

**A ZEITLUPE fehérje szerepének vizsgálata a növényi cirkadián óra
működésében és a fényszabályozott folyamatokban**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: Kevei Éva

Témavezető: Dr. Nagy Ferenc

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

**Szegedi Tudományegyetem
Molekuláris és Sejtbiológia Doktori Program**

Szeged

2006

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1. Biológiai ritmusok.....	9
2.2. A cirkadián ritmusok jellemzői.....	9
2.3. A cirkadián óra.....	10
2.4. A cirkadián óra általános felépítése, óraelemek és definíciók.....	11
2.5. A növényi cirkadián óra felépítése.....	14
2.5.1. <i>Az oszcillátor.....</i>	<i>15</i>
2.5.2. <i>„Input”.....</i>	<i>20</i>
2.5.2.1 A cirkadián óra beállítása fénnnyel.....	21
2.5.2.2 A cirkadián óra beállítása hőmérséklettel.....	32
2.5.3. <i>„Output” - cirkadián ritmusok a növényekben.....</i>	<i>33</i>
2.6. A cirkadián óra jelentősége.....	36
2.7. Az Arabidopsis óramodell korlátai.	38
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	41
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	43
4.1. Kísérleti anyagok és organizmusok.....	43
4.1.1. <i>Vegyszerek és forgalmazók.....</i>	<i>43</i>
4.1.2. <i>Tápanyagok és táptalajok, antibiotikumok, szelekció.....</i>	<i>43</i>
4.1.3. <i>Plazmid konstrukciók.....</i>	<i>44</i>
4.1.4. <i>Baktériumok.....</i>	<i>45</i>
4.1.5. <i>Növények.....</i>	<i>46</i>
4.2. Molekuláris biológiai módszerek.....	46
4.2.1. <i>Riporter gén konstrukciók készítése, transzgenikus növények előállítása.....</i>	<i>46</i>
4.2.2. <i>Agrobacterium konjugáció.....</i>	<i>47</i>
4.2.3. <i>A ZTL gén szekvenálása.....</i>	<i>47</i>
4.2.4. <i>Növényi össz-RNS tisztítás.....</i>	<i>48</i>
4.2.5. <i>Northern hibridizáció.....</i>	<i>48</i>
4.2.6. <i>Növényi össz-protein tisztítás és Western-blot analízis.....</i>	<i>49</i>
4.2.7. <i>Élesztő két-hibrid rendszer használata fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára.....</i>	<i>50</i>
4.3. Növényeken alkalmazott technikák.....	50
4.3.1. <i>Magsterilizálás, növénynevelés.....</i>	<i>50</i>
4.3.2. <i>Transzgenikus növények előállítása.....</i>	<i>51</i>

4.3.3. EMS mutagenesis.....	51
4.3.4. In vivo lumineszcencia-mérés luminométerrel.....	52
4.3.5. Luciferáz enzimaktivitás meghatározása CCD kamerával.....	53
4.3.6. Levélmozgás ritmusának dokumentálása.....	53
4.3.7. Periódushossz adatok számolása.....	53
4.3.8. Hipokotilhossz-mérés.....	54
4.3.9. A virágzási idő meghatározása.....	54
4.3.10. A klorofilltartalom meghatározása.....	55
4.3.11. A fotoszintetikus gázcsere vizsgálata.....	55
4.3.12. Kompetíciós kísérlet <i>ztl</i> és <i>toc1</i> mutánsok között.....	55
4.4. Adatfeldolgozási, interpretálási irányelvek.....	56
5. EREDMÉNYEK.....	57
5.1. Új cirkadián óra mutánsok azonosítása.....	57
5.2. A mutációk elhelyezkedése a ZTL fehérje szekvenciájában.....	50
5.3. A ZTL fehérje „kelch” doménjében található mutációk lokalizációja egy „kelch” domén háromdimenziós szerkezeti modelljén.....	53
5.4. A ZTL gén mutációjának hatása a cirkadián óra működésére.....	54
5.5. Fényfüggő cirkadián fenotípus a <i>ztl</i> mutánsokban.....	59
5.6. A <i>ztl</i> mutánsok fotomorfogenikus fenotípusa.....	72
5.7. A virágzás fotoperiodikus indukciója a <i>ztl</i> mutánsokban.....	75
5.8. A ZTL szerepe etiolált növényekben.....	75
5.9. Hőmérsékletkompenzáció a <i>ztl</i> mutánsokban.....	77
5.10. A mutáns ZTL fehérjék kifejeződése a növényekben.....	78
5.11. A ZTL fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata élesztő két-hibrid rendszer segítségével....	81
5.12. A cirkadián szabályozás előnyei <i>Arabidopsis</i> ban.....	87
5.12.1. A klorofilltartalom meghatározása.....	89
5.12.2. Széndioxid fixálás.....	89
5.12.3. Termésmennyiség.....	90
5.12.4. Biomassza képződés.....	92
6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	94
6.1. A mutánsszűrés eredményeinek összegzése.....	94
6.2. Az új <i>ztl</i> mutáns növények jellemzése.....	96
6.3. A ZTL fehérje domének funkciójának vizsgálata.....	99
6.3.1. Az F-box domén kölcsönhatásának vizsgálata az SCF komplex elemeivel.....	99
6.3.2. A „kelch repeat” domén funkciója a ZTL fehérje szerkezetének kialakításában.....	100
6.3.3. A LOV/PAS domén szerepe a vörös fény indukált jelátviteli folyamatokban és a cirkadián szabályozásban.....	101
6.4. A cirkadián szabályozás előnyei <i>Arabidopsis</i> ban.....	103

7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	106
8. SUMMARY.....	109
8.1. Introduction.....	109
8.2. Research objectives.....	112
8.3. Methods.....	113
8.4. Results and discussion.....	113
8.5. Conclusions.....	117
9. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	118
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	119
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	132

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD	activator domain = aktivátor domén
ALT	adenin-, leucin- és triptofán hiányos
ATA	aurin-trikarboxilsav
BD	binding domain = kötő domén
bHLH	bázikus „helix-loop-helix” motívum
BRASS	Biological Rhythms Analysis Software System
CCD	charge coupled device
CCT	„constans/constans-like/timing of cab 1” motívum
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Columbia-0 ökotípus
cps	count per seconds = 1 másodperc alatt beérkező fotonok száma
DEPC	dietil-pirokarbonát
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EE	evening element = esti elem
EMS	etil-metán szulfonát
FMN	flavin-mononukleotid
FRC	fluence rate curve
FRP	free-running period = szabadon futó periódus
LD	light/dark cycles = fény/sötét ciklusok
LOV	light/oxigen/voltage domén
LRE	light-responsive element = fény-válasz elem
NOS 3'	nopalín-szintáz gén 3' nem transzlálódó szekvenciája
PAS	Per/Arnt/Sim domén
P _{fr}	a fitokróm távoli vörös fényt abszorbeáló konfomerje
pPCV	plant cloning vector
P _r	a fitokróm vörös fényt abszorbeáló konfomerje
PRC	phase response curve
SCF	Skip-Cullin-F-box
SDS	nátrium-dodecyl-szulfát
SEM	standard error mean
TRIS	tris(hidroximetil)amino-metán (C ₄ H ₁₁ NO ₃)
UV-A/B	ultraibolya-A/B sugárzás

VT	vad típusú növény
Ws	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Wassilevskija ökotípus
ZT	zeitgeber time

GÉNSZIMBÓLUMOK

ASK1	<i>ARABIDOPSIS</i> SKIP-LIKE 1
CAB	CHLOROPHYLL A/B-BINDING = klorofill A/B-kötő
CAT3	CATALASE 3
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
CCR2	COLD CIRCADIAN CLOCK REGULATED 2
CK2	CASEIN KINASE 2
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1
CRY	CRYPTOCHROME = kriptokróm
DET1	DE-ETIOLATED 1
ELF	EARLY FLOWERING
EPR1	EARLY PHYTOCHROME-RESPONSIVE 1
FHY	FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL
FRQ	FREQUENCY
GI	GIGANTEA
GRP7	GLYCINE-RICH PROTEIN 7
HPT	higromicin-foszfotranszferáz
LHY	LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LUC	<i>Photinus pyralis</i> (szentjánosbogár) luciferáz
PER	PERIOD
PHOT	PHOTOTROPIN = fototropin
PHY	PHYTOCHROME = fitokróm
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PIL	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR-LIKE
PRR	PSEUDO RESPONSE REGULATOR
SRR1	SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1
TIC	TIME FOR COFFEE
TOC1	TIMING OF CAB 1
WC-1	WHITE COLLAR 1
ZTL	ZEITLUPE

1. BEVEZETÉS

Az élőlények egyik igen fontos tulajdonsága a változó környezethez való alkalmazkodás képessége. Különösen fontos ez a helyhez kötött, magasabbrendű növények esetében, amelyek nem képesek a kedvezőtlen hatásokat helyváltoztatással elkerülni, így a környezeti változásokra anyagcseréjük, illetve fejlődési folyamataik megváltoztatásával válaszolnak. A növények életében az egyik legfontosabb környezeti tényező a fény, amely nemcsak energiaforrásként hasznosul a fotoszintézis során, hanem a növény egész egyedfejlődésére kihat. A Föld tengely körüli forgása következtében a fény- és a sötétszakaszok ciklikusan követik egymást. A környezet fény-, valamint hőmérsékletviszonyainak rendszeresen bekövetkező, napi ismétlődést mutató oszcillációjához történő alkalmazkodás során az élővilág minden szintjén kialakult egy olyan mechanizmus, amely lehetővé teszi ezen periodikus változások érzékelését, belső rögzítését és előrejelzését. Ez az időmérő mechanizmus az ún. biológiai óra, amely az általa szabályozott folyamatoknak ritmikus jellegű működést biztosít, szabályosan ismétlődő maximum és minimum értékekkel. Ezen ritmusok periódushossza hozzávetőleg egy nap, ezért a latin *circa diem* kifejezés nyomán cirkadián órának, az általa létrehozott ritmust pedig cirkadián ritmusnak nevezzük. A cirkadián ritmusokra jellemző, hogy állandó körülmények között is fennmaradnak és hőmérsékletkompenzáltak. A cirkadián óra szabályozó funkciója révén lehetővé válik, hogy a szervezet előre jelezze a ciklikusan bekövetkező környezeti változások időpontját, és ezekre az életfolyamatainak megfelelő időben történő átállítással felkészüljön, ami egyértelműen növeli a környezethez való alkalmazkodás képességét.

A cirkadián rendszer megfelelő működéséhez a belső biológiai óra által mért időnek azonos fázisban kell lennie az abszolút, környezetben mérhető idővel. A cirkadián óra és a környezetben mért idő szinkronizációja a biológiai óra újra és újra történő beállításával valósul meg, amely folyamatban ritmikusan változó környezeti faktorok vesznek részt. Az órát beállító két legfontosabb környezeti tényező a fény és a hőmérséklet.

Magasabbrendű növényekben a cirkadián óra számos folyamatot szabályoz. Kimutatták, hogy a növénybiológiai kutatásokban széles körben használt kétszikű modellnövény, az *Arabidopsis thaliana* génjeinek hozzávetőleg 6%-a cirkadián szabályozás alatt áll. A génexpresszió szintjén megfigyelhető ritmusok a növények biokémiai és fiziológiai folyamataiban is megnyilvánulnak. A növényekben megfigyelhető cirkadián ritmusok nagy száma ellenére a növényi cirkadián rendszer elemeiről és működésükről még néhány évvel ezelőtt is igen keveset tudtunk.

A klasszikus óramodell szerint a cirkadián óra három fő része a központi oszcillátor mechanizmus, a bemeneti oldal és a kimeneti oldal. A növényi cirkadián óra által szabályozott folyamatokról, azaz a kimeneti oldal végén található elemekről már igen sok információ áll rendelkezésünkre. Jól ismertek az óra környezeti szinkronizációjában résztvevő fény bemeneti oldal legelső elemei, a fényérzékelésben résztvevő fotoreceptorok is. A növényi óra központi elemeiről, valamint a bemeneti és kimeneti utak jelátviteli mechanizmusában közreműködő faktorokról, ill. ezek működéséről azonban kevés információ áll rendelkezésünkre. Az egyéb modellszervezetekben (*Synechococcus*, *Neurospora*, *Drosophila* és egér) megismert óramodellek közös vonása, hogy a központi oszcillátor mechanizmus minden esetben egy ún. negatív visszacsatolási szabályozó hurokból áll, amelynek elemei kölcsönösen szabályozzák egymás kifejeződését, illetve aktivitását.

Az utóbbi évek intenzív kutatásai eredményeként *Arabidopsis*-ban számos, az óraműködésben fontos fehérjét azonosítottak, ezek pontos működési mechanizmusáról, egymáshoz fűződő viszonyáról mégis igen keveset tudunk. Az eddig azonosított nagyszámú óraelem közül a növényi óra központi oszcillátor mechanizmusának felépítésében - mai ismereteink szerint - csak három elem vesz részt: a TIMING OF CAB 1 (TOC1), a CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) és a LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) fehérjék. Az oszcillátort képező visszacsatolási kör negatív szabályozó elemei az LHY és CCA1, amelyek a *TOC1* expresszióját gátolják. A TOC1 fehérje ezzel szemben pozitívan szabályozza az *LHY* és *CCA1* gének kifejeződését. Az *LHY/CCA1* és a *TOC1* gének kifejeződése hozzávetőleg 24 órás periódussal, ellentétes fázisban ritmizál, amely a központi oszcillációs mechanizmus alapjául szolgál. Ez az oszcilláció a kimeneti jelátviteli utakon keresztül tevődik át az óra által szabályozott folyamatokra. A három központi óraelem kifejeződésének visszacsatolási hurkon belüli kölcsönös szabályozása azonban nem elegendő a 24 órás periódushossz kialakításához, további késleltető mechanizmusok hiányában ugyanis a negatív visszacsatolási szabályozó kör néhány óra alatt végigfutna. A 24 órás periódushossz kialakításában szerepet játszó késleltető mechanizmusokról nem sokat tudunk. Valószínű, hogy az újonnan izolált óraelemek egy része a központi óraelemek kifejeződésének, aktivitásának, vagy degradációjának módosítása révén vesz részt a normális oszcilláció kialakításában.

Annak ellenére, hogy az elmúlt években nőtt a cirkadián témájú közlemények száma, a ma rendelkezésünkre álló információk nem elegendőek a növényi óraműködés teljes leírására. Munkánk elsődleges célja ezért további óraelemek azonosítása és jellemzése volt *Arabidopsis thaliana*-ban, amelynek segítségével a cirkadián szabályozás még hiányzó elemeit szeretnénk

volna megtalálni, és a korábban felvázolt óramodellbe beilleszteni. Ezzel párhuzamosan a már megismert óraelemek funkciójának és hatásmechanizmusának részletes vizsgálata, valamint az egyes elemek egymáshoz való kapcsolatának feltárása vált kutatásaink célpontjává.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Biológiai ritmusok

Az élővilágban széles körben ismertek olyan biológiai folyamatok, amelyek ritmikus jellegűek. Biológiai ritmusnak nevezzük azokat az élő szervezetekben lejátszódó folyamatokat, amelyek megjelenésében bizonyos ismétlődés, periodicitás figyelhető meg. A biológiai ritmusok rendkívül sokfélék lehetnek, mind megjelenésükben, mind a ritmus periódusának hosszában.

Ultradián (latinul *ultra diem* = kevesebb mint egy nap) ritmusoknak nevezzük azokat a biológiai ritmusokat, amelyekben a megfigyelt folyamat egy nap alatt többször ismétlődik. Ezek egy szélsőséges megjelenési formája az ecetmuslica hímjének nászéneke, amelynek frekvenciája 50-60 másodperces periodicitást mutat (Kyriacou és Hall, 1980). Az infradián (*infra diem* = több mint egy nap) ritmusok periódushossza több mint egy nap. Ide sorolható a főemlősök menstruációs ciklusa, 25-35 napos periódussal. A leghosszabb biológiai ritmusok az ún. cirkannuális ritmusok, mint pl. a téli álmot alvó állatok nyugalmi periódusa, amelyek éves ismétlődést mutatnak. Végezetül megkülönböztetjük az ún. cirkadián (*circa diem* = közel egy nap) ritmusokat, amelyek periódushossza közelítőleg 24 óra. A cirkadián ritmusok szinte valamennyi élő szervezetben megtalálhatók a Földön a prokariótáktól az emberig, és a biológiai folyamatok széles skáláját szabályozzák.

2.2. A cirkadián ritmusok jellemzői

A cirkadián ritmusok specifikus vonásait, a többi biológiai ritmustól megkülönböztető jegyeit meghatározó kritériumait az alábbi pontokban foglalhatjuk össze (Edmunds, 1988).

1. A cirkadián ritmusok periódushossza megközelítőleg 24 óra. Ciklikusan változó környezetben (pl. fény/sötét vagy hőmérséklet ciklusokon) a periódushossz (bizonyos határokon belül) megegyezik a külső ciklus periódushosszával. Ilyenkor a külső környezet ritmikus változása vezérli az oszcillációt. Állandó körülmények között azonban (állandó fény és hőmérsékletviszonyok mellett) a ritmikus folyamatok „szabadon futnak” (free-running) és kialakul a cirkadián ritmusokra jellemző saját periódushossz, amely közelítőleg, bár soha nem pontosan, 24 óra. Ez az ún. szabadon futó periódus (free-running period = FRP).

2. A cirkadián ritmusok periodikusan változó környezeti stimulusokkal állíthatók be a környezeti ciklusoknak megfelelően. A cirkadián szabályozás nyújtotta előnyök igazán csak akkor érvényesülhetnek, ha a belső óra által mért idő megfelel a külső, valós időnek. A beállítás (entrainment) az a folyamat, amelynek során a belső, szubjektív idő (azaz a ritmus időzítése, fázisa) szinkronba kerül a valós környezetben mérhető idővel (objektív idő). A cirkadián órát beállító legfontosabb tényező a fény/sötét ill. a meleg/hideg szakaszok periodikus váltakozása.
3. A cirkadián ritmusok állandó körülmények (konstans fény- és hőmérsékletviszonyok) között is fennmaradnak, és az adott ritmusra jellemző periódushosszat mutatják. Ez a jelleg alapvetően megkülönbözteti a cirkadián ritmusokat az ún. diurnális ritmusoktól, amelyeket közvetlenül a fény- és/vagy hőmérsékletviszonyok változása vezérel és a külső oszcilláció megszűnte után nem folytatódnak tovább. Állandó körülmények a természetben nem tapasztalhatók, csak mesterséges, laboratóriumi környezetben alkalmazhatók a cirkadián kísérletek elvégzése során. Ez a rendszer ugyanakkor rendkívül hasznos eszköznek bizonyult a cirkadián ritmusok kutatása során, mivel ilyen körülmények között a környezeti tényezők hatása elhanyagolható, és a ritmus jellegét egyedül annak belső törvényszerűségei alakítják ki. Ebben az egyszerűsített vizsgálati rendszerben hatékonyabban és könnyebben ismerhetjük meg a cirkadián szabályozásban résztvevő molekuláris mechanizmusokat.
4. A cirkadián ritmusok hőmérsékletkompenzáltak, azaz a környezet hőmérsékletének bizonyos határok közötti változására a cirkadián ritmus periódushossza nem, vagy csak kis mértékben változik. A biokémiai folyamatok sebességének hőmérsékletfüggését az ún. Q10 érték mutatja. Ez a paraméter fejezi ki, hogy egy adott folyamat sebessége hányszorosára nő, ha a hőmérsékletet 10°C-kal emeljük. A cirkadián ritmusok periódushossza csak minimális mértékben változik a hőmérséklet változtatásával ($Q_{10} = 0.8-1.2$, szemben az átlagos biokémiai folyamatok 2-4 közötti Q_{10} értékével).

2.3. A cirkadián óra

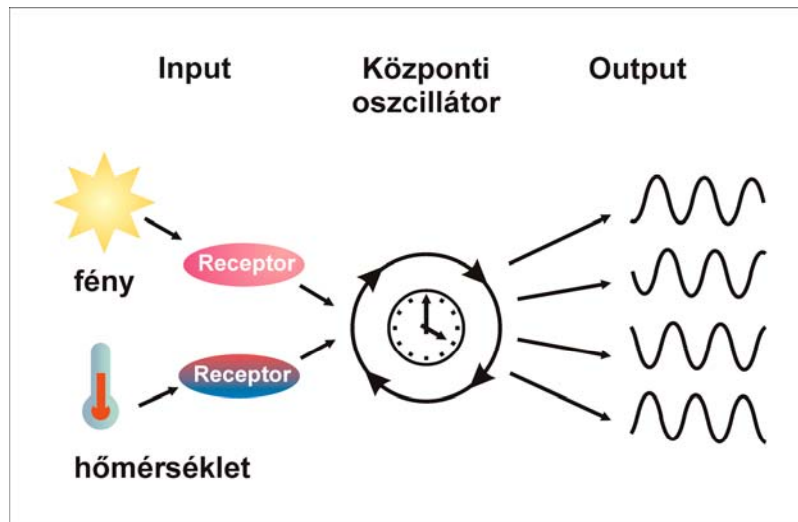
Cirkadián órának nevezzük azt a belső időmérő mechanizmust, amely a cirkadián ritmusok létrehozásában, fenntartásában és irányításában vesz részt. A cirkadián órák működésének alapja egy endogén, önfenntartó, negatív visszacsatolás („feedback loop” mechanizmus), amelyben pozitívan és negatívan ható faktorok (órafehérjék) kölcsönös, transzkripciós és translációs szintű szabályozása vesz részt. A cirkadián órák működésének

alapvető feltétele a késleltetés, amelynek révén az egyes órafehérjék mennyisége csak a megfelelő óragén indukciója után több órával éri el maximumát. Ennek hiányában a szabályozó ciklus sokkal rövidebb idő alatt futna körbe, mint egy nap. A késleltetés kialakításában különböző poszt-transzlációs mechanizmusok vesznek részt, amelyek az egyes óraelemek aktivitását, kompartmentalizációját vagy degradációjának sebességét szabályozzák, és amelyek eredményeképpen kialakul a viszonylag hosszú, közel 24 órás periódushossz.

2.4. A cirkadián óra általános felépítése, óraelemek és definíciók

A cirkadián óra vázlatos szerkezetét és működését a 2.1. ábra mutatja be. A klasszikus modell alapján (Morrow és mtsai, 1997; Johnson és mtsai, 1998a) az óra három fő részből épül fel:

1. A bemeneti oldal („input”) az óra működését a környezeti ciklusokkal összehangoló jeleket továbbítja az oszcillátor felé. Az óra szinkronizációjában résztvevő legfontosabb környezeti jelek a fény és a hőmérséklet. A fény-jelet speciális fotoreceptorok érzékelik és bonyolult jelátviteli úton közvetítik a hatást az óra központja felé.
2. A központi oszcillátor egy olyan mechanizmus, amely - az őt alkotó elemek (gének és azok fehérjetermékei) között fennálló kölcsönhatásokon és egymás kölcsönös szabályozásán keresztül - a külső környezettől függetlenül képes oszcilláció létrehozására és fenntartására. Fontos hangsúlyoznunk, hogy a környezeti paraméterek ciklikus változásai (amelyek az „input” utak révén érik el az oszcillátort) nem szükségesek a ritmus kialakításához és fenntartásához, de hatással vannak az oszcilláció periódushosszára, fázisára és amplitúdójára is. A központi oszcillátor elemei (az ún. óragének ill. órafehérjék) alkotják a cirkadián ritmusokat létrehozó negatív visszacsatolási szabályozókört. Az órafehérjék szabályozzák önmaguk és más óraelemek kifejeződését, aktivitását vagy éppen a lebomlását.
3. A kimeneti oldalon („output”) találhatjuk mindazon a folyamatokat, amelyekre az oszcillátor hatást gyakorol. Itt szerepelnek az óra által sejtszinten vagy a szervezet szintjén szabályozott biokémiai vagy fiziológiai folyamatok és a cirkadián génexpresszió is.



2.1. ábra. A cirkadián óra klasszikus modellje

A cirkadián órának három fő része van: „input” (bemeneti oldal), központi oszcillátor és „output” (kimeneti oldal). A központi oszcillátor a környezettől függetlenül kb. 24 órás oszcillációt hoz létre, mely állandó körülmények között is fennmarad. Az óraműködést a környezeti ciklusokkal összehangoló jeleket az „input” jelátviteli utak közvetítik az oszcillátor felé. A két legfontosabb óraműködést befolyásoló környezeti tényező a fény és a hőmérséklet. Az óra által szabályozott folyamatok ill. az általa létrehozott cirkadián ritmusok a cirkadián óra kimeneti oldalán találhatók.

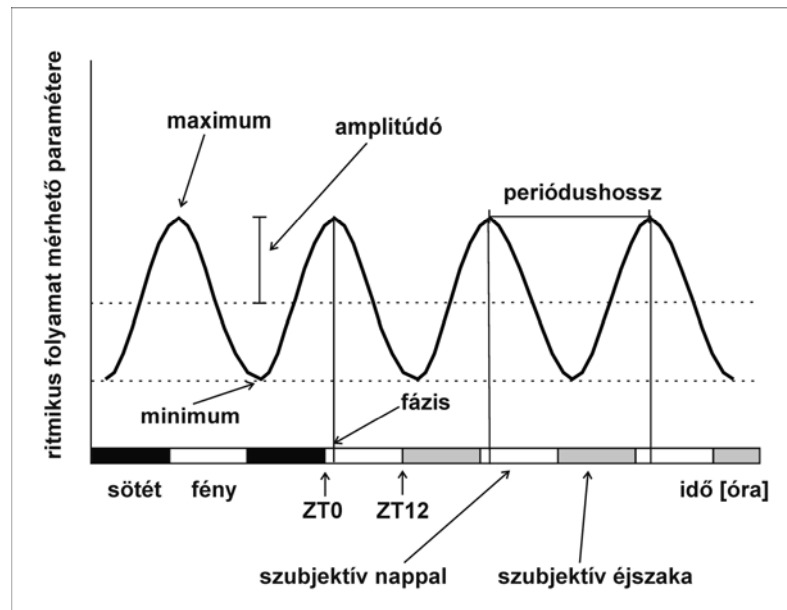
Az egyes óraelemek elhelyezése a fent meghatározott három funkcionális komponensből álló óramodellben – a modell egyszerűsége ellenére vagy talán éppen ezért – nem könnyű feladat, mégis létezik néhány kritérium, amely segíti az azonosított órafehérjék elhelyezését a három fő egység egyikében. Ezek a valamennyi modellszervezet cirkadián órájára kiterjeszthető kritériumok a következők:

1. Az „input” elemek mutációja megváltoztatja az óra fény- vagy hőmérséklet általi beállíthatóságát, illetve az óra érzékenységét ezekre a környezeti tényezőkre. A bemeneti oldal mutációja leggyakrabban az óra periódushosszának, amplitúdójának vagy fázisának a megváltozását eredményezi, szélsőséges esetben azonban aritmiát is okozhat. Az óra fénybemenetét érintő mutációk az óra működésében leggyakrabban olyan hibákat hoznak létre, amelyek hatására fellépő cirkadián aberráció fényfüggő módon jelentkezik.
2. A központi oszcillátor elemek kifejeződésének megváltozása mutáció vagy az adott elem túltermelése révén a ritmus bármelyik paraméterének (periódushossz, fázis, amplitúdó) megváltozását eredményezheti vagy aritmiát okozhat.
3. Az „output” elemek működése nem hat vissza az órára, így mutációjuk csak az adott elem illetve az általa szabályozott folyamatok működését zavarja. Ezek eredményeként az

„output” elemek sérülése csak néhány ritmusban okoz eltérést, míg az oszcillátor elemek működése normális marad. Az „output” elemek mutációja nem okoz periódushossz változást.

A cirkadián ritmusok és az óraműködés leírásakor használt fogalmakat legegyszerűbben egy ritmus sematikus ábráján mutathatjuk be (2.2. ábra). A 2.2. ábra egy „output” elem működését mutatja. A grafikonon a ritmikus folyamat valamely paraméterét ábrázoltuk az idő függvényében és az órát jellemző fogalmakat is feltüntettük.

- a. Periódushossznak (τ) nevezzük a görbe két azonos pontjának, pl. két egymást követő maximum pontjának időben kifejezhető távolságát. A cirkadián ritmusok esetében a periódushossz közel 24 óra.
- b. A cirkadián ritmus amplitúdója a maximum és a minimum értékek különbségének a fele.
- c. A ritmus fázisán a ritmikus folyamatot leíró jelleggörbe egy jellegzetes pontját, általában a maximumpontját értjük, órákban kifejezve.
- d. ZT (zeitgeber time) alatt az órát beállító utolsó környezeti szignál óta eltelt időt értjük, órákban kifejezve. Mivel az eddig vizsgált rendszerekben a fény bizonyult az általános környezeti beállító jelnek (Edmunds, 1998), ezért $ZT = 0$ az az időpont, amikor a szervezet az utolsó sötét-fény átmenetet (utolsó hajnal) érzékelte az állandó körülmények beállta előtt. A ZT a laboratóriumokban konstans körülmények között végzett kísérletek során alkalmazott kifejezés, mivel a természetben nem léteznek állandó körülmények. Természetes környezetben az óra minden reggel, a fényszakasz kezdetén újra beállítódik, így ilyenkor a ZT skála csak $ZT = 0$ -tól $ZT = 24$ -ig terjed.
- e. Az állandó körülmények között végzett kísérletekben szubjektív nappalnak (ill. szubjektív éjszakának) nevezzük azt az időtartamot, amely az órát beállító (fény/sötét vagy meleg/hideg) ciklusoknak megfelelően a belső óra által jelzett nappali (ill. éjszakai) szakasznak felel meg. A szubjektív hajnal tehát a környezetben rendszerint bekövetkező sötét-fény váltás időpontját jelenti, a kísérletben alkalmazott állandó fényviszonyok mellett azonban csak az óra által jelzett hajnali időpont, amelyet nem kísér valós sötét-fény átmenet.



2.2. ábra. Egy cirkadián óra által szabályozott folyamat jelleggörbéje

Az ábrán egy cirkadián óra által szabályozott ritmikus folyamat mérhető paraméterét tüntettük fel az idő függvényében. A vizsgálat ideje alatt uralkodó fényviszonyokat fekete ill. fehér sávokkal jelöltük az idő-tengely mentén. Periódushossznak nevezzük a görbe két azonos pontjának, pl. két egymást követő maximum pontjának időben kifejezhető távolságát. A cirkadián ritmus maximum és minimum értéke között mérhető különbségnek a fele a ritmus amplitúdója. A ritmus fázisán a ritmikus folyamatot leíró jelleggörbe egy jellegzetes pontját, általában a maximumpontját értjük, órákban kifejezve. A további paraméterek részletesebb magyarázatát lásd a szövegben.

2.5. A növényi cirkadián óra felépítése

Bár a cirkadián óra működését először növényekben fedezték fel (de Marian, 1729), az oszcillátor működéséről és elemeiről nyert legtöbb információnk kéalgákon (*Synechococcus* sp.), gombákon (*Neurospora crassa*), ecetmuslicán (*Drosophila melanogaster*) és egéren (*Mus musculus*) végzett kísérletekből származik (Harmer és mtsai, 2001). A növényi molekuláris óra működéséről még néhány évvel ezelőtt is meglehetősen kevés adat állt rendelkezésünkre. A növényi cirkadián szabályozás folyamatának molekuláris mechanizmusa legjobban *Arabidopsis thaliana*-ban jellemzett, bár számos adat áll rendelkezésünkre a *Pharbitis nil*, *Kalanchoe* és *Phaseolus* fajok cirkadián ritmusairól is (Bünig, 1935; Lumsden és mtsai, 1995; Engelmann és Johnsson, 1998; Borland és mtsai, 1999).

Az alábbiakban az *Arabidopsis thaliana* cirkadián rendszerét vázolom fel a klasszikus óramodell szerinti felosztást követve, majd az utóbbi néhány év kutatómunkájának

eredményeként megismert, bár funkciójában nem teljesen jellemzett óraelemekről rendelkezésre álló információkat rendszerezem.

