

Egy szokatlan szerkezetű kis GTPáz növényi cirkadián órában betöltött szerepének vizsgálata

A doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Gyula Péter

Témavezető: Dr. Nagy Ferenc

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet
Foto- és Kronobiológiai Csoport

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola

Szeged
2009

BEVEZETÉS

A cirkadián óra egy olyan biológiai időzítőmechanizmus, amely ismétlődő időbeli mintázatot biztosít a génkifejeződésnek, az anyagcserének és egyes élettani folyamatoknak számos élőlényben. Ez a belső óra segíti az élőlényeket a leghelyesebben ismétlődő környezeti tényező, a nappalok és éjszakák váltakozásának előrejelzésében, lehetővé téve az életfolyamatok legmegfelelőbb napszakra való időzítését. Ezen belső folyamatok pontos egyeztetése a szabályosan változó külső környezettel bizonyítottan növeli az élőlények életképességét [1].

A lúdfű cirkadián órájának genetikai hátteréről úgy vélik, hogy az a *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* és *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* valamint a *TIMING OF CAB 1 (TOC1)* gének és termékeik által létrehozott negatív visszacsatoláson alapul [2-4]. A reggel kifejeződő CCA1 és LHY MYB-szerű átírófehérjék gátolják a TOC1 gént, az este kifejeződő TOC1 viszont serkenti a CCA1/LHY átírását [5]. A TOC1 a PSEUDO RESPONSE REGULATOR fehérjecsaldba tartozik, amelynek öt tagja van: TOC1/PRR1, 3, 5, 7 és 9 [6].

Matematikai modellezések és újabb kísérletes eredmények a CCA1/LHY-TOC1 körhöz kapcsolódó további szabályozóhurkok létezését valószínűsítették. Az ún. „esti hurkot” a TOC1 és egy feltételezett Y elem alkotja, mindketten este fejeződnek ki. Az Y serkenti a TOC1 működését, a TOC1 viszont gátolja az Y átíródását, amelyet még a CCA1/LHY is gátol. A TOC1 a CCA1/LHY kifejeződését egy másik feltételezett elem, az X-en keresztül serkenti [7]. Bebizonyították, hogy a GIGANTEA (GI), egy ismeretlen működésű sejtmagi fehérje jelentős összetevője az Y tényezőnek [8]. Az ún. „reggeli hurok” a CCA1/LHY és a PRR7/9 génekből áll. A CCA1/LHY serkenti a PRR7/9 kifejeződését reggel, a PRR7/9 viszont gátolja a CCA1/LHY-t a nap hátralevő részében [8,9]. A három szabályozóhurok összehangolt működésére van szükség ahhoz, hogy létrejöjjön a 24 órás ritmus.

Ezt a belső ritmust a természetben szabályosan változó fény és hőmérsékleti jelek állítják a külső környezet ritmusához. A fényjeleket a vörös/távolivörös fényt elnyelő fitokrómok és a kék fényt érzékelő kriptokrómok közvetítik a központi óramű felé a bemeneti jelátviteli utakon keresztül [10,11]. A beállítási folyamat, amelyet időzítésnek is hívhatunk, elengedhetetlen a központi óramű fázisának a környezetben bekövetkező sötét/fény váltásokhoz való hangolásához. Állandó fényben a fény erőssége viszont az óra futási sebességét/periódusát határozza meg. Az óra mindegyik szabályozóhurkában van legalább egy fényérzékeny elem (PRR9, CCA1/LHY, GI), ami lehetőséget teremt a beállításra. Az F-box elemet tartalmazó ZEITLUPE (ZTL) fehérje [12] és a CASEIN KINASE 2 (CK2) fehérjekináz [13] a szabályozás egy másik szintjét képviselik: nem közvetlenül az óragének átírását felügyelik, hanem az óraféhrjék szintjét illetve működését

befolyásolják. A ZTL a TOC1 fehérje lebontását irányítja fényfüggő módon [14], míg a CK2 a CCA1 fehérje működését állítja foszforilálás segítségével [15].

