. melléklet tartalmazza. A keletkezett HY5-DNS komplexek, valamint a HY5 fehérjét nem kötött szabad próbák sávjait a megfelelő helyen jelöltük az ábrán. A csillagok nonspecifikus sávokat jeleznek; e sávok a HY5 jelenlététől függetlenül is megjelennek az előhíváskor. W= vad-típusú ACE-elemet tartalmazó próba. M= mutáns változatú ACE-elemet tartalmazó próba. A HY5 fehérje hozzáadását/mellőzését a reakcióelegyből + és – jelekkel illettük. Az (A) panelben szögletes szegéllyel körülvett elemek szekvenciái egyazon próbán szerepeltek. A kísérletet háromszor végeztük el, lényegében azonos eredményekkel, így azok reprezentatív adatoknak tekinthetők.

A HY5 kötődését az *ELF4* ACE-elemeihez már bizonyították [59], de szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a HY5 a többi felderített elemhez is képes-e kötődni. E kérdés megválaszolásához EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) technikát alkalmaztunk. A kísérletben minden próba egy adott promoter *cisz*-elemének vad típusú (W) vagy mutáns (M) változatát hordozta (9A ábra és 1. melléklet). A *PRR5*, *LUX* és *ELF4* próbák két, egymáshoz közel levő elemet is tartalmaztak. Az EMSA kísérletben baktériumban expresszált HY5 az *ELF3* ACE-elemétől eltekintve mindegyik vad-típusú próbához sikerrel kötődött, mely arra utal, hogy az ACGT mag szekvencia előtt vagy után C vagy G nukleotidnak kell szerepelnie a sikeres kötéshez (9B ábra). A mutáns ACE-próbákkal nem történt komplexképzés, vagyis a kötődés valóban ezen motívumokon keresztül jött létre. Mindezen adatok alapján kijelenthetjük, hogy a HY5 szinte az összes óragén promoterének *cisz*-eleméhez képes közvetlenül kötődni *in vitro*.

4.4. A HY5 és HYH szintje kék fényben megemelkedik

A kék és vörös fénykezelésben mért eltérő mértékű HY5-asszociációra magyarázat lehet, hogy kék fényben a HY5 és HYH fehérjék magasabb szinten fejeződnek ki.

A *HY5* és *HYH* mRNS-ek mennyiségét olyan vad típusú növények mintáiban mértük, melyek egy hét napig tartó 12:12 LD ciklus után folyamatos kék vagy vörös fénykezelést kaptak, utóbbi kezelés hosszát a minta nevében rögzítettük (10A és 10B ábra). Mindkét gén mRNS-görbéje tiszta ritmust és jelentősen nagyobb amplitudót mutatott kék fényben a vörös fénykezeléshez képest (10A és 10B ábra). A *HYH* mRNS-szintjére kiváltképp pozitív hatást gyakorolt a kék fénykezelés.

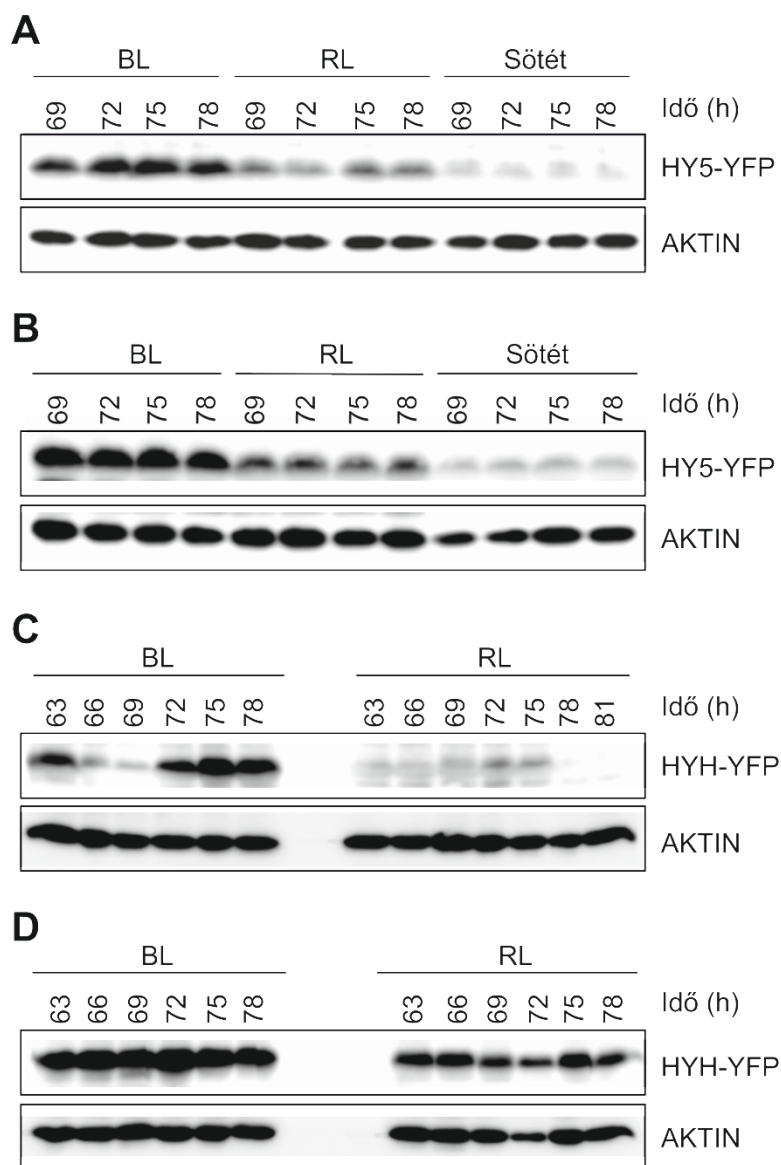


10. ábra. A *HY5* és *HYH* transzkripció rátája kék fényben megemelkedik.

Vad típusú (WT) növényeket neveltünk 12:12 órás fény/sötét ciklusokon 7 napon keresztül, majd azokat $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású kék (BL) vagy vörös (RL) fény alá helyeztük át. A mintákat a jelzett időpontokban gyűjtöttük be. A *HY5* (A) és *HYH* (B) mRNS szinteket qPCR segítségével állapítottuk meg, s azokat a hozzájuk tartozó *TUBULIN* (*TUB*) mRNS szintekkel normáltuk. A hibásávok a kísérlet három független ismétlésének standard hibájából lettek megállapítva.

Hogy a *HY5* és *HYH* termelődést fehérje-szinten is nyomon követhessük, YFP fluoreszcens toldalékkal ellátva termeltettük őket natív (*HY5:HY5-YFP*, *HYH:HYH-YFP*), vagy konstitutív 35S promotor segítségével (*35S:HY5-YFP*, *35S:HYH-YFP*) a megfelelő *hy5* vagy *hyh* mutáns háttérű növényekben. Ilyen kísérleti elrendezésekkor mindenféleképpen ellenőrizni kell, hogy a toldalékkal ellátott fehérje a vad típusú fehérjével összehasonlításban azonos vagy közel megegyező mértékben termelődik és funkcionál. Ezen kísérleteket komplementációs teszteknek nevezzük. A fehérje termelődés mennyiségi összehasonlításánál először Western blot segítségével olyan független transzgenikus vonalakat választunk ki, melyeknél a *HY5* és *HYH* fehérjeszintje hasonló a vad típus szintjeihez. Második körben meg kell vizsgálni, hogy a bennük termelődő *HY5* és *HYH* képesek-e a YFP toldalékuk ellenére szabályozó szerepüket - pl.: a hipokotil megnyúlás szabályozásában - ellátni. Az 6. melléklet azt mutatja, hogy sikerrel tudtunk olyan natív promoterrel kifejeztetett *HY5* és *HYH* vonalakat előállítani, melyekben a kérdéses fehérjék ugyanolyan mértékben rövidítik meg a hipokotil hosszát fehér fény hatására, mint a vad típusban, vagyis működőképességük érdemben nem változott a toldalék ellenére sem.

A natív promoterrel kifejeztetett HY5-YFP és HYH-YFP fúziós fehérjék könnyen detektálhatók voltak kék fényben (11A és 11C ábra). A HYH-YFP szintje a mért mRNS-szintekkel összhangban oszcillált, azonban a HY5-YFP esetében nem észleltünk ilyen ritmicitást (7. melléklet). Vörös fényben – ellentétben a kék fényben látottakkal – a HY5-YFP szintje sokkal alacsonyabb, a HYH-YFP szintje pedig alig észlelhető volt (11A és 11C ábra). A konstitutív promoterrel hajtott fehérjéknél egyik esetben sem tapasztaltunk oszcillációt a termelődésben, azonban jelentős különbség volt, hogy - a 35S promoter fény-független transzkripció aktivitása ellenére - vörös fényben alacsonyabb mértékű fúziós fehérjeszinteket mértünk a kék fényen nőtt növények mintáihoz képest (11B és 11D ábra). Ezen eredmények alapján a HY5-YFP és HYH-YFP fehérjék jobban felhalmozódnak kék fényben, mint azonos fényerősségű vörös fényben, valószínűleg a pozitívabb transzkripció és poszt-transzkripció szabályzásoknak köszönhetően. Az eddigi eredményeinket alátámasztva azt is kijelenthetjük, hogy a sötét körülményhez képest a vörös fénykezelés jobban elősegíti a HY5 termelődését (11A és 11B ábra).

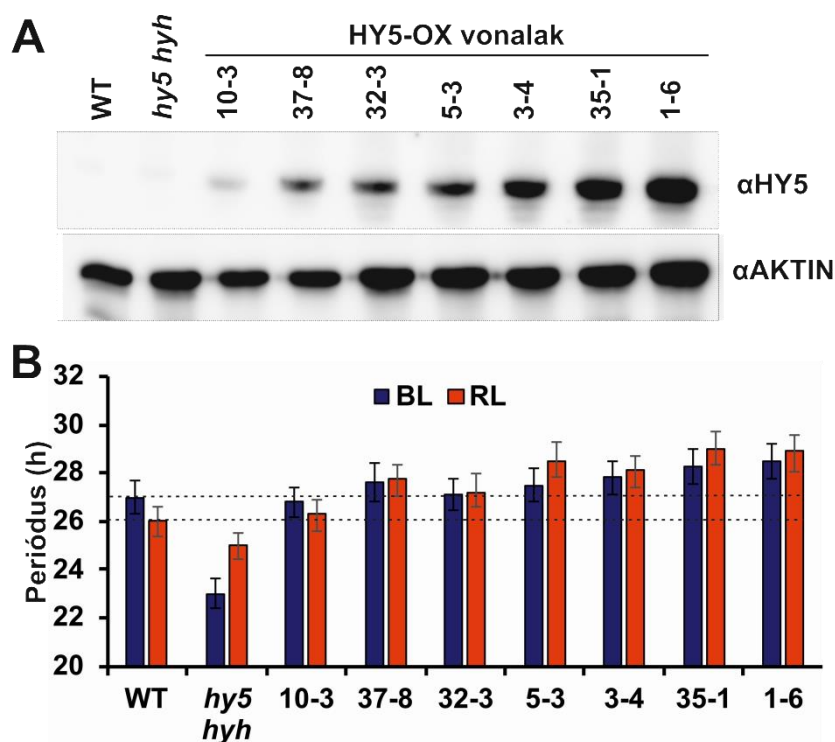


11. ábra. A HY5 és HYH fehérjék felhalmozódását a kék fény jelentősen serkenti

(A)-(B) A *HY5:HY5-YFP* (A) vagy *35S:HY5-YFP* (B) konstrukciót hordozó *hy5* mutáns növényeket 12:12 órás fény-sötét cikluson neveltük 7 napon át, majd áthelyeztük őket 63-78 óra erejéig folyamatos kék/vörös fénybe, vagy sötétbe. A HY5-YFP fúziós fehérjét Western-blottal azonosítottuk α GFP antitest segítségével. A felvitel kontrolljaként a minták AKTIN szintjeit is megvizsgáltuk. Minden kísérletet négyszer ismételtünk meg, két egymástól független transzgenikus vonalat használva.

(E)-(F) A *HYH:HYH-YFP* (A) vagy *35S:HYH-YFP* (B) konstrukciót hordozó *hyh* mutáns növényeket 12:12 órás fény-sötét cikluson neveltük 7 napon át, majd 63-78 óra erejéig folyamatos kék/vörös fényben tartottuk őket. A HYH-YFP fúziós fehérjét Western-blottal azonosítottuk α GFP antitest segítségével. A felvitel kontrolljaként a minták AKTIN szintjeit is megvizsgáltuk. Minden kísérletet háromszor ismételtünk meg, két egymástól független transzgenikus vonalat használva.

Mivel a HY5 és HYH hiánya fényfüggő módon perióduscsökkenést okozott a vad típushoz hasonlítva, érdekesnek találtuk megvizsgálni azt az esetet is, mi történik a cirkadián ritmus periódusával, ha ezen fehérjét túltermeltetjük (12. ábra).



12. ábra. A HY5 túltermeltetése emeli a periódust.

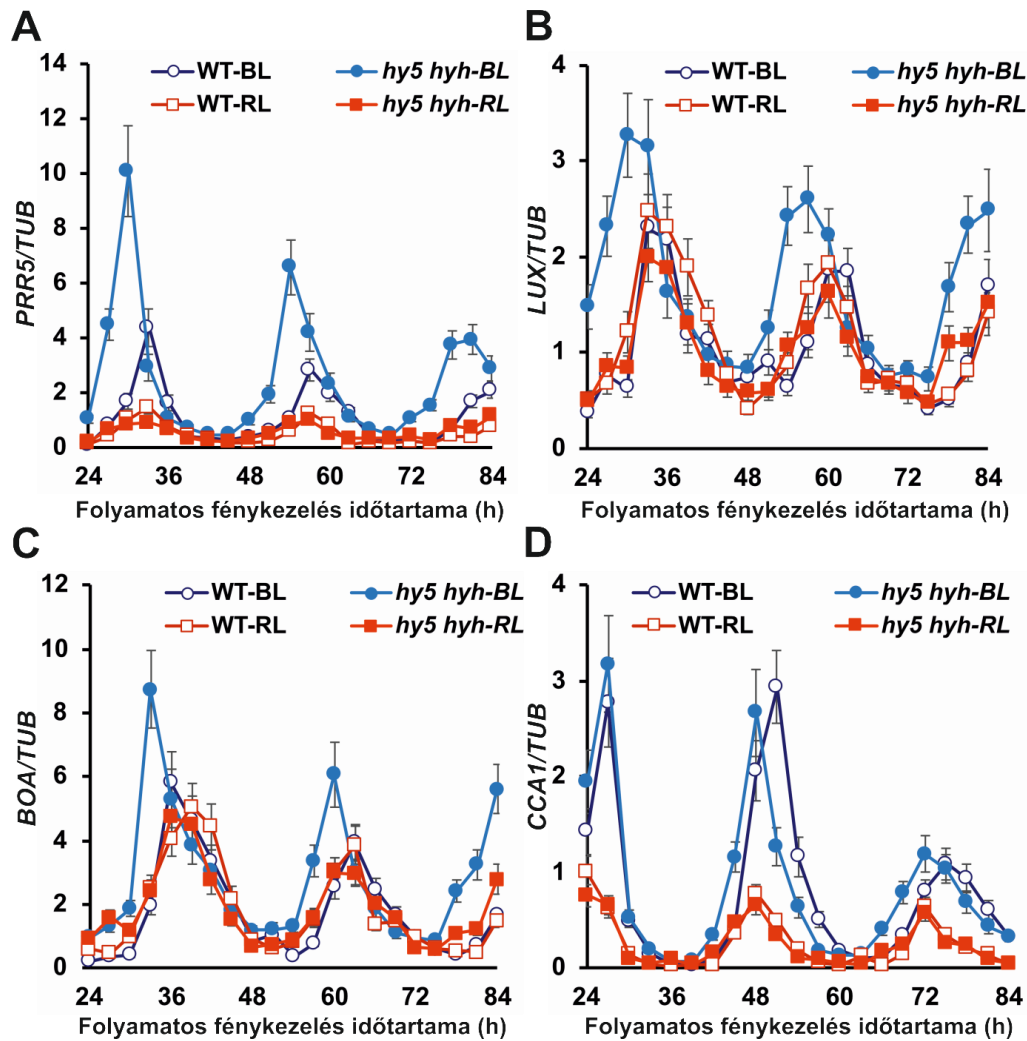
- (A) 35S:HY5 konstrukciót és CAB2:LUC riporter gént hordozó *hy5* mutáns neveltünk 12:12 fény/sötét ciklusokon 7 napig, majd 2 napon át folyamatos kék (BL) vagy vörös (RL) fénybe helyeztük őket, ezután gyűjtve be a szükséges mintákat. A HY5 fehérje szinteket anti-HY5 antitesttel mutattuk ki.
- (B) A folyamatos kék vagy vörös fénykezelés elindítása után a feltüntetett vonalak ritmikus CAB2:LUC kifejeződését 4-5 napon keresztül mértük, s abból becsültük meg periódusukat.