2.5.1. Az oszcillátor

A növényi központi oszcillátor vázlatos szerkezetét a Salomé és McClung által közölt (2004) *Arabidopsis thaliana* óramodell alapján mutatom be (2.3. ábra). A növényi cirkadián óra oszcillátora - hasonlóan a többi modellszervezetben megismert óramechanizmusokhoz - egy transzkripció-transzlációs szabályozáson alapuló negatív visszacsatolási kör, amelynek három fő eleme van (Alabadi és mtsai, 2001): *CCA1*, *LHY* és *TOC1*.

A *CCA1* és *LHY* fehérjék egymással nagyfokú hasonlóságot mutatnak. Mindkét óraelem atipikus DNS-kötő fehérje, amely a DNS-en aszimmetrikus nukleotid szekvenciát ismer fel, és ehhez monomer formában kötődik. A fehérjék tartalmaznak egy MYB-szerű domént, amelynek egyetlen MYB struktúrája a szekvenciaspecifikus DNS-kötésért felelős. A MYB domén általában 1-3 ismétlődő MYB szekvenciát tartalmaz, amelyeken belül a fehérjelánc egy-egy ún. helix-turn-helix szerkezetbe rendeződik (Stracke és mtsai, 2001). A MYB-domént hordozó transzkripció regulátorok családja *Arabidopsis*-ban meglehetősen nagy (Riechmann és mtsai, 2000a; 2000b), többségük azonban 2-3 MYB-szekvenciát hordoz, és dimerek formájában kapcsolódik a DNS-lánchoz (Romero és mtsai, 1998). A *CCA1* fehérjét eredetileg egy *in vitro* DNS-kötő vizsgálat során azonosították azon képessége alapján, hogy a klorofill A/B-kötő (CHLOROPHYLL A/B-BINDING = CAB) fehérjét kódoló gén promoterében található ún. fény-válasz elemhez (light-responsive element = LRE) kötődik (Kenigsbuch és Tobin, 1995). A későbbiek során kiderült, hogy a *CCA1* a cirkadián óra fontos szabályozóeleme (Wang és Tobin, 1998). Az *LHY* gén azonosításához egy olyan mutáns izolálási kísérlet sorozat vezetett, amelyben hosszú hipokotilú, későn virágzó *Arabidopsis* növényeket kerestek (Schaffer és mtsai, 1998). Az így azonosított mutánsban (*lhy-1*) az *LHY* gén konstitutívan magas szinten expresszálódik. A *CCA1* és az *LHY* fehérje által felismert DNS motívum az AAAATCT vagy az AAATATCT szekvencia; ez utóbbi szekvencia típust „esti elemnek” (EE = evening element) nevezzük, mivel olyan gének promoterében azonosították, amelyek cirkadián kifejeződése este éri el maximumát (Harmer és mtsai, 2000). A *CCA1* és *LHY* transzkripció faktorok specifikusan kötődnek ezen elemeket tartalmazó promoterekhez és résztvesznek a génexpresszió szabályozásában. A *CCA1* és az *LHY* gén expressziója a cirkadián óra szabályozása alatt áll: az mRNS és fehérje akkumuláció ritmusának maximumát reggeli fázisban (ZT1) mérhetjük. A *CCA1/LHY* gének

kifejeződése fényvel indukálható, ami arra utal, hogy ezek a molekulák esetleg részt vesznek az óra fázisának fényindukált átállításában (phase resetting).

A két gén bármelyikének túltermelése számos cirkadián óra által szabályozott folyamat aritmiáját okozza (Wang és Tobin, 1998; Schaffer és mtsai, 1998). Az aritmia sötétben és fényben egyaránt megfigyelhető. A CCA1 ill. LHY fehérjét túltermelő növények későn virágoznak, és hipokotiljuk is hosszabb, mint a vad típusú növényeké. A két gén bármelyikének funkcióvesztéssel járó mutációja ugyanazon cirkadián ritmusok periódushosszának rövidülését okozzák, valamint korai virágzást és hipokotilhossz rövidülést eredményeznek a mutáns növényekben (Green és Tobin, 1999; Mizoguchi és mtsai, 2002).

Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az LHY és a CCA1 fehérje nagyon hasonló szerepet tölt be a növényi cirkadián szabályozásban. A két protein abundanciájának megváltozása többé-kevésbé ugyanazon cirkadián működési zavarokhoz vezet, ami arra utal, hogy köztük funkcionális redundancia áll fent. Ezt megerősíteni látszik, hogy a növényekben egyikük hiánya sem okoz aritmiát, míg az *lhy/ccal* kettős mutáns növények állandó fényben és állandó sötétben is aritmiássá válnak (Alabadí és mtsai, 2002; Mizoguchi és mtsai, 2002; Carré és Kim, 2002). Habár az aritmia állandó körülmények között nem azonnal, hanem csak bizonyos idő elteltével alakul ki, mégis, a kétféle mutációt hordozó növények cirkadián fenotípusa sokkal erőteljesebb az egyedi mutánsokban megfigyelnél.

A funkcionális redundancia nem új keletű jelenség a cirkadián szabályozásban: az emlősökben megtalálható mPER1, mPER2 és mPER3 (PER = PERIOD), ill. a CRYPTOCHROME 1 (CRY1) és CRYPTOCHROME 2 (CRY2) fehérjék is hasonló módon, részben átfedő funkciót látnak el a cirkadián óra működésében (Panda és mtsai, 2002; Chang és Reppert, 2001). Tudjuk, hogy az oszcillátor elemek minden leírt óramodellben negatív visszacsatolás révén szabályozzák önmaguk kifejeződését (lásd 2.4. fejezet, oszcillátor elem definíció) (Dunlap, 1999). Mivel az LHY és a CCA1 fehérjék negatívan szabályozzák saját transzkripciójukat (Kim és mtsai, 2003; Wang és Tobin, 1998) és a hiányuk, vagy túltermelésük erős cirkadián fenotípus kialakulásához vezet, valószínű, hogy a *CCA1* és az *LHY* is a központi oszcillátor mechanizmus eleme.

A növényi központi oszcillátor működése azonban feltételez legalább még egy órafehérjét, amely aktivitásának maximuma - szemben az *LHY* és *CCA1* génnel - az esti időszakra tehető, és működése révén bezárja a negatív visszacsatolós szabályozókört. Az oszcillátor harmadik eleme a *TOC1* gén ill. fehérje, amit egy rövid periódust okozó cirkadián óra mutáció térképezése során azonosítottak (Somers és mtsai, 1998a; Strayer és mtsai, 2000).

A TOC1 fehérje hasonlít a bakteriális két-komponensű jelátviteli rendszerekben található ún. „response regulator” (RR) fehérjékhez (Mizuno, 1998). A kétkomponensű jelátviteli folyamat tulajdonképpen egy többlépcsős foszforillációs mechanizmus, amely során egy külső jel hatására egy szignáltranszdukciós folyamat indul el. A kétkomponensű rendszer szenzor fehérje egy hisztidin kináz, amelynek bemeneti („input”) doménje érzékeli a környezetéből származó jelet és elindít egy autofoszforillációs mechanizmust. Ennek következtében a szenzor fehérje transzmitter doménjében foszforillálódik egy konzervált pozícióban elhelyezkedő hisztidin. A foszfor csoport ezután áttevődik a két-komponensű rendszer másik elemére, a válasz-szabályozó („response regulator”) fehérje fogadó („receiver”) doménjének konzervált aszparaginsav oldalláncára. A fogadó domén foszforilláltsági állapota határozza meg a „response regulator” fehérje kimeneti („output”) doménjének az aktivitását (Stock és mtsai, 2000). A TOC1 fehérjében hiányzik az RR fehérjékben megtalálható, foszforillálódó, konzervált aszparaginsav, így a TOC1 fehérjét PSEUDO RESPONSE REGULATOR 1-nek (PRR1) is nevezik. A fehérje a C-terminális végen tartalmaz még egy ismert, ún. CONSTANS, CONSTANS-LIKE, TIMING OF CAB 1 (CCT) motívumot, amely a CONSTANS fehérjecsalád tagjaiban található meg (Robson és mtsai, 2001). A CCT motívum hozzávetőleg 45 aminosavból álló proteinszakasz, amely bázikus aminosavakban gazdag, és az N-terminális végen tartalmaz egy olyan szekvenciát, amely nukleáris lokalizációs szignálként funkcionálhat.

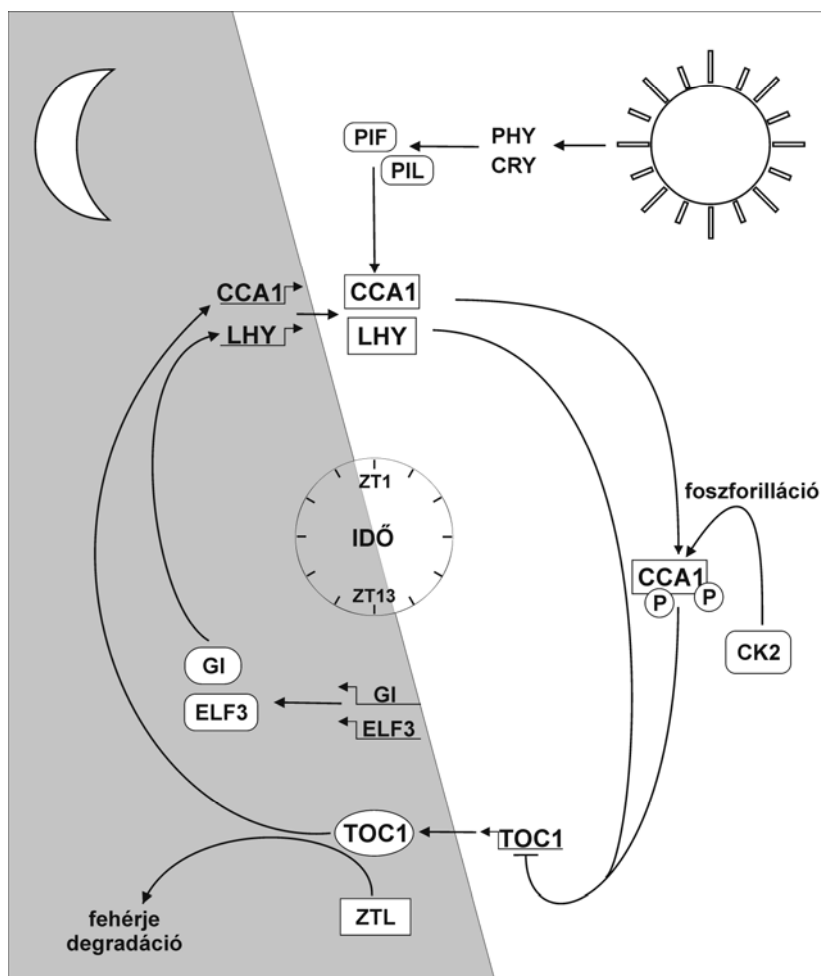
A *TOC1* (*PRR1*) egy 5 elemből álló gén család tagja; a család többi elemét a későbbiek során mutatom be. A *toc1* mutáns növényekkel végzett kísérletek eredményei alapján megállapították, hogy a TOC1 fehérjének kettős szerepe van: részt vesz a fényjel oszcillátor felé történő közvetítésében ill. integrálásában, és fontos szabályozó funkciója van a korai fotomorfogenezisben is (Somers és mtsai, 1998a; Más és mtsai, 2003). A TOC1 fehérje vörös fényben esszenciális eleme a központi oszcillátornak, míg kék fényben a megfelelő periódushossz ill. amplitúdó fenntartásában fontos. A mutánsban megváltozik a hipokotilmegnyúlás fényfüggő szabályozása, valamint a mutáció hatására a növények mind hosszú, mind rövid nappalon korábban virágoznak, mint a vad típusú növények. Ez utóbbi fenotípus a virágzás fotoperiodikus szabályozásának zavarát tükrözi. A cirkadián óra által szabályozott élettani folyamatok között kiemelkedő jelentőségű a nappalok hosszának szezonális (évszakfüggő) változására adott válaszreakciók összessége, azaz a fotoperiodizmus, amelynek növényekben az egyik legszembetűnőbb formája a virágzás indukciója a nappalok hosszúságának megváltozásával. Az *Arabidopsis* egy fakultatív hosszúnappalos növény, amely hosszúnappalon (16 óra fény/8 óra sötét) hamarabb virágzik,

mint rövidnappalon (8 óra fény/16 óra sötét). A rövidnappalon, nem induktív körülmények között észlelt korai virágzás általában arra utal, hogy a növény fotoperiodikus szabályozási folyamatai sérültek.

A *TOC1* gén kifejeződése cirkadián ritmust mutat, esti (ZT13) maximummal (Strayer és mtsai, 2000). Promoterének szekvencia analízise kimutatta, hogy tartalmaz egy ún. „esti elemet”, amely a génexpresszió cirkadián regulációjához és az esti fázis kialakításához szükséges (Alabadi és mtsai, 2001). Az Alabadi és munkatársai által elvégzett *in vitro* DNS-kötő vizsgálat kimutatta, hogy a CCA1 és az LHY képes a *TOC1* promoteréhez kötődni. Megfigyelték, hogy a CCA1 ill. LHY fehérjét túltermelő növényekben a *TOC1* mRNS szintje nagyon alacsony, amiből arra következtettek, hogy a növényekben az LHY/CCA1 közvetlenül gátolja a *TOC1* transzkripcióját. A *toc1-1* mutáns növényekben az *LHY* és *CCA1* jóval alacsonyabb szinten fejeződik ki, mint vad típusú növényekben, ami amellet szól, hogy a *TOC1* pozitív regulátora a két MYB fehérje kifejeződésének (Alabadi és mtsai, 2001).

Az *Arabidopsis* cirkadián óra oszcillátorának legegyszerűsített modellje a fent bemutatott három molekula kölcsönös regulációján alapul (2.3. ábra). A *CCA1* és *LHY* gén expressziójának maximumát reggel, a fényfázis kezdete után körülbelül 1 órával (ZT1) éri el. Az mRNS-ről a citoplazmában képződő fehérjék visszajutnak a sejtmagba és ott hozzákapsolódnak a *TOC1* gén promoter szekvenciájához, ahol a *TOC1* gén kifejeződését gátolják. Magas CCA1/LHY szint (ZT1) mellett tehát a *TOC1* gén kifejeződése igen alacsony szintre esik vissza. Ennek következtében a *TOC1* fehérje szintje is csökkenni kezd a sejtben. Mivel a *TOC1* fehérje pozitívan szabályozza a *CCA1/LHY* gének kifejeződését, ezért a csökkenő *TOC1* szint eredményeként a *CCA1/LHY* gének expressziója fokozatosan csökkenni kezd. A *TOC1* fehérje nem közvetlenül szabályozza a két MYB faktor kifejeződését, mivel nem képes DNS kötésére. A CCA1/LHY fehérjék szintjének csökkenése eredményeként napközben a *TOC1* gén felszabadul a represszió alól és estére (ZT13) eléri a maximális expressziós szintjét. Ennek eredményeként a két MYB fehérje szintje fokozatosan emelkedni kezd, hogy reggelre, amikor a *TOC1* fehérje szintje már lecsökkent, újra nagy mennyiségben legyen jelen a sejtekben. Ezzel a lépéssel a szabályozó kör bezárul és egy újabb 24 órás ciklus veszi kezdetét.

Az *CCA1/LHY* és *TOC1* gének és fehérjetermékeik részvételével létrejött visszacsatolós szabályozó kör önmagában nem elegendő a közel 24 órás periodushosszú ciklusok kialakításához, mivel egyéb szabályozó lépések híján a szabályozó kör néhány óra alatt végig futna. A napi ritmus létrehozásához számos késleltető mechanizmusnak, további csatolt szabályozó köröknek kell beépülnie - a kutatások mai eredményei alapján - a



2.3. ábra. Az *Arabidopsis* cirkadián óra modellje (Salomé és McClung, 2004)

A *TOC1*, *LHY* és *CCA1* mRNS és fehérje mennyisége napi oszcillációt mutat. A *TOC1* maximális kifejeződése este (ZT13), míg az *LHY* és *CCA1* maximuma a fényszakasz kezdetén (ZT1) mérhető. Az *LHY* ill. a *CCA1* a *TOC1* gén promoterében található esti elemhez kapcsolódik, ahol a *TOC1* expressziót gátolják. Reggel tehát, amikor az *LHY* és *CCA1* fehérjéből sok van a sejtben, a *TOC1* fehérje szintje nagyon alacsony. Estére a *LHY* és *CCA1* fehérjék mennyisége a sejtben lecsökken, a *TOC1* gén felszabadul a represszió alól, és a sötét fázis elején eléri a maximális expressziós szintet. A visszacsatolási kör pozitív szabályozó elemeként az éjszaka folyamán a *TOC1* aktiválja az *LHY* és *CCA1* expresszióját, melynek következtében reggelre ismét megemelkedik az *LHY/CCA1* fehérje mennyisége a sejtben. Ezzel a kb. 24 órás oszcillációs kör bezárul és egy újabb ciklus kezdődik. A fitokrómok (*PHY*) és kriptokrómok (*CRY*) az óra fénybeállításában játszanak szerepet. A lehetséges modell szerint a fotoreceptorok fény hatására aktív formába kerülnek, majd transzkripciós faktorokkal (*PIF* = *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR*; *PIL* = *PIF-LIKE*) kapcsolódva indukálják a *CCA1* és az *LHY* kifejeződését. Az *EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*) és a *GIGANTEA* (*GI*) fehérje a megfelelő szintű *LHY* és *CCA1* génexpresszióhoz szükséges. A *CASEIN KINASE 2* (*CK2*) a *CCA1* aktivitását foszforilláción keresztül szabályozza. A *ZTL* fehérje a *TOC1* degradációját irányítja, amely a sötét fázisban folyik nagyobb sebességgel. Az ábra fehér szektora a fényszakaszt, a szürke szektora a sötét fázist mutatja. Az ábra központjában látható óra a ZT időt mutatja: ZT0 a sötét-fény átmenet időpontját, ZT12 a fény-sötét átmenet idejét jelöli.

feltételezett központi oszcillátort alkotó 3 molekula kölcsönös szabályozási mechanizmusát magába foglaló negatív visszacsatolási körbe.

Az egyik ilyen késleltető mechanizmus az órafehérjék működésének szabályozása poszt-transzlációs módosításon keresztül. A *CASEIN KINASE 2* (*CK2*) fehérjéről kimutatták, hogy képes a *CCA1* fehérjét foszforillálni (Sugano és mtsai, 1998; 1999). A *CK2* fehérje egyik alegységének túlermelése a növény cirkadián ritmusainak periódushosszában erősebb rövidülést okoz, mint maga a *CCA1* gén mutációja. A *CCA1* intenzívebb foszforillációja mellett tehát a sejtben csökkent *CCA1* funkció jeleit tapasztalhatjuk. A csökkent *CCA1* működést magyarázhatja a *CCA1* fehérje degradációjának felgyorsulása azáltal, hogy a foszforilláció következtében a molekulák kijelölődnek a degradációra. Ezt alátámasztja, hogy sok fehérje degradációját megelőzi a fehérje foszforillációja; többek között a *Neurospora* cirkadián oszcillátor kulcs komponensének, a *FREQUENCY* (*FRQ*) fehérjének a foszforilláltsági állapota is egyértelműen kihat a molekula stabilitására (Yang és mtsai, 2003). A szintén *Neurospora* óraelem, a *WHITE COLLAR 1* (*WC-1*) fehérje hiperfoszforillálódása szintén előfeltétele a fehérje degradációjának (Talora és mtsai, 1999).

Az *Arabidopsis* *TOC1* fehérje degradációjának szabályozása szintén alapvető fontossággal bír a közel 24 órás cirkadián oszcilláció kialakításában. A *TOC1* degradációját

egy F-box fehérje, a ZEITLUPE (ZTL), fényfüggő módon irányítja (Más és mtsai, 2003; bővebben lásd a 2.5.2.1. és az 5.11. fejezetekben).

A cirkadián szabályozásban működő EARLY FLOWERING 3 (ELF3) és GIGANTEA (GI) fehérjékről bebizonyították, hogy nélkülözhetetlen szerepük van a kora reggel megfigyelhető magas LHY és CCA1 expresszió kialakításában (Doyle és mtsai, 2002). Az *ELF3* és a *GI*, a *TOC1* génhez hasonlóan, a sötét fázisban fejeződik ki legmagasabb szinten, szabályozó szerepük tehát az éjszaka folyamán érvényesül. Ezeknek a fehérjéknek a szerepét részletesebben a következő fejezetben ismertetem.

2.5.2. „Input”

A cirkadián rendszer megfelelő működéséhez a belső biológiai óra által mért időnek azonos fázisban kell lennie az abszolút, környezetben mérhető idővel. Ennek hiányában a növény elveszti mindazon adaptív előnyöket, amelyekhez a cirkadián szabályozás révén jut. A cirkadián ritmusok periódushossza nem pontosan 24 óra, ezért az óra fázisa rendszeres korrekcióra szorul. A cirkadián óra és a környezetben mért idő szinkronizációja a természetben minden egyes nap, a biológiai óra újra és újra történő beállításával („resetting”) valósul meg. Az óra beállításában ritmikusan változó környezeti paraméterek vesznek részt; a két legfontosabb beállító tényező a fény és a hőmérséklet (Edmunds, 1988; Roenneberg és Foster, 1997). Az óra beállítása molekuláris szinten azt a folyamatot jelenti, amely során a környezeti jel hatására valamely központi óraelem mennyisége vagy aktivitása a ciklus egy adott pontján úgy változik meg, hogy az így kialakult egyensúlyban az oszcillátor a ciklus egy másik pontjára jellemző állapotba kerül (Crosthwaite, és mtsai, 1995). Ezek eredményeként a cirkadián óra fázisa megváltozik és az óra az új fázisban oszcillál tovább.

2.5.2.1 A cirkadián óra beállítása fénnel

A növényi cirkadián óra és a fény kapcsolata nagyon speciális. Az *ecetmuslica*, egér és *Neurospora* oszcillátorának működése folyamatos fényben leáll, a kékalgák órája konstans sötétben felfüggeszti működését, míg a növények cirkadián órája állandó sötétben és állandó fényben is működik (Millar és Kay, 1991; Strayer és mtsai, 2000). Folyamatos fényben az oszcilláció periódushossza nagyban függ az alkalmazott fény minőségétől és mennyiségétől, így a megfelelő fázis kialakítása mellett a fény „input” folyamatok az oszcilláció sebességének beállításában is igen fontos szabályozó szerepet játszanak. A fény „input”

folyamatokban résztvevő fotoreceptorokat elsőként növényekben azonosították (Somers és mtsai, 1998b).

A fotoreceptorok szerepe a fény „input” folyamatokban

A fény érzékelésében a növényekben speciális receptorfehérjék vesznek részt. A növényi fotoreceptorokat fényelnyelésük, illetve hatásspektrumuk alapján 3 nagy csoportba osztjuk (Chen és mtsai, 2004):

1. A vörös/távoli vörös fény érzékelésében résztvevő fitokrómok.
2. Az UVA és kék fény tartományban elnyelő kriptokróm és fototropin fotoreceptorok. (Cashmore és mtsai, 1999; Lin és Shalitin, 2003; Briggs és mtsai, 2001a; Lin, 2002)
3. UVB fotoreceptorok (Jansen, 2002).

A cirkadián órát beállító fényimpulzus érzékelésében a fitokróm és a kriptokróm fényreceptorok szerepe bizonyított (Somers és mtsai, 1998b; Yanovsky és mtsai, 2001).

A fitokrómok két, spektroszkópiai szempontból különböző formában léteznek (Schäfer és Bowler, 2002): a biológiailag inaktív, ún. P_r formában és az aktív P_{fr} formában. A fitokrómok P_r formában szintetizálódnak, amelynek elnyelési maximuma a vörös hullámhossz-tartományban ($\lambda_{max}=660$ nm) van. A foton elnyelésével a molekula szerkezete megváltozik, kialakul a biológiailag aktív, ún. P_{fr} forma, amely a fényindukált jelátviteli utak kiindulópontja. Ennek a formának az abszorpció maximuma a távoli-vörös hullámhossz-tartományba esik ($\lambda_{max}=730$ nm), és távoli vörös fény elnyelésével visszaalakul P_r formává, azaz inaktiválódik (reverzibilis konverzió). A fitokrómokat kódoló géncsaládnak *Arabidopsis*-ban 5 tagja van, amelyek a *PHYA*, *B*, *C*, *D*, *E* nevet kapták (Sharrock és Quail, 1989; Clack és mtsai, 1994). Az egyes gének által kódolt fehérjék nagyon hasonlítanak egymásra, szerkezetük, doménjeik is megegyeznek, de a köztük meglévő különbségek eltérő funkciókkal ruházzák fel őket. A *PHYA* az egyetlen ún. I-es típusú fitokróm *Arabidopsis*-ban. Az I-es típusú fitokrómokra jellemző, hogy fényben instabilak, gyorsan elbomlanak, így legnagyobb mennyiségben a sötétben csírázó (föld alatti) és sötétben nőtt, etiolált növényekben található meg (Furuya, 1989; Furuya és Schäfer, 1996). E tulajdonságok egyértelműen meghatározzák a *PHYA* funkcióját: elsősorban a csírázás megindításában játszik szerepet, illetve nagyon alacsony fényintenzitáson a de-etioláció (zöldülés) szabályozásában vesz részt. A II-es típusú fitokrómkészletet *Arabidopsis*-ban a többi (*PHYB-E*) gén terméke alkotja. Ezek a fehérjék fényben stabilak (Furuya, 1989; Furuya és Schäfer, 1996), a zöld növények domináns fitokrómjai, és többek között a de-etioláció folyamatát, a szár megnyúlását, az

árnyékelkerülést és a virágzást szabályozzák. Az etiolált növények legabundánsabb, vörös fény érzékelésért felelős fotoreceptor a PHYA, míg a fényen nőtt növényeké a PHYB.

A kék fényt és UVA tartományt érzékelő fényreceptorok közül *Arabidopsis*-ban négyet azonosítottak: CRY1, CRY2 (kriptokrómok), PHOT1, PHOT2 (fototropinok), amelyek közül a fototropinok nem játszanak szerepet a cirkadián óra fényérzékelésében. A kriptokróm fotoreceptorok elsősorban a kék/UVA fény-mediált fotomorfogenikus válaszreakciók (pl. de-etioláció, virágzás, fényindukált génexpresszió) kiváltásában játszanak szerepet (Cashmore és mtsai, 1999; Lin és Shalitin, 2003). Kék fény hatására a CRY2 mennyisége csökken, míg a CRY1 fehérje szintje nem változik, ennek megfelelően CRY2 szerepe alacsony, míg a CRY1-é inkább magasabb fényintenzitáson fontos.

A fényérzékelés első lépéseként a fotoreceptorok aktiválódnak, ami elindítja az „input” jelátviteli mechanizmust, amelyen keresztül a környezet fényviszonyairól származó információ eléri a központi oszcillátort. Az oszcillátorban ennek hatására bekövetkező változások eredményeként az oszcilláció fázisa megváltozik („phase resetting”). A fotomorfogenezis során aktiválódó fényindukált jelátviteli folyamatokról igen sok információ áll rendelkezésünkre (Quail, 2002), ám a cirkadián óra fény „input” folyamatait, a kiindulási lépésen túl (fotoreceptor aktiváció), nem igazán ismerjük. Feltehető, hogy az óra a fotomorfogenezisben résztvevő jelátviteli láncokkal ill. szignáltranszdukciós molekulákkal részben átfedő utakat ill. elemeket használ (Yanovsky és mtsai, 2001), az e téren gyűjtött adatok azonban igen hiányosak.

Növényi fotoreceptor mutánsok (*phyA*, *phyB*, *cry1*, *cry2*) illetve ezek kettős, hármas és négyes mutáns kombinációinak vizsgálata során sikerült meghatározni, hogy ezek a fotoreceptorok milyen hullámhosszú fény érzékelésével vesznek részt az óra fény „input” folyamataiban (Yanovsky és mtsai, 2001). A kísérletek során a fény/sötét ciklusokon nevelt növényeket folyamatos, gyenge fényre helyezték úgy, hogy az utolsó sötét fázis ideje alatt a növények egy része különböző fénykezeléseket kapott. Vad típusú növényekben a fénykezelések hatására az óra új fázisra állítódik át. Ezután a különböző mutáns és vad típusú növényekben a levélmozgás szabadon futó ritmusát követték nyomon több napon keresztül, majd a fénykezelt növények cirkadián fázisát összehasonlították a nem kezelt, kontroll növényekével. A kísérletek kimutatták, hogy a PHYA fotoreceptor a távoli vörös- és kék fény érzékelésében, a CRY1 és CRY2 a kék fény érzékelésében, a PHYB pedig a vörös fény érzékelésében, ill. a jel óra felé történő továbbításában vesz részt. Vörös fény hatására a *phyA/phyB* dupla mutáns növényben a vad típuséhoz képest csökkent, de még mindig jelentős

fáziscsúszást figyeltek meg, ami arra utal, hogy további fotoreceptorok (PHYC-E) is részt vesznek az óra vörös fény bemeneti jelének érzékelésében.

A szabadon futó cirkadián ritmus periódushossza a fény intenzitásának növelésével csökken (Aschoff szabály; Aschoff, 1979). Fotoreceptorok hiányában a növények nem képesek bizonyos hullámhossztartományok érzékelésére, így a fotoreceptorok mutációja a növényekben a fényintenzitás csökkenéséhez hasonló hatással van az óra működésére. A fotoreceptor mutánsok állandó fényben történő vizsgálatokkor a szabadon futó ritmus periódushosszának megváltozását figyelhetjük meg. Somers és munkatársai egy lumineszcens riporterkonstrukció segítségével különböző fotoreceptor mutáns növényekben követték nyomon a *CAB2* gén cirkadián expresszióját. A kísérletben alkalmazott riporter gén a szentjánosbogár luciferáz (LUC) enzimjét kódoló gén volt, amelyet a *CAB2* gén promotorszekvenciája után építettek be a riporterkonstrukcióba. A *LUC* riporter gén alkalmasnak bizonyult a génexpresszió valós idejű, transzkripciós szintű vizsgálatára, mivel a gén által kódolt fehérje néhány katalizált reakció után gyorsan lebomlik. A luciferáz által irányított reakció könnyen kimutatható végterméke a lumineszcencia, amely élő, intakt növényekben teszi lehetővé a génkifejeződés nyomon követését, hosszabb időn keresztül. Somers és mtsai (1998) kimutatták, hogy alacsony intenzitású vörös és kék fényben a *phyA* mutáns növényekben a *CAB2:LUC* riporter gén expresszió cirkadián ritmusának periódushossza - a vad típusú háttérben megfigyelhető ritmus periódushosszához képest - megnő, míg erős vörös fényben ugyanez a jelenség figyelhető meg a *phyB* mutánsokban. A PHYB mellett további fitokrómok vehetnek részt a vörös fény „input” érzékelésében, mivel növekvő fényintenzitás mellett – hasonlóan a vad típusú növényekhez - a *phyB* mutánsban is észlelhető a fény periódushossz rövidítő hatása. Hasonló kísérletben, kék fény alkalmazása mellett, igazolták a CRY1 és CRY2 fehérjék redundáns funkcióját a kék fény bemeneti jel érzékelésében és továbbításában.

A fent említett kísérletek bebizonyították, hogy a cirkadián óra fény „input” mechanizmusában több fotoreceptor együttesen vesz részt, szerepük a megfelelő fázis és periódushossz kialakításában redundáns. Ezt támasztja alá az a felismerés, hogy a *phyA/phyB/cry1/cry2* négyszeres mutáns növény képes a környezetből származó fényjel továbbítására a cirkadián oszcillátor felé (Yanovsky, 2000). Ez azért is érdekes tény, mivel ez a mutáns képtelen normális fotomorfogenikus válaszok kialakítására. Míg az egyedfejlődésre specifikus folyamatok irányításában ez a négy fotoreceptor domináns szereppel bír, a cirkadián óra fény „input” mechanizmusában valószínűleg további fotoreceptorok (PHYC-E) is részt vesznek. A fény „input” és az oszcillátor közti kétirányú kölcsönhatást szemlélteti az a

tény, hogy a fitokróm és kriptokróm fotoreceptor gének (*PHYA,B,D,E*; *CRY1,2*) cirkadián módon fejeződnek ki (Tóth és mtsai, 2001), amely az óra fény „input” folyamatokkal szemben mutatott érzékenységeinek finom szabályozását teszi lehetővé.