Dolgozatomban egy új óragén, a LIP1 azonosításáról és jellemzéséről számolok be. Megmutattuk, hogy a LIP1 gátló hatással van a cirkadián óra fényfüggő periódusrövidülésére és a fénybeállításra a névleges sötét szakasz alatt, valamint, hogy a LIP1 az első azonosított kis GTPáz a növényi cirkadián rendszerben. A kis egyalegységes GTPázok egy nagy családot képeznek a sejtmagvasok fehérjéin belül. Biokémiai működésük nagyon hasonló, ami guanin nukleotidok ismétlődő kötésén és bontásán alapul [16]. A kis GTPázok molekuláris kapcsolók, amelyek egy GDP-kötött kikapcsolt alak és egy GTP-kötött bekapcsolt alak között ingáznak. Szerkezeti és működésbeli hasonlóságaik alapján a kis GTPázokat öt alcsaládba lehet sorolni: Ras, Rho, Rab, Ran és Arf [17]. A LIP1 rendelkezik ugyan a fentebb említett alcsaládok jellemzőivel, figyelemreméltó eltérései miatt azonban egymagában egy új, csak a magvas növényekre jellemző családot alkot.

CÉLKITŰZÉSEK

A lúdfű teljes génállományának közzététele után nyilvánvalóvá vált, hogy az egyéb élőlényekben azonosított óragéneknek nincsenek növényi megfelelőik. Ez annyira nem meglepő, hisz a kékmoszatok és a fonalas gombák órája is egyedi felépítésű, különbözik az összes többi élőlényétől. A növényi cirkadián óra megismerése érdekében végzett kutatások jelentős eredményei ellenére ma még messze vagyunk attól, hogy elmondhassuk: ismerjük a növényi cirkadián óra felépítését. Célunk ezért az volt, hogy új cirkadián óraelemeket azonosítsunk a növényi modellszervezetként szolgáló lúdfűben, majd ezeket szerepük és más elemekhez fűződő kapcsolatuk tisztázása után megkíséreljük elhelyezni a cirkadián óra működését leíró modellben.

Ehhez a *CAB2:LUC* jelzőgént hordozó növény génállományában véletlenszerű nukleotidcserét hoztunk létre. Az így előállított változatok között olyanokat kerestünk, amelyekben megváltozott a jelzőgén kifejeződésének cirkadián mintázata. Sikerült is azonosítanunk egy eddig ismeretlen óragént, amelyet a növény cirkadián viselkedése után *LIP1*-nek (*LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1*) neveztünk el. A LIP1 működésének megismerése érdekében a következő főbb célokat tűztük ki:

1. A *lip1-1* növény cirkadián órájának jellemzése
2. A *lip1-1* génváltozat által érintett élettani folyamatok körülhatárolása
3. A *LIP1* gén azonosítása
4. A *LIP1* gén kifejeződésének jellemzése
5. A LIP1 fehérje működésének vizsgálata
6. A LIP1-függő jelátviteli utak feltérképezése

MÓDSZEREK

- Génebézészeti módszerek
- Idegen gént hordozó növények előállítása és fenntartása
- Magvak EMS-kezelése
- Genetikai térképezés, sokmintás PCR vizsgálatok
- Lumineszcencia mérése élő növényekben
- Cirkadián ritmusok periódusbecslése BRASS alkalmazással
- Növények mérhető jellegeinek (szikalatti szár, virágzási idő) vizsgálata különböző fényviszonyok között
- Növényi RNS-tisztítás, Northern blot, folyamatosan mért PCR
- Növényi összfehérje-tisztítás, Western blot
- Különböző mikroszkópos módszerek
- Mesterséges fehérje tisztítása baktériumból
- GTP-bontás vizsgálata kémcsőben
- Élesztő kéthibrid szűrés és kölcsönhatásvizsgálat
- Idegen DNS bejuttatása növényi sejtekbe, fehérjeegyüttes tisztítása növényi sejtekből

EREDMÉNYEK

1. A *lip1-1* minden vizsgált cirkadián kimenet periódusát rövidíti, ezért a *LIP1* nem kimeneti szabályozóelem, hanem a főrezgőkör működését befolyásoló tényező.
2. A periódus a *lip1-1* növényekben szinte változatlan marad a teljes vizsgált fényerősség tartományban. Eszerint a *LIP1* fontos szerepet játszik a periódus fényhangolásában.
3. Erős fényben a *lip1-1* periódusa megkülönböztethetetlen a vad háttérűétől. Feltételezésünk szerint a vad háttérű növényben az erős fény *LIP1*-hiányos állapotot idéz elő.
4. A *lip1-1* folyamatos sötétben mért periódusa szinte megegyezik a fényben mértével, ami tovább erősíti azt a feltételezést, hogy a *lip1-1*-ben a fénynek nincs jelentős hatása az óra sebességére. Elképzelhető, hogy a *lip1-1*-ben a periódus fény szabályozását biztosító jelátviteli út folyamatosan bekapcsolt állapotban van, nem képes fogadni a fényérzékelők felől érkező gátló jelet (amelyet feltehetőleg a *LIP1* közvetít).
5. A *lip1-1* kora este érzékenyebb a beállító fényjelekre. Ez arra utal, hogy a *LIP1* csak ebben a napszakban fejt ki gátló hatását, tehát a *LIP1* működését az óra zsilipeli.
6. Központi óragének mRNS szintjét állandó fényben nem érinti jelentősen a *LIP1* elrontása. A természetes viszonyokat utánzó fény/sötét körülmények között azonban az esti kifejeződésű *TOC1* mRNS szintje jelentősen csökken, miközben a reggeli kifejeződésű *CCA1* és *LHY* szintje