A kísérletben különböző mértékben HY5-túltermelő vonalak periódusát hasonlítottuk össze a vad típusú illetve a *hy5 hyh* mutáns vonalak periódusával kék és vörös fénykezelés hatására. A *hy5 hyh* mutáns periódusával összehasonlításban a vad típusú és a HY5-túltermelő vonalak értékei ugyan vörös fényben is magasabbak voltak, de kék fény hatására egy sokkal erősebb periódusnövekedés tapasztalható, melynek megfeleltethető a magasabb HY5-termeléssel.

Összességében eredményeink arra mutatnak, hogy a HY5 több szinten is stabilizálódik kék fényben, ami egy karakteresebb HY5-mennyiségi különbséget eredményezett kék fényben a vad típusú és a mutáns vonalak között, mint vörös fényben. Hozzáadva mindezekhez a felfedezést, hogy a HY5 mennyiségétől függően képes cirkadián ritmust lassító hatását kifejteni az oszcillátorra, már értelmezhetővé válik a vad típusú valamint a mutáns vonalak közti periódus-különbség kékfény-specifikus jellege.

4.5. A HY5 és HYH több központi oszcillátor elem expresszióját szabályozzák

Hogy fényt derítsünk arra, pontosan miként hat a HY5 és HYH az óragének transzkripciójára, folyamatos kék fényben tartott vad típusú (Ws) és *hy5 hyh* mutáns növények mintáiban hasonlítottuk össze a kék fényben HY5-t kötő óra- és óra-asszociált gének mRNS szintjeit (13. ábra).



13. ábra. Az óragének transzkripcióját a HY5 és HYH fényfüggő módon befolyásolja.

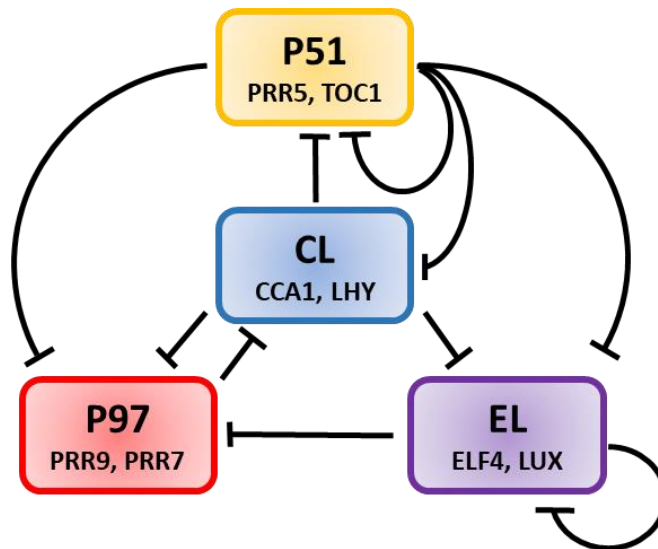
A vad-típusú (WT) és *hy5 hyh* mutáns növényeket 7 napig neveltük 12:12 órás fény/sötét ciklusokon, majd majd azokat $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású kék (BL) vagy vörös (RL) fény alá helyeztük át. A mintákat a jelzett időpontokban gyűjtöttük be. A *PRR5* (A), *LUX* (B), *BOA* (C) és *CCA1* (D) mRNS szinteket qPCR segítségével állapítottuk meg, s azokat a hozzájuk tartozó *TUBULIN* (*TUB*) mRNS szintekkel normáltuk. A hibásávok a kísérlet három független ismétlésének standard hibájából lettek megállapítva.

A cirkadián óra kimeneti elemeinek expressziójában tapasztalt ritmusváltozás alapvetően abból következik, hogy a rájuk direkt/indirekt módon ható óraelemek expressziós ritmusa felgyorsul/lelassul. Ezért korántsem meglepő, hogy a korábbi kísérletben vizsgált *CAB2:LUC* riportergén (és kimeneti elem) kifejeződésével összhangban (1. ábra) a jelen kísérletben vizsgált óraelemek kifejeződése is rövid periódusú oszcillációt mutatott a *hy5 hyh* mutánsban kék fényben, vörös fényben pedig a vad típussal megegyező módon működött. Az óraelemek döntő többsége a *CCA1* gén kifejeződéséhez hasonlóan viselkedett (13D ábra): a génről átitrt

mRNS mennyiségét nem befolyásolta sem a folyamatos fénykezeléshez használt fény minősége, sem a *hy5/hyh* gének funkciókészsége. Három gén esetében (*PRR5*, *LUX* és *BOA*) azonban kék fényben az mRNS felhalmozódás átlagos szintje mintegy másfél-kétszer magasabb volt a *hy5 hyh* mutánsban a vad típushoz képest. E három gén ritmikus működését vörös fényben is megvizsgáltuk, azonban ilyen körülmények között a *hy5 hyh* mutánsban semmilyen paraméter nem különbözött vad típusú kontrolljától egyik vizsgált gén tekintetében sem. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy kék fényben a HY5 – bár sok más óragén promoteréhez is képes kötni - óra-asszociált funkcióit a *PRR5*, *LUX*, és *BOA* óragéneken keresztül látja el, azok transzkripció gátlásával.

4.6. Matematikai modellek alapján a HY5 egyéb óragének transzkripciójára is hatással lehet

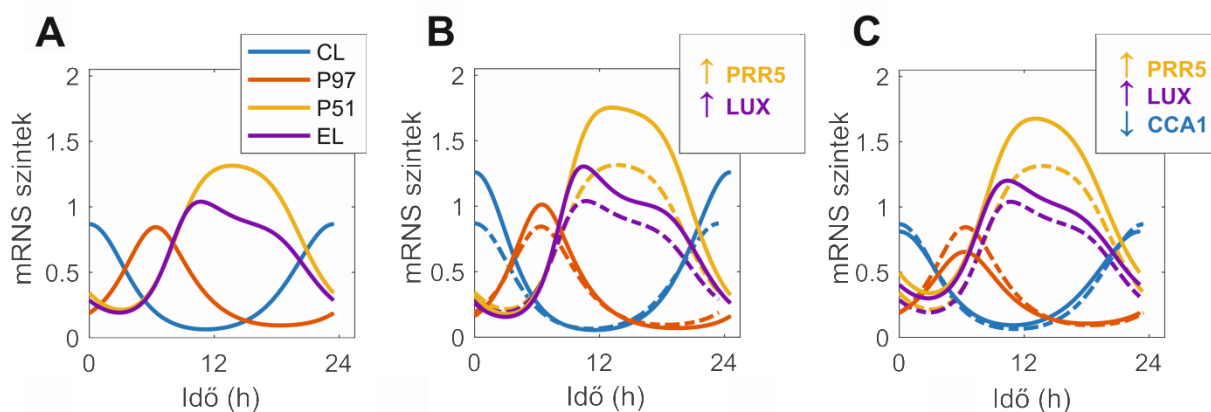
Az óra funkciója az óragének és az órafehérjék közötti keresztszabályozás bonyolult hálózatán alapul, ami az órakomponensek ritmikus, de jól meghatározott átlagos expressziós szintjét eredményezi. A kísérleti adatok illesztése érdekében a már azonosított szabályozási kapcsolatok és egy adott paraméterkészlet alapján olyan matematikai modellek szerkeszthetők és használhatók, melyek előre képesek jelezni, hogyan változik az oszcillátor funkciója (periódusa, fázisa, amplitúdója), ha egy adott óragén expressziójában változás történik. Ez arra készítetett bennünket, hogy teszteljük, hogy a *PRR5*, *LUX* és *BOA* átlagos expressziójának növekedése a *hy5 hyh* mutánsban összhangban van-e a mért rövid periódusú fenotípussal. Az elemzéshez de Caluwé legújabb modelljét használtuk [60]. Ez a modell nyolc óragén hálózatán alapul, amelyeket négy funkcionális egységre osztottak fel: P51 (*PRR5*, *TOC1*), CL (*CCA1*, *LHY*), P97 (*PRR7*, *PRR9*) és EL (*ELF4*, *LUX*) (14. ábra).



14. ábra. *Arabidopsis* óragének funkcionális egységei alapján történő felosztása de Caluwé modellje alapján.

Az ábra eredeti forrása: De Caluwé et al. 2016, Front Plant Sci, 7, 74.

Elsőként a vad típusú növény viselkedését prezentáló paramétereket töltöttük fel a de Caluwé modellt alkalmazó szimulációs programba, mely a megadott paraméterekkel dolgozó cirkadián rendszer periódusát 23,44 órára becsülte (15A ábra). Ezt követően úgy hangoltuk át a funkcionális egységek transzkript-szintjét a szimulációban, hogy az tükrözze a *hy5 hyh* mutánsban korábban tapasztalt (13. ábra) markánsabb *PRR5*, *LUX* és *BOA* mRNS expressziót. A modell paraméterkészletében ezt úgy jeleníthető meg, ha a P51-es és az EL csoport transzkript-szintjét megemeljük (15B ábra). Ennek hatására a szimuláció új becslést végzett, melyből az következett, hogy ilyen transzkript szintekkel a cirkadián órának egy hosszabb, 24,57 órás periódussal kellene operálni. Ez nem állt összhangban az általunk mért *hy5 hyh* periódussal, de az ellentmondás feloldható, ha feltételezzük, hogy olyan kölcsönhatások is közrejátszanak az *Arabidopsis* cirkadián órájának hálózatában, amelyeket eddig még nem sikerült kimutatnunk.



15. ábra. Az *hy5 hyh* mutáns cirkadián órájának modellezése.

A De Caluwé modell a négy géncsoport mRNS expresszióját szimulálta egy periódusciklus alatt, az LC mRNS csúcspontját tekintve kezdőpontnak. (A) WT modell alapértelmezett paraméterekkel. A (B)-(C) ábrákon a módosított modell által adott mRNS-szinteket egybefüggő, normál vonallal ábrázoljuk. Az eredeti WT modell által kalkulált értékek szaggatott vonallal vannak jelezve az összehasonlíthatóság érdekében.

A *hy5 hyh* mutáns értékeire hangolt modellben ugyanis nemcsak a kalkulált periódus növekedett meg, hanem a P97 és a CL funkcionális egységek prediktált expressziós szintje is. Azt általunk elvégzett qPCR vizsgálatok (13. ábra és 8. melléklet) azonban nem mutattak különbséget sem a *PRR9*, sem a *PRR7*, sem a *CCA1* mRNS-ek tekintetében a vad típusú és a *hy5 hyh* növények összehasonlításakor. Éppen ezért a szimuláció megismétléseinél a paramétereket úgy egészítettük ki, hogy a P51 és EL szintek emelése mellett az eredeti, vad típusú szintekre korlátoztuk a CL/P97 értékeit. A P97-es szinteket is visszaszorító árnyaltabb modell betáplálása és újbóli lefuttatása még folyamatban van, azonban mikor a P51 és EL értékek emelése mellett a *CCA1* mRNS szint visszaszorítása is megtörtént (15C ábra), a modell által számított *hy5 hyh* hálózat periódusa 23,09 órára csökkent, ami a vad típushoz hasonlítva rövid periódust jelent. Ezen eltérés mértéke ugyan nem, de az iránya megegyezett az általunk tapasztalt cirkadián fenotípussal (1. ábra). Ez arra utalhat, hogy a HY5 valójában a *CCA1* génátírására is hatással van (még hozzá annak pozitív szabályozója lehet), csupán a kölcsönhatás nem kimutatható, mert a HY5 egyidejűleg olyan szabályozásokat is végrehajt a cirkadián hálózat egyéb pontjain, melyek összességében a HY5 *CCA1*-re gyakorolt hatását kioltják, ellensúlyozzák. Amennyiben e gondolatmenetet helytálló, úgy az is elképzelhető, hogy ez az eset a cirkadián óra más elemeinél is fennáll, vagyis a HY5 nemcsak arra lehet képes, hogy szinte mindegyik óraelem promoteréhez kössön (9. ábra), hanem arra is, hogy a *PRR5*, *LUX* és *BOA* géneken kívül más pontokon keresztül is kétfény-függő ritmusváltozást idézzon elő a cirkadián óra működésében.

4.7. A HY5 akkumulációját és kromatin asszociációját a szacharóz nem befolyásolja

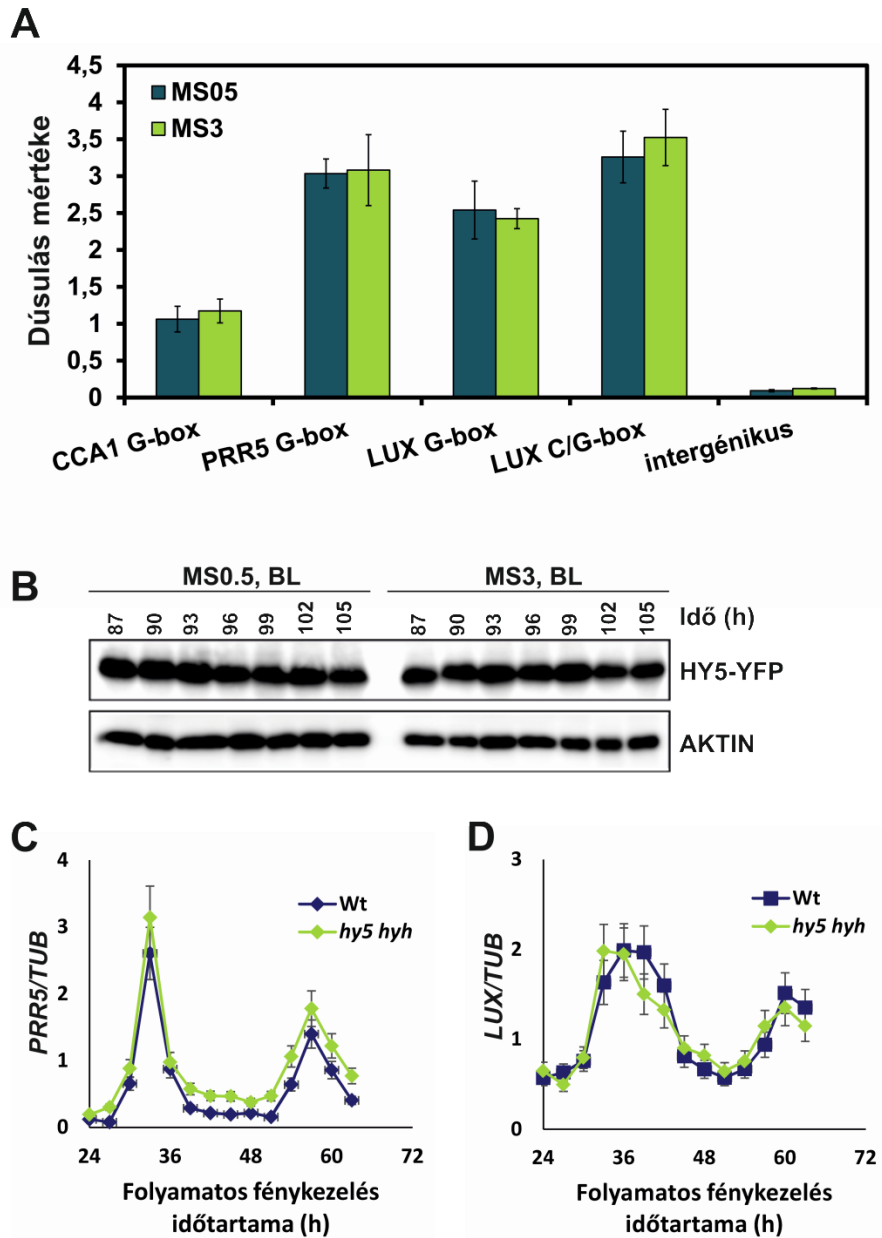
Munkánk során megpróbáltunk választ találni arra a kérdésre is, hogy a *hy5* és *hyh* mutánsok cirkadián fenotípusa miért gyengébb a magasabb cukortartalmú médiumon nevelt növények esetében (1. ábra). Másként fogalmazva: milyen módon befolyásolja a cukor-jelátvitel a HY5- és HYH-mediált óraszabályozást? E kérdés megválaszolásához folyamatos kék fényben tartott és 3% szacharóz tartalmú táptalajon nevelt vad típusú és *hy5 hyh* mutánsokat hasonlítottunk össze a *PRR5* és a *LUX* óragének kifejeződését vizsgálva. (16. ábra).