Az eddig leírt kísérleti eredményeket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a növényi cirkadián óra fény „input” mechanizmusában a következő fotoreceptorok vesznek részt:

- a *PHYA*, *CRY1* és *CRY2* redundáns funkcióval rendelkeznek a kék fény jel közvetítésében;
- egyedül a *PHYA* képes a távoli vörös fény érzékelésére és a jel továbbítására az oszcillátor felé;
- a *PHYA*, *PHYB*, *PHYD* és *PHYE* additív módon a juttatja el a vörös fény hatásait az órához (Devlin és Kay, 2000).

A fent bemutatott eredmények mellett leírták még, hogy:

- a *CRY1* jelenléte szükséges a *PHYA* indukált jelátviteli mechanizmusokhoz vörös ill. kék fényben (Devlin és Kay, 2000);
- a *PHYB* fehér fényben szükséges a *CRY2* funkciójához (Már és mtsai, 2000).

Az óra és a fény kapcsolata nem merül ki a fény fázisra gyakorolt hatásában. Ismert tény, hogy az óra a 24 órás ciklus során maga is szabályozza a fázist moduláló hatásokkal szembeni érzékenységét. Más szóval, a cirkadián óra a 24 órás ciklus folyamán nem egyformán reagál a ritmust átállító fénykezelésekre: a szubjektív hajnal előtt adott fényimpulzus a ritmus fázisát korábbra hozza („phase advance”), a szubjektív este után alkalmazott fénykezelés a fázist későbbre tolja („phase delay”), míg szubjektív nappal az óra csak minimális fáziscsúszással válaszol az órát beállító fénystimulusra. A fénykezelés hatására kialakult új fázisnak a nem fénykezelt minták fázisához képest (pozitív ill. negatív irányba) mutatott eltérését a fénykezelés időpontjának (ZT) függvényében történő ábrázolásával az ún. phase response curve (PRC) megrajzolása válik lehetővé (Johnson, 1990). Az óra fény általi beállíthatóságának mértéke a nap folyamán cirkadián görbe szerint változik, mivel az óra fázis-specifikusan gátolja a fénystimulusra adott válaszreakció erősségét. Ezt a jelenséget „gating”-nek (kapuzó mechanizmus) nevezzük. A „gating” szabályozási mechanizmus azonban nemcsak az óra beállíthatóságának érzékenységében nyilvánul meg. Régóta ismert, hogy a cirkadián óra által szabályozott gének egy része egyben fényregulált is, tehát a fény a fotoreceptorokon keresztül, az órát kikerülve közvetlenül képes ezeknek a géneknek az expresszióját szabályozni. A fénynek ezt a gyors, közvetlen hatását akut válasznak nevezzük. A cirkadián óra a „gating” mechanizmus révén képes

fázisspecifikusan gátolni a fényre adott akut válasz erősségét, azaz tulajdonképpen az óra fázisának megfelelően csökkenti, vagy növeli az adott folyamat fényérzékenységét. A gátló hatás tehát maga is cirkadián ritmust mutat.

A fény „input” jelátviteli lánc elemei

Habár a fény „input” első lépéséről, azaz a fényérzékelésben résztvevő receptorokról már meglehetősen sok adat áll rendelkezésünkre, a fényreceptoroktól az oszcillátor felé induló jelátviteli lánc elemeit még nem sikerült egyértelműen azonosítani. Az eddig leírt fény jelátviteli elemek közül csak igen kevés szerepét vizsgálták a cirkadián „input” folyamatokban. A fotomorfogenezisben sérült *constitutive photomorphogenesis 1 (cop1)* és *de-etiolated 1 (det1)* mutánsok periódushossza állandó sötétében rövidebb lesz (Millar és mtsai, 1995), bár a COP1 és DET1 hatásmechanizmusát az órában nem ismerjük. A FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL 1 és 3 (FHY1 és FHY3) hiányában távoli vörös fénnel nem állítható át megfelelően az óra fázisa (Yanovsky és mtsai, 2000; 2001), így ezen fehérjék is nélkülözhetetlenek az óra normális működéséhez.

A kriptokróm fotoreceptorok a sejten belül konstitutívan a sejtmagban találhatók (Guo és mtsai, 1999; Cashmore és mtsai, 1999), a fitokrómok pedig fényfüggő módon a sejtmagba vándorolnak (Nagy és Schafer, 2000). Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a fényindukált jelátviteli folyamatok korai lépései a sejtmagban játszódnak le, ahol a fotoreceptorok közvetlenül, vagy jelátvivő molekulákon keresztül szabályozhatják a fényregulált gének kifejeződését. A fitokrómok által szabályozott folyamatok egyik legfontosabb eleme valóban a génexpresszió közvetlen szabályozása transzkripciós faktorok közreműködésével. Erre bizonyítékot a fitokrómokkal kölcsönható fehérjék keresése során találtak. Az elsőként azonosított fitokróm B-vel kölcsönható fehérje a PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) volt (Ni és mtsai, 1998). A PIF3 egy bHLH típusú transzkripciós faktor, amely az aktív fitokróm molekulával kapcsolódva kötődik számos fényindukált gén promoterében található, ún. G-box szekvenciához, és szabályozza ezeknek a géneknek a kifejeződését (Martinez-Garcia és mtsai, 2000). Ilyen G-box elem található a *CCA1* és *LHY* óragének promoterében is, amelyekhez a PIF3 szintén kapcsolódni képes. *PIF3*-antiszensz növényekben (amelyekben a *PIF3* mRNS szintjét antiszensz konstrukcióval csökkentették) az *LHY* és *CCA1* gének fényindukciója erősen csökken, ami arra utal, hogy a PIF3 fehérje *in vivo* körülmények között szerepet játszik a két óragén kifejeződésének fényregulációjában.

A fenti eredmények alapján a cirkadián óra fény „input” mechanizmusának leírására a következő modell vázolható fel: vörös fény hatására a PHYB aktív konformációba kerül, bejut a sejtmagba, ahol az *LHY/CCA1* promoterhez kötött PIF3 transzkripciós faktorhoz kapcsolódik; az így létrejött (PIF3 homodimerből és PHYB-ből álló) transzkripciós aktivátor komplex indukálja az *LHY* és *CCA1* gének expresszióját; ennek eredményeként a sejtben megemelkedik az *LHY* és *CCA1* fehérje szintje és az óra fázisa átállítódik. A modellből az következik, hogy a PIF3 funkciója nélkülözhetetlen az óra fény „input” folyamatában. Ennek azonban ellentmondanak azok a kísérleti eredmények, amelyek szerint a PIF3 túltermelése ill. funkcióvesztéssel járó mutációja nem változtatja meg a cirkadián ritmusok periódushosszát, és az óra vörös fénnel történő beállíthatósága is normális marad (Viczián és mtsai, 2005). Ezen felül a *PIF3* transzkripciója csak igen alacsony amplitúdójú cirkadián ritmust mutat. Ezen eredményeket tekintve megállapítható, hogy a PIF3-nak nincs jelentős szerepe az óra működésében, ez azonban nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a fotoreceptorok a sejtmagban más transzkripciós faktorokkal kapcsolódva szabályozzák a *CCA1/LHY* óraelemek kifejeződését, ami az óra átállítását kezdeményezi (Yamashino és mtsai, 2003). Ma még azonban nem ismert, hogy az oszcillátor mechanizmus mely folyamata reagál elsőként a beállító jelre, azaz melyik óraelem mennyiségének vagy aktivitásának környezeti jel hatására történő megváltozása okozza az óra fázisának átállítását.

A növényi cirkadián rendszer elemeinek keresése során több olyan óraelemet is azonosítottak, amelyeknek az órában betöltött szerepe és pontos helye nem ismert. Mutáns fenotípusuk alapján legvalószínűbb, hogy ezek az elemek az oszcillátort a fény „input” folyamatokkal összekötő oldalon találhatók, ezért ismertetésükre itt kerül sor.

A ZEITLUPE (ZTL) egy három tagból álló fehérjecsalád egyik eleme, amelynek további tagjai a LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) és FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1). A fehérjék három olyan funkcionális doménnel rendelkeznek (Light, Oxygen, Voltage (LOV) domén, F-box motívum és „kelch repeat” domén), amelyek egyedülálló, egy molekulán belüli kombinációja a fehérjék potenciális funkcióját sejteti. A LOV domént korábban olyan proteinekben azonosították, amelyek külső környezeti tényezők – fény, redox állapot ill. feszültség – érzékelésében vesznek részt. A LOV domén a Period-ARNT-Sim (PAS) fehérjemotívum egyik altípusa (Somers, 2001), a későbbiek során ezért a ZTL fehérje LOV/PAS doménjeként fogom tárgyalni. A különböző fehérjékben előforduló PAS doméneknek legalább két fő típusát különböztetjük meg: egyik típusa protein-protein kölcsönhatások kialakításában vesz részt, másik formája a környezeti jelek érzékelésében játszik szerepet (Crews és Fan, 1999). Ez utóbbi csoport ismert tagjai az *Arabidopsis*

fototropinok, amelyek a LOV doménon keresztül flavin-mononukleotidot (FMN) kötnek. A fototropinok kék fény fotoreceptorként működnek, és a LOV doménon kötött FMN a fehérje kromofórjaként funkcionál (Christie és mtsai, 1999; Briggs és mtsai, 2001b). Az F-box motívumot olyan fehérjékben találták meg, amelyek az ún. SCF (Skp1–Cul1–F-box)-protein-ubiquitin-ligáz komplex részeként a fehérjék irányított degradációjában működnek. Az F-box fehérjék a proteolízis célfehérjéinek felismerését, kötését és a degradációs komplex más elemeihez történő kapcsolását végzik, így biztosítják a degradációs folyamat szubsztrátspecifitását. A „kelch repeat” állati fehérjék széles körében előforduló motívum, amelynek elsődleges feladata fehérje-fehérje kölcsönhatások létrehozása (Adams és mtsai, 2000). A ZTL géncsalád tagjai által kódolt fehérjék feltételezett funkciója tehát fehérjék fényszabályozott degradációjának irányítása.

A ZTL gén mutációja a cirkadián ritmusok periódushosszának növekedését okozza (Somers és mtsai, 2000). A mutáns cirkadián fenotípusának megnyilvánulása a fényintenzitás függvényében változik, ami arra utal, hogy a ZTL a fény „input” jelátviteli lánc egyik eleme, amely feltételezést megerősíti az is, hogy a ZTL képes a PHYB és a CRY1 fotoreceptorokkal összekapcsolódni (Jarillo és mtsai, 2001). A ZTL fehérje cirkadián szabályozásban betöltött szerepét az „Eredmények” című fejezetben mutatom be részletesen.

Az FKF1 egy, a CONSTANS (CO) fehérje kifejeződését gátló transzkripciós faktor degradációját irányítja (Imaizumi és mtsai, 2005), amelyen keresztül a virágzás fotoperiodikus szabályozásában vesz részt. Az *fkf1* mutáns növényben emellett a cirkadián ritmusok görbéje is megváltozik, tehát ez a fehérje is hozzájárul a normális óraműködéshez (Nelson és mtsai, 2000).

AZ LKP2 fehérjéről kimutatták, hogy élesztőben összekapcsolódik a ZTL, a TOC1 és a PRR5 fehérjével is, bár ezeknek a kölcsönhatásoknak az *in vivo* jelentőségéről még nem sokat tudunk (Yasuhara és mtsai, 2004). Az LKP2 túltermelése aritmiát okoz, hosszúnappalon a növények későn virágoznak, és megváltozik a növények hipokotil elongációjának fényszabályozása is (Schultz és mtsai, 2001).

Az *early flowering 3 (elf3)* és az *early flowering 4 (elf4)* mutánsok rövidnappalon korán virágoznak, és fényben nevelve hosszabb a hipokotiljuk, mint a vad típusú növényeké (Zagotta és mtsai, 1996; Doyle és mtsai, 2002; Khanna és mtsai, 2003). Ez utóbbi tény arra utal, hogy az ELF3 és ELF4 pozitív regulátora a hipokotil elongáció fényszabályozott gátlásának. Az *elf3* növények állandó fényben aritmiássá válnak (Hicks és mtsai, 1996), míg sötétben a vad típushoz hasonló cirkadián ritmusokat mutatnak (Covington és mtsai, 2001). ELF4 hiányában, állandó környezetben, a vizsgált cirkadián ritmusok periódushossza egyes

növényekben rövidebb, másokban hosszabb lesz, és a ritmus amplitúdója néhány ciklus alatt nagymértékben lecsökken, majd aritmia lép fel. Az ELF3 és ELF4 fehérjék a *CCA1* ill. *LHY* óragének megfelelő szinten történő kifejeződéséhez is szükségesek (Doyle és mtsai, 2002). Az *ELF3* és az *ELF4* expresszióját a cirkadián óra szabályozza. Az *ELF4* kifejeződése emellett fényel indukálható. Az ELF3 és az ELF4 fehérje nem tartalmaz egyetlen ismert funkcióval rendelkező domént sem. Mivel az ELF3 funkciójára csak fényben van szükség, ez az elem valószínűleg az óra fény „input” folyamatait szabályozza, bár pontos hatásmechanizmusát még ma sem ismerjük. Élesztő két-hibrid rendszer alkalmazásával kimutatták, hogy az ELF3 képes összekapcsolódni a PHYB fotoreceptorral (Liu és mtsai, 2001), amely az előbbi feltételezést megerősíti. Az ELF3 és ELF4 konstitutívan a sejtmagban található (Liu és mtsai, 2001; Khanna és mtsai, 2003), ahol valószínűleg a fitokróm-szabályozott génexpresszió jelátviteli elemeként részt vesznek a de-etioláció, a fotoperiodizmus, valamint a cirkadián óra fény „input” folyamatainak szabályozásában. Megfigyelték, hogy az *elf3* mutáns cirkadián órája nem képes a *CAB2* akut fényválaszát gátolni (sérült a „gating” mechanizmus). A kutatók ezek alapján arra a következésre jutottak, hogy folyamatos fényben az *elf3*-ban megfigyelt óraleállás a fény „input” folyamatok fázisspecifikus gátlásának hiányával – azaz a „gating” sérülésével – magyarázható (McWatters és mtsai, 2000). Az ELF3 tehát részt vesz az egyes fényregulált folyamatokat érő fény mennyiségének a 24 órás ciklus során történő szabályozásában (gating), amely egyfajta védőmechanizmusként szolgál az órát a nem megfelelő időben érő fény kedvezőtlen hatásaival szemben.

A GIGANTEA (GI; Fowler és mtsai, 1999; Park és mtsai, 1999) egy sejtmagi fehérje (Huq és mtsai, 2000), amelynek nincs ismert funkcióval rendelkező doménje. A *GI* mRNS és fehérje mennyisége napi ritmusú oszcillációt mutat, maximuma esti időpontban mérhető. A *gi* mutáns növényekben az *LHY* és *CCA1* gének kifejeződése erősen csökkent, ami arra utal, hogy a GI a megfelelő *LHY* és *CCA1* szint kialakításában játszik szerepet. A GI részt vesz a virágzás fotoperiodikus indukciójában, amelyre a *gi* mutáns hosszú nappalon mutatott eltérő virágzási idejéből következtettek (Park és mtsai, 1999), valamint szerepe van a fotomorfogenezis egyes PHYB által irányított folyamatainak szabályozásában is (Huq és mtsai, 2000). A különböző *gi* mutánsok vizsgálata kimutatta, hogy a GI fehérje szerepe a cirkadián ritmusok amplitúdójának és periódushosszának szabályozásában van. Mivel a *GI* különböző mutációi nem okoznak aritmiát (Park és mtsai, 1999), valamint a GI fontos szerepet játszik a vörös fény indukált jelátviteli folyamatokban, ezért lehetséges, hogy a GI a fény „input” folyamatok egyik utolsó elemeként résztvesz az oszcillátorelemek

kifejeződésének fényfüggő módosításában. A rendelkezésre álló adatok fényében valószínűsíthető, hogy a GI egy, az oszcillátorhoz kapcsolódó szabályozóhurok része, amelyen keresztül az óra regulálja a *GI* gén kifejeződését (azaz a *GI* kifejeződése egyben „output” is), a *GI* pedig pozitívan szabályozza a *CCA1* és *LHY* óragének - valamint önmaga – expresszióját.

Az *ELF3*, *ELF4* és *GI* fehérjék közel azonos fázisban fejeződnek ki legnagyobb mennyiségben; cirkadián expressziójuk maximuma este, a *TOC1* kifejeződés maximumával egy időben figyelhető meg. Mind a négy fehérje szükséges a megfelelő szintű *CCA1* és *LHY* expresszióhoz, bár pontos hatásmechanizmusukat nem ismerjük, és nem tudjuk, milyen funkcionális kapcsolat van köztük.

A *TOC1* (*PRR1*) fehérje mellett még négy hasonló szerkezetű fehérjét azonosítottak *Arabidopsis*-ban, amelyek a következők: *PRR3*, *PRR5*, *PRR7* és *PRR9*. Mind az öt fehérje cirkadián módon fejeződik ki. A *PRR9* mRNS felhalmozódásának maximuma reggel van, majd ezt követi egymás után hozzávetőleg 2-3 óra csúszással a *PRR7*, *PRR5*, *PRR3* és *PRR1* (*TOC1*) mRNS akkumuláció maximuma (Matsushika és mtsai, 2000). A *PRR* gének kifejeződésében tapasztalható transzkripciós kaszkád jelenség ellenére eddig semmilyen bizonyítékunk nincs arra nézve, hogy az egyes *PRR* fehérjék bármilyen módon részt vennének egymás kifejeződésének közvetlen szabályozásában.

Az öt gén közül egyedül a *PRR9* transzkripciója mutat fényregulációt: expressziója vörös fényvel a fitokróm-közvetített jelátviteli mechanizmuson keresztül indukálható (Ito és mtsai, 2003). A *PRR* fehérjék részt vesznek a virágzás szabályozásában, a korai fotomorfogenezis során a csíranövények fényérzékelési folyamatában, és szerepük van a cirkadián óra periódushosszának beállításában is (Makino és mtsai, 2001; Matsushika és mtsai, 2002; Murakami-Kojima és mtsai, 2002; Sato és mtsai, 2002; Kaczorowski és Quail, 2003; Ito és mtsai, 2003; Michael és mtsai, 2003; Yamamoto és mtsai, 2003; Murakami és mtsai, 2004; Yashuara és mtsai, 2004). A *prr5* és *prr7* mutánsok hosszú nappalon később virágoznak, mint a vad típusú növények. A *PRR9* fehérjét túltermelő növények a fotoperiódus hosszától függetlenül korábban virágoznak a kontroll növényeknél, míg a *PRR3*-at túltermelő növények hosszúnappalon későn virágoznak. Vörös fényben a *PRR5*, *PRR7* és *PRR9* fehérje pozitív regulátora a fotomorfogenezis folyamatának. Ezzel szemben a *PRR3*-at konstitutívan nagy mennyiségben expresszáló növények a de-etioláció folyamatát tekintve vörös fényre hiposzenzitívvé válnak, azaz a *PRR3* negatív szabályozó faktora a korai fotomorfogenikus folyamatoknak. A cirkadián óra elemek akut fényválaszában a *PRR5* és a *PRR7* is negatív faktorként szerepel: hiányukban a *CCA1*, *LHY* és *PRR9* gének fitokróm-közvetített

fényindukciója sokkal erősebb, mint vad típusú növényekben. Az óraelemek fotoreceptor-mediált akut fényválasza az óra fény „input” folyamatának alapvető mechanizmusa lehet, így az óraelemek akut válaszána kialakításában résztvevő faktorok fontos elemek lehetnek az óra fény „input” mechanizmusában.

Az *prp3,5,7,9* mutánsok cirkadián fenotípusa gyenge, általában a periódushossz 1-1.5 óras eltérését okozzák, ellentétben a *toc1*-nél tapasztalt 3-4 óras különbséggel. A *prp3* ill. *prp5* mutációk a cirkadián ritmusok periódushosszána rövidülését, míg a *prp7* és *prp9* a periódushossz megnyúlását eredményezi (Yamamoto és mtsai, 2003; Eriksson és mtsai, 2003; Michael és mtsai, 2003). A PRR3,5,7 és 9 fehérjék hiánya tehát befolyásolja a szabadon futó ritmusok periódushosszát, de aritmiát nem okoz. A PRR család egyes tagjai különböző mértékben járulnak hozzá a fotomorfogenezis és a virágzás szabályozásához, valamint a cirkadián óra működéshez, és funkciójuk csak részleges redundanciát mutat.

A PRR fehérjék a sejtmagban találhatók, ahol lehetséges funkciójuk a fotoreceptorok által szabályozott génexpresszió regulációja. A *prp* gének funkciójáról további információkat a kettős- és hármas mutánsok vizsgálata szolgáltatott (Salomé és McClung, 2005; Nakamichi és mtsai, 2005). A kísérletek kimutatták, hogy két vagy három PRR fehérje együttes hiányában sokkal súlyosabb problémák lépnek fel a cirkadián szabályozásban és a fotomorfogenezis során, mint amit az egyes mutációk hatásának vizsgálatakor tapasztaltak. A *prp5/prp7* kettős mutánsok állandó körülmények között például aritmiássá válnak (Nakamichi és mtsai, 2005). A *prp7/prp9* növényekben fényben nagyon hosszú periódus mérhető, sőtétben pedig a növények aritmiásak lesznek (Salomé és McClung, 2005). Kimutatták, hogy a CCA1 fehérje specifikusan kötődik a PRR7 és PRR9 promoteréhez, és pozitívan szabályozza a két gén expresszióját (Farré és mtsai, 2005), a PRR7 és a PRR9 ezzel szemben gátolja a CCA1 és LHY kifejeződését (Salomé és McClung, 2005). Ezek alapján valószínű, hogy a délelőtti fázisban expresszáló PRR9 és 7 - egy külső szabályozóhurkon keresztül - közvetlenül résztvesz a központi oszcillátor működésének regulációjában. Ennek során a CCA1 és LHY közvetlenül indukálja a PRR9 és PRR7 termelődését, amelyek ezután ismeretlen úton gátolják a két óragén expresszióját. Érdemes megjegyezni azonban, hogy ez a leírás nem felel meg teljesen a *prp* gének cirkadián kifejeződésében tapasztalt kaszkádnak, ugyanis a PRR7 expressziós maximuma 2-3 órával később jelentkezik a PRR9-énél, a valóságban tehát a CCA1/LHY aktiváló hatása nem egyforma mértékben érvényesülhet a két gén transzkripcióján. A CCA1/LHY és PRR9 gének kifejeződése mindezek mellett a fitokrómokon keresztül fényel indukálható, amely az egyik lehetséges szabályozási pontot jelenti, ahol a fény hatása az oszcillátort eléri.

A legújabb kutatási eredmények arra szolgáltattak bizonyítékot, hogy a PRR7 és PRR9 nemcsak a fény, hanem a hőmérséklet „input” folyamataiban is nélkülözhetetlen funkcióval rendelkeznek (lásd: A cirkadián óra beállítása hőmérséklettel c. fejezetben).

Számos adat áll rendelkezésünkre a *prp* mutáns és túltermelő növények vizsgálatából, amelyeket nem tudunk egyszerűen beleilleszteni a mai óramodellbe. Az azonban biztos, hogy a növényi cirkadián szabályozást irányító központi mechanizmus nem írható le egyszerűen egyetlen negatív visszacsatolási hurok működésével. Az óra valószínűleg számos, egymásba kapcsolódó, egymás működését szabályozó kisebb-nagyobb szabályozó körből épül fel, amelyeken keresztül a környezetből érkező jelek több ponton is módosíthatják az óra működését, lehetővé téve a ritmus pontos beállítását és a rendszer finom hangolását. Összefoglalva: habár a PRR fehérjék a PRR1 (TOC1) kivételével nem részei a központi oszcillátornak, az eddigi eredmények alapján elmondhatjuk, hogy ezek a molekulák nagyon közeli kapcsolatban állnak az oszcillátor mechanizmussal, befolyásolják a létrehozott ritmusok periódushosszát, amplitúdóját, és valószínűleg részt vesznek a fény, ill. hőmérséklet hatásainak közvetítésében.

A TIME FOR COFFEE (TIC) szerepe elsősorban a cirkadián ritmusok amplitúdójának fenntartásában és a pontos periódushossz kialakításában van (Hall és mtsai, 2003). A *tic* mutáció nem egyformán hat minden „output” ritmusra: egyeseknél periódushosszabbodást, másoknál rövidülést okoz. A különböző ritmusok amplitúdója is eltérő a *tic* mutánsban: a *CAB2* kifejeződés ritmusának amplitúdója folyamatos fényben például gyorsan csökken, ezzel szemben a levélmozgás robusztus ritmust mutat. A TIC tehát fényben és sötétben is szükséges a normális cirkadián szabályozáshoz, és részt vesz a cirkadián óra gating mechanizmusában is. A *tic* mutáns, hasonlóan a korábban ismertetett *elf3* és *elf4* mutánsokhoz, fotoperiodikusan inszenzitív, és a vad típustól eltérő időben virágzik.

A SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1 (SRR1) fehérjét egy olyan munka során azonosították, amelynek célja fényszabályozott fejlődési folyamatokban résztvevő elemek izolálása volt (Staiger és mtsai, 2003). Az *srr1* mutáns csökkent érzékenységet mutat vörös fényre, rövid nappalon korábban virágzik a vad típusú növényeknél, és számos egyéb, PHYB-specifikus fényválasza is sérült. Ennek megfelelően igen valószínű, hogy az *srr1* a fényszabályozásban a PHYB jelátviteli lánc részeként működik. Állandó körülmények közé helyezve a mutáns szabadon futó ritmusainak periódushossza a vad típushoz képest rövidül, valamint megfigyelték, hogy az akut fényválasz erősebb, mint a vad típusú növényekben. Az *SRR1* kifejeződése vörös fény hatására megemelkedik, ami arra utal, hogy az SRR1 az óra fényérzékenységének beállításában vesz részt. Az észlelt cirkadián fenotípusok azonban arra

engednek következtetni, hogy az SRR1 az órában nem egyszerűen a PHYB-által irányított szignálátviteli mechanizmusok részeként funkcionál, hanem más módon vesz részt a cirkadián szabályozásban. A fehérjében nem található semmilyen ismert funkcióval rendelkező domén, és a molekula hatásmechanizmusát sem ismerjük.

Az itt ismertetett faktorok mindegyikénél megfigyelhető, hogy mutációjuk nemcsak az óra által szabályozott folyamatokat érinti, hanem hatással van a virágzás fotoperiodikus indukciójára és a fotomorfogenezis egyes folyamataira is. Hiányuk nem okoz általános aritmiát, de fontos szereppel bírnak a ritmusok amplitúdójának, periódushosszának kialakításában, így a normális óraműködéshez elengedhetetlenek.

2.5.2.2 A cirkadián óra beállítása hőmérséklettel

A fény mellett az órát beállító másik fontos környezeti tényező a hőmérséklet. A környezetben tapasztalható magasabb és alacsonyabb hőmérsékletű nappalok és éjszakák ciklikus változása és a laboratóriumi körülmények között alkalmazott meleg/hideg ciklusok éppen olyan hatásosak az óra szinkronizációjában, mint a fény/sötét ciklusok. Egy *Kalachoe* faj vizsgálata során kimutatták, hogy a CO₂ asszimilációjának ritmusa beállítható olyan hőmérsékletciklusokkal is, amelyekben az egymást váltó szakaszok hőmérsékletében nincs nagyobb különbség, mint 0.5°C (Rensing és Ruoff, 2002). A természetben a fényszakasz mindig magasabb hőmérséklettel, míg a sötét fázis alacsonyabb hőmérséklettel jár, és ez a két stimulus együttesen, egymás hatását erősítve alakítja nap mint nap az óra fázisát.

Habár a hőmérsékletváltozás óraműködésre gyakorolt hatását már régóta ismerjük, az ennek hátterében álló molekuláris mechanizmusokról meglehetősen keveset tudunk. A már azonosított óraelemek vizsgálata során kiderült, hogy a PRR7 és PRR9 molekulák nagyon fontos szerepet játszanak az óra normális hőmérsékletválaszainak kialakításában. Erre az eredményre az a megfigyelés vezetett, amely szerint a *prp7/prp9* mutáns órája nem állítható be termociklusokkal, és a mutáns növény órája nem mutat normális fáziscúszást olyan hideg kezelésre, amely a vad típusú óra fázisát jelentősen megváltoztatja (Salomé és McClung, 2005). A PRR7 és PRR9 tehát nemcsak a fény, hanem a hőmérséklet „input” jelek továbbítójaként is szolgál az *Arabidopsis* órában.

A fenti eredményektől eltekintve nincs információnk arról, hogy mely molekulák vehetnek részt a hőmérsékleti jelek érzékelésében és azok óra felé történő közvetítésében. Tulajdonképpen minden, az élő szervezetben végbemenő biokémiai folyamat érzékenyen reagál a hőmérséklet megváltozására (leginkább a sebessége változásával), így a hőmérséklet

érzékelése a különböző élőlényekben nagyon hasonló mechanizmus is lehet. Az utóbbi években bizonyítékot találtak arra nézve, hogy a fotoreceptor-mediált jelátviteli folyamatok hőmérséklet érzékenyek lehetnek (Mazzella és mtsai, 2000; Halliday és mtsai, 2003), ami felveti annak lehetőségét, hogy a növények fény- és hőmérséklet érzékelése, illetve ezek jelátviteli folyamatai bizonyos mértékben átfedő utakon mehetnek végbe.

2.5.3. „Output” - cirkadián ritmusok a növényekben

Az élőlényekben működő cirkadián szabályozó rendszer léteire elsőként növényekben figyeltek fel. de Marian a XVIII. század első felében (1729) írta le a *Mimosa pudica* levelének napi ritmust mutató mozgását. A cirkadián ritmusok az élő szervezetek folyamatainak különböző szintjein figyelhetők meg.

A cirkadián óra hatást gyakorol a gének kifejeződésére: számos gén expresszióját szabályozza a transzkripció vagy a transláció szintjén. A „microarray” technológia megjelenése lehetővé tette a génexpresszió közel teljes transzkriptóma szintjén elvégezhető vizsgálatát. Így lehetőség nyílt arra, hogy egyidejűleg, egy kísérleten belül több ezer gén - *Arabidopsis* esetében az egész génállomány - kifejeződéséről kapjunk információt. Az elmúlt néhány év során több laboratóriumban is végeztek olyan „microarray” kísérleteket, amelyekben szabadon futó körülmények között vizsgálták, mely gének mutatnak cirkadián kifejeződést. A kísérletek során fény derült arra, hogy az *Arabidopsis* genom közel 6%-a ritmikusan fejeződik ki, és az expressziós mintázatok között a legkülönbözőbb fázisú ritmusok is megtalálhatók (Harmer és mtsai, 2000; Schaffer és mtsai, 2001). Számos esetben kimutatható volt, hogy az azonos folyamatban vagy reakcióútban résztvevő fehérjéket kódoló gének a napnak ugyanabban a szakaszában fejeződnek ki a legmagasabb szinten. A fenilpropanoid bioszintézis enzimeit kódoló gének közül például 23 a szubjektív hajnal idején, ugyanabban a fázisban termelődik a legnagyobb mennyiségben. Ezek a fehérjék igen fontosak a fényvédő (fotoprotektív) pigmentek szintézisében és felhalmozódásában. A cirkadián módon expresszált gének egy nagy csoportja a környezeti stresszhatásokra közvetlenül is reagál (Kreps és mtsai, 2002). Ezeknek a géneknek a ritmikus kifejeződése felkészítheti a növényt az előre jelezhető, kiszámítható stresszhatásokra (pl. reggeli erős fény), ezáltal is növelve a szervezet környezeti hatásokkal szembeni ellenállóképességét.