nem változik. Erre a furcsa viselkedésre egyelőre nem tudunk magyarázatot adni, de már mások is megfigyelték.

7. A *lip1-1* mutáns szikalatti szára vörös és kék fényben rövidebb, sötétben és távolivörösben viszont a vad háttérűével megegyező. Ez utóbbi azért figyelemreméltó, mert a rövid periódus sötétben is megfigyelhető. További érdekesség, hogy erős fényben, ahol nincs különbség a periódusban, a szikalatti szár szintén rövid. Eszerint a cirkadián és a fényfejlődési tünetek más módon alakulnak ki.
8. A *lip1-1* mutáns bőrszöveti sejtjei lekerekítettek, ami az aktinhálózat zavarára utal.
9. A *lip1-1* növények sóérzékenyek.
10. A térképezés eredményeként kiderült, hogy a *lip1-1* mutánsban a LIP1 gén első fele a promóter egy részével együtt hiányzik, ezért a *lip1-1* hiányváltozatnak tekinthető.
11. A *lip1-1* tünetegyüttes sikeres gyógyítása a *35S* vagy a *LIP1* promóter által szabályozottan termelődő YFP-LIP1 fehérjével megerősítette a térképezés eredményét.
12. A *LIP1* egy különleges, a magvas növényekre jellemző kis GTPáz kódol. A LIP1 több helyen is a hagyományos kis GTPázokból hiányzó fehérjerészletet tartalmaz. A legérdekesebb különbség azonban a GTP-bontásban kulcsszerepet játszó katalitikus glutamin₉₄ cseréje hisztidinre. A LIP1 aminó- és karboxi-végéről hiányoznak a lipidmódosításhoz szükséges felismerőhelyek.
13. A LIP1 fehérje aminósavsorrendjének számítógépes elemzésével a molekula szabályozásának egy lehetséges módját sikerült felvázolni. Eszerint a fehérje lebomlási sebességét más ismert óraféhérjékhez hasonlóan lépcsőzetes foszforilálás szabályozná, amelyben a kazein kináz I-nek és II-nek lehet elsődleges szerepe.
14. Mesterséges MBP-LIP1 fehérje segítségével sikerült kimutatnunk jelentősebb GTP-bontó hatást a LIP1-ben, ami bizonyítja, hogy a szerkezeti különbségek ellenére a LIP1 valóban egy működőképes GTPáz.
15. A LIP1 kifejeződését több szinten is megvizsgáltuk. Eredményeink szerint a cirkadián óra nincs jelentős hatással a *LIP1* mRNS egyensúlyi szintjére. Ugyanakkor a LIP1 fehérje termelődésében és egyensúlyi szintjében a névleges naplemente környékén csúcsosodó cirkadián szabályozás jelenlétét sikerült kimutatni. Jellemeztük az YFP-LIP1 fehérje sejten belüli eloszlását is. Az YFP fluoreszcens jelét a sejtek magjában és plazmájában is látni lehetett, utóbbiban gyorsan mozgó alakzatokban is, amelyek feltehetőleg a Golgi-zsákocskáknak felelnek meg.
16. Élesztő kéthibrid szűréssel azonosítottunk egy a LIP1-gyel kölcsönható fehérjét, a RopGEF7-et. Ez a fehérje egyéb esti kifejeződésű cirkadián óraféhérjékkel (ZTL, GI, TOC1) is összeragad. Ezek a fehérjék egymással is kölcsönhatnak, ami felveti egy esti fehérjeegyüttes létezésének lehetőségét.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Időtartamától és mennyiségétől függően a fény az óra különböző tulajdonságait befolyásolja. Folyamatos megvilágítás esetén a fény a periódust állítja be. Növényekben a leghosszabb periódust folyamatos sötétben mérhetjük, míg folyamatos fényben a fényerősség növelésével egyre rövidebb periódust figyelhetünk meg. Ugyanakkor egyszeri fényvillanásokkal jellegzetes fáziscúszásokat lehet kiváltani beállított, majd folyamatos körülmények közé helyezett növényekben. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a vad háttérű növényekben a LIP1 a cirkadián periódust hosszabbítja, és hogy a fény – erősségétől függő módon – gátolja ezt a hatást. Ebből következik, hogy vad háttérű növényekben a LIP1 fehérje nem működik azoknál a fényerősségeknél, ahol a *lip1-1* vadra jellemző periódusú. Ez a gátlás feltehetően a LIP1 fényszabályozott lebomlásán vagy kikapcsolásán keresztül valósul meg.