Az említett körülmények között a *hy5 hyh* mutáns *PRR5* mRNS szintje rendkívül kismértékű emelkedést mutatott, míg a *LUX* kifejeződésének szintje azonos volt a mutánsban és a vad típusban. Ez összhangban van a korábbi *CAB2:LUC* riportergént követő kísérletünk eredményével, miszerint ilyen szacharóz koncentráció mellett a mutáns rövid periódus fenotípusa még kék fényben is rendkívül gyenge (1C ábra). Ezzel szemben, a vizsgált mRNS expressziós szintekben mutatott különbségek a vad típusú és a mutáns cirkadián rendszer között sokkal hangsúlyosabbak voltak alacsony cukorkoncentráció esetén (13. ábra).

A fénykörülmények hatásának feltérképezéséhez hasonlóan itt is megvizsgáltuk, hogy a cukor jelátvitel miként hat a HY5-YFP fúziós fehérjék szintjére. A kísérletben a korábbiakban már használt saját promoterrel vezérelt *HY5:HY5-YFP* konstrukciót hordozó növényeket neveltünk 0.5% vagy 3% szacharózt tartalmazó táptalajon, s a folyamatos fénykezelés is a korábbiaknak megfelelően történt. A 16B ábra alapján a HY5-YFP akkumulációját a szacharóz nem befolyásolta.

Végezetül, kísérletünkben 99 óra folyamatos kékfénykezelést kapott, *HY5:HY5-YFP*-t kifejező növényekről gyűjtöttünk mintát, hogy megmérhessük a HY5-YFP és az egyes óragének promoter régiója közötti asszociáció esetleges szacharóz-függését. A 16C ábra adatai bizonyítják, hogy a HY5 és a célgének promoterei között ugyanakkora mértékű kötődés figyelhető meg 0.5% és 3% szacharózt tartalmazó médium alkalmazása esetén is.

Mindent egybevetve eredményeink arra utalnak, hogy bár a HY5 magas cukorkoncentráció esetén is ugyanúgy kötődik az óragének promoteréhez, azonban azok transzkripcióját ilyen körülményben nem szabályozza.



16. ábra. A HY5 akkumulációját és kromatin asszociációját a szacharóz nem befolyásolja.

(A) A *HY5:HY5-YFP* konstrukciót hordozó *hy5* mutáns növényeket 0.5% (MS05) vagy 3% szacharózt tartalmazó (MS3) táptalajon, 12:12 órás fény-sötét cikluson neveltük 7 napon át, majd áthelyeztük őket folyamatos kék fénybe. A növényekről 99 óra folyamatos kékfény kezelés után gyűjtöttünk mintát, majd ChIP eljárással vizsgáltuk a HY5-YFP, illetve a *CCA1*, *PRR5* és *LUX* közötti asszociáció mértékét. Az *At4g26900*-as és *At4g26910*-as gének közötti régióra tervezett primerpárra "intergénikus" néven hivatkoztunk. A dúsulás mértékét az antitest-specifikus kicsapást nélkülöző minták dúsulási értékeivel normalizáltuk. Minden kísérletet 3 független ismételtsben elvégeztünk, hasonló eredményekkel. A hibásávok a három ismételts standard hibájából lettek kiszámolva.

(B) A *HY5:HY5-YFP* konstrukciót hordozó *hy5* mutáns növényeket 12:12 órás fény-sötét cikluson neveltük 7 napon át, majd áthelyeztük folyamatos kék fénybe. A mintákat a jelzett időpontokban gyűjtöttük be. A HY5-YFP fúziós fehérjét Western-blottal azonosítottuk α GFP antitest segítségével. A felvitel kontrolljaként a minták

AKTIN szintjeit is megvizsgáltuk. Minden kísérletet négyszer ismételtünk meg, lényegében azonos eredményekkel, így azok reprezentatív adatoknak tekinthetők.

(C) Vad típusú (WT) és hy5 hyh mutáns növényeket neveltünk MS3 médiumon 12:12 órás sötét/fény ciklusokon 7 napon keresztül, majd folyamatos kék fénybe helyeztük át őket. A mintákat a jelzett időpontokban gyűjtöttük be. A *PRR5* és *LUX* mRNS szinteket qPCR segítségével állapítottuk meg, s azokat a hozzájuk tartozó *TUBULIN* (*TUB*) mRNS szintekkel normáltuk. A hibasávok a kísérlet három független ismétlésének standard hibájából lettek megállapítva.

5. Eredmények megvitatása

A cirkadián óra és a környezet közötti szinkronizálás elengedhetetlen ahhoz, hogy az óra által szabályozott események a nap megfelelő időpontjában történjenek. A szinkronizáció elvégzéséhez az óra fény általi génexpressziós szabályozása egy általánosan alkalmazott mechanizmus nemcsak a növényekben, hanem más eukarióta szervezetekben is [61]. Korábbi tanulmányok arra utaltak, hogy az általános fényjelző kaszkádok kulcsfontosságú transzkripciós faktora, a HY5 is részt vehet ebben a folyamatban, bár az eredmények meglehetősen változóak voltak. Egyes szerzők kimutatták, hogy a HY5 funkció elvesztése rövid periódusú ritmusokat okoz [17], [48], míg mások nem jeleztek nyilvánvaló periódus fenotípust a *hy5* mutánsok esetén [39], [59]. Ezt a látszólagos ellentmondást eddig nem sikerült érdemben feloldani.

5.1. A HY5 és HYH óraszabályozó hatása függ a fényminőségtől

Az eltérő eredményeket adó, HY5 kronobiológiai szerepkörével foglalkozó tanulmányok folyamatos fehér fénykörülményben vizsgálták a HY5 cirkadián órára gyakorolt hatását. A fehér fény komplex információforrás a növények számára, emiatt feltételeztük, hogy érdemes a fehér fényt a növények számára külön-külön is értelmezhető hullámhossz tartományaira (kék, vörös és távoli vörös) felbontani, s ilyen monokromatikus fénykezelésben összehasonlítani a *hy5* és *hyh* mutánsok cirkadián ritmusát a vad típusú vonallal. Kiderült, hogy kék fényben a *hy5* és a *hyh* mutánsok szignifikánsan rövidebb periódussal operálnak a WT növényekhez képest, vagyis a HY5 és HYH kék fényben lassítja a cirkadián óra ritmusát. Vörös fényben a periódusok különbsége elhanyagolható volt, fehér fényben pedig egy középértékű fenotípust kaptunk, ami egy várható eredmény volt annak tükrében, hogy a fehér fény kék és vörös hullámhosszú fényt is tartalmaz. Mindez arra utal, hogy a különböző hullámhossz-tartományok aránya fontos tényezője a HY5 és a HYH tényleges hatásának az órában, s valószínűleg a korábbi kísérletekben alkalmazott fehér fény változó összetétele vezethetett a HY5 és HYH cirkadián funkciójában tapasztalt eltérésekhez. Az, hogy a növényi cirkadián óra ritmusa érzékeny a fehér fény összetételére, élettani

szempontból is megmagyarázható. A Napból érkező fénysugarak összetétele változik a nap folyamán, mivel a beesési szögtől függően a fénynek más-más vastagságú légrétegen kell áthatolni. Minél kisebb a beesési szög, a fény annál vastagabb légrétegen hatol át, aminek következtében energiája nagy része elnyelődik, s ezen energiaveszteség miatt a fény hullámhossza, vörös-telítettsége megnő (emiat látjuk vörös fényben a reggeli és alkonyati égboltot). A Nap és a földfelszín által bezárt szög nemcsak napi, hanem éves szinten is változik: télen a beesési szög kisebb, emiatt a beérkező fény ugyancsak energiaszegényebb, vörös tartományban gazdagabb lesz, mint nyáron. Mindezen jelenségeket figyelembe véve elképzelhető, hogy a növények számára evolúciós előnyt jelentett egy olyan cirkadián szabályozási útvonal kialakítása, amelyben a HY5/HYH segítségével napszakosan és/vagy adott évszaktól függően tudják lassítani a cirkadián órájuk ritmusát, ezzel mintegy kiterjesztve azon életfolyamataik időablakát, melyek energiagazdag fénykörülményekben aktívak, pl.: fotoszintézishez szükséges fehérjék termelése.

5.2. A HY5 célgénjeinek és hatásmechanizmusának megállapítása

A *hy5 hyh* mutáns transzkripció profiljában az óragének megváltozott expressziója összhangban állt a cirkadián fenotípussal. Megállapítottuk, hogy a *PRR5*, a *LUX* és a *BOA* kék fényben emelkedett mRNS-szinteket mutatott a mutánsban. Azonban az óra *hy5 hyh* mutánsokban való modellezése (azaz a *PRR5*, *LUX* és *BOA* fokozott transzkripciója) hosszú periódusú fenotípust jósolt, ami ellentétes a megfigyelt hatással. Ugyanez a modell megnövekedett *CCA1* mRNS-szinteket is becsült, amelyeket semmilyen körülmények között nem észleltünk a *hy5 hyh* mutánsban. Érdekes módon, amikor a mutánsban a *CCA1* mRNS-szinteket vad típus-szerű szintre állítottuk, a szimuláció rövidebb periódust adott a vad típusnál. Ezt az esetet meg lehet magyarázni úgy, hogy a HY5 – más óraelemeken keresztül kifejtett negatív visszacsatolásokkal - kioltja közvetlen pozitív hatását a *CCA1* expresszióra. Ez alátámasztaná a hipotézisünket a HY5 általánosabb szabályozói szerepéről a cirkadián rendszerben. Az adataink ugyan nem szolgálnak közvetlen bizonyítékként, de összhangban vannak ezzel a hipotézissel. Feltételezésünk kísérleti tesztelése és a HY5 elsődleges óragén célpontjainak azonosítása további munkát és módszereket igényel. Ennek keretén belül egy olyan kísérleti rendszert tervezünk létrehozni, melyben exogén ösztrogén-szignál hatásra

HY5 expresszió indukálható *hy5* mutáns növényi háttérben. Az indukciót követő nagy gyakoriságú mintavétellel és a mintákban kimutatható óragén-transzkripció változásokkal reményeink szerint szemléltetni tudjuk majd, hogy a *HY5* mely pontokon ad közvetlen bemeneti jelzést az óra központi oszcillátora felé [62], [63]. Mindazonáltal a modellezéssel kombinált eredmények arra utalnak, hogy egy transzkripciós faktor (TF) specifikus hatása egy erősen összekapcsolt génhálózat minden egyes összetevőjére nem írható le tökéletesen pusztán a TF mutáns növények elemzéséből, különösen ha a TF közvetlenül a hálózat több összetevőjéhez is kötődik. Vizsgálatunk tehát azt mutatja, hogy a nagyobb áteresztésű és méretű kísérleti megközelítések, bár szükségesek, de önmagukban nem elegendőek komplex rendszerek szerkezetének és mechanikai részleteinek megfejtéséhez. Fontos megállapításunk továbbá, hogy az intuitív hipotézist alátámasztó kísérletek mellett az adatok helyes értelmezéséhez matematikai modellezésre is szükség van.

Mivel a *HY5* nem rendelkezik transzkripciós aktivációs doménnel [44], [64], célgénjei transzkripciós szabályozásához ko-faktorokat igényel. Példaként: a FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3 (*FHY3*), mely egy transzpozáz-eredetű transzkripciós faktor, kötődik az *ELF4* promoterhez *in vivo*, és elengedhetetlen az *ELF4* transzkripcióhoz [45]. Az *FHY3* fizikailag kölcsönhatásba lép a *HY5*-tel, ami arra utal, hogy az *FHY3* a *HY5* kofaktora lehet az *ELF4* szabályozásában. Az *FHY3* szintén közvetlenül kötődik a *CCA1* promoterhez [45], [65], jelezve egy másik potenciális óra targetet a *FHY3*-*HY5* komplex számára. A *HY5* és a *HYH* más transzkripciós faktorokkal is képes fizikai és funkcionális kölcsönhatásba lépni, ide sorolhatunk számos B-BOX DOMAIN PROTEIN-t [47], illetve a PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 1-et és 3-at [66]. Mindazonáltal ezeknek az interakcióknak a funkcióját eddig csak fotomorfogenezis és a reaktív oxigén fajok jelzésének szabályozásában bizonyították, a cirkadián óra irányításában nem.

A *HY5* transzkripciót gátló funkciója számos mechanizmuson keresztül megvalósulhat: történhet pozitív transzkripciós faktorok gátlásával/aktiválásával [64], a gátló hiszton-metilációk létrejöttének elősegítésével, vagy akár közvetlen transzkripciós represszióval [67]. Ezenkívül a *HY5* bizonyítottan kölcsönhatásba lépett a *CCA1*-gyel élesztőben [48]. Eképpen az is lehetséges, hogy a *HY5* segíti/zavarja a *CCA1* DNS-kötődését vagy funkcióját (mely utóbbi egy általános transzkripciós represszorként értelmezhető a cirkadián rendszeren belül) [68].

Érdekes, hogy a CCA1 DNS-kötőhelyeként szolgáló „esti elemek” (EE) a *PRR5*, *LUX* és *BOA* promoterekben viszonylag közel állnak a HY5 kötőhelyekhez. Ez lehetővé teheti a HY5 és a CCA1 egyidejű DNS-kötődését és kölcsönhatását ezen óragének expressziós modulálásához.

5.3. A HY5 és HYH cirkadián fenotípusának kékfény-specifitása

Kimutattuk, hogy a *hy5 hyh* mutánsok kék fény-specifikus cirkadián fenotípusa fokozott HY5-óragén asszociációval társul az óragének promoter-régiójában. Bizonyítottuk továbbá, hogy a HY5 és a HYH felhalmozódását a kék fény sokkal jobban elősegíti, mint a vörös fény, mind transzkripció, mind poszt-transzkripció szinteken. Valószínű, hogy a HY5-nak a promoterekhez való fokozott kötődése a kék fényben a HY5 fehérjék magasabb szintjének tudható be ilyen körülmények között, bár kék fény-indukált HY5-módosítások sem kizártak. A legújabb adatok azt mutatják, hogy a transzkripció faktorok - köztük a HY5 és a HYH - bonyolult komplexek formájában kapcsolódnak az óragének promotereihez [45], [68]. Adataink arra utalnak, hogy a HY5 és HYH mennyisége ezekben a komplexekben dinamikusán változhat a fény kék és vörös komponenseinek aránya szerint, és e mechanizmus képessé teheti a növényeket arra, hogy a fény mennyiség mellett a fény minőségét is figyelembe véve modulálhassák cirkadián órájuk működését.