A génkifejeződés szintjén érvényesülő ritmusok végsősoron a növény biokémiai és fiziológiai folyamataiban jelentkeznek. A cirkadián óra által irányított fiziológiai folyamatok közül a leggyakrabban vizsgált, és a növényi óraműködés jellemzésére legtöbbször használt

ritmus a levélmozgás cirkadián ritmusa (Engelmann és mtsai, 1994; Millar és mtsai, 1995). A növények levelei a nap folyamán jellegzetes mozgást mutatnak. Nappal a növények igyekeznek a levéllemezeiket vízszintes pozícióba helyezni, ezáltal a napenergiát a legnagyobb levélfelületen keresztül, a leghatékonyabban felhasználni. Éjszaka a levelek ellenkező irányba, függőleges pozíció felé mozdulnak el. Ez a ritmus nem közvetlen fény szabályozás eredményeként jön létre, mivel állandó fény- és hőmérsékleti körülmények között is fennmarad, tehát a cirkadián óra irányítása alatt áll. A növények hipokotilja nem azonos sebességgel növekszik a nap során: a megnyúlás sebessége este éri el maximumát, hajnalban pedig növekedési szünet tapasztalható. Ennek folytán a hipokotilmegnyúlás napi ritmust mutat, ami szabadon futó körülmények között is megfigyelhető (Dowson-Day és Millar, 1999). A gázcsere nyílások mérete a nap folyamán szintén ritmikusán változik: fény/sötét ciklusokon nevelt növényekben a fényszakasz során mérhető sztómakonduktancia értéke hozzávetőleg háromszorosa a sötétben mért értéknek (Somers és mtsai, 1998a). A sztómakonduktancia ritmusa állandó fény és hőmérséklet körülmények között is megfigyelhető, vagyis a gázcsere nyílások működésének irányításában a cirkadián óra is közreműködik. A gázcsere nyílások működésének ilyen módon történő szabályozása kihatással van a CO₂ fixálás sebességére is, ami szintén ritmikus jelleget mutat. Ismert továbbá, hogy számos biokémiai folyamat - pl. egyes fotoszintetikus folyamatok is - a cirkadián óra szabályozása alatt állnak.

A fotoperiodizmus egy igen speciális szabályozási folyamat, amelynek kialakításában a cirkadián óra és a fényreguláció együttesen vesz részt. Fotoperiodizmusnak nevezzük a nappalok hosszának szezonális változására adott válaszreakciók összességét. A növények fotoperiodikus érzékelése során lehetővé válik a nappalhosszúság éves ritmust mutató változásának észlelése, és ennek megfelelően egyes speciális folyamatok – pl. fagyűrő rügyek kialakítása, gumók képzése - megfelelő évszakra történő időzítése. A folyamatok megfelelő szezonális kialakítása egyértelmű szelektív előnyt jelent a növény számára. A növényeket több csoportra lehet bontani aszerint, hogy a virágzás indukciója érzékeny-e a fotoperiódus hosszára. Ez alapján elkülöníthetünk rövidnappalos, azaz rövid nappalon (8 óra fény/16 óra sötét) virágzó, vagy hosszúnappalos, azaz hosszú nappalon, (16 óra fény/8 óra sötét) virágzó növényeket, valamint a nappalhosszúságtól függetlenül virágzó növényeket. Az elmúlt évek kutatásai nyilvánvalóvá tették, milyen fontos szerepet játszik a cirkadián óra a fotoperiodizmus szabályozásában: a cirkadián óra a nappalok hosszának érzékelésében vesz részt. A ma felvázolható modell szerint a mechanizmus molekuláris hátterének alapját két fehérje képezi (Hayama és Coupland, 2003). A FLOWERING LOCUS T (FT)

Arabidopsis-ban normálisan hosszúnappalos körülmények között fejeződik ki magasabb szinten, és részt vesz a virágzás indukciójában. A CONSTANS (CO) transzkripció faktor fehérje az *FT* kifejeződés pozitív regulátora, amely az *FT* expresszióját a transzkripció szintjén indukálja. A *CO* kifejeződését a cirkadián óra szabályozza, maximumát ZT16 körül éri el. Hosszúnappalon a *CO* felhalmozódása már a fény fázisban megindul, és még a sötét beállta előtt magas szintet ér el, míg rövidnappalos környezetben az mRNS és a fehérje akkumuláció maximuma a sötétszakaszban figyelhető meg. A *CO* fehérje aktivitásához azonban nélkülözhetetlen a fény, így a növények virágzása csak akkor indul el, ha a növény fényben van, amikor a *CO* expresszió emelkedni kezd, illetve eléri a maximumát. Tehát ha a fényfázis egybeesik a CONSTANS maximális expressziójának - belső óra által meghatározott - idejével, akkor a *CO* fehérje elegendő mennyiségben és aktív formában áll rendelkezésre ahhoz, hogy a virágzás pozitív regulátorának, az *FT*-nek a kifejeződését indukálja. Az óra a fotoperiodikus virágzásindukcióban a *CO* kifejeződés cirkadián szabályozásán keresztül vesz részt. Ennek megfelelően, ha egy mutáció megváltoztatja az óra, és ezáltal a kimeneti ritmusok periódusát vagy fázisát, akkor ez a *CO* kifejeződés ritmusának változása révén könnyen a virágzás korai indukciójához, vagy késleltetéséhez vezethet. Az óramutások vizsgálata során tapasztaltak megerősítik ezt a feltételezést, mivel az eddig izolált óramutásokban a virágzás ideje minden esetben megváltozott.

Az „output” folyamatok szabályozásában résztvevő, a ritmikus jelet az oszcillátortól a szabályozott folyamatig vivő elemekről kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Az EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE 1 (EPR1) (Kuno és mtsai, 2003) és a GLYCINE-RICH PROTEIN 7 (GRP7) (Heintzen és mtsai, 1997) olyan fehérjék, amelyek külön-külön egy-egy, ún. alárendelt oszcillátorban („slave oscillator”) működnek. Mindkét fehérje negatív visszacsatolás útján szabályozza önmaga kifejeződését, amely szabályozás egy stabil oszcillációt hoz létre. Ez a mini oszcillációs mechanizmus a cirkadián óra központi oszcillátorával szoros kapcsolatot tart fenn, amelyen keresztül az órától temporális információt kap. A központi oszcillátortól érkező jel az ily módon alárendelt oszcillátor működését megfelelő fázisba állítja. Az EPR1 ill. GRP7 oszcillátorok ezután továbbküldik a ritmikus jeleket az „output” folyamatok egy része felé. Az alárendelt oszcillátorok hibás működése, ill. a résztvevő faktorok aberráns kifejeződése néhány, de nem az összes „output” folyamat ritmusát befolyásolja.

A növényi cirkadián rendszer elemeiről készült fenti összefoglaló távolról sem teljes. Az elmúlt évek során felgyorsult cirkadián kutatások eredményeként azonban olyan

mennyiségű adat halmozódott fel ezekről az óra elemekről, amelyek teljes körű ismertetése meghaladja ezen dolgozat kereteit.

2.6. A cirkadián óra jelentősége

Az élővilágban minden szerveződési szinten megfigyelhető a cirkadián szabályozás valamilyen formája. Ennek a molekuláris szabályozó mechanizmusnak a megjelenése az evolúciós lépcsők különböző szintjein található, egymással igen kevés hasonlóságot mutató szervezetekben bizonyítja, hogy az órának nagyon fontos szerepe van az életfolyamatok szabályozásában. Az élővilág fejlődése során legalább négy különböző úton alakult ki hasonló tulajdonságokkal és struktúrával bíró óramechanizmus (Young és Kay, 2001), így nagyon valószínű, hogy a cirkadián óra megjelenése az evolúció során szelektív előnyt biztosított az élőlények számára. A kutatók már hosszú ideje feltételezik, hogy a közel 24 órás periódusú cirkadián reguláció igen fontos szerepet tölt be a változó környezethez történő alkalmazkodás folyamatában, azaz működése adaptív előnyhöz juttatja az organizmust, növeli az élőlény életképességét, vitalitását és versenyképességét.

A cirkadián óra legfontosabb funkciója valószínűleg az, hogy az adott élőlény számára mintegy előre jelzi a környezeti tényezők megváltozásának időpontját. A cirkadián óra az általa szabályozott folyamatokon keresztül felkészíti a szervezetet a megfelelő napszakhoz való alkalmazkodásra, ténylegesen nappali vagy éjszakai üzemmódba állítva azt. Az egyes folyamatok időbeli programozása, megfelelő napszakra történő időzítése teszi lehetővé például azt, hogy az egyébként inkompatibilis folyamatok azonos térben játszódhassanak le. Erre példa a cianobaktériumokban a nitrogénkötés és a fotoszintézis folyamatának időbeli szétválasztása (Mitsui és mtsai, 1986). A növények energiaellátása szempontjából igen fontos, hogy a nappal során a fény, mint energia felhasználása maximális hatékonysággal történjen. Ehhez azonban elengedhetetlen, hogy a növény még napfelkelte előtt felkészítse sejtjeit a fényenergia maximális elnyelésére, tehát időben beindítsa a fotoszintézis fényszakaszához szükséges molekuláris folyamatokat, és biztosítsa a fotoszintézisben résztvevő molekulák elérhetőségét ill. utánpótlását (Kreps és Kay, 1997). Az óra másik igen fontos funkciója, hogy szabályozza az élőlények fotoperiodizmusát, ezáltal lehetővé teszi az egyedek számára a környezet szezonális változásaihoz történő maximális alkalmazkodást és a kedvezőtlen körülmények közötti túlélést (Thomas, 1998).

Számos módon vizsgálták azt a kérdést, hogy a megfelelően működő óra valóban hozzájárul-e az élőlények vitalitásának növeléséhez, és ha igen, hogyan valósul meg ez a

szabályozás. Az egyik lehetséges megközelítési mód annak vizsgálata, milyen hatással van az organizmusra, ha olyan körülmények között nevelik az egyedeket, amelyben hiányoznak a ritmikusan változó környezeti tényezők (állandó fény és hőmérséklet). Paradicsommal (*Lycopersicon esculentum*) végzett kísérletek azt mutatták, hogy a növények állandó fényen és hőmérsékleten rosszul fejlődnek, kicsik maradnak és kevés termést hoznak (Highkin és Hanson, 1954; Went, 1960). Ha a paradicsomot az állandó fény mellett hőmérsékletciklusokkal kezelik, azaz a termociklusok révén hosszú távon is működésben tartják a cirkadián órát, akkor a növények állandó fényben is normálisan fejlődnek. Egy másik kísérleti elrendezésben azt vizsgálták, milyen hatással van az egyed fejlődésére, ha olyan fotoperióduson tartják, amelynek periódushossza nem egyezik meg az endogén cirkadián óra periódusával. A kísérletekben vizsgált húslégy (*Sarcophaga argyostoma*) érzékenyen reagált a 24 órától eltérő periódusú fény/sötét ciklusok alkalmazására: egyedei lassabban nőttek, mintha 24 órás fotocikluson tartották volna őket (Saunders, 1972). Igen érdekes megfigyelés az is, hogy azok a mutáns hörcsög és ecetmuslica egyedek, amelyek cirkadián periódusa eltért 24 órától, 24 órás cikluson nevelve hozzávetőleg 20%-kal rövidebb ideig élnek, mint azon társaik, akiknek cirkadián órája a környezeti ciklusokkal összhangban, 24 órás periódussal működik (Hurd és Ralph, 1998; Klarsfeld és Rouyer, 1998). Cianobaktériumokon néhány éve végzett kísérletek egyértelműen bebizonyították, hogy a versengés során a külső környezet által meghatározott idővel szinkronban és ahhoz hasonló periódushosszal működő cirkadián óra (azaz a cirkadián rezonancia) kompetitív előnyt jelent az élőlény számára (Ouyang és mtsai, 1998). Egy kísérletben hosszú periódusú ($\tau = 28\text{h}$) és rövid periódusú ($\tau = 20\text{h}$) mutáns törzseket kevert kultúrában neveltek hosszú (14h fény/14h sötét; $T = 28\text{h}$) ill. rövid (10h fény/10 sötét; $T = 20\text{h}$) fotoperióduson. Néhány generáció után a hosszú fénycikluson tartott kultúrában a hosszú periódusú, míg a rövid fénycikluson nevelt kultúrában a rövid periódusú mutánsok váltak domináns alkotó törzssé.

A fent vázolt kísérletek bizonyították, hogy a cirkadián óra nagyon fontos szerepet játszik az élőlények - köztük a növények - egyedfejlődésében, növekedésében, a megfelelő morfológia kialakításában, ezek a paraméterek pedig egyértelműen meghatározzák az egyed életképességét és vitalitását, valamint túlélési esélyeit egy versenyhelyzetben.

2.7. Az *Arabidopsis* óramodell korlátai

Az előzőekben részletesen ismertetett növényi cirkadián szabályozórendszer központi mechanizmusát egy negatív visszacsatoláson alapuló szabályozási mechanizmus képezi. A

kutatók igyekeztek az elmúlt tíz év során azonosított újabb és újabb, az óraműködést szabályozó faktorokat a klasszikus modell szerinti három funkcionális egység valamelyikében elhelyezni. Az egyes elemekről felhalmozott információk gyarapodása azonban ahelyett hogy tisztázta volna ezek pontos szerepét a cirkadián szabályozásban, egyre bonyolultabbá tette az eredetileg igen egyszerűnek elképzelt növényi óra modelljét. Ma már tudjuk, hogy a cirkadián óra egyes részeit nem lehet élesen elhatárolni egymástól, az egyes elemek funkciója nem korlátozódik kizárólag az „input”, „output” vagy oszcillátor működésére. Jól ismert példa erre az óra „input” folyamataiban résztvevő fotoreceptorok kifejeződése, amely maga is cirkadián szabályozás alatt áll, tehát egyfelől a cirkadián „output” folyamatok végén található, másfelől pedig az „input” jelátviteli lánc első elemei. A fényszabályozás és a cirkadián reguláció a növényi sejtekben egymással szoros kapcsolatban áll, amit az bizonyít, hogy a cirkadián óra aktívan részt vesz egyes fényszabályozott folyamatok módosításában, a fény pedig a legerősebb környezeti szabályozó tényező, amely az óra működését befolyásolja. A ma ismert összes *Arabidopsis* óramutáns fényfüggő fenotípusos jegyeket is mutat, azaz az óraelemek funkcióját részben a fényviszonyok határozzák meg. Legtöbbjük aberráns expressziója nemcsak a cirkadián ritmusok megnyilvánulását befolyásolja, hanem hatással van a fotomorfogenezis, különösen a hipokotil elongáció folyamatára is. Azt azonban máig sem tudjuk, hogy az óraelemek funkciója a fotomorfogenezis egyes folyamataiban független-e a cirkadián szabályozásban betöltött szerepüktől, vagy ezek a faktorok az óraműködés szabályozásán keresztül - mint „output” folyamatot - befolyásolják a fotomorfogenezis egyes lépéseit. Továbbra sem ismerjük az óraelemek többségének hatásmechanizmusát, nem tudjuk, milyen kapcsolatban állnak a többi órafehérjével, és hogy hogyan jön létre az óra hozzávetőleg 24 órás periódushossza.

A Salomé és McClung által közölt (2004) óramodellnek több hiányossága is van:

- Nem tudjuk mi az oka annak, hogy a CCA1/LHY fehérje mennyisége a sejtben csak akkor kezd emelkedni, amikor a TOC1 fehérje szintje már elérte ill. túljutott a cirkadián maximumán. A modell szerint a TOC1 pozitív regulátora a CCA1/LHY kifejeződésének, ezek szerint a két MYB fehérjének gyorsabb akkumulációt kellene mutatnia a sejtekben. A legvalószínűbb magyarázat erre, hogy a TOC1 nem közvetlenül indukálja a CCA1 és LHY gének kifejeződését, hanem előbb egy másik fehérje termelődését szabályozza, ami ezután a két MYB faktor kifejeződését direkt módon regulálja.
- Nem ismert, milyen mechanizmuson keresztül, illetve milyen fehérjék közreműködésével indukálja a TOC1 fehérje a CCA1 és az LHY transzkripcióját.

- A TOC1 túltermelése nem eredményez magas *CCA1/LHY* expressziót; helyette csökken az *LHY/CCA1* kifejeződési ritmusának amplitúdója. Ez a TOC1 pozitív regulátor funkciója ellen szól.
- A *CCA1/LHY* túltermelésének hatására csökken az endogén *CCA1/LHY* mRNS szint. Nincs információnk arról, hogy ez a negatív visszacsatolás az *LHY/CCA1* fehérjék közvetlen akciója révén valósul meg, vagy az elsődleges hatás a *TOC1* kifejeződés gátlása és így a pozitív regulátor TOC1 fehérje mennyiségének csökkentése.
- Nem ismertek az oszcillációt késleltető, a 24 órás periódushossz kialakításában résztvevő mechanizmusok.
- Valószínű, hogy nem egy, hanem többféle oszcillátor is működik a növényi sejtekben. Ezt támasztja alá az, hogy bizonyos „output” gének expressziója (*CAB2*, *CAT3*, *PHYB*) azonos fényintenzitás alatt különböző periódushosszú szabadon futó ritmust mutat (Hall és mtsai, 2002; Thain és mtsai, 2002), ami csak úgy jöhet létre, ha az egyes gének különböző periódushosszú órák kimeneti elemei. Bizonyíték van arra nézve is, hogy *Arabidopsis*-ban két, különböző hőmérsékletérzékenységű óra működik (Michael és mtsai, 2003). Nem tudjuk azonban, hogy a különböző órák oszcillátorai milyen molekulákból épülnek fel és vannak-e közös elemeik. Fontos lenne tudni azt is, hogy ezek az órák egy sejten belül, egymás mellett működnek, vagy térben ill. időben egymástól elválasztva, szövet- vagy fejlődésspecifikus módon gyakorolják szabályozó tevékenységüket.
- Az óra fény beállításának mechanizmusa nem működhet a korábban feltételezett, *PHYB* és *PIF3* interakcióján alapuló, transzkripciós aktivációs mechanizmuson keresztül, mivel a *PIF3* hiánya nem okoz eltérést az óra működésében ill. beállíthatóságában. Így - a fotoreceptoroktól eltekintve - nem ismertek a fény „input” jelátviteli lánc elemei. Ugyanígy nem ismertek a hőmérséklet „input” folyamatok sem.

A felsorolásból kitűnik, hogy ismereteink a növényi cirkadián szabályozó rendszer működéséről meglehetősen hiányosak. Az elmúlt években megjelent cirkadián tematikájú közlemények nagy száma ellenére a ma rendelkezésünkre álló információk elégtelennek bizonyulnak a növényi óraműködés teljes leírására, ezért a következő évek kutatásainak elsődleges célja a megismert óraelemek funkciójának, hatásmechanizmusának részletes vizsgálata, valamint az egyes elemek egymáshoz fűződő viszonyának feltárása lesz.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt évek intenzív kutatásainak eredményeként számos modellszervezetben sikerül azonosítani a cirkadián óra központi elemeit és kirajzolódott az óra működésének alapelve is. A felvázolt óramodellek közös vonása az, hogy a központi oszcillátor mechanizmus minden esetben egy ún. negatív visszacsatolós szabályozó hurokból áll. Bár a cirkadián óra működését először növényekben fedezték fel (de Marian, 1729) és az utóbbi években a növényi modellnek választott *Arabidopsis thaliana* cirkadián rendszerének kutatása is felgyorsult, ennek ellenére a növényi óra oszcillátor mechanizmusának elemei közül csak igen keveset azonosítottak, és ezen elemek pontos működési mechanizmusát sem ismerjük.

Az előző fejezetben ismertettem a növényi óra már azonosított elemeit és ezek lehetséges funkcióját a cirkadián szabályozásban. Munkánk kezdetén e faktorok közül azonban alig néhányat ismertünk, és a cirkadián óra működésében betöltött szerepüket vizsgáló kutatások még éppen csak elkezdődtek. A teljes *Arabidopsis* genom szekvenálása eredményeként nyilvánvalóvá vált, hogy az egyéb szervezetekben megtalálható legtöbb óragénnek (ill. órafehérjének) nincs megfelelő ortológja növényekben, feltételezhető tehát, hogy az *Arabidopsis* cirkadián órában működő fehérjéknek legalább egy része struktúráisan és funkcionálisan is különbözik a már jellemzett óramodellek fehérjéitől.

Munkánk elsődleges célja az volt, hogy *Arabidopsis*-ban új cirkadián óra elemeket azonosítsunk, és ezek hatásmechanizmusát, ill. a már ismert óraelemekhez fűződő viszonyát részletesen megismerjük.

A tervezett munka főbb lépései a következők voltak:

1. Egy olyan vizsgálati rendszer kialakítása, amely alkalmas a cirkadián óra mutánsok azonosítására. Az óraműködés jellemzésére a klorofill A/B-kötő fehérjét kódoló gén (*CAB2*) cirkadián expresszióját a luciferáz (*LUC*) riportergén segítségével szeretnénk volna nyomon követni. Első lépésként tehát a *CAB2promoter:LUC* riportergén konstrukciót hordozó transzgenikus növényeket kellett létrehoznunk.
2. A *CAB2:LUC* konstrukciót hordozó transzgenikus növények mutagenizálása EMS-sel.
3. Cirkadián óra mutánsok izolálása a *CAB2:LUC* expresszió *in vivo* nyomon követésével.
4. A mutációk genetikai térképezése, az óragén azonosítása.
5. A mutánsok jellemzése:
6. Az óragén/órafehérje működésének vizsgálata, elhelyezése az aktuális óramodellben.

A fent vázolt munkafolyamat több éves, csoportban végzett kutatómunkának az elindítását jelentette, előre nem tervezhető eredményekkel. Az előbbi munkaterv egy

mutánsizolálási projekt általános sémáját tükrözi, amely a doktori munkám megkezdésekor kiindulási pontként szolgált. A későbbiekben a mutánsszűrés során azonosított 11 új *zeitlupe* (*ztl*) mutáns részletes jellemzését tűztem ki célul, így a közvetlen célkitűzések az alábbiak szerint módosultak:

1. A *ztl* mutációk helyének és természetének meghatározása a 11 új mutánsban.
2. A mutánsok cirkadián- és fotomorfogenikus-, valamint virágzás fenotípusának összehasonlítása a korábban leírt *ztl* mutánsokéval, azzal a céllal, hogy az esetleges különbségek révén információt nyerjünk a ZTL molekula egyes doménjeinek funkciójáról.
3. A ZTL fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata a már leírt kölcsönható partner fehérjékkel élesztő két-hibrid rendszerben, annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a ZTL fehérje egyes doménjei milyen kölcsönható fehérje kötéséért felelősek.
4. A fenotipikus vizsgálatok és a fehérje-fehérje kölcsönhatásokról élesztőben nyert adatok összevetésével annak meghatározása, hogy a ZTL fehérje egyes doménjei milyen mértékben és módon járulnak hozzá a ZTL fehérje különböző folyamatokban betöltött szabályozó szerepéhez.
5. Annak megállapítása, milyen előnyökkel jár a cirkadián rendszer működése a növény általános állapota, életképessége, vitalitása szempontjából. E cél megvalósítását a *ztl* mutánsok viselkedésének tanulmányozása révén szerettük volna elérni.

A fent vázolt kísérletek várhatóan újabb részletekkel gazdagítják a ZEITLUPE fehérje cirkadián szabályozásban, valamint a fotomorfogenezis és a virágzás folyamatában betöltött szerepéről rendelkezésre álló ismereteinket, és lehetővé teszik a ZTL molekula más óraelemekkel kialakított kapcsolatának és a fényszabályozott jelátviteli folyamatokban elfoglalt helyének meghatározását.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti anyagok és organizmusok

4.1.1. Vegyszerek és forgalmazók

A kísérletek során használt finomvegyszerek többségét a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be. A luciferint a Biosynth AG cégtől, a restriktációs endonukleázokat és a DNS módosító enzimeket az MBI/Fermentas cégtől, a ³²P-vel jelölt nukleotidákat az Izinta Kft.-től vásároltuk.

4.1.2. Tápoldatok és táptalajok, antibiotikumok, szelekció

Bakteriális táptalajok

LB (Luria-Bertani Medium) (pH=7.0): 1% (w/v) tripton, 0.5% (w/v) élesztő kivonat, 1% (w/v) NaCl

YEB (pH=7.0): 0.5% (w/v) beef extract, 0.1% (w/v) élesztő kivonat, 0.5% (w/v) pepton, 0.5% (w/v) szacharóz, 2 mM MgCl₂ (sterilre szűrve, autoklávozás után hozzáadva)

A szilárd táptalaj készítésénél autoklávozás előtt 1.5% (w/v) agart tettünk az folyadékba.

Élesztő táptalajok

CSM (Complete Supplement Mixture) (pH=7.0): 2.2% (w/v) glükóz, 0.67% (w/v) yeast nitrogen base amino acids (DIFCO), 0.64 g/l Leu-/Trp- (LT) CSM (Bio101, Inc.) vagy 0.63 g/l Ade-/Leu-/Trp- (ALT) CSM (Bio101, Inc.); táptalajhoz: 1.5% (w/v) agar

Növényi táptalajok

MS3 (Murashige-Skoog Medium) (pH=5.6): 4.3 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma), 3% (w/v) szacharóz, 1% (w/v) agar

AM (*Arabidopsis* Medium) (pH=5.6): 2.16 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma) 1% (w/v) szacharóz, 0.2% (w/v) phytigel (Sigma)

1/2 MS0 (pH=5.6): 2.16 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma), 1% (w/v) agar

MS0 (pH=5.6): 4.3 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma), 1% (w/v) agar

A munkánk során használt, sterilre szűrt antibiotikumokat autoklávozás (120°C, 25 perc) és 60°C-ra hűtés után kevertük a tápoldatba, ill. táptalajba.

Az antibiotikumok felsorolását az alkalmazott végkoncentrációval együtt a kísérleti organizmus szerint csoportosítottuk:

Escherichia coli:

Ampicillin (Amp) 100 µg/ml

Streptomycin (Sm) 100 µg/ml

Tetraciklin (Tet) 100 µg/ml

Agrobacterium tumefaciens:

Karbenicillin (Cb) 100 µg/ml

Rifampicin (Rif) 25 µg/ml

Arabidopsis thaliana:

Higromicin (Hyg) 15 µg/ml

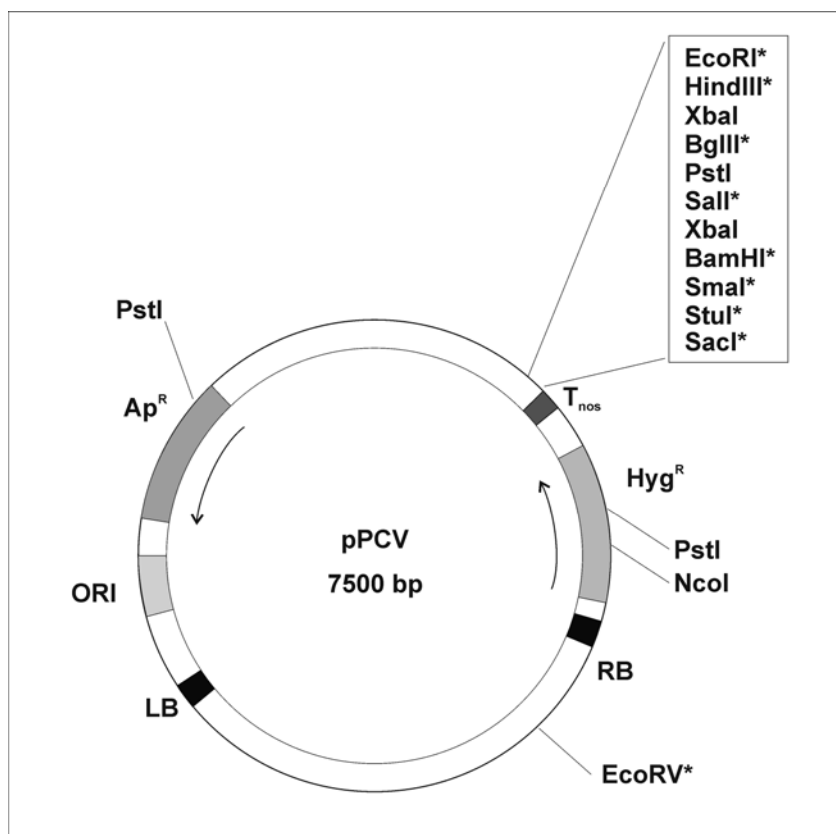
Klaforán (Cf) 200 µg/ml (A klaforánt nem szelekciós célra használtuk, hanem azért, hogy az AM és MS táptalajokban csökkentsük a bakteriális eredetű fertőződés esélyét.)

4.1.3. Plazmid konstrukciók

A szubklónozási lépéseket pBluescriptII SK plazmid vektort (Stratagene) használva hajtottuk végre. A plazmid vektor mérete 2964 bp és ampicillin rezisztenciát hordoz.

Az *Arabidopsis* transzformálására használt pPCV (Plant Cloning Vector) bináris plazmidot Koncz Csaba csoportja fejlesztette ki (Koncz és mtsai, 1994). A pPCV bináris vektor vázlatát a 4.1. ábrán látható.

A *CAB2:LUC(+)*, *CCA1:LUC+* és *CCR2 (COLD CIRCADIAN CLOCK REGULATED 2):LUC+* konstrukciókban használt szentjánosbogár *LUCIFERÁZ (LUC)* ill. *LUCIFERÁZ+ (LUC: módosított LUC cDNS; az általa kódolt luciferáz enzim erősebb lumineszcenciát hoz létre, mint a LUC fehérje) cDNS-t* a Promega cégtől vásároltuk. A kísérleteinkben használt *CAB2* promoter szakasz a *CAB2* gén transzlációs start kodonja előtt elhelyezkedő 320 bp hosszú gemoni szekvenciát tartalmazza. A kísérletekben használt promoter szakaszokat genomi DNS templáton végzett PCR során amplifikáltuk, majd izoláltuk. A *CCR2* promoter ill. a *CCA1* promoter a *CCR2* ill. *CCA1* gén előtt található legközelebbi kódoló szekvencia transzlációs stop kodonja utáni első nukleotidtól a vizsgált gén transzlációs start kodonja előtti utolsó nukleotidig terjed.



4.1. ábra. A pPCV növényi klónozó vektor szerkezete

A 7.5 kb méretű, *Agrobacterium* Ti-plazmid alapú vektor tartalmazza a jobb- és baloldali integrációs határszekvenciákat (LB, ill. RB), ezek közé építve a bakteriális replikációs origót (ORI_{ColE1}) és az ampicillin/karbenicillin rezisztenciát okozó β-laktamáz kazettát (Ap^R), valamint a növényi szelekciót lehetővé tevő – a higromicin rezisztenciáért felelős – higromicin-foszfotranszferáz (HPT) fehérjét konstitutívan kifejező kazettát is. A plazmidba építettek egy, a molekuláris klónozást megkönnyítő, egyedi DNS endonukleáz hasítóhelyeket hordozó polilinker régiót, amelyet 3' irányban a nopalín szintáz gén 3' poliadenilációs szignálja (NOS) követ. A NOS szekvencia az expresszált mRNS megfelelő processzálasát irányítja növényben.

4.1.4. Baktériumok

A molekuláris klónozás során az *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsét (Stratagene) használtuk. Az elkészült pPCV alapú bináris plazmid konstrukciókat S17-1 *E. coli* törzsbe transzformáltuk, amely képes a konjugációra a növényi transzformáció során használt *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM90RK) (Rif^R) törzsével. Az utóbbi két törzs Koncz Csaba laboratóriumából származik (Max-Planck Intézet, Köln).

4.1.5. Növények

A mutagenézisben az *Arabidopsis thaliana* két ökotípusát, a C24 és a Wassilevskija (Ws) ökotípust használtuk fel. Rendelkezésünkre állt a *CAB2:LUC* konstrukciót 1 kópiában hordozó, a transzgénre nézve homozigóta, stabil transzformáns C24 ökotípusú *Arabidopsis* vonal (Millar et al., 1995), amelyet a kísérletek során C24(VT) jelöléssel, vad típusú háttérű, kontroll növényként vizsgáltunk. Emellett létrehoztuk a *CAB2:LUC+* riporter konstrukciót Wassilevskija (Ws) ökotípusban 1 kópiában hordozó transzgenikus *Arabidopsis* vonalat (Hall és mtsai, 2001), amelyet a kísérleteinkben Ws(VT) jelöléssel, vad típusú háttérű, kontroll növényként használtunk. A transzgenikus növény előállítására a Clough és Bent által leírt (1998) *Agrobacterium*mal történő viráginfiltrációs módszert alkalmaztuk (lásd: 4.3.2. fejezet).