A *lip1-1* sötétben megfigyelhető rövid periódusát ugyanakkor megmagyarázhatjuk, ha feltételezzük, hogy a LIP1 az esti, lassan rezgő hurok része, így törlésével a reggeli (gyorsan rezgő) hurok „elszabadul”. Ehhez a hatáshoz nincs szükség fényre, az a rendszer felépítéséből, a két eltérő sebességgel rezgő hurok negatív visszacsatolással történő összekapcsolódásából következik.

A periódus ugyan érzéketlen a fényre a *lip1-1* mutánsban, a PRC-ből azonban kiderül, hogy a *lip1-1* a beállító fényvillanásokra érzékenyebb (jellemzően a névleges éjszaka első felében), hiszen jelentősen nagyobb késleltető fáziscúszásokat lehetett kiváltani benne, mint a vad háttérűben. Ezért inkább arról lehet szó, hogy LIP1 hiányában az óra túlérzékenyé válik a fényre, tehát már gyenge fényben is ugyanarra az értékre áll be a periódus, mint erősben.

A PRC azt is megmutatta, hogy a LIP1 működését nem csak a fény, hanem a cirkadián óra is szabályozza (zsilipeli). Elképzelhető, hogy a LIP1 fehérje szintjét a cirkadián körön át a foszforilálás miatt folyamatosan változó erősségű PEST-mintázat szabályozza. Az a kináz, amely ezt a foszforilálást cirkadián mintázat szerint végrehajthatja, valószínűleg a cirkadián órában bizonyítottan szerepet játszó CKII. Cirkadián órafehérjék ilyen szabályozására van példa az irodalomban. A LIP1-LUC+ és az YFP-LIP1 fehérjék szintjében megfigyelhető cirkadián mintázat ennek a szabályozásnak a meglétét bizonyítja. Mivel ezeket a géneket egyenletesen működő promóterek vezérelték, az ingadozás nem az mRNS-szint ingadozásának következménye.

A szeringazdag részlet foszforilálása nem csak a fehérje lebomlását, hanem a működését is szabályozhatja, mivel ez a részlet pont a célfehérjéket kötő csuklók között található. A foszforilálás erős torzulást eredményezhet, megváltoztatva a LIP1 célfehérjekötő képességét. A két folyamat össze is függhet. Érzékelő rendszerekre ugyanis általában igaz az, hogy a bekapcsolt alakot gyorsan el kell tüntetni a változások nyomon követhetősége érdekében. Kísérleti adataink alapján

úgy tűnik, hogy a LIP1 szabályozása (az ELF3-hoz és ZTL-hoz hasonlóan) szintén fehérjeszinten zajlik elsősorban, mivel a LIP1 egyensúlyi mRNS-szintjében nem figyelhető meg semmiféle cirkadián mintázat, továbbá a LIP1 fehérje túltermelése nem vált ki semmilyen lényeges hatást (pl. hosszú periódust). Ez utóbbi megfigyelés arra utal, hogy a LIP1 fehérjének másodlagos fehérjemódosításon kell átesnie ahhoz, hogy működőképes állapotba kerüljön. Valójában a módosítás sebessége határozza meg a LIP1 fehérje hatékonyságát, a nagy mennyiségben jelen levő módosítatlan LIP1 nem hatásos. Ez a módosítás valószínűleg nem lipidmódosítás, mert az ehhez szüksége fehérjemintázatok nincsenek meg a LIP1-ben. Legvalószínűbb, hogy a LIP1 GDP-kötött állapotából a GTP-kötött állapotba való átkapcsolás ez a módosítás, a sebességmeghatározó tényező pedig a LIP1 GEF-jének működése. A második legvalószínűbb módosítás a foszforilálás.