5.4. A HY5 és HYH óraszabályozó hatása cukorfüggést mutat

A *hy5* és *hyh* mutáns vonalak rövidebb periódusa különösen alacsony cukorkoncentrációjú táptalajon nőtt növények esetében volt megfigyelhető, magasabb mennyiségű exogén cukor jelenléte esetén a vizsgált fehérjéink cirkadián ritmust szabályozó hatása nem volt nyilvánvaló. A cukor-szignálok, csakúgy, mint a fény, zeitgeberként befolyással vannak az óra sebességére, éppen ezért előfordulhat, hogy esetünkben a két jelátviteli útvonal egy adott ponton keresztezte egymást, s az általuk kiváltott hatások kompetáltak egymással. Egy ilyen interakciós pont lehet a *CCA1/LHY* óragén szabályozása, ezt a feltételezést több megfigyelés támasztja alá indirekt módon. Először is, a cukor-jelátvitel ún. PIF (PHYTOCHROME

INTERACTING FACTOR) transzkripció faktorok segítségével bizonyítottan képes hatni a *CCA1/LHY* transzkripció rátájára [69], s így az óra sebességére. Másodszor, az általunk használt matematikai modellezés szerint a HY5 képes lehet a *CCA1/LHY* promoter kötésén kívül annak szabályozására is. Nem utolsósorban pedig az is bizonyított tény, hogy bizonyos promoter-kötőhelyekért a HY5 és PIF transzkripció faktorok kompetícióban állnak egymással [70]. Mindezek függvényében elképzelhető, hogy nagyobb mennyiségű exogén cukor jelenlétében az erősebb cukor jelátvitel egy markánsabb PIF-jelenlétet eredményezett a *CCA1* (és/vagy egyéb óraelemek) promoter régiójában, leszorítva a HY5 transzkripció faktorokat a kötőhelyeiről, így gyengítve a fény-bemenet hatását az óra működésére nézve. A hipotézisnek viszont ellentmond, hogy a szacharóz nem hat a HY5 kromatin-asszociációjára, így a jelenség hátterének megválaszolásához további más kísérletek szükségesek. Ennek keretében többszörös mutánsokat hozunk létre, melyekben a *hy5* mutáció mellett olyan géneket rontunk el, melyek a már felderített cukor-útvonalak részét képezik az óra felé, így meghatározva a fény- és szacharóz óra-bemenetek kereszteződési pontjait.

6. Idézett Közlemények

- [1] „Sejtbológia - [Szabó Gábor et al.] ; szerk. Szabó Gábor”. [Online]. Elérhető: <http://qulto.bibl.u-szeged.hu/hu/record/-/record/bibJAT00754653>. [Elérés: 15-ápr-2019].
- [2] D. H. Nagel, C. J. Doherty, J. L. Pruneda-Paz, R. J. Schmitz, J. R. Ecker, és S. A. Kay, „Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in Arabidopsis”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 112, sz. 34, o. E4802–E4810, aug. 2015.
- [3] S. L. Harmer és mtsai., „Orchestrated Transcription of Key Pathways in Arabidopsis by the Circadian Clock”, *Science*, köt. 290, sz. 5499, o. 2110–2113, dec. 2000.
- [4] L. E. Dixon, K. Knox, L. Kozma-Bognar, M. M. Southern, A. Pokhilko, és A. J. Millar, „Temporal Repression of Core Circadian Genes Is Mediated through EARLY FLOWERING 3 in Arabidopsis”, *Curr. Biol.*, köt. 21, sz. 2, o. 120–125, jan. 2011.
- [5] A. Helfer, D. A. Nusinow, B. Y. Chow, A. R. Gehrke, M. L. Bulyk, és S. A. Kay, „LUX ARRHYTHMO Encodes a Nighttime Repressor of Circadian Gene Expression in the Arabidopsis Core Clock”, *Curr. Biol.*, köt. 21, sz. 2, o. 126–133, jan. 2011.
- [6] N. Nakamichi, T. Kiba, R. Henriques, T. Mizuno, N.-H. Chua, és H. Sakakibara, „PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 Are Transcriptional Repressors in the Arabidopsis Circadian Clock”, *Plant Cell*, köt. 22, sz. 3, o. 594–605, márc. 2010.
- [7] J.-F. Wu, Y. Wang, és S.-H. Wu, „Two New Clock Proteins, LWD1 and LWD2, Regulate Arabidopsis Photoperiodic Flowering”, *Plant Physiol.*, köt. 148, sz. 2, o. 948–959, okt. 2008.
- [8] J.-F. Wu és mtsai., „LWD–TCP complex activates the morning gene CCA1 in Arabidopsis”, *Nat. Commun.*, köt. 7, o. 13181, okt. 2016.
- [9] B. Farinas és P. Mas, „Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation”, *Plant J.*, köt. 66, sz. 2, o. 318–329, 2011.
- [10] P. Y. Hsu, U. K. Devisetty, és S. L. Harmer, „Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in Arabidopsis”, *eLife*, köt. 2, o. e00473, ápr. 2013.
- [11] R. Rawat és mtsai., „REVEILLE8 and PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 Form a Negative Feedback Loop within the Arabidopsis Circadian Clock”, *PLOS Genet.*, köt. 7, sz. 3, o. e1001350, márc. 2011.
- [12] Q. Xie és mtsai., „LNK1 and LNK2 Are Transcriptional Coactivators in the Arabidopsis Circadian Oscillator”, *Plant Cell*, köt. 26, sz. 7, o. 2843–2857, júl. 2014.
- [13] M. L. Rugnone és mtsai., „LNK genes integrate light and clock signaling networks at the core of the Arabidopsis oscillator”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 110, sz. 29, o. 12120–12125, júl. 2013.
- [14] K. Greenham és mtsai., „Temporal network analysis identifies early physiological and transcriptomic indicators of mild drought in Brassica rapa”, *eLife*, köt. 6, 18 2017.
- [15] A. J. Nagano és mtsai., „Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions”, *Cell*, köt. 151, sz. 6, o. 1358–1369, 0 2012.
- [16] T. P. Michael és mtsai., „Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules”, *PLoS Genet.*, köt. 4, sz. 2, o. e14, febr. 2008.
- [17] M. J. Haydon, O. Mielczarek, F. C. Robertson, K. E. Hubbard, és A. A. R. Webb, „Photosynthetic entrainment of the Arabidopsis thaliana circadian clock”, *Nature*, köt. 502, sz. 7473, o. 689–692, okt. 2013.
- [18] W. Rüdiger, F. Thümmler, E. Cmiel, és S. Schneider, „Chromophore structure of the physiologically active form (P(fr)) of phytochrome”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 80, sz. 20, o. 6244–6248, okt. 1983.
- [19] M. Chen, „Phytochrome nuclear body: an emerging model to study interphase nuclear dynamics and signaling”, *Curr. Opin. Plant Biol.*, köt. 11, sz. 5, o. 503–508, okt. 2008.
- [20] J. Aschoff, „Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions”, *Z. Tierpsychol.*, köt. 49, sz. 3, o. 225–249, márc. 1979.

- [21] D. E. Somers, P. F. Devlin, és S. A. Kay, „Phytochromes and Cryptochromes in the Entrainment of the Arabidopsis Circadian Clock”, *Science*, köt. 282, sz. 5393, o. 1488–1490, nov. 1998.
- [22] E. Kolmos és mtsai., „A Reduced-Function Allele Reveals That EARLY FLOWERING3 Repressive Action on the Circadian Clock Is Modulated by Phytochrome Signals in Arabidopsis”, *Plant Cell*, köt. 23, sz. 9, o. 3230–3246, szept. 2011.
- [23] H. Huang és mtsai., „Identification of Evening Complex Associated Proteins in Arabidopsis by Affinity Purification and Mass Spectrometry”, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, köt. 15, sz. 1, o. 201–217, 0 2016.
- [24] K. D. Edwards, F. Guerinéau, P. F. Devlin, és A. J. Millar, „Low-temperature-specific effects of PHYTOCHROME C on the circadian clock in Arabidopsis suggest that PHYC underlies natural variation in biological timing”, *bioRxiv*, o. 030577, nov. 2015.
- [25] K. A. Franklin és P. H. Quail, „Phytochrome functions in Arabidopsis development”, *J. Exp. Bot.*, köt. 61, sz. 1, o. 11–24, 2010.
- [26] W. Hu, K. A. Franklin, R. A. Sharrock, M. A. Jones, S. L. Harmer, és J. C. Lagarias, „Unanticipated regulatory roles for Arabidopsis phytochromes revealed by null mutant analysis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 110, sz. 4, o. 1542–1547, 0 2013.
- [27] C. Lin, H. Yang, H. Guo, T. Mockler, J. Chen, és A. R. Cashmore, „Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 95, sz. 5, o. 2686–2690, márc. 1998.
- [28] D. E. Somers, A. A. Webb, M. Pearson, és S. A. Kay, „The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*”, *Dev. Camb. Engl.*, köt. 125, sz. 3, o. 485–494, febr. 1998.
- [29] P. F. Devlin és S. A. Kay, „Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity”, *Plant Cell*, köt. 12, sz. 12, o. 2499–2510, 0 2000.
- [30] M. Ahmad, J. A. Jarillo, és A. R. Cashmore, „Chimeric proteins between *cry1* and *cry2* Arabidopsis blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability”, *Plant Cell*, köt. 10, sz. 2, o. 197–207, febr. 1998.
- [31] J. A. Jarillo és mtsai., „An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB”, *Nature*, köt. 410, sz. 6827, o. 487–490, márc. 2001.
- [32] J.-Y. Cha és mtsai., „GIGANTEA is a co-chaperone which facilitates maturation of ZEITLUPE in the Arabidopsis circadian clock”, *Nat. Commun.*, köt. 8, sz. 1, o. 3, 23 2017.
- [33] J.-W. Yu és mtsai., „COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability”, *Mol. Cell*, köt. 32, sz. 5, o. 617–630, 0 2008.
- [34] P. Más, D. Alabadí, M. J. Yanovsky, T. Oyama, és S. A. Kay, „Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in Arabidopsis”, *Plant Cell*, köt. 15, sz. 1, o. 223–236, 0 2003.
- [35] S. Fujiwara és mtsai., „Post-translational regulation of the Arabidopsis circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins”, *J. Biol. Chem.*, köt. 283, sz. 34, o. 23073–23083, 0 2008.
- [36] A. Baudry és mtsai., „F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression”, *Plant Cell*, köt. 22, sz. 3, o. 606–622, márc. 2010.
- [37] T. F. Schultz, T. Kiyosue, M. Yanovsky, M. Wada, és S. A. Kay, „A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis”, *Plant Cell*, köt. 13, sz. 12, o. 2659–2670, 0 2001.
- [38] L. Rizzini és mtsai., „Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein”, *Science*, köt. 332, sz. 6025, o. 103–106, ápr. 2011.
- [39] B. Fehér és mtsai., „Functional interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE LOCUS 8-controlled UV-B signaling pathways in Arabidopsis thaliana”, *Plant J. Cell Mol. Biol.*, köt. 67, sz. 1, o. 37–48, júl. 2011.
- [40] M. Holm, L.-G. Ma, L.-J. Qu, és X.-W. Deng, „Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis”, *Genes Dev.*, köt. 16, sz. 10, o. 1247–1259, máj. 2002.

- [41] M. Binkert, L. Kozma-Bognár, K. Terecskei, L. D. Veylder, F. Nagy, és R. Ulm, „UV-B-Responsive Association of the Arabidopsis bZIP Transcription Factor ELONGATED HYPOCOTYL5 with Target Genes, Including Its Own Promoter”, *Plant Cell*, köt. 26, sz. 10, o. 4200–4213, okt. 2014.
- [42] S. Chattopadhyay, L. H. Ang, P. Puente, X. W. Deng, és N. Wei, „Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression”, *Plant Cell*, köt. 10, sz. 5, o. 673–683, máj. 1998.
- [43] J. Lee és mtsai., „Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development”, *Plant Cell*, köt. 19, sz. 3, o. 731–749, márc. 2007.
- [44] L.-H. Ang és mtsai., „Molecular Interaction between COP1 and HY5 Defines a Regulatory Switch for Light Control of Arabidopsis Development”, *Mol. Cell*, o. 10.
- [45] G. Li és mtsai., „Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in Arabidopsis”, *Nat. Cell Biol.*, köt. 13, sz. 5, o. 616–622, máj. 2011.
- [46] M. T. Osterlund, C. S. Hardtke, N. Wei, és X. W. Deng, „Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis”, *Nature*, köt. 405, sz. 6785, o. 462–466, máj. 2000.
- [47] S. N. Gangappa és J. F. Botto, „The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development”, *Mol. Plant*, köt. 9, sz. 10, o. 1353–1365, 10 2016.
- [48] C. Andronis, S. Barak, S. M. Knowles, S. Sugano, és E. M. Tobin, „The clock protein CCA1 and the bZIP transcription factor HY5 physically interact to regulate gene expression in Arabidopsis”, *Mol. Plant*, köt. 1, sz. 1, o. 58–67, 0 2008.
- [49] T. Oyama, Y. Shimura, és K. Okada, „The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl”, *Genes Dev.*, köt. 11, sz. 22, o. 2983–2995, nov. 1997.
- [50] A. Hall, L. Kozma-Bognár, R. Toth, F. Nagy, és A. J. Millar, „Conditional Circadian Regulation of PHYTOCHROME A Gene Expression”, *PLANT Physiol.*, köt. 127, sz. 4, o. 1808–1818, dec. 2001.
- [51] A. Palágyi és mtsai., „Functional Analysis of Amino-Terminal Domains of the Photoreceptor Phytochrome B1[C][W]”, *Plant Physiol.*, köt. 153, sz. 4, o. 1834–1845, aug. 2010.
- [52] M. R. Doyle és mtsai., „The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in Arabidopsis thaliana”, *Nature*, köt. 419, sz. 6902, o. 74, szept. 2002.
- [53] S. J. Clough és A. F. Bent, „Floral dip: a simplified method for Agrobacterium -mediated transformation of Arabidopsis thaliana”, *Plant J.*, köt. 16, sz. 6, o. 735–743, 1998.
- [54] H. Inoue, H. Nojima, és H. Okayama, „High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids”, *Gene*, köt. 96, sz. 1, o. 23–28, 0 1990.
- [55] B. Pope és H. M. Kent, „High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli.”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 24, sz. 3, o. 536–537, febr. 1996.
- [56] „Rapid mini-scale plasmid isolation for DNA sequencing and restriction mapping. - PubMed - NCBI”. [Online]. Elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rapid+mini-scale+plasmid+isolation+for+DNA+sequencing+and+restriction+mapping>. [Elérés: 17-máj-2019].
- [57] M. Haring, S. Offermann, T. Danker, I. Horst, C. Peterhansel, és M. Stam, „Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization”, *Plant Methods*, köt. 3, o. 11, szept. 2007.
- [58] B. Wenden, L. Kozma-Bognár, K. D. Edwards, A. J. W. Hall, J. C. W. Locke, és A. J. Millar, „Light inputs shape the Arabidopsis circadian system”, *Plant J. Cell Mol. Biol.*, köt. 66, sz. 3, o. 480–491, máj. 2011.
- [59] G. Li és mtsai., „Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in Arabidopsis”, *Nat. Cell Biol.*, köt. 13, sz. 5, o. 616–622, máj. 2011.
- [60] J. De Caluwé, Q. Xiao, C. Hermans, N. Verbruggen, J.-C. Leloup, és D. Gonze, „A Compact Model for the Complex Plant Circadian Clock”, *Front. Plant Sci.*, köt. 7, o. 74, 2016.
- [61] S. L. Harmer, S. Panda, és S. A. Kay, „Molecular Bases of Circadian Rhythms”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, köt. 17, sz. 1, o. 215–253, 2001.