A mutáns növények vizsgálatakor alkalmazott további riportergén konstrukciókat (*CCR2:LUC+* és *CCA1:LUC+*) szintén *Agrobacterium*-közvetített géntranszfer (Clough és Bent, 1998) segítségével juttattuk be a mutáns és a megfelelő vad típusú növényekbe. A riportergénnek expresszióját mindegyik háttér esetében (mutáns és vad típus) legalább 5 független transzformáns növényi vonalban vizsgáltuk meg. A vizsgált riportergén kifejeződése minden azonos genotípusba tartozó transzgenikus növényi vonalban hasonló mintázatot mutatott.

További kísérletekben a következő mutáns és vad típusú növényvonalakat vizsgáltuk: *toc1-1*, *toc1-2*, *ztl-1*, *ztl-27* mutáns (C24 ökotípus háttérben) és Columbia-0 (Col-0) vad típusú növények.

4.2. Molekuláris biológiai módszerek

4.2.1. Riportergén konstrukciók készítése, transzgenikus növények előállítása

A plazmidvektor-konstrukciók készítése során és a plazmid DNS *E. coli* sejtekből történő tisztításakor Sambrook és munkatársai (1989) által közölt módszereket követtük.

A riporterkonstrukciókban használt, gemoni DNS-en végzett PCR-ral izolált promotorszekvenciákat első lépésként a pBluescriptII (SK) plazmid vektorba építettük be, a PCR során alkalmazott oligonukleotid szekvencián található egyedi restrikciós hasítóhelyek segítségével. A klónozás következő lépéseként a 4.1. ábrán látható pPCV vektorba a *StuI* és *SacI* helyek közé beépítettük a *LUC+* cDNS-t, így létrehoztuk a *LUC+-NOS* pPCV vektort. A *LUC+* cDNS elé építettük be a *CAB2* promotert a *HindIII* és *SalI*, a *CCR2* promotert és a

CCAI promotert pedig a *Hind*III és *Bam*HI hasítóhelyek felhasználásával. Minden elkészült konstrukciót szekvenálással ellenőriztünk.

4.2.2. *Agrobacterium* konjugáció

Az elkészült bináris plazmid vektort *E. coli* S17-1 törzsbe transzformáltuk, majd 2 ml-es, ampicillinnel kiegészített LB folyadékkultúrában 16 órán át növesztettük. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzséből YEB tápoldatban, 24 óra alatt szintén friss folyadékkultúrát neveltünk. A két baktériumszuszpenzióból 1-1 ml-t összekevertünk és YEB táplemezen együtt növesztettük. 24 óra után a növekedésnek indult baktériumtenyészetből kis mennyiséget rifampicin és karbenicillin tartalmú YEB lemezre szélesztettünk, majd a felnövekvő rezisztens *Agrobacterium*-telepeket legalább 3 alkalommal passzáltuk. Az *E. coli*tól ilyen módon megtisztított *Agrobacterium*ot használtuk *Arabidopsis* virág-infiltrációs transzformálásra (lásd: 4.3.2 alfejezet).

4.2.3. A *ZTL* gén szekvenálása

A mutáns és a vad típusú növényekből genomi DNS-t tisztítottunk a Dean és munkatársai (1992) által közölt módon, majd minden genotípusból 3 párhuzamos PCR során amplifikáltuk a *ZTL* gén teljes kódoló szekvenciáját, promoter régióját és 3'UTR régióját. A genomi PCR-ban alkalmazott oligonukleotidák szekvenciája a következő volt:

ZTL F: 5'-tgccggatcctcgaggtcgctttctgttatagga-3'

ZTL R: 5'-gccgctcgagaaggaaggtgctagtgtcagggtt-3'.

A PCR terméket pBluescriptII (SK) plazmid vektorba klónoztuk az oligonukleotid szekvenciákon található *Xho*I hasítóhelyek felhasználásával. A szekvenáláshoz használt oligók szekvenciája a következő volt:

ZTL seq1: 5'-tcgtttctttgtccaccatc-3'

ZTL seq2: 5'-ggaggaaattggttagttgt-3'

ZTL seq3: 5'-cgcatgttaaggaaacttga-3'

ZTL seq4: 5'-agccgcttcttgcaatgtag-3'

ZTL seq5: 5'-gcctgacaccaagagacgtt-3'

ZTL seq6: 5'-acgctcacttgtgtaaatgg-3'

ZTL seq7: 5'-ccttgaaattccgttcgag-3'

ZTL seq8: 5'-cacgtaaccaagagagcct-3'

ZTL seq9: 5'- tagttcggagacaaaatgag -3'

T3: 5'aattaaccctcactaaaggg3'

T7: 5'gtaatacgactcactatagggc

4.2.4. Növényi össz-RNS tisztítás

1 gramm növényi anyagot folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és dörzsmozsárban homogenizáltunk, üveg centrifugacsőbe helyeztük, majd 5 ml extrakciós puffert [50 mM TRIS-HCl pH=8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% SDS, 0.1% (v/v) β -merkaptó-etanol, 2 mM ATA (aurin-trikarboxilsav)] mértünk rá. 37°C -on inkubáltuk 30 percig, majd 1 ml 2 M KCl oldat hozzáadása és összerázás után jégen tartottuk 30 percig. 10 perc centrifugálás után (15000 g, 4°C) a felülúszót új centrifugacsőbe mértük át és 2.5 ml 8 M LiCl oldat hozzáadása után 4°C -on 12-16 óra alatt csaptuk ki az RNS-t, amit ismételt centrifugálással gyűjtöttünk össze (15000 g, 20 perc, 4°C). A csapadékot 400 μ l steril desztillált vízben oldottuk fel és 1.5 ml-es mikro-centrifugacsőben fenolos extrakcióval tisztítottuk, majd az RNS-t 1/10 térfogatnyi 5 M NaCl és 2.5x térfogatnyi etanollal -20°C -on csaptuk ki 12 órán át. 20 perc 4°C -on történő centrifugálást követően a csapadékot 70%-os etanollal mostuk, vákuum alatt szárítottuk, majd 100 μ l steril desztillált vízben oldottuk fel. A kapott RNS mennyiségét a minta 260 nm-en mért optikai denzitásából határoztuk meg. Az RNS izolálás során használt üvegeszközöket 3%-os H₂O₂ oldatban áztattuk 60 percig, etanollal átöblítettük, majd megszáritottuk. Az RNS izolálás során használt oldatokat és desztillált vizet DEPC (dietil-pirokarbonát) kezeléssel RNáz mentesítettük Sambrook és mtsai (1989) módszerét követve.

4.2.5. Northern hibridizáció

A növényi össz-RNS izolálását követően mintánként 20 μ g RNS-t denaturáltunk a felvivő pufferben (1X MOPS, 50% formamid, 7% formaldehid, 0.1 μ g/ μ l etidium-bromid), majd az RNS mintákat formaldehydes, 1%-os agaróz gélen frakcionáltuk. A gélből az RNS-t a Zeta-Probe GT Genomic Tested Blotting pozitívan töltött nylon membránra transzferáltuk a gyártó cég (Bio-Rad) által megadott instrukciók alapján. A hibridizációhoz próbaként használt ZTL teljes hosszúságú cDNS-t az Amersham cég MegaprimeTM DNA labelling System (RPN 1606) jelölő kitjét felhasználva, random primer meghosszabbításával jelöltük [α -³²P]-dCTP jelenlétében. A membránt egy éjszakán át előhibridizáltuk 42°C-on a hibridizáló pufferben

[50 mM foszfát puffer pH=6.5 (50 mM Na₂HPO₄ és 50 mM NaH₂PO₄ keverékéből), 50% formamid, 5X SSC, 0.2% SDS, 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml PVP40, 1 mg/ml fikoll, 100 µg/ml denaturált hordozó DNS)]. A radioaktív próbát denaturálás után adtuk a hibridizáló pufferhez és a hibridizálást 42°C-on, 24 órán keresztül végeztük. Ezt követően a filtert csökkenő sókoncentráció és emelkedő hőmérséklet mellett (2x SSC, 0.2% SDS – kétszer 15 perc, 42°C; 2x SSC, 0.2% SDS – kétszer 15 perc, 65°C; 1x SSC, 0.2% SDS – kétszer 15 perc, 65°C; 0.5x SSC, 0.2% SDS – egyszer 15 perc, 65°C) mostuk (1x SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM Na₃-citrát, pH=7.2). A filtert speciális kazettákban exponáltuk, majd a Phosphorimager (Molecular Dynamics) készülék segítségével tettük láthatóvá a radioaktív jeleket, amelyeket az ImageQuant (Molecular Dynamics) szoftver használatával kvantitáltunk.

4.2.6. Növényi össz-protein tisztítás és Western-blot analízis (Kim és mtsai, 2003 nyomán)

12 óra fény/12 óra sötét fotoperióduson nevelt, 10 napos növényeket (200 mg) folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és dörzsmozsárban homogenizáltunk. Az elporított mintára 1 ml extrakciós puffert mértünk (50 mM TRIS-HCl, pH=7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM fenil-metil-szulfonil fluorid, 5 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, 5 µg/ml antipain és 5 µg/ml chymostatin). A mintákat összeráztuk a pufferrel, majd a sejtörmelékcentrifugálással távolítottuk el (14000 g, 10 perc, 4°C). A felülúszóból Bradford (1976) módszerével határoztuk meg a preparátumok össz-fehérje tartalmát, majd triklórecetsavas kicsapást követően a fehérjéket urea/SDS tartalmú pufferben vettük fel (40 mM TRIS-HCl, pH=6.8, 8 M urea, 5% SDS, 1 mM EDTA és 2% (v/v) β-merkapto-etanol). Mintánként 40 µg össz-fehérjét szeparáltunk 8%-os poliakrilamid-SDS gélen (Laemmli, 1970), és az elválasztott fehérjéket Bio-Rad elektroblot készülékkel (25 V, 2 h) transzferáltuk PVDF (polivinil-difluorid) membránra (Millipore). A filtereket blokkoló pufferben [10% (w/v) tejpor, TBS pufferben (10 mM TRIS-HCl pH=8.0, 150 mM NaCl)] inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 óráig. Ezt követően a filtert poliklonális anti-ZTL elsődleges ellenanyag (Colcalico Biological) jelenlétében (1:1000 arányban hígítva) inkubáltuk 3 órán át. Ezután a filtert peroxidázhoz kapcsolt (1:1000 arányban hígított) másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, majd a kemilumineszcens jelet speciális film segítségével tettük láthatóvá (ECL Western Blotting System, Amersham Pharmacia).

4.2.7. Élesztő két-hibrid rendszer használata fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára

Az élesztő két-hibrid rendszer alkalmazása során a Chien és munkatársai (1991) által leírt módszereket alkalmaztuk. A fehérjék ko-expressziójához a Clontech cég által forgalmazott pGADT7 és pGBKT7 élesztő expressziós vektorokat használtuk. A vizsgált fehérjéket kódoló cDNS szekvenciákat a GAL4 fehérje transzkripciós aktivátor doménjét (pGADT7) ill. a GAL4 fehérje DNS-kötő doménjét (pGBKT7) kódoló szekvencia után építettük be a vektorba, oly módon, hogy a transzláció során fúziós fehérje keletkezett. A vizsgálni kívánt két fehérjét kifejező vektorokat a ko-expresszióhoz élesztőbe transzformáltuk, majd az élesztő sejteket leucin- és triptofán-hiányos (LT), ill. adenin-, leucin- és triptofán-hiányos (ALT) CSM táptalajra szélesztettük. Ezután az élesztős lemezeket 5 napig 30°C-on tartottuk. Az ALT lemezen történt növekedést, ill. ennek hiányát feljegyeztük. A szelektív táptalajon történt növekedés dokumentálásához 1-1 élesztőtelepet az LT és ALT lemezekről 100 µl steril vízben szuszpendáltunk és ebből 5 µl-t új LT ill. ALT lemezre cseppentettünk ki. 5 nap 30°C-on történt növesztés után a telepekről síkágyas lapszkennel képet készítettünk. Az LT ill. ALT táptalajon nőtt további 3-3 kolóniát átoltottunk LT CSM folyadékba, és az élesztőket folyamatos rázás mellett 30°C-on neveltük, amíg az oldat sűrűsége elérte az OD₆₀₀ ≈ 1 értéket. Az oldatokon elvégeztük az ONPG mérést, amely során az oldat β-galaktozidáz enzimaktivitását mérjük *O*-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid szubsztrát jelenlétében (Yasuhara és mtsai, 2004).

A két hibrid rendszerben vizsgált PHYB fehérjedarabok a következők voltak:

- PHYB-N: fitokróm B N-terminális fragment, 1-621. aminosav
- PHYB-C: fitokróm B C-terminális fragment: 645-1972. aminosav (Jarillo és mtsai, 2001).

A különböző mutáns ZTL fehérjéket a cDNS szekvenciában történt irányított mutagenézissel hoztuk létre (Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). A PHYB fehérje kromofóráját Shimizu-Sato és munkatársai (2002) szerint izoláltuk.

4.3. Növényeken alkalmazott technikák

4.3.1. Magsterilizálás, növénynevelés

A sterilizálandó magokat vízbe áztatás után 2 napig 4°C-on tároltuk, majd 10 percig 5%-os (w/v) kalcium-hipoklorit oldatban áztattuk. Ezután steril desztillált vízzel ötször

átmostuk, majd a steril magokat táptalajra szélesztettük. Ezt követően a növényeket 12 h fehér fény/12 h sötétben, 22°C-on neveltük steril körülmények között; a méréseket 22°C-on végeztük. Az ettől eltérő nevelési ill. mérési körülményeket az aktuális kísérlet ismertetése során tüntettem fel. A megvilágításra használt fehér fényt fluoreszcens fénycsövek, a monokromatikus vörös ($\lambda_{\max}=667\text{nm}$), kék ($\lambda_{\max}=470\text{nm}$) ill. távoli vörös ($\lambda_{\max}=730\text{nm}$) fényt a Quantum Devices Inc (USA) Snaplite LED (Light Emitting Diode) lámpákat tartalmazó fényforrásai biztosították.

4.3.2. Transzgenikus növények előállítása (Clough és Bent, 1998)

A megfelelő pPCV alapú vektorkonstrukciót hordozó *Agrobacterium* törzset 300 ml, 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó YEB oldatban növesztettük 25°C-on 2 napig ($\text{OD}_{600}=2.5-3.0$), majd az *Agrobacterium*ot centrifugálással (4000 g, 20 perc, 25°C) összegyűjtöttük és 3 ml YEB oldatban felfuszpendáltuk. Ezután folyamatos kevergetés mellett 300 ml 3%-os (w/v) szacharózoldatot, végül 40 µl Silwet L-77-et (Lehle Seeds) adtunk a szuszpenzióhoz. A transzformálandó, üvegházban nevelt *Arabidopsis* növények teljes virágzatát 15 másodpercre a szuszpenzióba merítettük, majd a növényeket 1 napig letakarva, a magasabb páratartalmat biztosítva, tartottuk. A felnevelt növényekről magot gyűjtöttünk és a megfelelő szelekciós ágenssel és klaforánnal kiegészített AM táptalajon steril körülmények között szelektáltuk a transzformánsokat (T1 nemzedék), amelyeket, miután megfelelő erősségű gyökérzetet fejlesztettek (10-12 nap), földbe ültettünk és az üvegházban felneveltünk. Minden konstrukció esetében 20-30 független T1 transzformáns vonalat állítottunk elő. Vizsgálatainkat a T3 nemzedék transzgenre nézve homozigóta, a transzgént 1 kópiában hordozó egyedein végeztük.

4.3.3. EMS mutagenézis

125 ml desztillált vízbe beáztattunk 1ml *Arabidopsis* magot (~40000 db), amelyet egy éjszakán át 4°C-on, sötétben inkubáltunk. A megnedvesített magokat 0,2% (w/v) illetve 0,3% (w/v) etil-metán szulfonát (EMS; Sigma-Aldrich) 1250 ml térfogatú vizes oldatában 16 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk folyamatos, lassú keverés mellett. Ezt követően a magokat 10-szer 1000 ml desztillált vízzel mostuk át, majd 3 napon keresztül 4°C-on, vízben, sötétben tartottuk. A hidegkezelés után a magokat üvegházban földbe vetettük úgy, hogy minden cserépbe 50-80 mag került. A növényeket (M1 generáció) 4 hétig rövidnappalon (8h

fehér fény/16h sötét), majd ezt követően hosszúnappalra neveltük. A mutagenizált magpopulációban 30-50%-os volt a letalitás. A növényekről származó magokat (M2 generáció) cserepenként gyűjtöttük össze, amelyek mindegyike egy-egy mag gyűjtőt alkotott. Az M2 magokat gyűjtőnként vizsgáltuk a mutáns izolálási munka során.

4.3.4. *In vivo lumineszcencia-mérés luminométerrel*

A *CAB2:LUC(+)* (Millar és mtsai, 1992), *CCR2:LUC+* és *CCAI:LUC+* konstrukciót kifejező csíranövényeket 12 óra fény /12 óra sötét féncikluson, 22°C-on neveltük MS3 táptalajon, 7 napig. A mérés kezdete előtt min. 6 órával a csíranövényeket steril körülmények között egyenként egy 96 zsebes mikrotiterlemezbe helyeztük, amelynek minden zsebe 0.25 ml MS3 táptalajt tartalmazott. Minden növényre 20 µl 2 mM-os luciferin oldatot cseppentettünk. A méréseket Topcount automatizált luminométerrel (Packard) végeztük, amely minden egyes - a mikrotiter lemez zsebeiben elhelyezett - csíranövény által kibocsátott lumineszcenciát 1-2 óránként rögzítette, a mérési idő végéig (2-7 nap). A mérés a csírázást követő 7. napon indult, a nevelés során alkalmazott fénciklusoknak megfelelően a fény-sötét átmenet pillanatában. A mérés módjától függetlenül a növények lumineszcenciáját az első 12 óra során (a nevelési körülményeknek megfelelő éjszakai fázisban) sötétben mértük. Ezt követően a mintákat a mérés módjától függően sötétben, vörös vagy kék fényben, ill. fény/sötét ciklusokon tartottuk. A fényben mért minták csupán a mérések alkalmával (1-2 óránként 9 percre) kerültek a mérőtér sötétjébe, ami nem befolyásolja a cirkadián óra működését (Millar és mtsai, 1995). A mérési eredmények feldolgozása a TopTempII nevű Microsoft Excel makro programmal (Dr. Andrew Millar, University of Edinburgh, UK ajándéka) történt. A luminométer által mért lumineszcenciaértékek az egy másodperc alatt beérkezett fotonok számát (cps = count per seconds) mutatják. Az egyes csíranövény által adott időpontban kibocsátott lumineszcencia értékét az adott növény által a teljes mérés során kibocsátott lumineszcencia átlagával osztottuk el, így kaptuk meg az adott időponthoz tartozó normalizált lumineszcencia értéket. Az ábrákon – ha másképpen nem tüntettük fel – legalább 16 csíranövény (normalizált) lumineszcencia értékéből számolt átlagértéket tüntettük fel. Ezeket az adatokat az idő függvényében ábráztuk.

4.3.5. Luciferáz enzimaktivitás meghatározása CCD kamerával

A lumineszcens riporter gén konstrukciót kifejező, transzgenikus csíranövényeket sötétben neveltünk MS3 lemezen. A csírázás kezdetét követő hetedik napon a növényeket sötétben 1 mM luciferin oldattal permetezzük le, majd sötétben, több napon keresztül mértük a növények lumineszcenciáját egy folyékony nitrogénnel hűtött, nagy érzékenységű CCD kamerával (LN-CCD-512-TKB, Princeton Instruments, USA). A csíranövények luciferinnel történt kezelése után 24 órával a mintákat - a kontroll minta kivételével - különböző hullámhosszú fényel kezeltük, majd újra visszahelyeztük a kamera sötét mérőterébe. A csíranövényekről félóránként digitális felvételt készítettünk, amelyeket a MetaView szoftverrel (Universal Imaging, USA) elemeztünk. A mérés eredményeként kapott fényintenzitás-érték arányos a minta luciferáz aktivitásával, azaz a riporter gén kifejeződésével, amelyből a digitális kamera zaj-háttérét levonva kapott relatív aktivitásértéket grafikonon ábrázoltuk (Excel szoftver, Microsoft). A csíranövényekről készült kép fényesség-küszöbértékeit a MetaView szoftverrel állítottuk be.

4.3.6. Levélmozgás ritmusának dokumentálása

A levélmozgás rögzítését megelőzően 10 napig neveltük a növényeket 12 h fény /12 h sötét fénycikluson, MS3 táptalajon. A 10. napon genotípusonként 16 csíranövényt táptalajjal együtt átemeltünk egy 16 rekeszre osztott, átlátszó petricsészébe, oly módon, hogy a rekeszekben egyesével található összes növény 1. pár valódi levelének mozgása - a csésze függőleges helyzetében – oldalról nézve jól nyomon követhető legyen. Ezt követően a csészéket függőleges helyzetben egy-egy kamera elé helyeztük, és 7 napon keresztül, folyamatos fehér fényben ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), állandó hőmérsékleten (22°C) 2 óránként felvételt készítettünk róluk. Az így készült felvételeket a Kujata Video Imaging System programja segítségével dolgoztuk fel (Dowson-Day és Millar, 1999). Egy növény vizsgálatakor 2 levél mozgását tudtuk egy időben nyomon követni és analizálni. A számítógépes szoftver segítségével a levelek függőleges vagy vízszintes tengely menti elmozdulását mértük az idő függvényében.

4.3.7. Periódushossz adatok számolása

Minden vizsgált ritmikus folyamat periódushosszának analízisét a Biological Rhythms Analysis Software System (BRASS; Southern és Millar, 2005) segítségével végeztük el,

amelyet Dr. Andrew Millar-tól (University of Edinburgh, UK) és munkatársaitól kaptunk. A Microsoft Excel alapú makro program képes az automatizált luminométer, a CCD kamera és a levélmozgás videó rendszer használata során nyert ritmusadatok kiértékelésére. A BRASS program a Fast Fourier Transform-Non-Linear Least Squares (FFT-NLLS; Plautz és mtsai, 1997) analízis futtatásával minden egyes, a kísérletben vizsgált növény ritmusára illesztett görbe alapján ad becslést az egyes növények ritmusának periódushosszára. A periódushossz meghatározásához minden kísérletben minimum 80, maximum 120 órás mérési időtartamból származó adatokat használtunk fel. A periódushossz középértékének becslése során csak azon, a program szerint számolt periódushossz értékeket vettük figyelembe, amelyek 15 és 38 óra közé estek (cirkadián tartomány: 15-38 h). Az azonos genotípusba tartozó, legalább 20 növény periódushosszáinak statisztikai elemzését a BRASS programmal végeztük el.

4.3.8. Hipokotilhossz-mérés

A magokat sterilizáltuk és 1/2 MS0 táptalajra szélesztettük, majd 3 napra 4°C-ra, sötétbe helyeztük. Ezután a magok 22°C-ra kerültek (0. napon): a csírázást indukáló 3-6 óra fehér fénykezelés ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) után 18-21 óra sötét, majd megfelelő intenzitású és hullámhosszú fénykezelés (vagy sötét) következett. A kezelés 4. napján a csíranövényeket 1%-os (w/v) agar lemezre fektettük, majd síkágyas lapszkennelrel digitális képet készítettünk róluk. A képet a MetaMorph szoftverrel (Universal Imaging, USA) dolgoztuk fel, amely az adatokat az Excel szoftver (Microsoft) által felismerhető formátumúvá alakította, így a statisztikai kiértékelést már ezzel végezhetjük. Minden növényvonal és alkalmazott fényintenzitás esetében minimum 30 növény hipokotilhosszát mértük meg. A grafikonokon a hipokotilhosszak normalizált értékeit tüntettük fel. A hipokotilhossz normalizált értékét minden vizsgált genotípus esetében úgy képeztük, hogy minden mérési ponthoz tartozó, mm-ben mért átlag hipokotilhossz értéket elosztottunk az adott vonalhoz tartozó, sötétben mért, mm-ben megadott hipokotilhossz értékkel.

4.3.9. A virágzási idő meghatározása

A magokat nedves talajra vetettük, majd 2 napig sötétben, 4°C-on tartottuk. Ezután állandó hőmérsékletet (22°C) biztosító klímakamrákba helyzetük őket rövid- (8 óra fehér fény/16 óra sötét), illetve hosszúnappalos (16 óra fehér fény/8 óra sötét) körülmények közé. A kísérletben használt fluoreszcens fehér fény intenzitása $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ volt. A növények

tőlevélrózsáinak leveleit akkor számoltuk meg, amikor a virágzati tengely hossza elérte az 1 centimétert. A virágzási idő jelölésére általában két paramétert használunk. A virágzási idő azoknak a napoknak a száma, amelyek a magok kivetésétől és fényre helyezéstől az 1cm-es virágzati tengely megjelenéséig teltek el. Az 1cm hosszú virágzati tengely megjelenésekor a növényen található tőlevelek száma szintén alkalmas a virágzás idejének a meghatározására. Kísérleteinkben minden növényvonalból 30-40 egyedi növény virágzási idejét vizsgáltuk a tőlevelek számának meghatározásával. A grafikonon a tőlevelek számának átlagértékeit tüntettük fel a „standard error” hibaértékekkel.

4.3.10. A klorofilltartalom meghatározása

A klorofillméréshez a 30 napos növények tőlevélrózsájából vett leveleket használtuk fel. A klorofillt 96% etanollal extraháltuk a levelekből, majd Lichtenthaler és Wellburn (1983) szerint végeztük el a klorofill mennyiségének meghatározását.

4.3.11. A fotoszintetikus gázcsere vizsgálata

A 32 napos növények fotoszintetikus gázcseréjét multiküvettás infravörös gázanalizátorral (Arabidopsis Special System, PP Systems, Hitchin, UK) vizsgáltuk. A rendszer lehetővé teszi, hogy intakt, egyedi növényekben, szabályozott páratartalom, CO₂ koncentráció, hőmérséklet és fényviszonyok mellett, akár 10 napon keresztül nyomon kövessük a gázcsere folyamatát (a CO₂ mennyiségének változását). A minták gázcseréjét óránként rögzítettük: minden órában 10 percen keresztül rögzítettük a vizsgált növények gázcseréjét. A kísérleteket azonos körülmények között kétszer ismételtük meg.

*4.3.12. Kompetíciós kísérlet *ztl* és *toc1* mutánsok között*

A növényeket 10 napig neveltük MS0 táptalajon folyamatos fehér fényben. A különböző mutáns *ztl* és *toc1* csíranövényeket egymástól 1 cm-re, külön-külön illetve egyes kultúrában földbe ültettük. A növényeket 10 óra fehér fény/10 óra sötét ill. 14 óra fehér fény/14 óra sötét fotoperiódusokon neveltük 3 héten át, majd ezeken elvégeztük a morfológiai és mennyiségi analízist: megmértük a száraz és nedves tömeget, a levelek klorofilltartalmát, a tőlevelek számát és a tőlevélrózsa átmérőjét.

4.4. Adatfeldolgozási, interpretálási irányelvek

Minden kísérletünket legalább 5 független transzgenikus növény-vonalon, ill. 2-3 egymástól függetlenül készült mintasoron is elvégeztük. Mivel ezek hasonló eredményt mutattak, így a dolgozatban – ha másként nem jeleztük – egy-egy kiválasztott reprezentatív ábraszorozat kerül bemutatásra.

5. EREDMÉNYEK

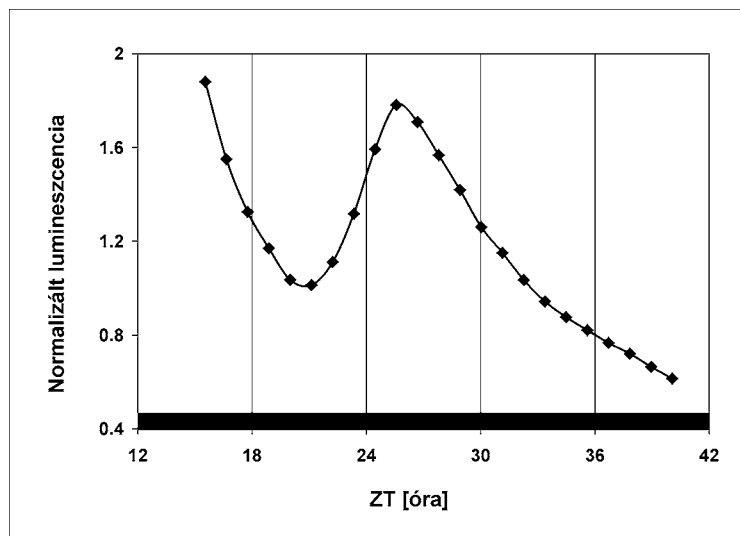
5.1. Új cirkadián óra mutánsok azonosítása

Munkánk elsődleges célja az volt, hogy új cirkadián óra mutánsokat azonosítsunk *Arabidopsis thaliana*-ban. Ehhez első lépésként el kellett döntenünk, hogyan kívánjuk nyomon követni a cirkadián óra működését a mutagenizált növényi populációban. A cirkadián óra működésének tanulmányozására a legmegfelelőbb az óra által szabályozott valamely folyamat, azaz kimeneti („output”) elem vizsgálata. A cirkadián óra által szabályozott folyamatok között megtalálható a génexpresszió közvetlen regulációja. A génexpresszió szintjén érvényesülő cirkadián szabályozás a növény fiziológiai-, és metabolikus folyamataiban is megnyilvánul. A cirkadián óra által szabályozott *Arabidopsis* gének közül a legismertebb a klorofill A/B-kötő fehérjét kódoló *CAB2* gén. A *CAB2* fehérje a kloroplasztiszok fénybegyűjtő komplexeiben található, és ott a klorofilok megkötésében játszik fontos szerepet. A *CAB2* gén expressziója kettős szabályozás alatt áll: a fény bizonyos fényreceptorok aktivációján keresztül befolyásolja a gén kifejeződését, és a cirkadián óra is részt vesz a *CAB2* kifejeződés regulációjában. A *CAB* géneket már igen régóta használják modellként a génexpresszió fény és cirkadián óra általi szabályozásának vizsgálatára (Nagy és mtsai, 1988a; Nagy és mtsai, 1988b). Növényekben az egyik *CAB* gén volt az első, amelyről leírták, hogy kifejeződése cirkadián ritmust mutat (Nagy és mtsai, 1988b). A génkifejeződés mintázatát részletesen jellemezték mind zöld, mind etiolált növényekben. Mivel az *Arabidopsis CAB2* gén kifejeződésének szabályozásáról rengeteg ismeret állt rendelkezésünkre, célszerűnek tűnt az órának ezen „output” elemét választani arra a célra, hogy a növényi cirkadián óra működéséről információt kapjunk, és ennek segítségével a mutáns növényi populációban olyan egyedeket azonosítsunk, amelyekben az óra hibásan működik.

A *CAB2* gén promoterének 320 bázispáros szakasza tartalmazza mindazon szabályozó elemeket, amelyek lehetővé teszik a gén fény- és óra általi, transzkripciós szintű regulációját (Millar és mtsai, 1991; 1992). A 320 bp-os *CAB2* promoter és a szentjánosbogár luciferáz (*LUC*) génjét kódoló cDNS fúziójából felépülő riporter gén konstrukciót már korábban is használták mind a cirkadián óra, mind a fényreguláció vizsgálatára transzgenikus *Arabidopsis* növényekben (Millar és mtsai, 1992). A luciferáz riporter gén használata lehetővé tette a génkifejeződés valós idejű nyomon követését, és a térbeli valamint az időbeli expressziós mintázat megfigyelését egyedi, élő növényekben.

Rendelkezésünkre állt a *CAB2:LUC* konstrukciót 1 kópiában hordozó, a transzgénre nézve homozigóta, stabil transzformáns, C24 ökotípusú *Arabidopsis* vonal (Millar és mtsai, 1995), és létrehoztuk a *CAB2:LUC+* riporter konstrukciót 1 kópiában hordozó transzgenikus *Arabidopsis* vonalat Wassilevskija (Ws) ökotípusban. A *LUC+* egy olyan, a *LUC* cDNS szekvenciájának módosításával előállított enzimfehérje, amely hozzávetőleg 100-szor erősebb lumineszcenciát biztosít, mint a *LUC* enzim. A riporter konstrukciót hordozó C24 valamint Ws növények magjait etil-metán-szulfonáttal (EMS) kezeltük. Az ily módon mutagenizált magokat (M1 populáció) üvegházban földbe vetettük, majd a felnevelt növényekből összegyűjtöttük a magokat (M2 populáció). Az M2 populáció csíranövényeiben 7 napos korban vizsgáltuk a *CAB2:LUC(+)* expresszió időbeli mintázatát.