A *lip1* változatokban a központi óragének egyensúlyi mRNS szintje nem változik, ha állandó körülmények között vizsgáljuk őket. Ebből arra következtettünk, hogy a LIP1 elsősorban nem RNS-, hanem inkább fehérjeszinten befolyásolja az óra működését. A *TOC1* mRNS szintjének csökkenése váltakozó fény/sötét viszonyok közt nőtt *lip1-1* növényekben ugyanakkor összhangban van e változat rövid periódusával: *TOC1*-hiányos növényekben a periódus még a *lip1-1*-énél is rövidebb. A növényi óra jelenlegi modellje szerint a *TOC1*-et a reggeli hurok összetevői (*CCA1* és *LHY*) gátolják, míg az esti hurok összetevői (*GI*) serkentik.

Vajon mennyire egyedi a LIP1 előbb leírt működése a növényi cirkadián rendszerben? Az ELF3 és a ZTL, valamint az XCT órafehérjék működését lehet párhuzamba állítani a LIP1-ével néhány tekintetben. Vad háttérű növényekben az ELF3 a LIP1-hez hasonlóan tompítja a beállítójeleket és hosszabbítja a periódust, de ezt kizárólag fényben teszi, mivel sötétben a vadra jellemző periódust (ugyanakkor nagyon kis kitéréseket) figyeltek meg az *ELF3*-mat hibásan kifejező növényekben. Az ELF3 működésének molekulaszintű magyarázatára sokáig kellett várni. Az erre vonatkozó első közvetlen bizonyítékokat 2008 végén közölték. Ezek szerint az ELF3 a GI fehérje COP1 általi ubikvitinálásában illesztőfehérjeként vesz részt, hiányában a GI lebomlása gátolt. A GI viszont a ZTL fehérjéhez kötődve gátolja annak működését, a TOC1 fehérje ubikvitinálását. A TOC1 fehérje a *CCA1/LHY* gének kifejeződését serkenti, ezért az ELF3 hiánya végső soron felgyorsult TOC1 bomlást és alacsony szintű *CCA1/LHY* kifejeződést eredményez. A ZTL és az XCT hatása a periódus fényerősség-függésére pont az ellenkezője a LIP1-ének. A *ztl* periódusa nagyon hosszú, az *xct*-jé viszont a *lip1-1*-hez hasonlóan rövid folyamatos sötétben, amely fényben mindkét esetben erősebben csökken, mint a vad növényeké. A *ztl* és az *xct* PRC-je azt mutatja, hogy ezek a *lip1-1*-gyel ellentétben a sietést kiváltó beállító jelekre érzékenyebbek. A ZTL az órát átírás utáni szinteken befolyásolja, a TOC1 órafehérje lebomlásának serkentésével. Az XCT is feltehetőleg fehérjeszinten működik, de hogy milyen módon, még nem ismert.

Adataink alapján úgy véljük, hogy a LIP1 az óra sebességét szintén átírás utáni szinteken befolyásolja, vélhetőleg egy eddig ismeretlen célfehérje – talán a RopGEF7-tel kölcsönható esti fehérjék valamelyikének – sejten belüli eloszlását, vagy a fehérjeegyüttes összetételét szabályozva. A jelenlegi óramodellben a GI fehérje a *TOC1* gén kifejeződését serkenti, míg a TOC1 fehérje negatív visszacsatolással hat vissza a *GI* gén kifejeződésére. Vajon lehetséges, hogy az általunk kimutatott GI-TOC1 fehérjeszintű kölcsönhatás egy újabb szabályozókör (pl. pozitív visszacsatolás) jelenlétére utal? Elképzelhető, hogy a GI nagy méreténél (és egyedi felépítésénél) fogva valójában egy összeszerelő állvány, amelynek felületén áll össze egy esti cirkadián fehérjeegyüttes. Ennek része lehet a LIP1 is, a RopGEF7-en keresztül. A különféle GEF-ek és GTPázok célzott összeállását állványfehérjék segítik, így válogatva a lehetséges kölcsönhatások között.