- [62] S. Adams, I. Manfield, P. Stockley, és I. A. Carré, „Revised Morning Loops of the Arabidopsis Circadian Clock Based on Analyses of Direct Regulatory Interactions”, *PloS One*, köt. 10, sz. 12, o. e0143943, 2015.
- [63] J. M. Gendron, J. L. Pruneda-Paz, C. J. Doherty, A. M. Gross, S. E. Kang, és S. A. Kay, „Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 109, sz. 8, o. 3167–3172, febr. 2012.
- [64] J. Li és mtsai., „Arabidopsis Transcription Factor ELONGATED HYPOCOTYL5 Plays a Role in the Feedback Regulation of Phytochrome A Signaling”, *Plant Cell*, köt. 22, sz. 11, o. 3634–3649, nov. 2010.
- [65] R. Lin, L. Ding, C. Casola, D. R. Ripoll, C. Feschotte, és H. Wang, „Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in Arabidopsis”, *Science*, köt. 318, sz. 5854, o. 1302–1305, 0 2007.
- [66] D. Chen és mtsai., „Antagonistic Basic Helix-Loop-Helix/bZIP Transcription Factors Form Transcriptional Modules That Integrate Light and Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis”, *Plant Cell*, köt. 25, sz. 5, o. 1657–1673, máj. 2013.
- [67] Y. Jing és mtsai., „Arabidopsis Chromatin Remodeling Factor PICKLE Interacts with Transcription Factor HY5 to Regulate Hypocotyl Cell Elongation”, *Plant Cell*, köt. 25, sz. 1, o. 242–256, jan. 2013.
- [68] M. Kamioka és mtsai., „Direct Repression of Evening Genes by CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 in the Arabidopsis Circadian Clock”, *Plant Cell*, köt. 28, sz. 3, o. 696–711, márc. 2016.
- [69] E. Shor, I. Paik, S. Kangisser, R. Green, és E. Huq, „PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs) mediate metabolic control of the circadian system in Arabidopsis”, *New Phytol.*, köt. 215, sz. 1, o. 217–228, júl. 2017.
- [70] J. Shin, E. Park, és G. Choi, „PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis”, *Plant J. Cell Mol. Biol.*, köt. 49, sz. 6, o. 981–994, márc. 2007.
- [71] S. N. Gangappa és J. F. Botto, „The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development”, *Mol. Plant*, köt. 9, sz. 10, o. 1353–1365, 10 2016.
- [72] M. Holm, L.-G. Ma, L.-J. Qu, és X.-W. Deng, „Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis”, *Genes Dev.*, köt. 16, sz. 10, o. 1247–1259, máj. 2002.
- [73] R. Sibout, P. Sukumar, C. Hettiarachchi, M. Holm, G. K. Muday, és C. S. Hardtke, „Opposite root growth phenotypes of hy5 versus hy5 hyh mutants correlate with increased constitutive auxin signaling”, *PLoS Genet.*, köt. 2, sz. 11, o. e202, 0 2006.
- [74] H. Mi, A. Muruganujan, J. T. Casagrande, és P. D. Thomas, „Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system”, *Nat. Protoc.*, köt. 8, sz. 8, o. 1551–1566, 0 2013.
- [75] H. Mi és mtsai., „PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 45, sz. D1, o. D183–D189, 04 2017.

7. Saját közlemények

A dolgozat alapját képező közlemény:

Hajdu A*, **Dobos O***, Domijan M, Bálint B, Nagy I, Nagy F, Kozma-Bognár L (2018):
ELONGATED HYPOCOTYL 5 mediates blue light signalling to the Arabidopsis circadian clock.
Plant Journal doi: 10.1111/tpj.14106.

Egyéb közlemények:

Hajdu A, Terecskei K, Gyula P, Ádám É, Nyakó A, **Dobos O**, Kozma-Bognár L (2019): LIP1
regulates the plant circadian clock via the oscillator component GIGANTEA. Genes, 10
(közlésre elfogadva)

Hajdu A, Ádám É, Sheerin DJ, **Dobos O**, Bernula P, Hiltbrunner A, Kozma-Bognár L, Nagy
F.(2015): High-level expression and phosphorylation of phytochrome B modulates flowering
time in Arabidopsis. Plant Journal doi: 10.1111/tpj.12926.

*megosztott első szerzők

MTMT azonosító: 10052999

8. Összefoglaló

Az evolúciós siker egyik legfőbb kritériuma, hogy az élőlények a környezetük adta kihívásokat a lehető legkisebb energiaveszteséggel tudják átvészelni. A Föld forgásából adódóan több fontos környezeti paraméter (pl. fény, hőmérséklet) változása ritmikus jelleget mutat, így azon organizmusok, melyek e változások bekövetkeztét előre meg tudják jósolni, s ennek megfelelően tudják időzíteni anyagcsere folyamataikat és viselkedésüket, számottevő mennyiségű energiát tudnak megtakarítani, amelyet azután más, evolúciós szempontból hasznos folyamatokban tudnak kamatoztatni.

A szabályosan ismétlődő események között eltelt időt periódusnak nevezzük, s a biológiai ritmusokat ez alapján több csoportba lehet osztani. A cirkadián ritmusok – a latin „circa” (körülbelül) és „diem” (nap) szavaknak megfelelően - megközelítőleg egy napos (20-28h) periódust mutató ritmusok, melyeket az élőlények belső cirkadián órája diktál. Maga a cirkadián óra három fő egységből tevődik össze, melyek más-más fontos tulajdonságot kölcsönöznek a cirkadián ritmusok számára. Az óra magja, a „központi oszcillátor” egy önmagába visszatérő transzkripció/transzláció hálózat, melyben óragének és a róluk kifejeződő órafehérjék vesznek részt. Az óraelemek közötti interakciók külső hatás nélkül is lezajlanak, így a központi oszcillátorhoz kapcsolt élettani folyamatok akkor is ritmikusan működnek, ha az élőlény konstans környezeti körülmények közé kerül. Az óra második fontos egysége a kimenet. Az ezen egységbe tartozó géntermékek (és az általuk előidézett anyagcsere-folyamatok, viselkedési mintázatok) nem hatnak vissza a központi oszcillátor ritmusára. Közös jellemzőjük, hogy folytonos expressziójuk hatalmas erőforrás pazarlás lenne, mert géntermékeik hasznosulásának van egy optimuma a nap folyamán, amelyen kívül a termelés megtérülési rátája elmaradna a maximumtól. A génkifejeződés megfelelő időablakra való korlátozásával mindezen energia megtakarítható. A harmadik egység, a bemenet olyan jelátviteli hálózatok összessége, amelyek a cirkadián szempontból is jelentős környezeti szignálokat, ún „zeitgebereket” monitorozzák, s az azok ritmusához igazítják a központi oszcillátor által kialakított (nem teljesen 24 órás) ritmust. Ez a szinkronizáció, melyet „entrainment”-ként is nevezünk, molekuláris szinten úgy nyilvánul meg, hogy a bemeneti jelátvitel egyes óraelemek transzkripcióját/transzlációját serkenti vagy gátolja,

aminek eredményeképpen az óraelemek közötti interakciók erőssége és sebessége megváltozik, végeredményben pedig az óra által diktált ritmus felgyorsul/lelassul.

A növények számára a legfontosabb zeitgeber a fény, hiszen számukra a fény nemcsak információ-, hanem éltető energiaforrás is, így e paraméter monitorozása és a hozzá való igazodás döntő fontossággal bír. A fény-jelátviteli lánc azon tagjainak azonosítása, melyek a cirkadián óra felé is továbbítanak információt, jelenleg is intenzíven kutatott terület. Az elmúlt években számos receptort és jelátviteli intermediert sikerült e vonatkozásban megnevezni, azonban még mindig keveset tudunk arról, hogy melyek azok a bemeneti elemek, amelyek közvetlenül hatnak az óragének kifejeződésére, s ily módon direkt kapocsként szolgálnak a bemenet és a központi oszcillátor között.

Az egyik lehetséges jelölt erre a szerepkörre a HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) bZIP transzkripciósfaktor, mely leginkább ACGT-motívumot (ACE-elemet) tartalmazó promoterekhez kötődve fejt ki génexpressziós változást [71]. Homológjával, a HYH-al (HY5 HOMOLOG) részben átfedő funkciókat látnak el, de a HY5 szerepe meghatározóbbnak tűnik a növényi élettani folyamatokban: a fotomorfogenezis egyik alapvető pozitív szabályozójaként számos fény- és hormonális jelátviteli útvonal integrátora [42], [72], [73]. Emellett fontos szerepe van a flavonoid- és terpenoid szintézis indukciójában, a növény hideghez való akklimatizációjában, a különböző tápanyagok asszimilációjában [47]. Ahhoz, hogy mindezen funkciók egyidejű működtetése ne szenvedjen zavart, a HY5 valószínűleg különböző komplexek tagjaként fejt ki hatását, erre utal az a tény is, hogy a hagyományos transzkripciósfaktoroktól eltérően a HY5 nem rendelkezik aktivációs doménnel [44], [45].

A fény-jelátvitel központi elemeként, és mint transzkripciósfaktor a HY5 ideális jelöltnek bizonyult arra, hogy bizonyos óragének expressziójának megváltoztatásával közvetlen szabályozója legyen az óra fény általi beállításának, szinkronizációjának, azonban e kérdéskörben egymásnak ellentmondó tanulmányokat találunk a szakirodalomban. Az bizonyított volt, hogy a HY5 több óragén promoteréhez is (*TOC1*, *CCA1*, *LHY*, *ELF4*) is képes kötni fehér fényben [43], s az *ELF4* esetében annak transzkripcióját is aktiválja [45]. Ennek ellenére más tanulmányokban a *hy5 hyh* mutáns vonal cirkadián ritmusa nem különbözött a vad [39]. Dolgozatomban azt a célt tűztem ki, hogy az említett ellentmondásokat megvizsgálva és feloldva azokat tisztázzam, hogy a HY5 és homológja valóban képesek-e

hatni a növényi cirkadián óra működésére, és amennyiben van óra-asszociált funkciójuk, úgy azt milyen molekuláris mechanizmussal és környezeti feltételek mellett töltik be.

A munkánkat megelőző kísérletek során folyamatos fehér fényben vizsgálták a *hy5* mutáns és vad típusú vonalak periódusát. Mint tudjuk, a fehér fény többféle hullámhosszú fény keverékeként számos növényi receptort és jelátviteli folyamatot is képes aktiválni, a HY5 pedig mindezen jelátviteli utak szabályozásában egyidejűleg részt vesz [44], s képes azok információit integrálni. Éppen emiatt azt feltételeztük, hogy a tanulmányokban alkalmazott fehér fény különböző hullámhossz-összetétele magyarázat lehetett az eltérő eredményekre. Ennek megfelelően a fehér fényt a növények számára külön-külön is értelmezhető tartományaira bontottuk fel, s így folyamatos kék (BL), vörös (RL) és távoli vörös (FR) fényben is megmértük a *hy5*, *hyh* mutáns és a vad típusú (WT) vonalak periódusát. A kísérleti módszerünk (óra-vezérelt expressziójú luciferáz markerek nyomonkövetése) nem tette lehetővé, hogy távoli vörös fényben is összehasonlíthassuk az említett vonalak cirkadián ritmusát, de sikeresen kimutattuk, hogy kék fényben a *hy5* és a *hyh* mutánsok periódusa rövidebb a WT növényekhez képest, vagyis a HY5 és HYH kék fényben lassítja a cirkadián óra ritmusát. Vörös fényben a periódusok különbsége elhanyagolható volt, fehér fényben pedig egy középértékű fenotípust kaptunk, ami egy várható eredmény volt annak tükrében, hogy a fehér fény kék és vörös hullámhosszú fényt is tartalmaz. Mindez arra utal, hogy a HY5 és HYH valóban részt vesz a cirkadián óra fény általi szabályozásában, s ebben a különböző hullámhossz-tartományok aránya fontos tényező.

Transzkripció faktorokként a HY5 és HYH nagy valószínűséggel óragének promoter-régiójához kötve, azok transzkripció rátájának megváltoztatásával hatnak a növényi cirkadián ritmus sebességére. ChIP seq adatainkból több fontos információt nyertünk ki. Az egyik érdekes megfigyelésünk az volt, hogy a HY5 szinte valamennyi óra- és óra-asszociált gén promoterénél megtalálható volt. Ezen megfigyelésünket EMSA *in vitro* kísérletünk úgy árnyalta tovább, hogy a HY5 valószínűleg ezen promoterek cisz-elemeihez kötődik. A ChIP kísérletek egy további fontos eredménye, hogy bár a vörös fényhez képest kék fényben a HY5 nagyrészt ugyanazon gének promoteréhez köt, az asszociáció mértéke erősebb. Hogy e jelenség hátterét megmagyarázzuk, megvizsgáltuk a HY5 és HYH transzkripció és poszt-transzkripció szintjét kék és vörös fényben, amelyek azt mutatták, hogy a kék fény mindkét szinten erősíti a HY5 és HYH expresszióját. Az ebből következő magasabb HY5 és HYH

fehérjeszint magyarázatot adhat az erősebb mértékű kromatin-asszociációra, illetve a *hy5*, *hyh* mutánsok cirkadián fenotípusának kékfény-specifikus jellegére is.

Bár a HY5 szinte valamennyi óra- és óra-asszociált gén promoter régiójánál jelen van, mRNS-expressziós kimutatásaink alapján elmondhatjuk, hogy a HY5 csupán három óragén (*PRR5*, *LUX*, *BOA*) transzkripció rátáját befolyásolja, mégpedig negatív irányban. Ez az eredmény elsőre nem illeszkedik a korábbi eredményeink sorába, ugyanis a *hy5 hyh* mutáns cirkadián hálózatának matematikai modellezése (azaz a *PRR5*, *LUX* és *BOA* fokozott transzkripciója) hosszú periódusú fenotípust jósolt, ami épp az ellentéte az általunk mért rövid periódusnak. Ugyanez a modell megnövekedett *CCA1* mRNS-szinteket is becsült, amelyeket semmilyen kísérleti körülményben nem észleltünk a *hy5 hyh* mutánsban. Érdekes módon, amikor a szimulációs programban a *CCA1* mRNS-szinteket (a tapasztaltaknak megfelelő) WT-szerű szintre állítottuk, a szimuláció rövidebb periódust adott a WT-nél, az alapkísérletünk eredményeivel összhangban. Ez arra utalhat, hogy a HY5 valójában a *CCA1* génátírására is hatással van, csupán e kölcsönhatás nem kimutatható, mert a HY5 egyidejűleg olyan szabályozásokat is végrehajt a cirkadián hálózat egyéb pontjain, melyek összességében a HY5 *CCA1*-re gyakorolt hatását kioltják. Amennyiben e gondolatmenetet helytálló, úgy az is elképzelhető, hogy ez az eset a cirkadián óra más elemeinél is fennáll, vagyis a HY5 a *PRR5*, *LUX* és *BOA* géneken kívül számos más ponton keresztül is összekötheti a kékfény-függő bemenetet a cirkadián oszcillátorral.

A munkánkat megalapozó alapkísérlet egy másik fontos megfigyelése az volt, hogy a *hy5* és *hyh* mutánsok periódus-csökkenése kiváltképp olyan növények esetében volt mérhető, melyek alacsony cukorkoncentrációjú médiumon voltak nevelve, magasabb szacharóztartalmú növények esetében a perióduskülönbség sokkal csekélyebb volt. Mivel a növények cukor-ellátottságot monitorozó rendszere a cirkadián óra felé is szolgáltat információkat, úgy gyanítottuk, hogy a cukor-bemenet valamilyen ponton, és valamilyen módon zavarhatja a fény-bemenet HY5-függő ágát. Ennek tisztázása érdekében magas és alacsony szacharóz-tartalmú médiumon nőtt növényeknél vizsgáltuk, hogyan változik a *hy5* mutáns növények mRNS-profilja, a bennük expresszáldó HY5 transzkripció és poszt-transzkripció rátája, valamint annak kromatin-asszociációs képessége. Eredményeink alapján a cukor jelenléte/hiánya egyik aspektusban sem érintette a HY5 működését, így

további kísérletek szükségesek a *hy5* cirkadián fenotípus cukorfüggésének megmagyarázához.

9. Summary

One of the major criteria for evolutionary success is that organisms can overcome the challenges of their environment with minimal energy loss. Because of the rotation of the Earth, changes in several important environmental parameters (such as light, temperature) show a rhythmic nature, so organisms that can predict these changes in advance, and thus timing their metabolic processes and behaviors, can save a significant amount of energy.