A cirkadián óra vizsgálata állandó körülmények között történik, amikor az óra és az általa irányított ritmikus folyamat (ebben az esetben a *CAB2* génexpresszió) „szabadon fut”. Ilyen körülmények között kialakul a cirkadián ritmusra jellemző saját periódushossz. Kísérleteinkben állandó körülményeken konstans hőmérsékleti- és fényviszonyokat értünk. A mutáns keresés során állandó hőmérsékleten (22°C) és folyamatos sötétben követtük nyomon a csíranövényekben a *CAB2:LUC(+)* expressziót, miután a növényeket 7 napig neveltük 12 óra fehér fény/12 óra sötét fotoperióduson (LD 12:12). A *CAB2* gén expressziója sötétben 2 nap után olyan alacsony szintre csökken, hogy ezután nem lehet követni a kifejeződés ritmusát (5.1. ábra), így minden, folyamatos sötétben végzett kísérlet csak 36 órán keresztül tartott. Ilyen körülmények között a *CAB2* génnek ugyan csak egyetlen expressziós maximum pontja figyelhető meg, ZT26-27 időpontban (5.1. ábra), ami erősen csökkent a mutánszűrés érzékenységét, de egyúttal lehetővé teszi nagyobb mennyiségű mutagenizált növény rövidebb idő alatti átvizsgálását. Folyamatos fényben történt mutáns izolálásról már számos publikáció látott napvilágot, amelyekben leírták többek között a *timing of cab 1 (toc1)* (Millar és mtsai, 1995), a *zeitlupe (ztl)* (Somers és mtsai., 2000) és a *time for coffee (tic)* (Hall és mtsai, 2003) *Arabidopsis* cirkadián óra mutánsokat. Ezekben a kísérletekben hozzánk hasonló módon, szintén 7 napos korban vizsgálták EMS mutagenizált növénypopuláció egyedeinek *CAB2:LUC* ritmusát, de minden esetben kevesebb M2 növény cirkadián ritmusának analizését végezték el.



5.1. ábra. A *CAB2:LUC+* transzgén ritmikus expressziója folyamatos sötétben

A vad típusú, Ws ökotípusú csíranövényeket 7 napig neveltük 12 h fény/ 12 h sötét fotoperióduson. Ezt követően a növények lumineszcenciáját folyamatos sötétben követtük nyomon 42 órán keresztül, Topcount luminométerben. A grafikonon egy csíranövényből származó adatokat tüntettünk fel. A grafikon „x” tengelye mentén látható fekete sáv a sötétszakaszt jelöli. A csíranövény által adott időpontban kibocsátott lumineszcencia értéket a vizsgált csíranövény által a teljes mérés során kibocsátott lumineszcencia értékének átlagával osztottuk el, így kaptuk meg az adott időponthoz tartozó normalizált lumineszcencia értéket.

A Ws ökotípus háttérbe juttatott riporter gén konstrukció (*CAB2:LUC+*) magasabb luciferáz aktivitást eredményezett a növényekben, mint a C24 háttérben levő konstrukció (*CAB2:LUC*), ami megkönnyítette a mutánsok azonosítását a Ws háttérben. Mint azt az 5.1. táblázat is mutatja, a Ws háttérben kb. háromszor több cirkadián óra mutánst azonosítottunk, mint a C24 háttérben, annak ellenére, hogy a vizsgált Ws növények száma csak körülbelül 15%-a volt a C24 növények számának. Ennek elsődleges oka a két ökotípusban alkalmazott LUC, valamint LUC+ marker által létrehozott lumineszcencia intenzitásbeli különbsége lehet, de hozzájárult az is, hogy a Ws magok mutagenezise valószínűleg erősebb volt, mint a C24 magoké (Hall, nem publikált adatok).

A mutánsok azonosítása során egy kísérletben hozzávetőleg 2000 egyedi csíranövény *CAB2:LUC(+)* ritmusát mértük ZT12 és ZT48 között, folyamatos sötétben. A *CAB2:LUC(+)* expressziót 36 órán keresztül követtük nyomon és a mérési eredmények analizálását követően kiválasztottuk azokat a növényeket, amelyek a vad típusú növény ritmusától valamilyen módon eltérő cirkadián ritmust mutattak. Az 5.1. táblázat a munkánk során kiválasztott növények számáról mutat statisztikai összefoglalást.

Ökotípus	Vizsgált M2 növények	Kiválasztott M2 növények	Megtartott M3 mutánsok	Cirkadián fenotípus					
				kof	kéf	ar	aa	el	mg
C24	40,000	574	25	11	13	1	0	0	0
Ws	5,800	545	79	16	54	5	2	1	1

5.1. táblázat. A mutánsszűrés eredményének összefoglalása

kof = korai fázis, kéf = késői fázis, ar = aritmia, aa = alacsony amplitúdó, el = nagyon erős lumineszcencia, mg = megváltozott formájú görbe

Az 5.1. táblázatban feltüntetett adatokból leolvasható, hogy 104 *Arabidopsis* cirkadián óra mutánst azonosítottunk, amelyek fenotípusa az M3 generációba átöröklődött. Ezek nagyobb része (körülbelül 64%-a) késői fázisú fenotípust mutat; ez a fenotípus a Ws háttérben jelentkezett igen magas arányban. A mutánsszűrés eredményeként összesen hat aritmiás mutánst izoláltunk.

A mutációk közelítő térképpozícióját genetikai térképezéssel határoztuk meg, PCR alapú molekuláris markerek használatával. Miután az egyes mutációkat sikerült egy-egy kromoszómakarra lokalizálni, megvizsgáltuk, hogy az újonnan azonosított mutáció közelében található-e már ismert óragén. Azokban az esetekben, amikor a mutáció már ismert óraelemet kódoló kromoszómarégióhoz mutatott kapcsoltságot, és az észlelt mutáns cirkadián fenotípusa hasonlított a már azonosított óraelem mutációja révén előálló fenotípusra, a homozigóta mutáns vonalban megszekvenáltuk a megfelelő óragént és promoter régióját. Ezzel a módszerrel a 104 mutáns között két új *TOC1*, két új *GI*, egy új *ELF3* és tizenegy új *ZTL* allélt azonosítottunk.

5.2. A mutációk elhelyezkedése a ZTL fehérje szekvenciájában

A mutánsok azonosítása során számos hosszú periódusú mutáns növényt találtunk (5.1. táblázat). A genetikai térképezés eredményeként megállapítottuk, hogy tizenegy esetben a mutáció az ötös kromoszóma alsó karjára térképeződik. Az *Arabidopsis* cirkadián órában működő – ezen időszakban már ismert - gének közül egyedül a *ZTL* gén mutációja okoz hasonló cirkadián fenotípust, és ez a gén az ötödik kromoszóma alján található. A fenotípus hasonlósága és a mutációk *ztl* génhez közeli elhelyezkedése arra utalt, hogy az általunk azonosított óra mutációk allélikusak lehetnek a már ismert *ztl* mutációkkal (*ztl-1*, *ztl-2*; Somers és mtsai, 2000). A mutáns növényekből PCR-ral izolált *ZTL* gén szekvenálása során

kiderült, hogy a tizenegy vizsgált mutáns egy-egy pontmutációt hordoz a génben. A mutációk a fehérje szekvenciában aminosav cserét vagy korai stop kodon létrehozása révén a fehérje rövidülését okozzák. Az általunk azonosított 11 új mutáció és a korábban leírt *ztl* mutációk (*ztl-1*, *ztl-2*) pozícióját a fehérje szekvenciában az 5.2. ábra mutatja.

Az etil-metán-szulfonát (EMS) kezeléssel történt mutagenézis következtében >99%-os valószínűséggel keletkező mutáció a G/C>A/T tranzíció, mivel az EMS a guanint alkilálja, O6-etilguanint hozva létre, amely módosított bázis T-vel képez bázispárt, nem C-vel (Ashburner, 1990). A ZTL fehérjében keletkezett mutációk mindegyike a DNS-ben történt G>A nukleotid csere eredményeként állt elő. Az általunk izolált mutációk a ZTL fehérje mindhárom funkcionális doménjét érintik. Korábban nem izoláltak a ZTL PAS vagy az F-box doménjében mutációt hordozó növényt, így először nekünk nyílt lehetőségünk arra, hogy a ZTL fehérje domének funkcióját *in planta* vizsgáljuk.

MEWDSGSDLSADDASSLADDEEGLFPGGGPIPYVGNLLHTAPCG	
FVVTDAVEPDQPIIYV NTVFEMVTGYRAEEVLGGNCRFLQCRGPFACRRHPLVDSMVVSEIR	] LOV/PAS domén
ztl-21 KCIDEGIEFQGLLELLNFRKDGSPLMNRLRLTPYIGDDDTITHIIGIQ	
FFIETDIDLGPVLGSSTKEKSIDGIYSALAAGERNVSRGMC	] F-box domén
ztl-22 LFQLSDEIVVSMKILSRRLTPRDVASVSSVCRRLVLTKNEDLWRRVCQNAWGSETTRVLETVP	
GAKRLGWGRLARELTTL	] Kelch repeat domén
ztl-23 EAAAWRKL SVGGSV	
ztl-24 ztl-2 EPSRC--NFSACAV-GNRVVLFGG---EGVNMQFMNDTFVLDLNSDYPEWQHVKVSSP	
ztl-25 ztl-26 PPGRW--HTLTCVNGSNLVVFGGCGQG-LL---NDFVFLNLDAKPPTWREISGLAP	
ztl-1 PLPRS--WHSSCTLDGTKLIVSGGCADSGVLL--SDTFLLDLSEIEKPVWREIPAAT	
ztl-27/ztl-28 PPSRL--HTLSVYGGGRKILMFGGLAKSGPLKFRSSDVFTMDLSEEEPCWRCVTGSGMPGAGNPGGVAP	
ztl-29 ztl-30 PP-RL--DHVAVNLPGGGRILIFGGSVAG---LHSASQLYLLDPTEDKPTWRILNIPGR	
ztl-31 PPRFAWGHGTCVVGGTTRIVLGGQTGEEVWMLSELHELSSLASYLT	

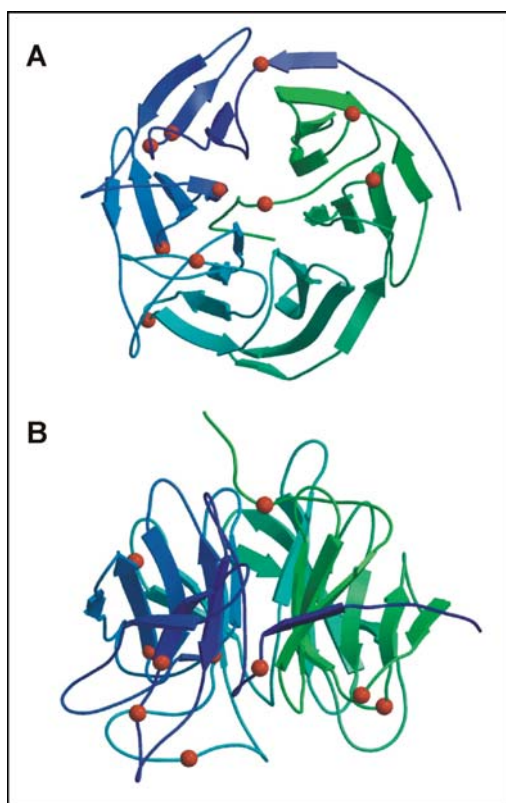
5.2. ábra. A mutációk elhelyezkedése a ZTL fehérje három funkcionális doménjében

A *ztl-21* mutánsban a PAS domén második felében történt mutáció egy, a ZTL fehérje családban konzervált glicin cseréjét okozza aszparaginsavvá. Az F-box mutáció (*ztl-22*) egy olyan pozíciójú glutaminsav cseréjét eredményezi lizinre, amely növényi, állati és gombákban található F-box fehérjékben nagyfokú konzerváltságot mutat. A többi 9 mutáció a fehérje C-terminális részén, az ún. kelch „repeat” doménben található. A *ztl-23* és a *ztl-30* mutánsokban igen hasonló pozícióban, de a hat és fél ismétlődő szekvencia közül nem ugyanabban a szekvenciában történt mutáció: egy glicin változott meg az első ismétlődés előtt található, részleges „repeat” szekvenciában illetve az 5. ismétlődő szakaszban. A *ztl-25* és a *ztl-27/ztl-28* mutánsokban a második, illetve a negyedik „repeat” szekvenciában ugyanaz a pozíciójú glicin változott meg. A *ztl-26* mutáns egy a *ztl-1* és *ztl-2* mutációhoz hasonló aszpartát-aszparagin aminosavcserét hordoz; ezek a mutációk a fehérjében az egymást követő első három ismétlődő szakaszban találhatók. A *ztl-24* mutáció egy prolin-szerin cserét eredményez az első „kelch repeat”-ben. Munkánk során azonosítottunk két olyan *ztl* mutánst is (*ztl-29* és *ztl-31*), amelyekben a mutáció stop kodon létrejöttét, ezáltal a transzláció korai befejezését és valószínűleg rövidebb fehérje termelését eredményezi. A mutációk neve mellett feltüntettük, hogy az egyes mutációkat melyik ökotípus háttérben azonosítottuk, ill. a korábban azonosított mutációk (*ztl-1*, *ztl-2*) milyen ökotípusban találhatók.

5.3. A ZTL fehérje „kelch” doménjében található mutációk lokalizációja egy „kelch” domén háromdimenziós szerkezeti modelljén

A „kelch repeat” domén általában egy ún. β -propeller szerkezetet hoz létre. Mindegyik teljes „kelch repeat” (1-5-ig) a propeller egy-egy lemezét képezi, az 1. „repeat” előtti rövid szakasz és a hatodik hiányos „repeat” szekvencia pedig zárja a propeller struktúrát (Li és mtsai, 2004). A ZTL fehérjében általunk azonosított „kelch” mutációk elhelyezkedését a modellként használt diizopropil-fluoro-foszfátáz fehérje „kelch repeat” doménjének 3D szerkezeti modelljén (Li és mtsai, 2004) a 5.3. ábra mutatja. A diizopropil-fluoro-foszfátáz fehérje „kelch repeat” doménje az egyetlen olyan, szerkezetileg jellemzett „kelch” domén, amelyben - hasonlóan a ZTL fehérjéhez - 6 ismétlődő fehérjeszakasz van.

A modellen jól látható, hogy az összes „kelch” domént érintő mutáció a β -propeller külső oldalán található hurokszerű fehérjeszakaszokra térképeződik. A propeller lemezszerű struktúráit kialakító β -rétegekben mutációt nem találtunk. A hét, aminosav cserét okozó mutáció közül hat a propeller struktúra egyik külső oldalára lokalizálható. A *ztl-31* mutáns növényben a ZTL fehérjéből csak a legutolsó, a propeller szerkezetből kinyúló fehérjeszakasz hiányzik, míg a *ztl-29* mutáció a teljes C-terminális (hatodik) „repeat” szekvencia elvesztésével jár.



5.3. ábra. A mutációk helye a „kelch” doménben

A mutációk pozícióját piros gömbök jelzik a diizopropil-fluoro-foszfátáz fehérje háromdimenziós modelljén (Li és mtsai, 2004). A szalagdiagramon a hat „kelch repeat” β -lemezeiből felépülő β -propeller struktúrában az N-terminális felől a C-terminális felé haladva kékből zöldre változik az egyes ismétlődő szakaszok színezése. A nyilak az N-terminális felől a C-terminális felé mutatnak.

A: A „kelch” domén alulnézeti képe.

B: A „kelch” domén oldalnézeti képe.

A mutációk elhelyezését a modellen Fülöp Vilmos (Warwick, UK) segítségével végeztük el.

5.4. A *ZTL* gén mutációjának hatása a cirkadián óra működésére

A cirkadián óra mutánsok azonosítása során a mutagenizált növényi populációban a *CAB2:LUC(+)* riporter gén ritmikus expresszióját követtük nyomon és ennek a ritmusnak a mutáns növényekben történt megváltozása vezetett a fentiekben ismertetett tizenegy új *ztl* mutáns azonosításához. A folyamatos sötétben vizsgált *CAB2:LUC(+)* expresszió az összes *ztl* mutánsban késői fázisú fenotípust mutat (5.4. ábra). A *CAB2:LUC(+)* ritmus esetében a késői fázis a kísérletben alkalmazott fénykörülmények között mérhető egyetlen cirkadián maximum körülbelül 5 órával eltolódását (késését) jelenti (5.4.A ábra). A lumineszcencia intenzitás mérés alapján az alkalmazott riporter gén átlagos expressziós szintje egyetlen mutánsban sem változott meg lényegesen a vad típusú növényéhez képest (5.4.B ábra), és a különböző mutáns allélok egymáshoz képest mért késői fázisa csak kicsiny eltéréseket mutat (5.4.A ábra).

Mivel folyamatos sötétben a *CAB2* promotor aktivitása, így módon a riporter gén kifejeződése is gyorsan, kb. másfél nap alatt lecseng, ezért a mutáns szűrés körülményei között nem állapítható meg, hogy a *ztl* mutánsok sötétben ténylegesen csak fáziseltérést mutatnak, vagy a későre csúszott cirkadián maximum a periódushossz változásának eredményeként lép fel. Ennek eldöntésére az új *ztl* mutánsokban a *CAB2:LUC(+)* ritmust folyamatos fényben is megvizsgáltuk. A folyamatos vörös fényben végzett kísérlet megmutatta, hogy fényben az összes *ztl* mutáns 2-3 órával növeli a *CAB2:LUC(+)* szabadon futó ritmusának periódushosszát (5.4.C ábra).

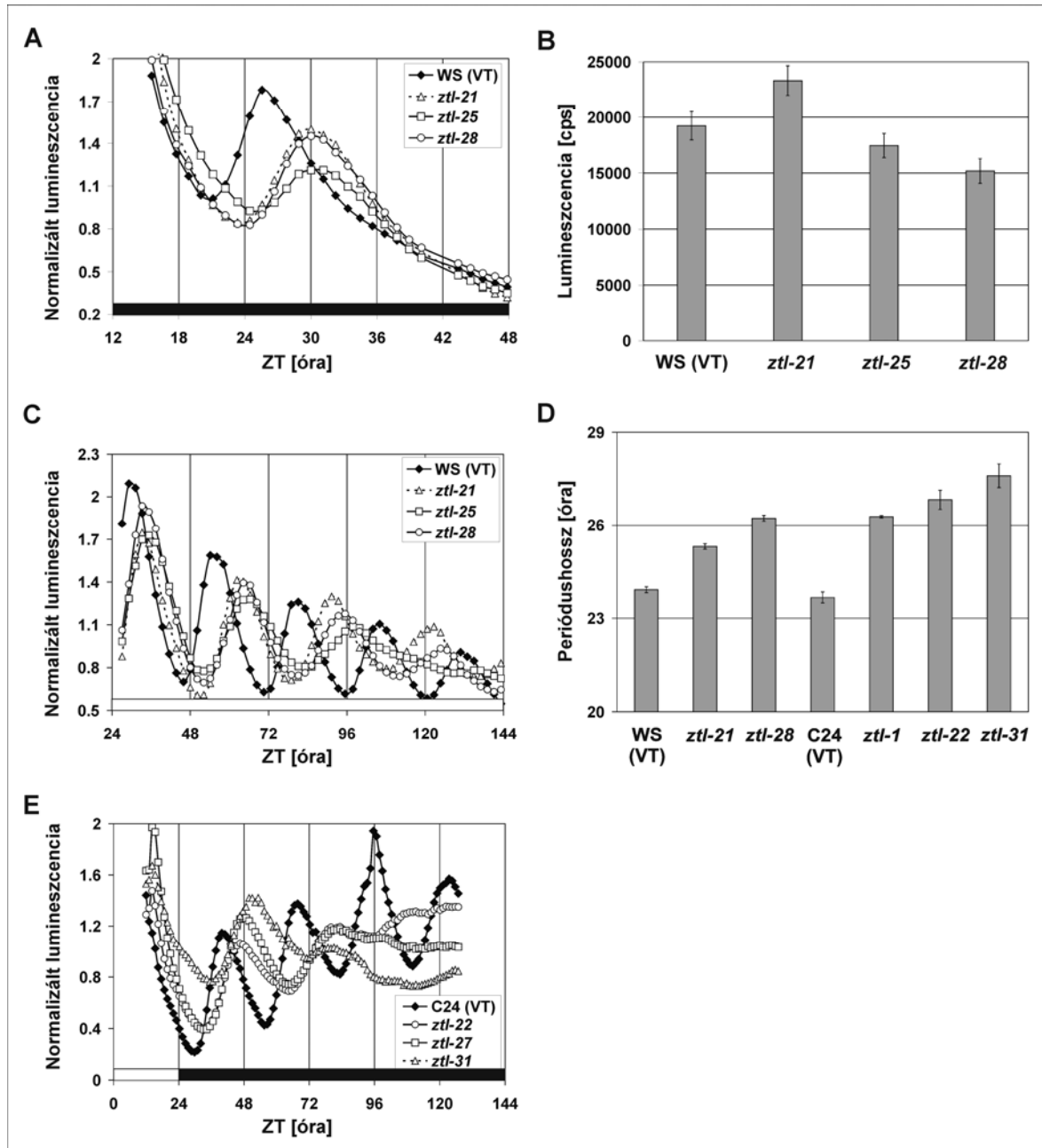
A vörös fény mellett kék fényben és fehér fényben is vizsgáltuk a *CAB2* gén és más cirkadián módon kifejeződő gének (pl. a *CCA1* és *CCR2*) cirkadián ritmusát a luciferáz riporter gén segítségével. Ezek a kísérletek azért voltak szükségesek, hogy eldönthessük, mennyire általános érvényű a *ZTL* gén mutációjának hatása a cirkadián szabályozásban: a mutációk többféle cirkadián ritmust is befolyásolnak, vagy csak a *CAB2* gén kifejeződésére vannak hatással. Folyamatos vörös, kék vagy fehér fényben végzett lumineszcencia méréseink azt mutatták, hogy a *ztl* mutáns növényekben minden általunk vizsgált génkifejeződési ritmus (*CAB2*, *CCA1*, *CCR2*) periódushossza megnövekedik a vad típusú kontrollnövényekéhez képest.

A cirkadián óra a génkifejeződés mellett számos fiziológiai folyamatot is szabályoz, amelyek közül a leggyakrabban vizsgált folyamat a napi ritmust mutató levélmozgás. A *ztl* mutáns és a vad típusú növények levélmozgás ritmusát speciális videokamera rendszerrel tudtuk nyomon követni. A kísérlet kezdetekor 10 napos *Arabidopsis* növények levélmozgását

hét napon keresztül rögzítettük. A vad típusú (Ws) és néhány, a különböző doménekben történt mutációkat reprezentáló *ztl* mutáns növényben megvizsgáltuk a levélmozgás cirkadián ritmusát, és az így nyert periódushossz adatokat az 5.4.D ábra grafikonján tüntettük fel. A levélmozgás ritmusának periódushossza az összes vizsgált mutáns növényben hosszabb volt a megfelelő vad típusú növényénél.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a *ZTL* gén mutációjának következtében számos, a cirkadián óra által szabályozott folyamat változik meg különböző, de állandó megvilágítású és hőmérsékletű környezetben. A *ztl* mutáció hatással van az óra központi mechanizmusára (pl. *CCA1* és *LHY* expresszió ritmusára), amelynek következtében az óra kimeneti ritmusait (pl. *CAB2* expresszió és levélmozgás) is befolyásolja. Eredményeink alátámasztják a már korábban publikált adatokat, amelyek szerint a *ZTL* gén mutációja fényben (fehérben, vörösben és kékben is) a periódushossz megnyúlásához vezet (Somers és mtsai, 2000).

A *ztl* mutánsok viselkedéséről sötétben semmilyen adat nem állt a rendelkezésünkre, ezért a mutánsok cirkadián órájának működését folyamatos sötétben is megvizsgáltuk. Ehhez a kísérlethez egy olyan riporter gén konstrukcióra volt szükségünk, amelynek a kifejeződése (ellentétben a *CAB2* génnel) fénytől független, és folyamatos sötétben több napon át követhető. A *COLD CIRCADIAN CLOCK REGULATED 2* (*CCR2*) gén egy RNS kötő fehérjét kódol, amelynek kifejeződése robusztus cirkadián ritmust mutat, expressziója a szubjektív este, ZT12 körül éri el a maximumát (Carpenter és mtsai, 1994). A *CCR2* gén promoter régióját összeillesztettük a *LUC+* cDNS-sel, és ezt a riporter konstrukciót vad típusú és *ztl* mutáns növényekbe transzformáltuk. Mivel a *ztl* mutánsok eredetileg tartalmaztak egy lumineszcens riporter gént, az újabb riporter konstrukciót csak a C24 háttérű mutánsokba transzformáltuk be, ahol a *CAB2:LUC* marker gyenge lumineszcenciáját a *CCR2:LUC+* nagyobb aktivitása teljesen elfedi (a Ws allélokban *CAB2:LUC+* marker van). A *CCR2:LUC+* expresszióját sötétben több napon át vizsgáltuk (5.4.E ábra). A sötétben végzett kísérletek eredményeként megállapítható, hogy a *ZTL* gén mutációja esetén az óra sötétben is hosszabb periódussal működik, mint a vad típusú növényben. Ez azt jelenti, hogy a *ZTL* fehérje mind folyamatos sötétben, mind fényben igen fontos szerepet játszik a ritmus periódushosszában kialakításában. Ezen eredményünket alátámasztják az időközben megjelent adatok is (Somers és mtsai, 2004). A periódus hosszabbodása mellett megfigyelhető még a ritmus amplitúdójának a vad típusban mérhetőnél gyorsabb csökkenése is, ami arra utal, hogy a *ZTL* fehérjének - a periódushossz beállítása mellett - a ritmus megfelelő amplitúdójának kialakításában is fontos szerepe van.



5.4. ábra. A *ztl* mutánsok cirkadián fenotípusa

A: A *CAB2:LUC+* riportergén expressziója vad típusú (Ws) és *ztl* mutáns csíranövényekben állandó sötétben.

B: A *CAB2:LUC+* kifejeződésének átlagos szintje állandó sötétben.

C: A *CAB2:LUC+* cirkadián expressziója folyamatos vörös megvilágítás mellett ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/2$).

D: A mutáns és vad típusú növények levélmozgás ritmusának periódushossza. A kísérlet során a növényeket folyamatos, $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ intenzitású fehér fényben tartottuk.

E: A *CCR2:LUC+* transzgen kifejeződése mutáns és vad típusú növényekben, állandó sötétben.

A „B” és „D” paneleken látható mérési hibahatárok a „standard error” értékét mutatják. A grafikon „x” tengelye mentén látható fehér sáv a fényszakaszt, míg a fekete a sötétszakaszt jelöli. A csíranövényeket a lumineszcencia mérés előtt 7 napig 12 h fény/ 12 h sötét fotoperióduson neveltük.

Genotípus	Periódus vörös fényben [óra]	± SEM	n	Periódus kék fényben [óra]	± SEM	n	Periódus kék+vörös fényben [óra]	± SEM	n
C24	29.5	0.33	34	25.9	0.26	24	26.10	0.16	20
<i>ztl-1</i>	35.3	0.79	22	32.5	0.48	18	33.04	0.34	16
<i>ztl-22</i>	34.5	0.70	24	31.4	0.57	24	31.36	0.45	18
<i>ztl-27</i>	34.1	0.75	21	32.5	0.29	35	32.07	0.36	27
<i>ztl-31</i>	36.4	0.81	18	32.7	0.61	20	34.30	0.34	17
Ws	27.3	0.21	77	24.7	0.09	39	26.32	0.09	29
<i>ztl-21</i>	29.4	0.21	39	27.9	0.23	60	28.68	0.13	60
<i>ztl-23</i>	33.7	0.66	29	29.9	0.35	42	31.51	0.28	23
<i>ztl-24</i>	32.1	0.64	23	28.2	0.65	19	30.79	0.41	29
<i>ztl-25</i>	35.0	0.54	21	31.2	0.29	26	33.60	0.36	38
<i>ztl-26</i>	32.1	0.61	24	28.4	0.43	18	32.51	0.50	58
<i>ztl-28</i>	32.9	0.43	29	28.5	0.27	28	30.25	0.33	36
<i>ztl-29</i>	32.3	0.49	22	27.7	0.31	28	29.97	0.46	21
<i>ztl-30</i>	32.7	0.48	20	28.4	0.41	23	31.49	0.38	33

5.2. táblázat. A *ztl* mutánsok különböző fénykörülmények között mérhető szabadon futó ritmusának periódushossza

A mutánsok izolálása során azonosított *ztl* mutáns növények és a *ztl-1* mutáns növény *CAB:LUC(+)* riporter gén expressziójának cirkadián ritmusát folyamatos vörös fényben ($5 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$), kék fényben ($8 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) illetve kék és vörös fény együttes alkalmazása ($5\text{-}5 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) során követtük nyomon Topcount luminométerrel, 5-7 napon keresztül. A periódushossz értékeket a BRASS program segítségével számoltuk ki. A mérési hibahatárokat a standard error középértékeként (SEM) tüntettük fel. „n”-nel jelöltük azon növények számát, amelyek periódushossz értékeiből az átlagos periódushosszt számoltuk.

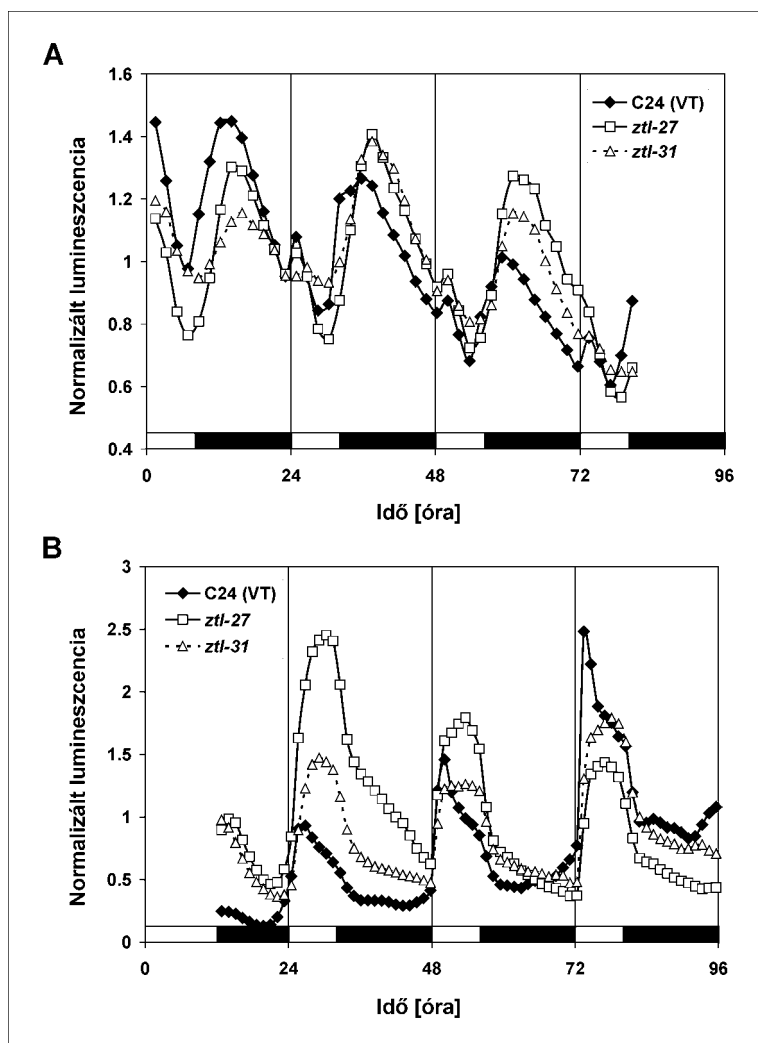
Az 5.2. táblázat tartalmazza az összes általunk vizsgált *ztl* mutáns növény (*CAB2:LUC(+)* expresszió alapján megállapított) szabadon futó ritmusának periódushosszát három különböző módon megvilágított (folyamatos vörös fény, folyamatos kék fény illetve folyamatos kék+vörös fény) és konstans hőmérsékletű környezetben. Az egyes *ztl* allélok periódushosszáinak összehasonlítása eredményeként megállapítható, hogy a *ztl-31* mutáns rendelkezik a legerősebb fenotípussal (leghosszabb periódus folyamatos fényben és sötétben, valamint a leggyorsabb amplitúdó csökkenés sötétben), míg a *ztl-21* mutatja a leggyengébb fenotípust (5.4.A, B, C, D ábra és 5.2. táblázat). Az eredményekből az is kitűnik, hogy a mutánsok keresése során talált 11 *ztl* pontmutáns fenotípusa hasonló, vagy esetenként

súlyosabb a null mutánsként izolált *ztl-3* mutáns növény fenotípusánál (Somers és mtsai, 2004) (5.2. táblázat).