Ha a LIP1-et megpróbáljuk elhelyezni a jelenlegi óramodellben, akkor azt minden bizonnyal az esti hurkon belül, valamely fehérje működését befolyásoló ponton kell beilleszteni. Legesélyesebbnek a TOC1 fehérje szintjét alakító fehérjelebontó E3 ubikvitin-ligáz együttes mutatkozik, amelyben a LIP1 a GI-val együtt a ZTL működését fogná vissza, a TOC1 lebomlását gátolva ezzel valamilyen szinten. A LIP1 törlése a TOC1-hiányos, illetve a ZTL-túlműködéses állapotot közelítő körülményeket idéz elő (rövid periódus). Ellentmondásnak tűnik, hogy a TOC1 lebomlása és a ZTL, de a LIP1 és a GI működése is a kora esti órákban a legnagyobb. Valószínűleg a LIP1 és a GI gátló hatására eleve akkor van szükség, amikor a ZTL működik, szerepük a megfelelő TOC1 fehérjeszint beállítása. A fény szerepe ebben a folyamatban az lehet, hogy megóvja a TOC1-et a lebomlástól. A LIP1 ezt a hatást közvetítheti, hiányában a fényjel nem jut el a ZTL-hoz, következésképp a TOC1 gyorsabban bomlik, pont annyira, mint sötétben (mindenhol egyformán rövid periódus). Feltételeztük, hogy a LIP1 fehérjeszintjét vagy működését a fény gátolja. Ez egy újabb ellentmondáshoz vezet: erős fényben a TOC1-nek fel kellene halmozódnia és hosszú periódust okoznia. Ezzel szemben az FRC szerint a fényerősség növekedésével a periódus csökken. A magyarázat az lehet, hogy a periódus kialakításakor legalább két, egymással ellentétes hatású fényszabályozott folyamat verseng. Például az egyik a TOC1 felhalmozódását vagy működését, a másik pedig a lebomlását befolyásolhatja, de fényerősség-függésük eltérő mértékű. Adott fényerősségnél a két folyamat eredőjeként alakul ki a periódus: gyenge fényben a felhalmozódás (LIP1 működik), erősben pedig a lebomlás érvényesül (nincs LIP1). Ebből következik, hogy a LIP1 az óra fénybemenetének egyik eleme. A fenti feltételezéseket a *ztl*, *toc1* és *lip1* változatok genetikai kölcsönhatásának vizsgálatával fogjuk igazolni.

A LIP1 a kis GTPázok egy új családjához tartozik. Kémcsőben végzett kísérletben megmutattuk, hogy a katalitikus glutamin hiányának ellenére a LIP1 fehérjének számottevő GTP-bontó képessége van, ezzel a LIP1 lett az első kis GTPáz, amelynek a növényi cirkadián órában van

szerepe. Legalább két másik kis GTPázról ismert eddig, hogy részt vesznek a cirkadián óra működésében valamilyen élőlényben. A *RAB3a* gén elrontása az egerek viselkedési ritmusának periódusát változtatja meg. Ugyanakkor a központi óra nem sérült, ami azt jelenti, hogy a *RAB3a* nem a fénybemenet vagy a központi óra része, hanem valószínűleg a ritmust előállító idegsejtek közötti kapcsolatot, azok összehangolását befolyásolja. A *DEXRAS1* viszont az emlős cirkadián óra fénybeállító jelekre való napszakfüggő érzékenységét alakítja.

A LIP1 – a kis GTPázok körében szokatlan – sejtmagi elhelyezkedése jól összeegyeztethető a cirkadián szerepével, ugyanis az összes eddig ismert óraféhrje sejtmagi elhelyezkedésű. Mivel a LIP1 a sejtplazmában is előfordul, elképzelhető, hogy a LIP1-nek a sejtmagtól eltérő működésű állapota is van. Ezt kiderítendő már folyamatban vannak azok a kísérletek, amelyekben a LIP1-et a sejtmagba illetve a sejtplazmába kényszerítjük. A kísérlettől azt várjuk, hogy a *lip1-1* cirkadián tüneteit csak a sejtmagba kényszerített változattal sikerül helyreállítani, míg a sejtplazmás változat az órán kívüli tüneteket javítja ki. Ezt a feltételezést erősítheti az a megfigyelésünk, hogy a mustársejtekbe belőtt RopGEF7 a sejtplazmában helyezkedik el. Ha a RopGEF7 valóban a LIP1 célfehérjéje, amely a sejtvázátrendeződést befolyásolja, akkor a LIP1 sejtplazmás alakjának a sejtvázátrendezés lehet az egyik – cirkadián órától független – szerepe. Nehéz megmagyarázni ugyanakkor azt, hogy ha a RopGEF7 a sejtplazmában található, akkor hogyan képes kölcsönhatni növényben a sejtmagi óraféhrjéjével (az élesztős kölcsönhatásokat ugyanis növényi sejttenyészetben is sikerült igazolni). Lehetséges, hogy a RopGEF7 elhelyezkedése időben, vagy külső jel (fény?) hatására megváltozik, bemegy a sejtmagba. A kérdést a RopGEF7-et hibásan kifejező vagy nélkülöző növények cirkadián órájának ellenőrzése fogja eldönteni.