The time between regular events is called a period, and biological rhythms can be divided into several groups. Circadian rhythms - according to the Latin words "circa" (approximately) and "diem" (day) - are rhythms with a period of approximately one day (20-28h), dictated by the internal circadian clock of the organisms. The circadian clock itself is made up of three main units. The core of the clock, the "central oscillator", is a recurring transcription / translation network in which clock genes and their clock proteins are involved. The interactions between the clock elements take place without any external influence, so the physiological processes connected to the central oscillator operate rhythmically even when the organism is placed under constant environmental conditions. The second important unit of the clock is the output. The gene products of this unit (and the metabolic processes and behavioral patterns they control) do not affect the rhythm of the central oscillator. Their common feature is that their continuous expression would be a huge waste of resources, because their gene products have an optimal utilization at a particular time of the day, outside of which the rate of return on production is below maximum. By limiting gene expression to an appropriate time window, part of this energy can be saved. The third unit, the input, is a set of signaling networks that monitor significant daily environmental signals, the so-called "zeitgebers", and adjust the pace and phase of the central oscillator according to the environmental light and thermal cycles. This synchronization, also called "entrainment", at least in part occurs at the molecular level by stimulating or inhibiting the transcription / translation of certain clock elements, resulting in a change in the level of clock components and hence, in the pace of the clock.

For plants, light is the most important zeitgeber, as light is not only a source of information but also a source of energy, so monitoring and adjusting to this parameter is crucial.

Identification of members of the light-signaling chain that transmit information to the circadian clock is an area of intensive research. In recent years, many receptors and signaling intermediates have been identified in this regard, but little is known about the input elements that directly affect the expression of clock genes and thus act as a direct link between the input and the central oscillator.

One potential candidate for this role is the HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) bZIP transcription factor, which binds to promoters containing the ACGT motif (ACE element) [71]. It has some overlapping functions with its homologue, HYH (HY5 HOMOLOG), but the role of HY5 appears to play a more prominent role in plant physiology: as an essential positive regulator of photomorphogenesis, it is an integrator of several light and hormonal signaling pathways [42], [72], [73]. It also plays an important role in inducing flavonoid and terpenoid synthesis, acclimatizing the plant to cold, and assimilating various nutrients [47]. In order to avoid disruption of the simultaneous operation of all these functions, HY5 is likely to act as a member of different complexes, as suggested by the fact that, unlike traditional transcription factors, HY5 does not possess a transcriptional activation domain [44], [45].

As a central component of light signalling, and as a transcription factor, HY5 has been shown to be an ideal candidate for direct control of clock light tuning and synchronization by altering the expression of certain clock genes, but contradictory studies can be found in the literature. It has been demonstrated that HY5 binds to several clock gene promoters (*TOC1*, *CCA1*, *LHY*, *ELF4*) in white light [45] and also activates transcription of the clock gene *ELF4* [46]. However, in other studies, the circadian rhythm of the *hy5 hyh* mutant line did not differ from the wild type [39]. In my dissertation, I set out to investigate and resolve these inconsistencies to determine whether HY5 and its homologue are capable of influencing plant circadian clock function and, if they have clock-associated function, identify the molecular mechanism and environmental conditions under which they operate.

Prior to our work, the period of *hy5* mutant and wild-type lines was examined in continuous white light. As we know, white light, as a mixture of multiple wavelengths of light, can activate many plant receptors and signalling pathways, and HY5 is involved in the regulation of all these signalling pathways simultaneously [44] and is able to integrate their

information. For this reason, we hypothesized that the different wavelength compositions of the white light used in the studies may have explained the different results.

Accordingly, the white light was subdivided into different ranges that could be interpreted individually by the plants, and the function of the clock (e.g. free-running period) was monitored in *hy5*, *hyh*, *hy5 hyh* mutants and wild-type (WT) lines in continuous blue (BL), red (RL), and distant red (FR) light. Our experimental method (tracing of luciferase markers with clock-driven expression) did not allow us to compare the circadian rhythms of these lines in FR light, but we successfully demonstrated that the period of *hy5* and *hyh* mutants in blue light is shorter than that of the WT plants. This indicates that HY5 and HYH decelerate the circadian clock in blue light. In red light, the difference in periods was negligible, and in white light a moderate phenotype was obtained, as expected, given that white light contains blue and red wavelengths. This suggests that HY5 and HYH are indeed involved in light control of the circadian clock, and the proportion of different wavelength ranges is important.

As transcription factors, HY5 and HYH are most likely bound to the promoter region of clock genes and affect the rate of plant circadian rhythm by altering their transcription rate. This hypothesis was addressed by a ChIP-seq approach. One of our interesting observations was that HY5 was found to be associated with the promoters of almost all clock and clock-associated genes. This observation was further refined by our *in vitro* EMSA experiment demonstrating that HY5 is likely to bind to specific G-box-like *cis*-elements located in these promoters. Another important result of the ChIP experiments is that although HY5 binds to the promoter of almost the same gene set in red and blue light, the strength of association is significantly greater in blue light. To explain this phenomenon, we examined the transcriptional and post-transcriptional regulation of HY5 and HYH accumulation in blue and red light, which showed that blue light enhances the expression of HY5 and HYH at both levels. The resulting higher levels of HY5 and HYH protein may also explain the stronger association with chromatin and the blue-specificity of the circadian phenotype of *hy5 hyh* mutants.

Although HY5 is present in the promoter regions of almost all clock and clock-associated genes, our mRNA expression studies indicate that HY5 only affects the transcription rate of three clock genes (*PRR5*, *LUX*, *BOA*) negatively. This result does not fit for the first time with

our previous results, since mathematical modelling of the circadian network of the *hy5 hyh* mutant (i.e. increased transcription of *PRR5*, *LUX* and *BOA*) predicted a long-period phenotype, which is the opposite of the short period we observed. The same model also estimated increased levels of *CCA1* mRNA, which was not detected in the *hy5 hyh* mutant under any experimental conditions. Interestingly, when the *CCA1* mRNA levels were set to WT-like levels in the simulation program (along with increased transcription of *PRR5*, *LUX* and *BOA*), the simulation gave a shorter period than for the WT plant, consistent with our results. This information may suggest that HY5 actually affects *CCA1* gene transcription, but this interaction is not detectable, since HY5 simultaneously regulates other parts of the circadian network that suppress, in general, the effect of HY5 on *CCA1*. If this line of reasoning is correct, this may also be the case with other elements of the circadian clock, meaning that HY5 can connect the blue light dependent input to the circadian oscillator through a number of other points besides the *PRR5*, *LUX* and *BOA* genes.

Another important observation of the basic experiment in which our work was based was that the period shortening in the *hy5 hyh* mutants was measurable especially in plants grown on low-sucrose media, while in plants grown on higher sucrose, the difference in period was much smaller. Because the plant's sugar supply monitoring system also provides information toward the circadian clock, we suspected that the sugar input may interfere at some point with the HY5-dependent branch of the light input. To test this idea, we examined transcriptional and post-transcriptional control of *HY5* and *HYH* expression as well as chromatin association of HY5 in plants grown on high and low sucrose media. According to our results, the presence / absence of sugar did not affect the function of HY5 in any aspect, therefore, further experiments are needed to explain the sugar dependence of the *hy5* circadian phenotype.

10. Köszönetnyilvánítás

„If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants”

Isaac Newton

Köszönöm szépen Dr. Nagy Ferencnek, hogy szakdolgozói és doktori éveim alatt csoportunkat a lehető legmagasabb nivójú szellemi és anyagi erőforrásokkal támogatta és vezette. Köszönöm, hogy proaktív attitűdömet, őszinteségemet és lelkesedésemet fontos értékeknek nevezte, és hogy mindig fordulhattam hozzá a legelképesztőbb kéréseimmel is.

Kiemelten szeretném témavezetőmnek, Dr. Kozma-Bognár Lászlónak megköszönni, hogy csoportjuk tagja és diákja lehettem eddigi munkásságom alatt. Személyében az egyik legerősebb oktatói vénával rendelkező tanáromat tisztelhetem, szaktudása, csapatszellem és türelme mind-mind alapkövek voltak közös munkánk sikerességéhez. Kívánom, hogy a jövőben még sok fiatal kutatótársam osztozzon szerencsémben, hogy doktorandusz hallgatója lehettem.

Szintén kiemelt köszönettel tartozom Dr. Hajdu Anitának, hogy a laboratóriumi mindennapokban végig kitűnő példával járt előttem. Neki köszönhetem, hogy rájöttem, milyen esszenciális kvalitás a jó kutató számára a pontos jegyzőkönyv és leltár, a gondos tervezés és a kimondott kritika mind a kollégáink, mind a saját teljesítményünkkel szemben.

Köszönöm szépen Dr. Viczián Andrásnak, hogy példás szakmai körültekintése mellett olyan kihívások megbeszélésében és megoldásában is segítő jobbot adott, melyekkel a doktorandusz hallgatók a tankönyvekben nem találkoznak. Köszönöm a közös munkát az új módszerek átvétele és megteremtése során egyaránt, mellyel egy rugalmasabb, precízebb és kreatívabb szakemberré válhattam.

Nagy köszönet illeti a csoportunk összes további jelenlegi és volt tagját is, hogy körükben lehettem része első ízben egy igazi szakmai közösségnek. Pozitív hozzáállásuk, szakmai tudásuk és munkabíráskuk mindenki számára példaértékű lehet.

Nagy hálával gondolok az orosházi Vörösmarty Mihály Általános Iskola tantestületének tagjaira is. Külön köszönöm Horváth Antal, Tompa Lajos, Orosz László és Ilovszky Árpád tanár uraknak, hogy legfiatalabb diákéveimben olyan szellemi és emberi értékeket tanítottak nekem, melyek nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm szépen Bartáné Németh Ilona tanárnőnek, hogy gimnáziumi éveim alatt a vasat acéllá kovácsolta, a gyomokat kiirtotta, és hogy a legelső perctől a legutolsóig olyan potenciált látott meg és hozott elő belőlünk, aminek még a létezéséről sem tudtunk.

Köszönöm osztálytársaimnak és barátaimnak, hogy utam minden eddigi lépésénél bátorítottak és ösztönöztek. Köszönöm a hálót, mellyel megtartottak a legnehezebb időszakokban is, és köszönöm színes karaktereiket, őszinteségüket és változatos meglátásaikat. Mindezek fontos feltételei voltak a dolgozatom elkészítésének.

Szeretném hatalmas hálámat kifejezni családom tagjainak. Köszönöm szüleimnek, hogy a lehető legjobb nevelést kaptam, amit gyermek kaphat. Köszönöm Péterné Dobos Ilonának és Péter Józsefnek, hogy második szüleimként biztosították mindazon jókedvet, dorgálást (és gyakran fizikai túlélési feltételeket) amelyek nélkül messze nem értem volna el ilyen nivójú teljesítményeket. Végül pedig köszönöm Danka Tivadarnak, hogy társamként és lelki exoskeletonomként mindvégig mellettem állt, a legnagyobb mélységekben és magasságokban egyaránt.

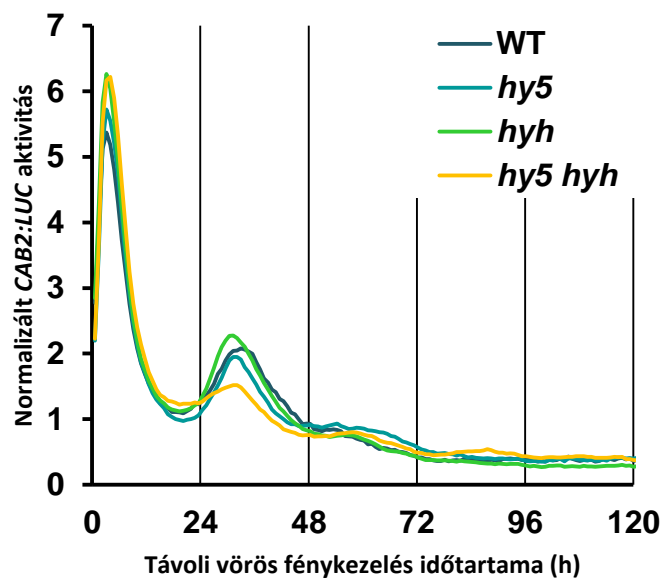
Dolgozatom a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal által odaítélt GINOP-2.3.2-15-2016-00001, GINOP-2.3.2-15-2016-00015, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00032 számú pályázatok nélkül nem készülhetett volna el. Munkámat az MTA Fiatal Kutató ösztöndíjjal segítette.

11. Mellékletek

Primer neve		Szekvencia (5' - 3' irányban)
HY5	RT Fwd	CAGGCGACTGTCGGAGAAAGTCAAAGG
	RT Rev	TCAACAACCTCTTCAGCCGCTTGTTCTC
HYH	RT Fwd	ATTCTCTCAACCTCTTACCTCTC
	RT Rev	AACTCCTCATCACTTTCCTCAG
PRR5	RT Fwd	GTGTATGTTGAAAGGTGCGG
	RT Rev	AGGAGCAAGTGAAGTTTGTC
LUX	RT Fwd	GACGATGATTCTGATGATAAGG
	RT Rev	CAGTTTATGCACATCATATGGG
BOA	RT Fwd	ACATATCCTTCTGTTGGTGGT
	RT Rev	CATAAGCCAAGAACCAGTATCTC
CCA1	RT Fwd	CTGTGTCTGACGAGGGTCGAA
	RT Rev	ATATGTAAACTTTGCGGCAATACCT
LHY	RT Fwd	CAACAGCAACAACAATGCAACTAC
	RT Rev	AGAGAGCCTGAAACGCTATACGA
PRR9	RT Fwd	GCCTTCTCAAGATTTGAGGAAAGC
	RT Rev	TTGGCTCACCTGAAGTACTCTC
PRR7	RT Fwd	GTAGAAACTGTGATCTGGCCCTG
	RT Rev	GCACATTCCGATCATCCCTAA
RVE8	RT Fwd	GAAACCATATACCATCACCAAGTC
	RT Rev	TTCAATCTTCTTCCAGTCACGA
RVE4	RT Fwd	TATCTTCTTGACGACTTCTTGCTC
	RT Rev	ATGTTCTCTTGTGTTGTGACGA
RVE6	RT Fwd	CTGACTTTGAGGATCATAGACGG
	RT Rev	CAGGTGGGTCTTTGTTTAAGGT
PRR3	RT Fwd	AGGAATGAAAGTGGGAGTAGTG
	RT Rev	ATTGATTTGAAGGCGAGGTG
TOC1	RT Fwd	ATCTTCGCAGAATCCCTGTGATA
	RT Rev	GCACCTAGCTTCAAGCACTTTACA
CHE	RT Fwd	GTTGACGGAAGAGGAAGAAGG
	RT Rev	TTGACCATCGGACTTGTGAC
ELF3	RT Fwd	CCATTGCCAATCAACAAAGAG
	RT Rev	CTGATCTCATCGAGCAAGAG
ELF4	RT Fwd	CGACAATCACCAATCGAGAATG
	RT Rev	AATGTTTCCGTTGAGTTCTTGAATC