A *ztl* mutánsok viselkedését diurnális körülmények között, fény/sötét (LD) cikluson is megvizsgáltuk. Ebben a kísérletben a *CCR2:LUC+* és a *CCA1:LUC+* riportergén expresszióját követtük nyomon (5.5. ábra). Ismert, hogy a *CCA1* gén kifejeződése kettős szabályozás alatt áll: a *CCA1* gén expresszióját - a *CAB2* génhez hasonlóan - a cirkadián óra mellett a fény pozitívan szabályozza (Wang és mtsai, 1997). A *CCA1* gén kifejeződésének cirkadián maximuma - szabadon futó körülmények között - a szubjektív hajnal után körülbelül 2 órával (ZT2) jelentkezik. A *CCA1* diurnális körülmények között is ritmikusan fejeződik ki, expressziós maximumát vad típusú növényekben a fény bekapcsolását követően körülbelül 2 óra múlva láthatjuk (5.5.B ábra), azonban megfigyelhető az is, hogy a gén expressziója már a sötét fázisban, annak végén emelkedni kezd. Ez bizonyítja, hogy diurnális körülmények között a génexpresszió nem (csak) a fény közvetlen indukciós hatására növekszik meg, hanem - a cirkadián szabályozás következtében - az óra által előre jelzett fényszakasz előtt már órákkal emelkedni kezd. A cirkadián kifejeződés maximumát megelőzően látható egy másik expressziós csúcs is, amely a fény által közvetlenül indukált génexpressziót, az ún. akut fényválaszt tükrözi (5.5.B ábra). A *CCA1* diurnális kifejeződését leíró görbén a cirkadián maximum az akut fényválasz csökkenő szakaszában látható váll formájában jelentkezik. A *CCR2* gén esti fázisban ritmizál, maximális kifejeződési szintje ZT12 időpontban várható, míg minimuma reggel mérhető (5.5.A ábra).

Az 5.5. ábráról leolvasható, hogy a *ztl* mutánsokban az LD cikluson mért cirkadián maximum mindkét vizsgált gén esetében körülbelül 2-3 órával később jelentkezik, mint a vad típusú növényekben. A mutánsokban hiányzik a sötét fázis végén a fényszakasz előrejelzését tükröző *CCA1* expressziós növekedés, valamint nem látható, illetve nagyon lecsökkent a *CCA1* gén akut fényválasza. Az első eltérés valószínűleg abból adódik, hogy a megváltozott periódushossz következtében a normálisan a sötét fázis végén jelentkező expresszió növekedés a *ztl* mutánsokban már a következő fény fázisra tolódik. A *CCA1* gén fényindukciójának csökkenése vagy hiánya arra utalhat, hogy a ZTL fehérje fontos szerepet tölthet be a *CCA1* gén expressziójának fényszabályozásában. A *CCA1* gén akut fényindukciójának csökkenését *ztl* mutánsokban már más kutatók is kimutatták (Somers és mtsai, 2004). Somers és munkatársai a *ztl-1*, *ztl-2* és *ztl-3* mutánsokban vizsgálták a *CCA1* mRNS szintjében fény hatására bekövetkező változást, és azt tapasztalták, hogy a fény hatására etiolált növényekben bekövetkező mRNS felhalmozódás indukciója nagymértékben csökkent a *ztl* mutánsokban (Somers és mtsai, 2004). Megvizsgáltuk, hogy a cirkadián

kísérletek során a *CCA1* expresszió átlagos szintjét befolyásolják-e a *ztl* mutációk, és azt tapasztaltuk, hogy a *CCA1:LUC+* transzgén kifejeződéséből származó lumineszcencia átlagos értéke a mutáns növényekben is a vad típusú növényben mérhetőhöz hasonló értéket mutat. Az akut fényválasz erősségében mutatott eltérés a *ztl* mutánsokban tehát nem magyarázható a *CCA1* gén kifejeződési szintjének általános csökkenésével. Meglepő módon a *CCR2* génexpresszió diurnális ciklusa szintén bifázisos görbével írható le, annak ellenére, hogy ennek a génnek a fénykezelésre adott akut válasza eddig nem volt ismert.



5.5. ábra. A *CCR2:LUC+* és a *CCA1:LUC+* transzgén kifejeződése rövidnappalos körülmények között

7 napos, 12h fény/ 12h sötét fotoperióduson nevelt csíranövényekben vizsgáltuk a *CCR2* és a *CCA1* gén expresszióját.

A: A *CCR2:LUC+* expresszió ritmusa 8h fehér fény/16h sötét fénycikluson.

B: A *CCA1:LUC+* kifejeződés ritmusa 8h fehér fény/16h sötét fotocikluson.

A grafikon „x” tengelye mentén látható fehér sáv a fényszakaszt, míg a fekete a sötét szakaszt jelöli.

5.5. Fényfüggő cirkadián fenotípus a *ztl* mutánsokban

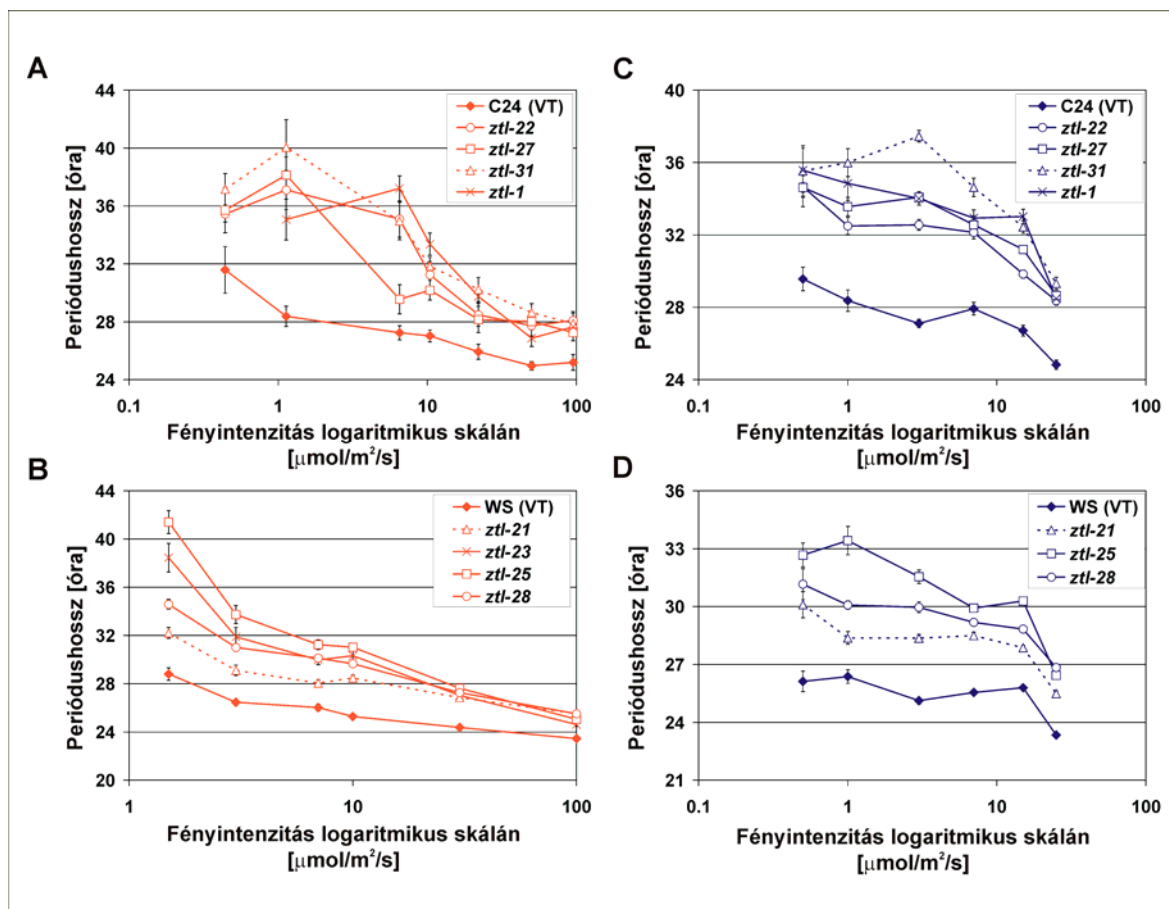
Növényekben a szabadon futó ritmus periódushossza (FRP) a kísérlet során alkalmazott állandó fény intenzitásának növelésével csökken. A különböző fényintenzitásokon (de azonos hullámhosszú fénykezelés során) mérhető periódushosszt a

fényintenzitás (általában logaritmikus skálán vett értékeinek) függvényében ábrázolva az ún. „fluence rate curve” (FRC) rajzolható meg. A vad típusú növény FRC-je meghatározott meredekséggel bír, amely az alacsony fényintenzitáson mérhető periódushosszból kiindulva a magasabb intenzitásokon mérhető rövidebb periódushosszak felé ereszkedik, azaz a görbe negatív meredekségű (5.6. ábra). A korábban azonosított *ztl-1*, *ztl-2* és *ztl-3* mutánsok vizsgálata során kiderült, hogy fenotípusuk erőssége, azaz a vad típusú növényhez képest viszonyított periódushossz eltérés nagymértékben függ az alkalmazott fény intenzitásától (Somers és mtsai, 2000; 2004). A mutánsokban minden vizsgált vörös- és kék fény intenzitáson hosszabb a cirkadián ritmusok periódusa, mint a vad típusban. Ez az eltérés alacsonyabb fényintenzitások felé haladva sokkal nagyobb, mint magas fényintenzitáson, tehát a *ztl* mutánsok periódushossza a vad típusénál erősebb fényfüggést mutat (meredekebb a görbe). Elsősorban ez a megfigyelés vezetett arra a következtetésre, hogy a ZTL fehérje a cirkadián órában a fény „input” jelátviteli utak fontos eleme lehet (Somers és mtsai, 2000). Mint azt már korábban mások (Somers és mtsai, 2004) és mi is kimutattuk (5.4.E ábra), a *ztl* mutánsok sötétben is hosszú periódusúak, tehát a fehérjének sötétben is fontos szerepe van a periódushossz alakításában. Ez a tény világossá teszi, hogy a ZTL molekula nem kizárólag a fény „input” eleme; a mutánsok fenotípusának fényérzékenysége valószínűleg abból adódik, hogy a ZTL fehérje aktivitását a fény szabályozza (Más és mtsai, 2003).

Az általunk azonosított *ztl* mutánsok jellemzésére meghatároztuk a különböző mutánsok szabadon futó ritmusának periódushosszát (FRP-t) folyamatos vörös illetve kék fényben, különböző fényintenzitásokon. A kísérletben a *CAB2:LUC+* riportergén ritmikus expresszióját vizsgáltuk, kontroll növényként a vad típus (Ws vagy C24) mellett a már korábban jellemzett *ztl-1* mutánst is felhasználtuk. A kísérlet eredményeként előállt FRC-t az 5.6. ábra mutatja.

Erős vörös fényben a *CAB2:LUC+* ritmus az összes vizsgált *ztl* mutánsban kb. 3.5 órával hosszabb periódusú, mint a vad típusú növényben (5.6.A, B ábra). Alacsony intenzitású vörös fényben azonban a cirkadián ritmus periódusa az összes vizsgált „kelch” mutáns és az F-box mutáns esetében körülbelül 8-12 órával hosszabb volt a vad típusú növényben mérhető periódushossznál. Ennek eredményeként a mutánsok FRC-je sokkal meredekebb, mint a Ws vagy a C24 növényeké. Az új *ztl* mutánsok ebben a vonatkozásban nagyon hasonlítanak a *ztl-1* és a *ztl-3* mutánsokhoz. A *ztl-21* növény, amely a mutációt a LOV/PAS doménben hordozza, vörös fényben a többi mutánstól eltérően viselkedett. A LOV/PAS mutáns FRC-je párhuzamos a vad típusú Ws görbéjével, az összes fényintenzitáson kb. ugyanakkora különbséget, 3.5 órás periódushosszabbodást mutat (5.6.B ábra). Habár a

cirkadián ritmus periódushossza a LOV/PAS mutánsban a fényintenzitás csökkenésével megnő, a periódushossz fényintenzitástól való függése normális marad, ezért a mutáns FRC



5.6. ábra. A *ztl* mutáns és vad típusú növények FRC-je vörös és kék fényben

A 7 napos, 12h fény/ 12h sötét fotoperióduson nevelt csíranövényeket ZT0 időpontban folyamatos vörös (A, B) ill. kék fénybe helyeztük (C, D), az ábrán feltüntetett fényintenzitás alkalmazása mellett. A csíranövények *CAB2:LUC+* expresszióját Topcount luminométerben követtük nyomon. A különböző fényintenzitásokon rögzített luciferáz aktivitás adatokból a BRASS program segítségével számoltuk ki a különböző mutáns és vad típusú vonalakhoz tartozó periódushossz értékeket, melyeket a fényintenzitás függvényében ábrázoltunk. A hibásávokat a standard error értékből képeztük.

A: A C24 háttérben izolált *ztl* mutánsok FRC-je vörös fényben.

A: A Ws háttérben izolált néhány *ztl* mutáns FRC-je vörös fényben.

A: A C24 háttérben izolált *ztl* mutánsok FRC-je kék fényben.

A: A Ws háttérben izolált néhány *ztl* mutáns FRC-je kék fényben.

görbájének meredeksége megegyezik a vad típusú növényével. A *ztl-21* mutáns fenotípusa nagyon hasonlít a *toc1-1* mutánséhoz, a periódushossz változás mindkét növényben független az alkalmazott fény intenzitásától (Somers és mtsai, 1998a).

Kék fényben az összes *ztl* mutáns hasonló módon viselkedik: a mutánsok FRC-je meredekebb, mint a vad típusú növényé (5.6.C, D ábra). Alacsonyabb fényintenzitások felé haladva a periódushossz a mutánsokban erőteljesebben nő, mint a vad típusú növényekben, bár a fenotípus fényintenzitástól való függése kék fényben mindegyik mutánsban gyengébb, mint vörös fényben. A *ztl-21* mutáns, eltérően a vörös fényben mutatott fenotípustól, ugyanúgy viselkedik, mint az összes többi vizsgált allél (5.6.D ábra), megállapíthatjuk azonban, hogy ez a mutáció okozza a leggyengébb fenotípust mind vörös, mind kék fényben.

5.6. A *ztl* mutánsok fotomorfogenikus fenotípusa

A „reverse” genetikai és „forward” genetikai módszerekkel azonosított cirkadián óra elemek vizsgálata *Arabidopsis*-ban megmutatta, hogy az összes ismert óraelem működése valamilyen módon kapcsolódik a fényszabályozási folyamatokhoz. A központi oszcillátor mechanizmusban működő TOC1 fehérjéről korábban azt gondolták, hogy az LHY és CCA1 molekulákkal közösen, fénytől független módon vesz részt az önfenntartó, endogén ritmus létrehozásában (Alabadi és mtsai, 2001). A közelmúltban azonban bebizonyosodott, hogy a TOC1-nek nagyon fontos szerepe van az oszcillátor mechanizmus, valamint a fotomorfogenezis folyamata felé mutató, fényszabályozott jelátviteli utak szabályozásában, illetve integrációjában (Más és mtsai, 2003). A fény közvetlenül szabályozza az *LHY* és *CCA1* gének kifejeződését (Wang és mtsai, 1997; Martinez és mtsai, 2000) és indukálja az LHY fehérje transzlációját (Kim és mtsai, 2003), amely szabályozási pontok az óra működését is befolyásolják. Az *lhy/cca1* dupla mutáns növény vizsgálatával az is kiderült, hogy az LHY és CCA1 fehérjék normális működése elengedhetetlen a cirkadián ritmusok folyamatos fényben történő fenntartásához, míg sötétben ezek a fehérjék nem esszenciális órakomponensek (Mizoguchi és mtsai, 2002). Növényekben a cirkadián óra működésében résztvevő elemek, mechanizmusok szoros kapcsolatban állnak a fényszabályozással: egyrészt az óra képes számos, a fény által közvetlenül szabályozott folyamat fázistól függő gátlására, másrészt a fény szabályozza egyes órakomponensek aktivitását, degradációját vagy termelődését.

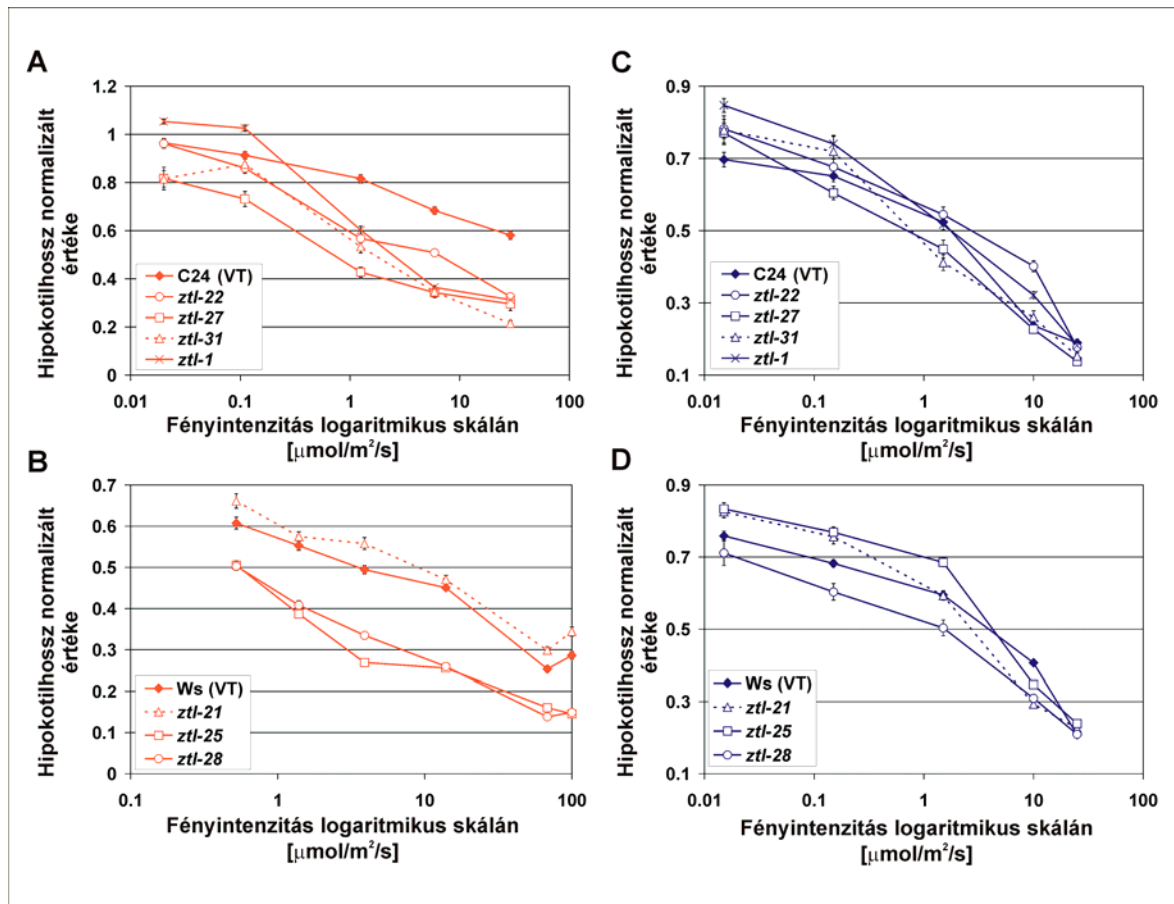
Számos óraelemről kimutatták, hogy hibás működése vagy aberráns expressziója megváltoztatja a hipokotil megnyúlás fény általi gátlását, ezáltal a normálisnál hosszabb vagy rövidebb hipokotil kialakulásához vezet (Hicks és mtsai, 1996; Schaffer és mtsai, 1998; Wang

és Tobin, 1998; Más és mtsai, 2003). Nem tudjuk azonban, hogy ezek a hatások az adott molekulának a fény jelátviteli utakban való közvetlen részvétele miatt lépnek fel, azaz az óraelemnek van egy órától független funkciója a fotomorfogenezisben, vagy az óraelem a fényszabályozott folyamatokat indirekt módon, az óramechanizmus működésén keresztül befolyásolja. Ez utóbbi lehetőség alapjául az a megfigyelés szolgál, hogy a hipokotilmegnyúlás folyamata maga is cirkadián óra által szabályozott, az óra egyik kimeneti ritmusa, amely konstans körülmények között is megőrzi ritmikus jellegét (Dowson-Day és Millar, 1999).

Somers és munkatársai leírták, hogy a *ztl-1* és a *ztl-3* mutáció, a csíranövényeket folyamatos vörös fényben nevelve, a hipokotil rövidülését okozza (Somers és mtsai, 2000; 2004). A mutánsok vörös fényben tapasztalt hiperszenzitivitása kék fényben nem, vagy csak igen kis mértékben volt megfigyelhető. A ZTL fehérjét túltermelő növény hipokotilja vörös fényben a vad típusúénál hosszabb, míg kékben csak kismértékű eltérést mutat (Somers és mtsai, 2004).

A ZTL fehérje fotomorfogenezisben betöltött szerepének tisztázására megvizsgáltuk a 11 új *ztl* mutáns hipokotil megnyúlását vörös és kék fényben. A hipokotilhossz meghatározása előtt a csíranövényeket a csírázástól számolt 4. napig neveltük különböző intenzitású és hullámhosszú folyamatos fényben, valamint sötétben. A hipokotilhossz adatokat diagrammokon ábrázoltuk, amelyeket az 5.7. ábra mutat be.

A korábbi adatoknak megfelelően az újonnan izolált *ztl* mutánsok többsége érzékenyebb a vörös fényre, azaz hipokotilja rövidebb, mint a vad típusú növényé (5.7.A, B ábra). A hipokotilnövekedés mutánsokban tapasztalható eltérő mértékű fénygátlása magasabb fényintenzitáson nyilvánul meg legerősebben. Az egyetlen kivételt a *ztl-21* (LOV/PAS) mutáns képezi, amelynek hipokotilhossza az egész fényintenzitás-skálán hozzávetőleg azonos volt a vad típusával (5.7.B ábra). Kék fényben minden *ztl* mutáns azonos módon viselkedett: a vad típusú csíranövénnyel összehasonlítva hipokotilhosszuk nem mutatott szignifikáns eltérést (5.7.C, D ábra). A sötétben nőtt, etiolált növények hipokotilhossza megközelítőleg megegyezik az összes mutánsban és a vad típusban, ami azt jelzi, hogy a mutánsok vörös fényben tapasztalt hiperszenzitivitása ténylegesen a fényfüggő szabályozási folyamatok megváltozásának az eredményeként jön létre.



5.7. ábra. A *ztl* mutációk hatása a fény által szabályozott hipokotilmegnyúlás folyamatára

A csíranövényeket a csírázástól számított 4. napig neveltük az ábrán megadott intenzitású vörös (A, B) ill. kék (C, D) fényben. Az grafikonok a hipokotilhossz normalizálását követően számolt adatokat mutatják be. A normalizált hipokotilhossz a fényben mért, mm-ben megadott hipokotilhossz és a sötétben mért hipokotilhossz érték hányadosaként áll elő. A hibásávokat a standard error értékéből képeztük.

A: A C24 háttérben azonosított *ztl* mutánsok és a vad típusú csíranövények hipokotilhossza vörös fényben.

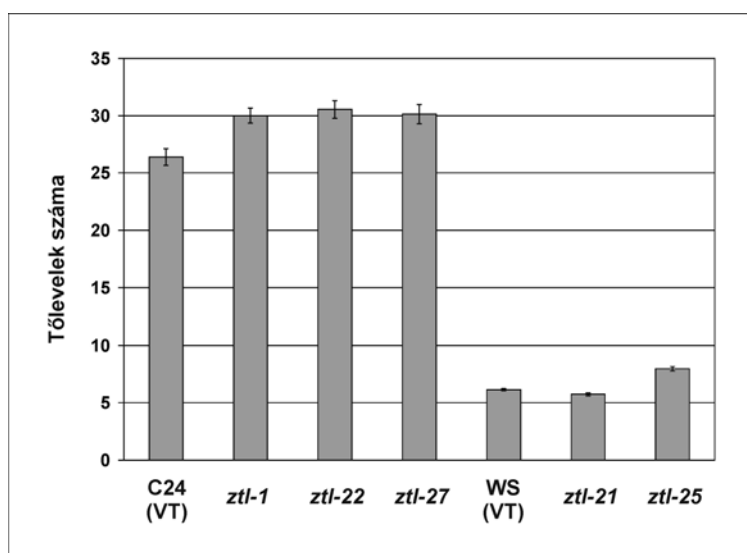
B: A Ws háttérben azonosított néhány *ztl* mutáns és a vad típusú csíranövények hipokotilhossza vörös fényben.

C: A C24 háttérben azonosított *ztl* mutánsok és a vad típusú csíranövények hipokotilhossza kék fényben.

D: A Ws háttérben azonosított néhány *ztl* mutáns és a vad típusú csíranövények hipokotilhossza kék fényben.

5.7. A virágzás fotoperiodikus indukciója a *ztl* mutánsokban

A *ztl* mutáns növények hosszú nappalon a vad típusnál később virágoznak, ez a különbség azonban az eddig vizsgált *ztl-1* és *ztl-3* mutáns esetében nagyon csekély (Somers és mtsai, 2000; 2004). Megvizsgáltuk az általunk izolált *ztl* mutánsok virágzási idejét hosszú nappalon történt nevelés során. A különböző vonalak virágzási idejét jellemző paramétert az 5.8. ábrán tüntettük fel. A vizsgált *ztl* mutánsok mindkét ökotípusban kismértékű, de szignifikáns eltérést mutattak a virágzási idő tekintetében: az általunk vizsgált mutánsok a korábban leírt *ztl-1* mutánshoz hasonlóan - egy vonal kivételével - később virágoztak a megfelelő vad típusú növényeknél. A várható késői virágzás fenotípust csak egyetlen mutáns vonal, a *ztl-21* nem mutatta: a LOV/PAS mutáns virágzásának ideje megegyezik a vad típusú növény virágzásának idejével.



5.8. ábra. A *ztl* mutációk hatása a virágzásra

A mutáns és vad típusú növényeket hosszú nappalon (16 óra fény/8 óra sötét) neveltük, majd a virágzati tengely megjelenésekor megszámoltuk a tőleveleket. A mérési hibahatárokat a „standard error” értékéből képeztük.

5.8. A ZTL szerepe etiolált növényekben

Korábbi kísérleteinkben a ZTL funkcióját minden alkalommal olyan növényekben vizsgáltuk, amelyeket előzőleg több napon keresztül fény/sötét ciklusokon neveltünk. Ezekben a növényekben a fényszabályozott jelátviteli utak már aktiválódtak, így vizsgálatuk arról nem ad információt, hogy a ZTL akkor is résztvesz-e a cirkadián óra működésében, ha a növény még nem látott fényt. A korábbiakban bemutatott kísérletei eredményeink bebizonyították, hogy a ZTL fontos szereppel rendelkezik a fényben nevelt növények cirkadián szabályozásában. A ZTL fehérje etiolált növényekben betöltött potenciális

szerepének felderítésére mutáns és vad típusú növényeket neveltünk állandó sötétben, majd a cirkadián óra működését a *CCR2:LUC+* cirkadián riporter gén expressziójának nyomon követésével vizsgáltuk. Ahhoz, hogy a növényekben megfelelően szinkronizált ritmusokat mérhessünk, az endogén cirkadián oszcillációt környezeti faktorok ciklikus változásával kell beállítanunk. Ebben a kísérletben nem alkalmazhattuk fény/sötét ciklusokat a cirkadián működés beállítására, ehelyett a *ztl* mutáns és a vad típusú növények óráját hőmérsékleti ciklusokkal szinkronizáltuk. A kísérlet során a csíranövényeket 3 napig növesztettük folyamatos sötétben 12h 26°C/12h 22°C hőmérséklet cikluson. Ezt követően az etiolált növényeket folyamatos sötétbe, 22°C-ra tettük és a *CCR2:LUC+* transzgén kifejeződését CCD kamera segítségével követtük nyomon, 5 napon át. A *ztl* mutánsok esetében, hasonlóan a vad típusú növényekhez, a *CCR2:LUC+* kifejeződése megfelelően szinkronizált, cirkadián ritmust mutatott. Párhuzamos kísérletben megvizsgáltuk, hogy a 12 h fény/12 h sötét, 22°C-os fotocikluson beállított mutáns növények órája hogyan viselkedik, a termociklusokkal beállított, etiolált növények órájához képest. A fotocikluson nevelt növényeket 3 napos korban 22°C-ra, sötétbe helyeztük. A kísérletek eredményeként megállapítottuk, hogy a cirkadián óra a *ztl* mutánsokban mind hőmérséklettel, mind fénnel ugyanúgy beállítható. A hőmérséklet- és a fénybeállítást követően a mutánsokban észlelt hasonlóan hosszú periódus (5.3. táblázat) azt bizonyítja, hogy a ZTL fehérjének etiolált növényekben is ugyanolyan fontos szerepe van a periódushossz meghatározásában, mint fényciklusokon nevelt növényekben. A ZTL fehérje tehát nemcsak a fényen nőtt, aktív fotoreceptorokkal rendelkező növényekben szükséges az óra pontos, megfelelő működéséhez, hanem olyan növényekben is, ahol a fény jelátviteli utak még nem aktiválódtak.

	Hőmérsékletcikluson nevelt etiolált növények		Fény/sötét cikluson nevelt növények	
A növény genotípusa	Periódushossz (óra)	± SEM	Periódushossz (óra)	± SEM
C24 (VT)	27.75	0.20	27.05	0.07
<i>ztl-22</i>	33.20	0.51	33.56	0.10
<i>ztl-27</i>	36.49	0.80	36.43	0.36

5.3. táblázat. A szabadon futó ritmus periódushossza sötétben, hőmérsékleti cikluson illetve fény/sötét cikluson nevelt *ztl* mutáns és vad típusú csíranövényekben

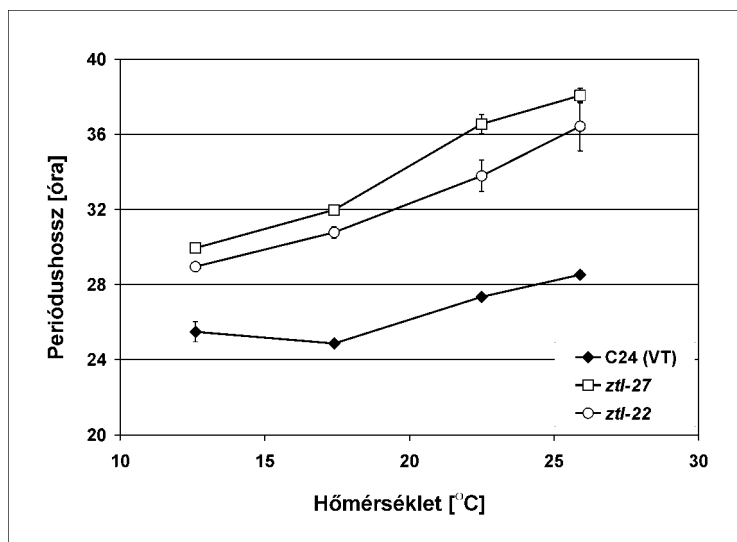
A növények egy részét 3 napig neveltük sötétben, 12h, 26°C/12h, 22°C hőmérséklet cikluson, majd állandó hőmérsékletre (22°C) helyeztük őket. A növények másik részét 12h fehér fény/12h sötét fotocikluson, állandó 22°C-on neveltük 3 napig, majd sötétbe, 22°C-ra helyeztük őket. A *CCR2:LUC+* ritmust 5 napon át követtük nyomon CCD kamerával. A ritmus periódushosszát a BRASS program segítségével határoztuk meg két mutáns és a megfelelő vad típusú növény esetében.