A lúdfű fehérjék aminosavsorrendjének elemzése a LIP1-nek mindössze egy közeli rokonát mutatta ki (LIP2), amely rendelkezett az összes LIP1-re jellemző eltéréssel. Ugyanakkor számos, a LIP1-re nagyon hasonlító fehérjét találtunk több magasabbrendű növényben is, ami a LIP1-szerű molekuláknak a magas növények (*Spermatophyta*) élettanában betöltött általánosabb szerepét valószínűsítik.

A LIP1 cirkadián órán kívüli hatásainak feltérképezésekor figyeltük meg, hogy a *lip1-1* fényfejlődése is megváltozott. A cirkadián jelleggel ellentétben ez azonban fényfüggő: a szikalatti szármegnyúlás fény általi gátlását vizsgáló kísérletekből kiderült, hogy sötétben a *lip1-1* és a vad növény szikalatti szára ugyanolyan hosszú. A LIP1-nek a cirkadián órában és a fényfejlődésben betöltött szerepének különállósága nem egyedülálló. Hasonló jelenséget figyeltünk meg a ZTL, a GI, az ELF3 és az XCT esetében is. Véleményem szerint a LIP1 hiánya a fényérzékelők felhalmozódásán keresztül vezethet a megfigyelt fényfejlődési tünetekhez, tehát ez valószínűleg egy mellékhatás.

Fénytől függetlennek tűnik a *lip1-1* növények bőrszöveti sejtjeinek lekerekített alakjának kialakulása. Ez a hatás az sejtvez rendellenességére utal, amelyet növényekben leginkább a Rop GTPázok szabályoznak. A *lip1-1* ilyen Rop-szerű tünete összefüggésbe hozható a LIP1-gyel kölcsönható RopGEF7 molekulával. Ahogy azt már felvetettem, lehetséges, hogy a RopGEF7 a LIP1 egyik célfehérjéje, amelyen keresztül a LIP1 a Rop-ok jelátviteli hálózatához kapcsolódik. Ebben az esetben a LIP1 ezen hatása a sejtvezátrendezésre áttételes, és függetlennek tekinthető a cirkadián órától, amelyet valószínűleg más célfehérjéken keresztül ér el. Mindazonáltal a sejtvezszerkezet megzavarása hatással van a cirkadián órára, mivel az aktinhálózatot megbontó latrunculin-B rövid periódust okoz, meglepő módon azonban csak sötétben és kék fényben, vörösben nem. Ez a hatás ugyanakkor a *lip1-1*-től független, mert a *lip1-1* periódusa tovább rövidíthető a kezeléssel (nem közölt adatok). Elképzelhető, hogy a LIP1 és a latrunculin ugyanarra (t.i. az aktinhálózatra) hat, de különböző irányból, ezért hatásuk összeadódik. A jelenség tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Másik érdekes megfigyelésünk az volt, hogy a *lip1-1*-nek nincs virágzási tünete, pedig ez „elvárható” lett volna a rövid periódus következményeként, amelynek hatással kellett volna lennie a fő virágzásszabályozó CO és az FT kifejeződésére. Ennek magyarázata lehet az, hogy a LIP1-nek úgy tűnik csak gyenge fényben van szerepe, a virágzási kísérleteket viszont erős fényben végeztük. Másik lehetséges magyarázat, hogy míg a cirkadián kísérleteket szacharózos táptalajon végezzük, a virágzási időt földben nőtt növényeknél mérjük. Nemrég írtak le egy olyan gént (*SFR6*), amelynek cirkadián tünete szacharózfüggő, így felmerül a lehetősége, hogy a *lip1-1*-é is ilyen. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy ez lehet a helyzet.

A *lip1* változatok sóstresszre érzékenyek. A sóstressz-tűrés erősen köthető a sejtthártyában jelenlevő ion- és vízcsatornákhöz, pumpákhoz, valamint a sejtfa állapotához. Mindezeket a sejtben belüli anyagmozgatás, a sejtvez állapota nagy mértékben befolyásolja, így a megfigyelt sóérzékenység nem meglepő. Mivel a sejtvezátrendeződés a fentiekben leírtak miatt valószínűleg nem a cirkadián tünehez kapcsolódik, ezért feltételezhetően a *lip1-1* sóérzékenysége sem a cirkadián óra zavarának következménye. Megfigyeléseink szerint nem csak a cirkadián jelleg, hanem a sóérzékenység is szacharózfüggő, mivel cukormentes táptalajon nem jelentkezik. A szacharóz és a cirkadián óra kapcsolatának vizsgálata egyelőre nem szerepel jövőbeli terveink között.