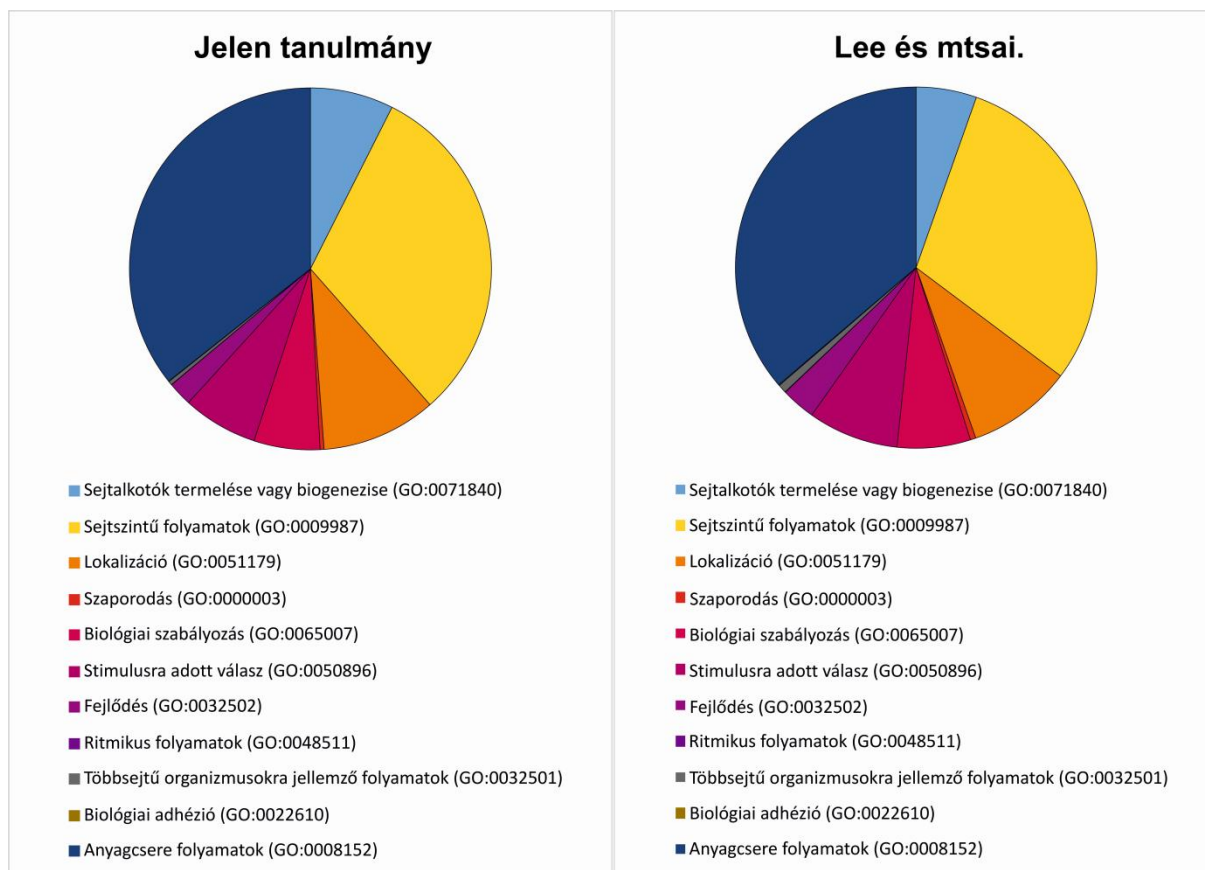
Primer neve		Szekvencia (5' - 3' irányban)
ZTL	RT Fwd	GGTATCGTGCTGAGGAAGTT
	RT Rev	TCGGAAACAACCATAGAGTCA
GI	RT Fwd	AATTCAGCACGCGCCTATTG
	RT Rev	GTTGCTTCTGCTGCAGGAACCT
LKP2	RT Fwd	CTCTTGAACTGACAACCCT
	RT Rev	AGAATCTACCATTGGATGCCT
FKF1	RT Fwd	AAGTCTTCACTGGCTATCGT
	RT Rev	TCTCAGATACAACCACAGGA
SKIP	RT Fwd	TAGTAATATAGCAAGGCAATCGGG
	RT Rev	ATCTACAGGCATCTCCACCA
LNK1	RT Fwd	CCTCAGACTCATCTCTTTCATCC
	RT Rev	TTCCTCTTGTTTCTCTATCCTCAG
LNK2	RT Fwd	TCTGTCATCCCAAAGTGTCC
	RT Rev	TTGTTGATATGGCTGGTCCT
JMJD5	RT Fwd	TACTCCGTTACACCATGATCC
	RT Rev	AGAGCATTGTCTCAGAGTAAGG
LWD1	RT Fwd	GCATCCTTATCCACCAACGA
	RT Rev	ATCAGCGATTCTCCATAAACGA
LWD2	RT Fwd	CGATTATCTACGAGAGTGGTGAG
	RT Rev	TGCCCATGATAACAGTAGCC
TEJ	RT Fwd	AGAAACTACTGCGTCACACC
	RT Rev	ACACCATCATCTTCATGATCCT
TIC	RT Fwd	CTCAAATCCTCAGACTCTTCCTC
	RT Rev	TCTCGGCTTCTTTCTCTTAGG
XCT	RT Fwd	ATCTGGTCTTCTCCAATTCGG
	RT Rev	ATTAACCCTCTTCTCCACATACTC
COP1	RT Fwd	TCACAAGGAAATCACGAGAC
	RT Rev	CTATCACTCTTCCAGCAAACC
TUB2/3	RT Fwd	CCAGCTTTGGTGATTTGAAC
	RT Rev	CAAGCTTTCGGAGGTCAGAG

1. melléklet. A valós idejű PCR-hoz használt primerek jegyzéke.



2. melléklet. A *CAB2:LUC* riportergén alacsony amplitudóval operál folyamatos távoli vörös fényben.

A *CAB2:LUC* expressziót vad típusú *Ws* (WT), *hy5*, *hyh* és *hy5 hyh* növényekben követtük nyomon. Ezen vonalakat 7 napon át neveltük 12:12 órás sötét/fény ciklusokon, majd $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitású távoli vörös fényen tartottuk őket, monitorozva lumineszcenciájukat.



3. melléklet. A jelen tanulmány, valamint a Lee és mtsai. (2007) által azonosított HY5-kötő gének funkcionális kategóriák szerint történő csoportosítása.

4. melléklet: kék és/vörös fénykezelés hatására megjelenő gének (BL+RL) adathalmaza

Analízis módja: PANTHER felülreprezentáltsági teszt (kiadás dátuma: 2017.04.13.)

Annotation Version and Release Date:	GO Ontology database Released 2017-08-14				
Analyzed List:	BL+RL (Arabidopsis thaliana)				
Reference List:	Arabidopsis thaliana (all genes in database)				
Bonferroni correction:	TRUE				
Bonferroni count:	2166				
GO biological process complete	Arabidopsis thaliana - REFLIST (27060)	BL+RL (6911)	BL+RL (expected)	BL+RL (fold Enrichment)	BL+RL (P-value)
response to UV-B (GO:0010224)	60	36	15.32	2.35	9.93E-03
circadian rhythm (GO:0007623)	85	47	21.71	2.17	3.57E-03
rhythmic process (GO:0048511)	102	56	26.05	2.15	4.88E-04
protein dephosphorylation (GO:0006470)	80	43	20.43	2.1	1.87E-02
response to karrikin (GO:0080167)	103	55	26.31	2.09	1.43E-03
chloroplast organization (GO:0009658)	100	53	25.54	2.08	2.78E-03
plastid organization (GO:0009657)	136	69	34.73	1.99	3.84E-04
small molecule catabolic process (GO:0044282)	110	54	28.09	1.92	1.90E-02
response to cadmium ion (GO:0046686)	261	117	66.66	1.76	2.84E-05
response to water deprivation (GO:0009414)	232	101	59.25	1.7	9.68E-04
response to water (GO:0009415)	240	103	61.29	1.68	1.41E-03

vesicle-mediated transport (GO:0016192)	271	114	69.21	1.65	9.56E-04
response to osmotic stress (GO:0006970)	447	187	114.16	1.64	3.85E-07
response to salt stress (GO:0009651)	403	168	102.92	1.63	4.00E-06
intracellular protein transport (GO:0006886)	282	117	72.02	1.62	1.31E-03
response to metal ion (GO:0010038)	364	151	92.96	1.62	3.45E-05
cellular macromolecule localization (GO:0070727)	338	139	86.32	1.61	2.02E-04
response to inorganic substance (GO:0010035)	682	278	174.18	1.6	2.67E-10
cellular protein localization (GO:0034613)	314	126	80.19	1.57	2.58E-03
cofactor metabolic process (GO:0051186)	280	112	71.51	1.57	1.11E-02
response to alcohol (GO:0097305)	410	163	104.71	1.56	1.39E-04
response to abscisic acid (GO:0009737)	406	161	103.69	1.55	1.94E-04
protein transport (GO:0015031)	470	186	120.04	1.55	2.34E-05
intracellular transport (GO:0046907)	410	162	104.71	1.55	2.20E-04
establishment of protein localization (GO:0045184)	474	187	121.06	1.54	2.66E-05
response to cold (GO:0009409)	277	109	70.74	1.54	2.87E-02
small molecule biosynthetic process (GO:0044283)	479	188	122.33	1.54	3.47E-05
establishment of localization in cell (GO:0051649)	424	166	108.29	1.53	2.70E-04
protein localization (GO:0008104)	497	194	126.93	1.53	3.04E-05
response to abiotic stimulus (GO:0009628)	1492	578	381.05	1.52	4.55E-19
response to lipid (GO:0033993)	559	216	142.77	1.51	1.04E-05
response to light stimulus (GO:0009416)	563	217	143.79	1.51	1.16E-05

cellular localization (GO:0051641)	519	200	132.55	1.51	4.59E-05
response to temperature stimulus (GO:0009266)	405	156	103.44	1.51	1.57E-03
regulation of response to stimulus (GO:0048583)	403	154	102.92	1.5	2.84E-03
response to radiation (GO:0009314)	582	221	148.64	1.49	2.65E-05
response to bacterium (GO:0009617)	342	129	87.35	1.48	3.47E-02
peptide transport (GO:0015833)	528	195	134.85	1.45	1.14E-03
response to acid chemical (GO:0001101)	882	324	225.26	1.44	3.99E-07
response to oxygen-containing compound (GO:1901700)	1139	417	290.9	1.43	1.43E-09
amide transport (GO:0042886)	533	195	136.13	1.43	2.06E-03
organophosphate metabolic process (GO:0019637)	420	153	107.27	1.43	3.51E-02
organelle organization (GO:0006996)	863	312	220.41	1.42	4.19E-06
response to endogenous stimulus (GO:0009719)	1209	429	308.77	1.39	4.22E-08
response to hormone (GO:0009725)	1202	426	306.99	1.39	5.80E-08
response to organic substance (GO:0010033)	1466	510	374.41	1.36	9.12E-09
shoot system development (GO:0048367)	604	210	154.26	1.36	2.01E-02
response to chemical (GO:0042221)	2091	727	534.03	1.36	1.57E-13
carboxylic acid metabolic process (GO:0019752)	739	256	188.74	1.36	2.94E-03
cellular response to stress (GO:0033554)	586	202	149.66	1.35	4.79E-02

small molecule metabolic process (GO:0044281)	1193	410	304.69	1.35	5.16E-06
macromolecule localization (GO:0033036)	695	238	177.5	1.34	1.45E-02
nitrogen compound transport (GO:0071705)	674	229	172.14	1.33	3.48E-02
organic acid metabolic process (GO:0006082)	849	287	216.83	1.32	4.64E-03
oxoacid metabolic process (GO:0043436)	847	286	216.32	1.32	5.26E-03
post-embryonic development (GO:0009791)	1108	362	282.98	1.28	4.90E-03
cellular component organization (GO:0016043)	1658	539	423.45	1.27	2.95E-05
system development (GO:0048731)	1367	438	349.13	1.25	3.02E-03
transport (GO:0006810)	1738	556	443.88	1.25	1.32E-04
establishment of localization (GO:0051234)	1754	561	447.96	1.25	1.18E-04
localization (GO:0051179)	1817	579	464.05	1.25	1.14E-04
cellular response to stimulus (GO:0051716)	1976	627	504.66	1.24	5.47E-05
cellular biosynthetic process (GO:0044249)	3278	1038	837.19	1.24	8.80E-10
organic cyclic compound biosynthetic process (GO:1901362)	2019	639	515.64	1.24	5.66E-05
heterocycle biosynthetic process (GO:0018130)	1832	579	467.88	1.24	3.20E-04
aromatic compound biosynthetic process (GO:0019438)	1898	597	484.74	1.23	3.68E-04
organic substance biosynthetic process (GO:1901576)	3361	1057	858.38	1.23	2.53E-09
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	1845	580	471.2	1.23	5.98E-04

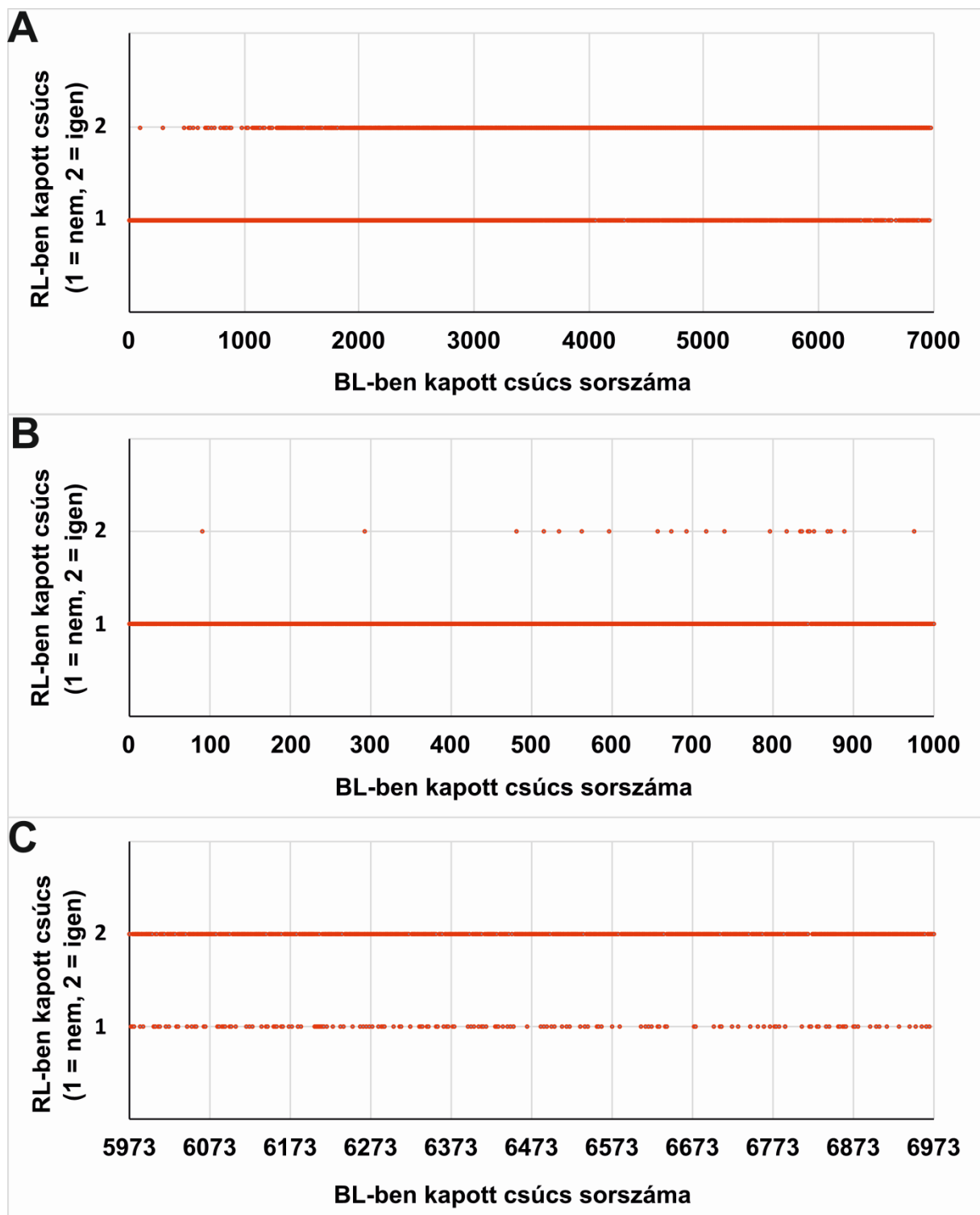
signal transduction (GO:0007165)	1373	430	350.66	1.23	3.03E-02
developmental process (GO:0032502)	2332	729	595.58	1.22	3.52E-05
multicellular organism development (GO:0007275)	1961	613	500.83	1.22	5.45E-04
biosynthetic process (GO:0009058)	3580	1112	914.32	1.22	1.06E-08
organic cyclic compound metabolic process (GO:1901360)	3047	944	778.19	1.21	1.03E-06
cell communication (GO:0007154)	1553	481	396.63	1.21	2.73E-02
cellular aromatic compound metabolic process (GO:0006725)	2927	906	747.54	1.21	2.93E-06
heterocycle metabolic process (GO:0046483)	2818	871	719.7	1.21	8.32E-06
response to stimulus (GO:0050896)	4604	1421	1175.84	1.21	2.38E-11
anatomical structure development (GO:0048856)	2181	672	557.02	1.21	9.41E-04
regulation of gene expression (GO:0010468)	2182	668	557.27	1.2	2.31E-03
regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	1955	598	499.3	1.2	9.67E-03
regulation of transcription, DNA-templated (GO:0006355)	1931	590	493.17	1.2	1.27E-02
cellular macromolecule biosynthetic process (GO:0034645)	2233	682	570.3	1.2	2.38E-03
regulation of RNA biosynthetic process (GO:2001141)	1932	590	493.42	1.2	1.34E-02
regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903506)	1932	590	493.42	1.2	1.34E-02