ÖSSZEFOGLALÁS

A LIP1 az első azonosított kis GTPáz a növényi cirkadián rendszerben. Kísérleteink alapján a cirkadián óra fénybemenetének szabályozásában vesz részt. Megmutattuk, hogy a LIP1 szükséges a periódus fényfüggő hangolásához és az óra fényvillanásokkal történő beállításához, kifejezetten a névleges éjszaka első felében. Adataink szerint a LIP1 az esti hurok részeként – valószínűleg más fényérzékeny fehérjék, pl. a ZTL vagy a GI működésének szabályozásán keresztül – korlátozza a fényjelekkel való beállítás fokát a cirkadián körnek ebben az időszakában, amikor a természetben fény nincs jelen. Lehetséges, hogy a LIP1 védi az órát a túl sok, vagy rosszul időzített fénytől, ezzel járulva hozzá a növényi óra pontos és erőteljes működéséhez.

AJÁNLOTT IRODALOM

1. Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kevei É, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA: Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 2005, **309**(5734): 630-633.
2. Wang ZY, Tobin EM: Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 1998, **93**(7): 1207-1217.
3. Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carré IA, Coupland G: The *late elongated hypocotyl* mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 1998, **93**(7): 1219-1229.
4. Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA, Kay SA: Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 2000, **289**(5480): 768-771.
5. Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA: Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 2001, **293**(5531): 880-883.
6. Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T: Circadian waves of expression of the *APRR1/TOC1* family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant and Cell Physiology* 2000, **41**(9): 1002-1012.
7. Locke JC, Southern MM, Kozma-Bognár L, Hibberd V, Brown PE, Turner MS, Millar AJ: Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Molecular Systems Biology* 2005, **1**: 0013.
8. Locke JC, Kozma-Bognár L, Gould PD, Fehér B, Kevei É, Nagy F, Turner MS, Hall A, Millar AJ: Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 2006, **2**: 59.
9. Farré EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA: Overlapping and distinct roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Current Biology* 2005, **15**(1): 47-54.
10. Somers DE, Devlin PF, Kay SA: Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 1998, **282**(5393): 1488-1490.
11. Devlin PF, Kay SA: Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 2000, **12**(12): 2499-2510.
12. Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay SA: *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 2000, **101**(3): 319-329.
13. Meggio F, Pinna LA: One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB Journal* 2003, **17**(3): 349-368.
14. Más P, Kim WY, Somers DE, Kay SA: Targeted degradation of *TOC1* by *ZTL* modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2003, **426**(6966): 567-570.
15. Daniel X, Sugano S, Tobin EM: CK2 phosphorylation of *CCA1* is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(9): 3292-3297.
16. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews* 2001, **81**(1): 153-208.
17. Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E: Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2003, **131**(3): 1191-1208.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

1. Ducza E, Gáspár R, Márki Á, **Gyula P**, Bottka S, Falkay G: Use of antisense oligonucleotides to verify the role of the α_{1A} -adrenergic receptor in the contractility of the rat uterus post partum. *Molecular Pharmacology* 2001, **59**(5): 1235-1242.
2. **Gyula P**, Schäfer E, Nagy F: Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2003, **6**(5): 446-452.
3. Edwards KD, Lynn JR, **Gyula P**, Nagy F, Millar AJ: Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Genetics* 2005, **170**(1): 387-400.
4. Kevei É, **Gyula P**, Hall A, Kozma-Bognár L, Kim WY, Eriksson ME, Tóth R, Hanano S, Fehér B, Southern MM, Bastow RM, Viczián A, Hibberd V, Davis SJ, Somers DE, Nagy F, Millar AJ: Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of ZEITLUPE. *Plant Physiology* 2006, **140**(3): 933-945.
5. Kevei É*, **Gyula P***, Fehér B, Tóth R, Viczián A, Kircher S, Rea D, Dorjgotov D, Schäfer E, Millar AJ, Kozma-Bognár L, Nagy F: *Arabidopsis thaliana* circadian clock is regulated by the small GTPase LIP1. *Current Biology* 2007, **17**(17): 1456-1464.†
6. McWatters HG, Kolmos E, Hall A, Doyle MR, Amasino RM, **Gyula P**, Nagy F, Millar AJ, Davis SJ: ELF4 is required for oscillatory properties of the circadian clock. *Plant Physiology* 2007, **144**(1): 391-401.
7. Kerényi Z, Mérai Z, Hiripi L, Benkovics A, **Gyula P**, Lacomme C, Barta E, Nagy F, Silhavy D: Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Journal* 2008, **27**(11): 1585-1595.

* Megosztott első szerzők

† A dolgozat alapjául szolgáló közlemény