regulation of biosynthetic process (GO:0009889)	2120	647	541.44	1.19	5.02E-03
nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0006139)	2581	787	659.18	1.19	4.08E-04
regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031326)	2103	641	537.1	1.19	6.52E-03
regulation of nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0019219)	1990	606	508.24	1.19	1.37E-02
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	3216	979	821.35	1.19	1.32E-05
cellular metabolic process (GO:0044237)	6383	1942	1630.19	1.19	5.77E-15
multicellular organismal process (GO:0032501)	2134	649	545.01	1.19	7.33E-03
macromolecule biosynthetic process (GO:0009059)	2273	691	580.51	1.19	3.62E-03
regulation of cellular macromolecule biosynthetic process (GO:2000112)	2056	625	525.09	1.19	1.18E-02
response to stress (GO:0006950)	2619	796	668.88	1.19	5.53E-04
regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010556)	2057	625	525.35	1.19	1.25E-02
regulation of metabolic process (GO:0019222)	2433	739	621.38	1.19	1.71E-03
regulation of macromolecule metabolic process (GO:0060255)	2296	697	586.39	1.19	3.88E-03
regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051171)	2186	662	558.29	1.19	9.61E-03
cellular nitrogen compound biosynthetic process (GO:0044271)	2289	693	584.6	1.19	5.83E-03

cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)	4370	1321	1116.08	1.18	6.95E-08
gene expression (GO:0010467)	2325	701	593.79	1.18	8.46E-03
regulation of primary metabolic process (GO:0080090)	2219	669	566.72	1.18	1.44E-02
regulation of cellular metabolic process (GO:0031323)	2282	687	582.81	1.18	1.27E-02
nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)	5359	1613	1368.66	1.18	6.01E-10
nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	2263	681	577.96	1.18	1.47E-02
regulation of cellular process (GO:0050794)	3544	1063	905.12	1.17	4.42E-05
regulation of biological process (GO:0050789)	3875	1161	989.66	1.17	1.02E-05
organonitrogen compound metabolic process (GO:1901564)	3312	986	845.87	1.17	5.71E-04
cellular process (GO:0009987)	8477	2522	2164.99	1.16	7.90E-17
primary metabolic process (GO:0044238)	6353	1872	1622.53	1.15	3.90E-09
organic substance metabolic process (GO:0071704)	6816	2007	1740.78	1.15	4.49E-10
biological regulation (GO:0065007)	4251	1251	1085.69	1.15	9.69E-05
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	4830	1420	1233.56	1.15	1.04E-05
metabolic process (GO:0008152)	8032	2321	2051.34	1.13	2.66E-09
Unclassified (UNCLASSIFIED)	7962	2099	2033.46	1.03	0.00E+00
modification of morphology or physiology of other organism (GO:0035821)	280	33	71.51	0.46	5.58E-04

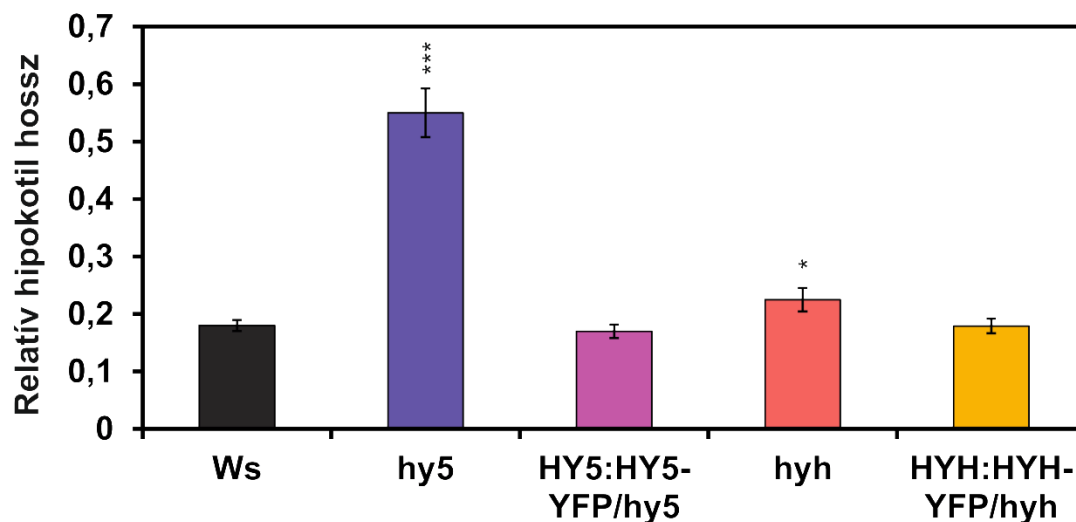
cell killing (GO:0001906)	253	22	64.62	0.34	1.47E-06
disruption of cells of other organism (GO:0044364)	253	22	64.62	0.34	1.47E-06
killing of cells of other organism (GO:0031640)	253	22	64.62	0.34	1.47E-06

4. melléklet. A BL+RL génlisták összevont génontológiai analízise PANTHER13 program segítségével [74], [75].



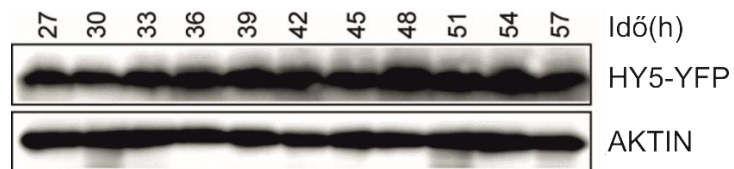
5. melléklet. A BL és RL génlistájának terjedelme különböző.

Az összes kék fényben (BL) HY5-kötő gént azok kötés-erőssége szerint rendeztük sorba az X tengelyen. Az Y tengely 1-es vagy 2-es értéke azt jelzi, hogy az adott gén megtalálható volt-e a vörös fény (RL) mintasorában vagy sem. Az A panel a teljes génlistát, míg a B és C panel a génlista első és utolsó 1000 tagját mutatja.



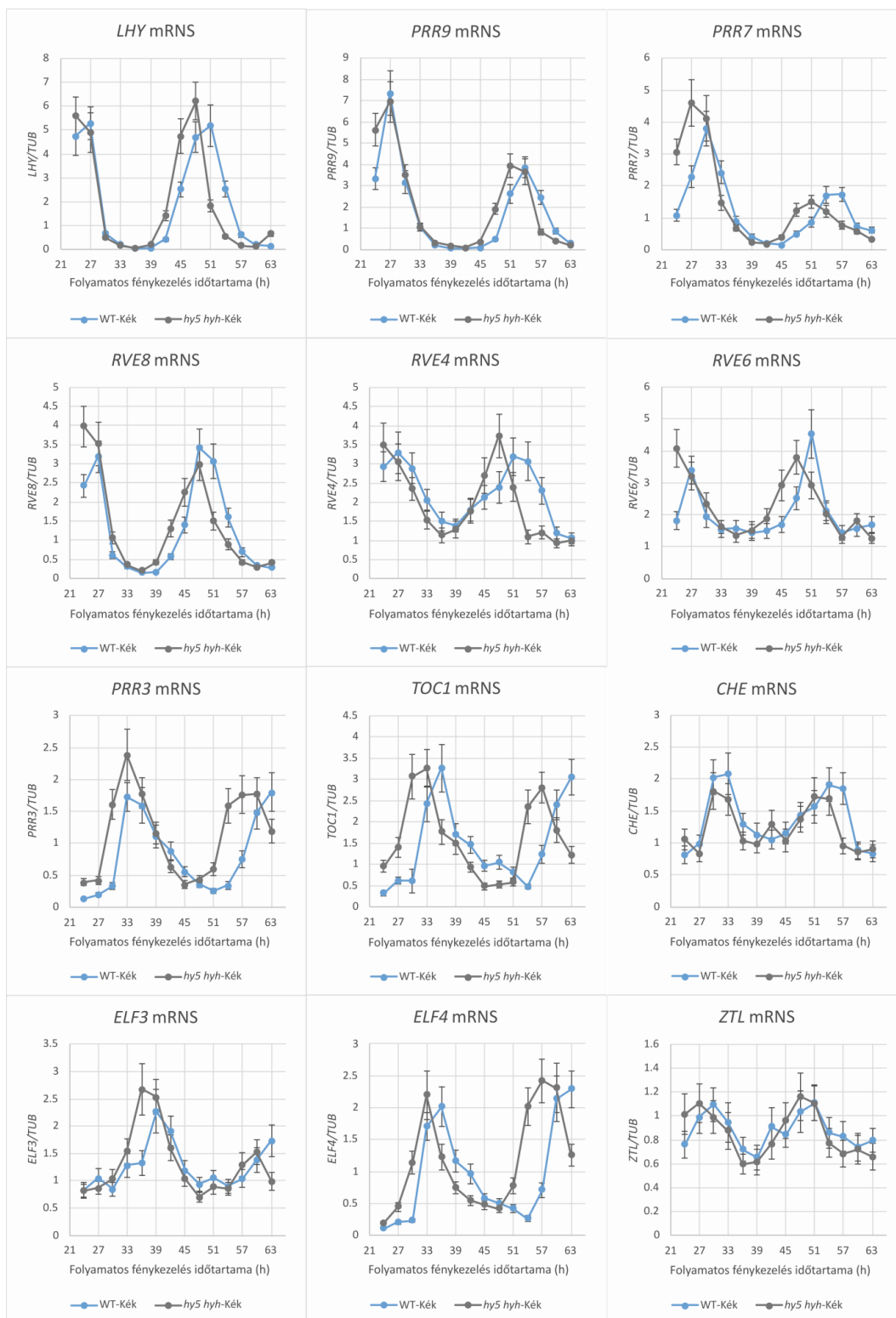
6. melléklet. A *hy5* és *hyh* vonal HY5-YFP-vel és HYH-YFP-vel történő fotomorfogenikus komplementációja.

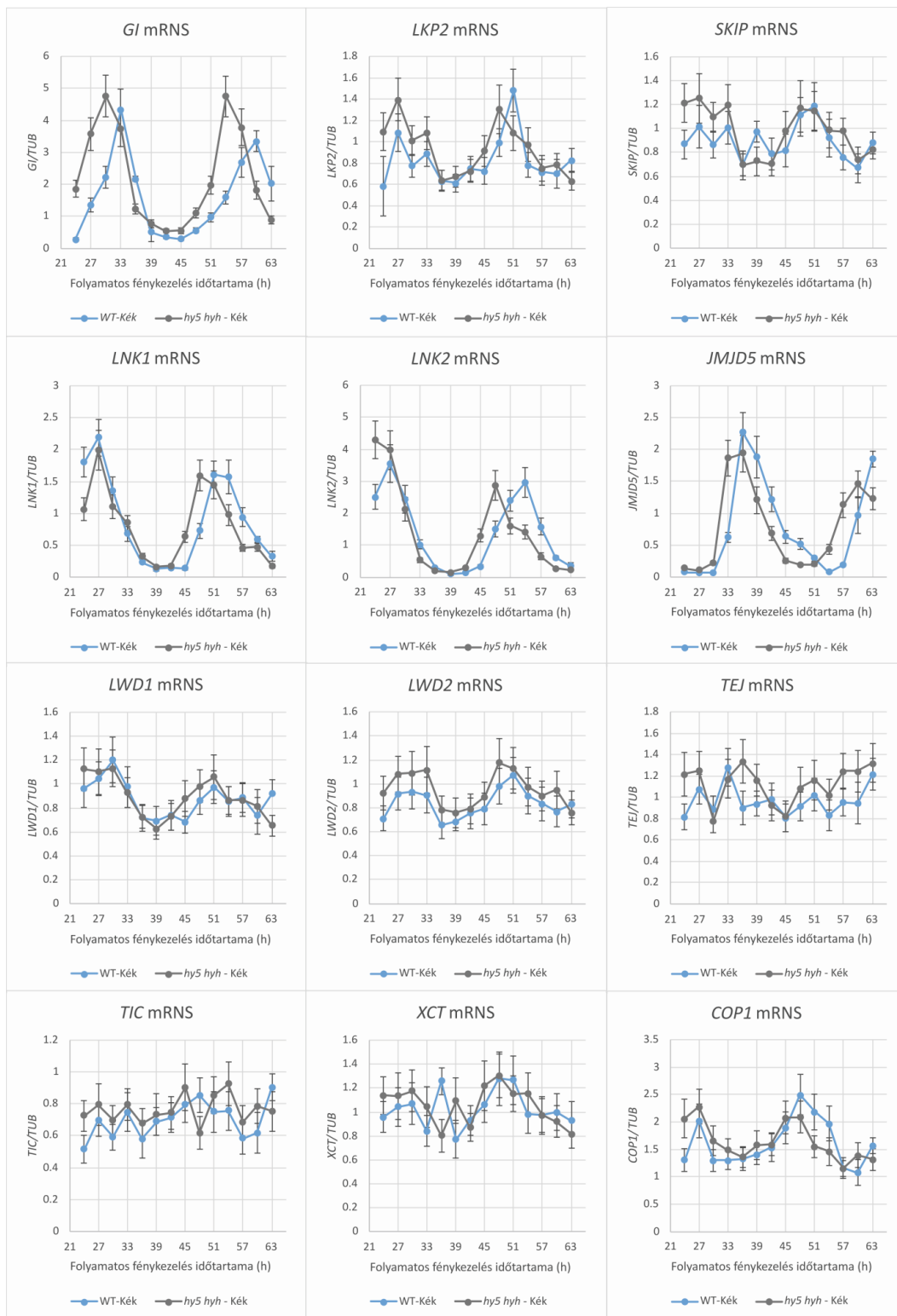
Vad típusú (*Ws*), *hy5* mutánst és *HY5:HY5-YFP* konstrukciót hordozó *hy5* transzgenikus vonalat, valamint *hyh* mutánst és *HYH:HYH-YFP* konstrukciót hordozó *hyh* transzgenikus vonalat neveltünk $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású folyamatos kék fényben 4 napon keresztül. A mért hipokotil hosszokat a megfelelő sötétben nőtt növények hosszával normalizáltuk. A hibasávok 30-40 db növény eredményeinek standard hibájából lettek kiszámítva. A csillagok szignifikáns különbséget jeleznek a vad típus értékeihez képes t-teszt elvégzésekor: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.



7. melléklet. A HY5-YFP fúziós fehérje nem mutat ritmikus termelődést folyamatos kék fényben.

HY5:HY5-YFP konstrukciót hordozó hy5 mutáns növényeket neveltünk 7 napig 12:12 órás sötét/fény ciklusokon, majd folyamatos kék fény alá helyeztük őket. A HY5-YFP fúziós fehérjét Western-blottal azonosítottuk α GFP antitest segítségével. A felvitel kontrolljaként a minták AKTIN szintjeit is megvizsgáltuk.





8. melléklet. Kék fényben a *hy5 hyh* óra- és óra-asszociált génjei eltérő expressziós átlagokkal operálnak a vad-típushoz képest.

Vad típusú (WT) *Ws* és *hy5 hyh* mutáns növényeket neveltünk 12:12 órás fény/sötét ciklusokon 7 napon keresztül, majd azokat $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású kék fény alá helyeztük át. A mintákat a jelzett időpontokban gyűjtöttük be. A jelzett gének mRNS szintjeit qPCR segítségével állapítottuk meg, s azokat a hozzájuk tartozó *TUBULIN2/3* (TUB) mRNS szintekkel normáltuk. A hibaszávok a kísérlet három független ismétlésének standard hibájából lettek megállapítva.