5.9. Hőmérsékletkompenzáció a *ztl* mutánsokban

A hőmérsékletkompenzáció a cirkadián óra egyik meghatározó tulajdonsága. A jelenség lényege, hogy a cirkadián óra által létrehozott ritmusok periódushossza - adott határokon belül - változó hőmérsékleti értékek mellett többé-kevésbé állandó marad. Míg az élő szervezetekben az enzimatis reakciók sebessége jól meghatározhatóan nő a hőmérséklet emelésével (Johnson és mtsai., 1998a; Pittendrigh, 1954), addig ugyanakkora hőmérsékletváltozásra a cirkadián óra működésének sebessége nem változik meg jelentősen. Habár a jelenség már régóta ismert, eddig még nem sikerült olyan óraelemeket azonosítani, amelyek a növényi óra hőmérsékletkompenzációs mechanizmusában töltenek be szerepet.

A ZTL fehérje hőmérsékletkompenzációban betöltött potenciális szerepének vizsgálatára a következő kísérletet hajtottuk végre: a mutáns és vad típusú, kontroll növények *CCR2:LUC+* expresszióját 4 különböző hőmérsékleten mértük és rögzítettük, majd a BRASS program segítségével kiszámoltuk az egyes hőmérsékleti értékekhez és növényi vonalakhoz tartozó periódushossz értékeket. A kísérletet folyamatos gyenge vörös fénnel történő megvilágítás mellett végeztük. Az így kapott periódushossz értékeket az 5.14. ábra mutatja. A vad típusú növényben a periódushossz körülbelül 4 órával nő, mialatt a hőmérséklet 12.5°C-ról 26°C-ra változik. Ezt tekinthetjük a periódushossz normális – a vad típusú növényekben megfigyelhető – változásának, amely a hőmérséklet emelés hatására jön létre. A vizsgált *ztl*

mutánsokban, ugyanebben a hőmérséklettartományban a két szélső hőmérsékleti érték között a periódushossz körülbelül 8 órával változik meg. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a *ztl* mutánsokban a hőmérsékletkompenzáció mechanizmusa is sérül.



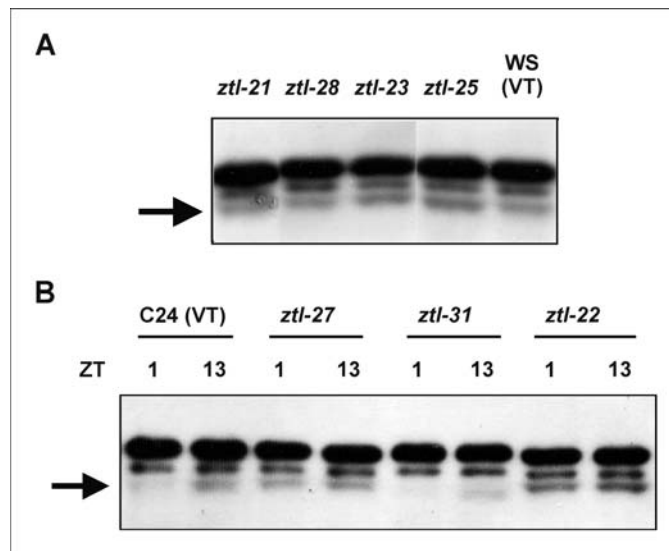
5.9. ábra. Hőmérsékletkompenzáció a *ztl* mutáns és vad típusú növényekben

A növényeket 7 napig neveltük 12h fény/ 12h sötét fotoperióduson, majd ZT0 időpontban folyamatos vörös fénybe ($1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), különböző hőmérsékletű környezetbe helyeztük őket. A *CCR2:LUC*+ génkifejeződés ritmusának periódushosszát 12.6°C, 17.4°C, 22.5°C és 25.9°C-on határoztuk meg.

5.10. A mutáns ZTL fehérjék kifejeződése a növényekben

Az újonnan azonosított *ztl* mutánsokban egy-egy pontmutáció található, amelyek nagyobb részben aminosavcserét okoznak, két esetben pedig - egy korai stop kodon kialakulása révén - feltehetően a fehérjetermék rövidülését eredményezik (5.1. ábra). Az aminosavcserével járó mutációk általában a fehérje részleges funkcióvesztését okozzák, vagy a fehérjestabilitás esetleges megváltozásával a fehérje mennyiségének drasztikus csökkenését ill. emelkedését eredményezhetik. Munkánk következő lépéseként ellenőrizni szeretnénk volna, hogy a *ztl* mutánsokban észlelt fenotípust a ZTL fehérje mennyiségének vagy funkciójának megváltozása okozza. Az általunk izolált *ztl* mutánsokban Western analízis segítségével meghatároztuk a ZTL fehérje mennyiségét. A kísérletbe azokat a növényvonalakat vontuk be, amelyek a különböző funkcionális doménekben bekövetkezett eltérő jellegű mutációkat reprezentálják. Így a fehérje kimutatását elvégeztük a LOV/PAS doménben mutáns *ztl-21*, és három, a „kelch” doménben mutáns (*ztl-23*, *ztl-25*, *ztl-28*) vonalban, amelyek a Ws ökotípus háttérben találhatók, valamint a C24 háttérű F-box (*ztl-22*) mutánsban, a „kelch” doménben aminosavcserét hordozó *ztl-27* és a korai stop kodont hordozó *ztl-31* mutánsban. A Western analízis eredményét az 5.10. ábra mutatja.

A kísérlet eredményeként megállapítottuk, hogy az összes vizsgált mutánsban termelődik ZTL fehérje, amelynek a mérete - a ZTL^{ztl-31} mutáns fehérje kivételével - megegyezik a vad típusú fehérje méretével (5.10.A ábra). A várakozásnak megfelelően a *ztl-31* mutánsban a mutáció természetéből adódóan (W→STOP) a ZTL fehérje mérete kisebb. A fehérje mennyisége minden vonalban eléri, vagy meghaladja a vad típusú növényben mérhető ZTL mennyiséget, kivéve a *ztl-31* mutáns vonalat, amelyben a ZTL szint minden vizsgált időpontban erőteljesen csökkent.



5.10. ábra. A ZTL fehérje kimutatása Western analízissel mutáns és vad típusú növényekben

A fehérje mintákat 12h fény/ 12h sötét féncikluson nevelt 10 napos növényekből tisztítottuk. A nyilak a ZTL fehérje pozícióját mutatják a Western bloton. A kísérletben poliklonális ZTL ellenanyagot használtunk, amely nemcsak a ZTL, hanem egyéb fehérjéket is felismer. A bloton látható további szignálok valószínűleg az aspecifikus jelölődés eredményei.

A: A ZTL fehérje mennyiségét a vad típusú és *ztl* mutáns növényekből ZT13 időpontban (1 órával a fény-sötét átmenet után) gyűjtött mintákban határoztuk meg.

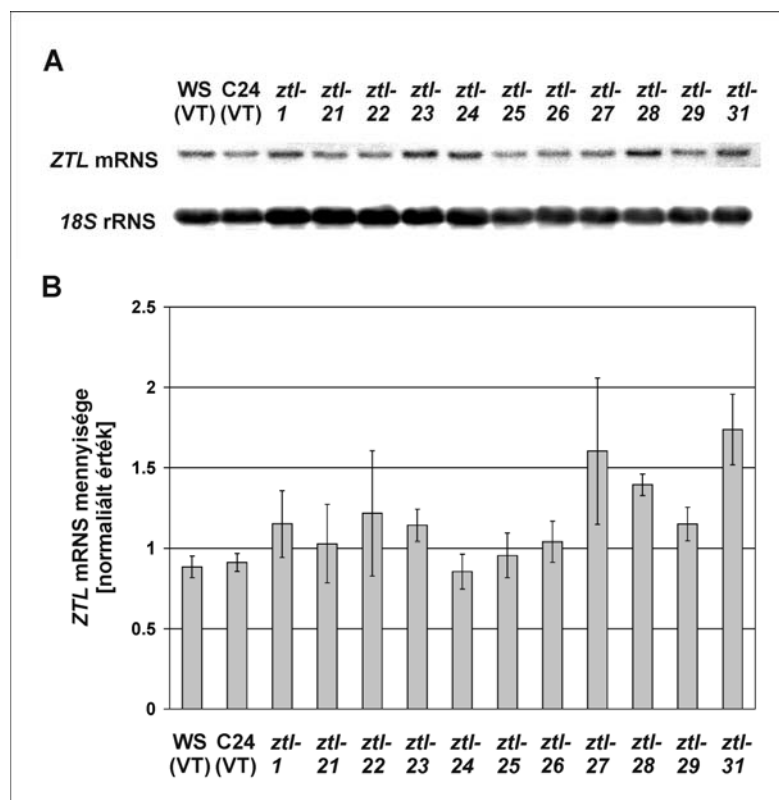
B: A diurnális fehérjeakkumuláció vizsgálatára ZT1 (1 órával a sötét-fény átmenet után) és ZT13 időpontban szedtünk növényi mintát a mutáns és vad típusú növényekből. Diurnális körülmények között, fény/sötét cikluson, a fehérje felhalmozódás minimuma ZT1, a maximuma ZT13 időponban mérhető.

Kim és munkatársai (2003) kimutatták, hogy a ZTL fehérje szintje a növényi sejtekben diurnális oszcillációt mutat: 12h fény/12h sötét féncikluson a fehérje felhalmozódás maximumát ZT13-kor, minimumát ZT1-kor éri el (5.10.B ábra). A fehérjeszintben bekövetkező ritmikus változások csak diurnális körülmények között figyelhetők meg, a fehérje felhalmozódás nem áll cirkadián szabályozás alatt. Folyamatos fényben a ZTL szintje

a diurnális maximum expresszió szintjét megközelítő, állandóan magas értékre, folyamatos sötétben pedig a diurnális ritmus minimum értékét megközelítő alacsony szintre áll be. A fehérje expresszió diurnális ritmusának kialakításában egy poszt-transzlációs szabályozási mechanizmus, a fehérje degradáció vesz részt, amelynek sebessége a nap folyamán (fázistól függően) eltérő (Kim és mtsai, 2003). A *ZTL* mRNS felhalmozódása a nap folyamán nem mutat jelentős eltéréseket, sem cirkadián, sem diurnális ritmust, így a fehérje diurnális felhalmozódásában az mRNS szintet szabályozó mechanizmusok nem játszanak szerepet (Somers és mtsai, 2000).

A fehérje diurnális ritmust mutató felhalmozódását megvizsgáltuk az újonnan azonosított mutáns növényekben (5.10.B ábra). Mint azt a Western analízis mutatja, a mutáns fehérjék többsége normális diurnális felhalmozódást mutat, azaz a fehérje mutációja nem befolyásolja a *ZTL* fázis-függő felhalmozódását. A *ztl-27* mutáció a *ZTL* fehérje fázis-specifikus stabilizálódását eredményezi: a *ZT1* időpontban vett növényi mintában a vad típusnál több fehérje mutatható ki. A *ztl-22* mutáció hatására a *ZTL* fehérje a *ZT1*, és a *ZT13* időpontban is nagyobb mennyiségben halmozódik fel, mint a vad típusú növényben. A *ztl-31* mutánsban a *ZTL* szint mindkét időpontban alacsonyabb, mint a vad típusú növényben.

A növényekben felhalmozódó fehérje mennyiségét a fehérje stabilitási viszonyai mellett mRNS-ének akkumulációja ill. stabilitása is befolyásolja. Megvizsgáltuk, hogy az egyes mutánsokban mérhető megemelkedett vagy csökkent fehérjeszint magyarázható-e a *ZTL* mRNS mennyiségének mutánsokban történő megváltozásával. 14 napos, *ztl* mutáns és vad típusú növények föld feletti részeiből *ZT11* időpontban mintát szedtünk, majd a mintákból össz RNS-t tisztítottunk. Az egyes minták *ZTL* mRNS tartalmát Northern analízissel határoztuk meg (5.11. ábra). Az eredmények bebizonyították, hogy a *ZTL* mRNS mennyisége - a vad típusban mérhető mRNS szinthez viszonyítva - a mutáns növények többségében nem mutat lényeges eltérést. A mutáns növényekben tapasztalható fehérje akkumulációs különbségek tehát a fehérjék megváltozott stabilitási viszonyait tükrözhetik.



5.11. ábra. A *ZTL* mRNS mennyiségének kimutatása vad típusú és *ztl* mutáns növényekben

A *ZTL* mRNS mennyiségét Northern analízis segítségével vizsgáltuk (A). Három párhuzamos kísérletet hajtottunk végre, amelyek során mért mRNS mennyiségeket kvantitáltuk. Kontrollként meghatároztuk a konstitutívan expresszáló 18S riboszómális RNS szintjét is. A *ZTL* mRNS mennyiség átlag értékét minden egyes mintában a 18S riboszómális RNS mennyiségére normalizáltuk, és a grafikus ábrázolásban ezt a normalizált értéket tüntettük fel, a három kísérlet eredményeiből számolt standard error értékével együtt (B).

5.11. A *ZTL* fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata élesztő két-hibrid rendszer segítségével

A *ztl* gén felfedezését követően, a kódolt fehérje szekvencia adatbázis segítségével történt analízise során kiderült, hogy a *ZTL* protein három olyan funkcionális doménnel rendelkezik, amelyek kombinációja még egy ismert fehérjében sem található meg. A *ZTL* fehérjecsalád mindhárom tagja rendelkezik egy LOV/PAS doménnel, egy F-box doménnel és egy „kelch repeat” doménnel. A LOV/PAS domén jelenléte a fehérje fényérzékelésben betöltött potenciális szerepére utal. *Arabidopsis*-ban először a fototropin 1 (PHOT1) és fototropin 2 (PHOT2) fotoreceptor fehérjében találták meg ezt a domént (Lin, 2002). A fototropinok LOV/PAS doménje flavin-mononukleotidot (FMN-t) köt, és ennek segítségével

abszorbeálja a fényt, amelynek következtében a molekula aktiválódik (Cristie és mtsai, 1999; Briggs és mtsai, 2001b). Időközben kimutatták, hogy a ZTL család egyik tagja, az FKF1 fehérje szintén képes a LOV/PAS doménjén keresztül FMN-t kötni, a FMN fényt abszorbeál, és az így aktivált molekula a virágzás szabályozásában tölt be szerepet (Imaizumi és mtsai, 2003). Az F-box motívumot először az Skip-Cullin-F-box (SCF) komplexek elemeként működő, ún. F-box fehérjékben azonosították, jelenléte a molekula fehérje degradációban való részvételére utal (Vierstra, 2003). A „kelch repeat” domén valószínűleg más fehérjékkel való kölcsönhatásban játszik szerepet (Adams és mtsai, 2000). A fent említett fehérjedomének egyedülálló kombinációja a cirkadián órában fontos szereppel bíró ZTL fehérjében arra engedett következtetni, hogy a fehérje növényi cirkadián szabályozásban betöltött elsődleges funkciója valószínűleg a más óraelemek fényfüggő degradációjának irányítása. A növényi cirkadián óra működésében ezáltal először merült fel a lehetősége annak, hogy a transzkripció, transláció, protein foszforillációk szabályozási mechanizmusokon túl az irányított fehérje degradáció is aktívan részt vehet a hozzávetőleg 24 órás periódusú ritmus létrehozásában. A ZTL molekula lehetséges funkciójának megismerésére több laboratóriumban is kutatások indultak. Ezen kutatások egyik célja a ZTL-val kölcsönható fehérjék azonosítása volt.

A kutatások eredményeként vált ismertté, hogy a ZTL fehérje élesztő két-hibrid rendszerben kölcsönhatásba lép a TOC1 fehérjével (Más és mtsai, 2003). Más és munkatársai kimutatták, hogy a ZTL-TOC1 kölcsönhatáshoz elegendő a fehérje PAS doménjének a jelenléte, míg a „kelch” domén önmagában, vagy az F-box motívummal együtt nem képes az interakció létrehozására. A fehérjék növényi fehérjekivonatokból történt ko-immunoprecipitációja megerősítette, hogy a ZTL-TOC1 kölcsönhatás nemcsak élesztőben, hanem *in planta* is működik.

Jarillo és munkatársai (2001) két fényreceptor, a PHYB valamint a CRY1 és a ZTL fehérje kölcsönhatását vizsgálták élesztő két-hibrid rendszerben. A fitokrómokról és a kriptokrómokról már korábban bebizonyosodott, hogy fontos szerepet töltenek be a cirkadián óra fény általi beállításában. Jarillo és munkatársainak kísérletei kimutatták, hogy élesztőben a ZTL kölcsönhatásba lép a PHYB fehérje C terminális fragmentjével (PHYB-C) és a CRY1 fehérje C-terminális részével (CRY1-C). Ezen kölcsönhatások valóságát *in vitro* elvégzett kötési reakciók szintén alátámasztják.

A fenti eredmények alapján feltételezik, hogy a ZTL, mint F-box fehérje, részt vesz bizonyos óraelemek ubiquitinálásában, amely folyamat az SCF típusú ubiquitin E3 ligáz komplex közreműködésével a kijelölt fehérjék proteolíziséhez vezet. Az SCF típusú ubiquitin

E3 ligáz komplex általában 3 alegységből, a Skp1, a Cullin és az F-box fehérjéből épül fel. Az ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 1 (ASK1) fehérjéről Risseuw és munkatársai (2003) kimutatták, hogy élesztőben kölcsönhatásba lép a ZTL fehérjével, így sikerült azt a molekulát azonosítani, amely a ZTL molekula közvetlen kapcsolódását teszi lehetővé a fehérje degradációs komplexszel.

Felmerült a kérdés, hogy az általunk izolált *ztl* mutánsokban termelődő hibás fehérjék képesek-e kölcsönhatást kialakítani a már ismert kölcsönható faktorokkal, vagy megváltozik ez a tulajdonságuk. További kérdés volt, hogy a különböző *ztl* mutánsok cirkadián fenotípusa magyarázható-e a mutáns fehérje megváltozott kölcsönhatásaival. A mutáns és vad típusú ZTL fehérjéket élesztő két-hibrid rendszerben vizsgáltuk. Első lépésként megismételtük a korábban publikált élesztő két-hibrid kísérleteket a teljes hosszúságú ZTL fehérje és a teljes hosszúságú TOC1 ill. ASK1 fehérje, valamint a Jarillo és munkatársai (2001) által közölttel azonos hosszúságú PHYB és CRY1 fehérje C-terminális darabjának felhasználásával. Erre a kísérletre azért volt szükség, hogy kiderüljön, az általunk használt élesztő törzsek és vektorok, valamint protokollok alkalmasak-e a leírt kölcsönhatások kimutatására. A ZTL-TOC1, ZTL-ASK1 és ZTL-PHYB-C kölcsönhatásokat meggyőzően sikerült reprodukálni, azaz élesztőben mind a három fehérje összekapcsolódott a ZTL-val (5.12.A, B, C ábra). Mivel a mutánsizolálás során mindhárom funkcionális doménben azonosítottunk mutációt, így lehetővé vált, hogy az egyes funkcionális domének fehérje-fehérje interakcióban betöltött szerepét külön-külön vizsgáljuk, és ezáltal az egyes domének funkcióját részletesebben megismerjük.

A vizsgálni kívánt két fehérjét élesztőben ko-expresszáltuk úgy, hogy az egyik fehérjét a GAL4 fehérje DNS-kötő doménjével, a másik fehérjét a GAL4 fehérje transzkripciós aktivátor doménjével kapcsoltuk össze (lásd az „Anyagok és módszerek” című fejezetben). Ha a két fehérje az együttes expresszió során kölcsönhatásba lép egymással, akkor az élesztőben transzkripcionálisan aktiválják a β -galaktozidáz enzim, valamint egy, az adenin bioszintéziséhez szükséges enzim termelődését. A két ko-expresszált fehérje lehetséges kölcsönhatásának kimutatását kettős szelekciós rendszer teszi lehetővé: az adenin hiányos táptalaj (ALT) alkalmazásával csak abban az esetben tapasztalunk élesztő növekedést, ha a vizsgált fehérjék az élesztőben megfelelő közelségbe kerülnek, azaz kölcsönhatásba lépnek egymással, az élesztőben termelt β -galaktozidáz enzimaktivitásának mérésével pedig a kölcsönhatás erősségére tudunk következtetni.

A teljes hosszúságú ZTL fehérjét a transzkripció aktivátor doménnel (AD = „activator domain”), vagy a DNS-kötő doménnel (BD = „binding domain”) összekapcsolva expresszáltuk élesztőben, így a kölcsönhatásokat mindkét kombinációban megvizsgálhattuk.

A kísérletben a vad típusú ZTL mellett három olyan mutáns fehérjét is vizsgáltunk, amelyek a három funkcionális doménben hordoznak egy-egy mutációt – tehát megfelelően reprezentálják a különböző típusú és eltérő helyzetű mutációkat, lehetővé téve az egyes domének funkciójának szétválasztását. Létrehoztuk a *ztl-21* (LOV/PAS), *ztl-22* (F-box) és *ztl-27* („kelch”) mutációt hordozó ZTL fehérjéket és élesztőben ko-expresszáltuk az ASK1, TOC1, PHYB-C fehérjékkel. A kísérlet eredményét az 5.12. ábrán foglaltam össze.

A teljes hosszúságú ASK1 fehérje mindkét orientációban kifejezve (az aktivátor ill. a DNS-kötő doménnel fuzionálva is) képes összekapcsolódni a teljes hosszúságú, vad típusú ZTL fehérjével (5.12.A ábra). Az ASK1-ZTL kölcsönhatást legerősebben a PAS/LOV doménben történt mutáció befolyásolta: a β -galaktozidáz enzimaktivitás alapján a ZTL^{ztl-21} mutáns fehérje alig mutat kölcsönhatást az ASK1 fehérjével, bár a két fehérjét együttesen kifejező élesztő képes nőni a szelektív, adenin hiányos (ALT) táptalajon. Az F-box (*ztl-22*) és a „kelch” (*ztl-27*) mutációk kismértékben gyengítik a ZTL-ASK1 kölcsönhatást.

A TOC1-ZTL kölcsönhatást a fehérjék mindkét orientációban történt expresszálása során megvizsgáltuk. Az 5.12.B ábrán csak az egyik fehérje kombinációt tüntettük fel, mivel a TOC1-BD és a ZTL-AD fúziós fehérjék együttes expressziója eredményeként mérhető β -galaktozidáz aktivitás értékek nem érik el a negatív kontrollknál mért értékeket, azaz ebben a kombinációban a két fehérje nem mutat kölcsönhatást. Ez a jelenség nem egyedi, számos esetben utaltak már hasonló kísérleti eredményre, amely során az élesztős ko-expresszió csak az egyik orientációban produkált kimutatható kölcsönhatást. A „kelch” (*ztl-27*) és PAS (*ztl-21*) doménben történt mutáció teljes mértékben megszünteti a ZTL-TOC1 kölcsönhatást, míg az F-box mutáció (*ztl-22*) nincs jelentős hatással a ZTL-TOC1 interakcióra (5.12.B ábra).

A fitokróm B C-terminálisa (PHYB-C) csak az egyik orientációban, a DNS-kötő doménnel fuzionálva lép kölcsönhatásba a teljes hosszúságú ZTL fehérjével (5.12.C ábra). A vad típusú ZTL fehérje mellett megvizsgáltuk a három különböző mutációt hordozó ZTL fehérje kölcsönhatását is a fotoreceptor C-terminális darabjával. A kísérlet eredményei azt mutatják (5.12.C ábra), hogy egyik mutáció sem okoz csökkenést a két fehérje közötti kölcsönhatásban, sőt, a *ztl-21* és *ztl-22* mutáció kismértékben felerősítette ezt az interakciót. Egy korábbi fejezetben már ismertettem, hogy a 3 különböző doménben történt mutációk hatására a molekula funkciója a hipokotil megnyúlás folyamatának szabályozásában nem egyformán változott meg. Az F-box és a „kelch” mutációk hiperszenzitívvé tették a növényt

vörös fényre, a LOV/PAS mutánsban azonban a fényválasz a vad típuséhoz hasonló maradt, annak ellenére, hogy a fitokróm B fotoreceptor C-terminálisa és a ZTL fehérje közötti kölcsönhatás erőssége élesztőben egyik mutáció hatására sem változott meg drasztikusan. Mindez azt jelenti, hogy a *ztl* mutánsokban megfigyelhető eltérő fotomorfogenikus reakciók nem magyarázhatók a PHYB fotoreceptor és a mutáns fehérjék közötti kölcsönhatás megváltozásával.

5.12. ábra. A ZTL fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata élesztő két-hibrid rendszerben

A: A teljes hosszúságú, vad típusú ill. mutáns ZTL fehérjék kölcsönhatása az ASK1 fehérjével.

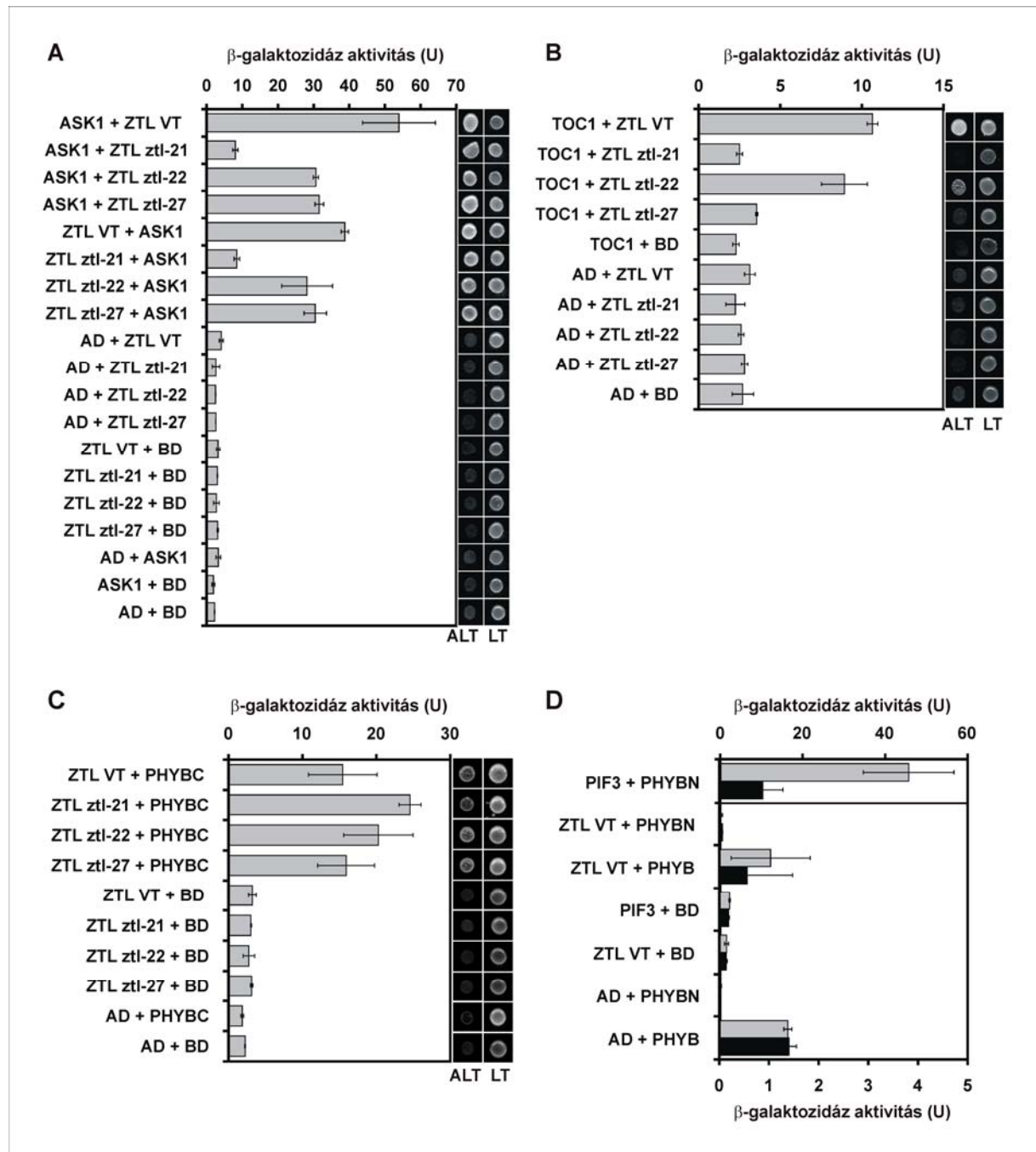
B: A teljes hosszúságú, vad típusú ill. mutáns ZTL fehérjék kölcsönhatása az TOC1 fehérjével.

C: A teljes hosszúságú, vad típusú ill. mutáns ZTL fehérjék kölcsönhatása a PHYB C-terminális fragmentjével (PHYBC).

D: A teljes hosszúságú, vad típusú ZTL fehérje és a teljes hosszúságú PHYB fehérje ill. a PHYB N-terminális fragmentje (PHYBN) kölcsönhatásának vizsgálata. A kísérletben a PHYB konformációfüggő kölcsönhatásának vizsgálatához pozitív kontrollként használtuk a PIF3 és PHYB interakcióját. A PHYB-PIF3 interakciót jellemző β -galaktozidáz enzimaktivitási értékeket az ábra felső skáláján tüntettük fel; az ezen az ábrán bemutatott további kölcsönhatásokat jellemző enzimaktivitásokat az alsó skála mutatja.

A diagrammokon a fehérjepárok feltüntetésekor az első helyen minden esetben az aktivátor doménnel fuzionált fehérje, a második helyen a DNS-kötő doménnel összekapcsolt fehérje szerepel. A β -galaktozidáz aktivitási értékeket Miller unit-ban adtuk meg. A szürke sávok azokat az enzimaktivitási értékeket jelölik, amelyeket vörös fénnel kezelt ($35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; 5 perc) élesztőminták analízisével nyertünk. A fekete sávok azon minták enzimaktivitását jelzik, melyeket vörös ($35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) és rögtön azután távoli vörös ($25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; 5 perc) fénnel kezeltünk. Az élesztők szelektív, ALT és nem szelektív, LT táptalajon való növekedési képességet kép formájában rögzítettük; a képeket a sávdiaagramm mellett tüntettük fel.

ZTL-ztl-21, ZTL-ztl-22, ZTL-ztl-27 = a megfelelő pontmutációt hordozó mutáns ZTL fehérje



5.12. ábra.

(Az ábra magyarázatát lásd az előző oldal alján.)

Mivel felmerült a lehetősége annak, hogy a PHYB C-terminális és a ZTL molekula kölcsönhatásának nincs fiziológias jelentősége *in vivo*, ezért élesztőben megvizsgáltuk a teljes hosszúságú, kromofórral ellátott fitokróm B és a teljes hosszúságú ZTL kölcsönhatását is (5.12.D ábra). Kromofór jelenlétében a fotoreceptor megfelelő fénykezelés révén aktív, P_{fr} és inaktív, P_r formába tudjuk alakítani, és a két különböző konformációjú fehérje kölcsönhatásait vizsgálhatjuk. Mint azt az 5.12.D ábra is mutatja, a teljes hosszúságú PHYB nem mutat kölcsönhatást a ZTL-val. A fotoreceptor N-terminális fragmentjének kölcsönhatását is megvizsgáltuk a ZTL fehérjével, és azt tapasztaltuk, hogy a fotoreceptor ezen része szintén nem képes kötődni a ZTL fehérjéhez. Ez azért is meglepő, mert a legújabb közlések alapján, melyeket saját kísérleti adataink is megerősítenek, a PHYB fotoreceptor N-terminális, 450 aminosavas rövid darabja (dimerizációs doménnel és NLS szekvenciával ellátva) elegendő a fitokróm B hiányos növény fotomorfogenikus fenotípusának tökéletes komplementációjára (Oka és mtsai, 2004). Ez azt jelenti, hogy a *phyB* mutáns növényben a vad típusú növényhez hasonló - vörös fényben mért - hipokotilhossz kialakításához elegendő a PHYB fotoreceptor N-terminális szakaszát expresszálni, mivel ez a növényben teljesen helyreállítja a PHYB funkciót. Ezért úgy gondoljuk, hogy a C-terminális PHYB fehérjefragment és a ZTL között korábban kimutatott fehérje-fehérje kölcsönhatásnak nincs *in vivo* jelentősége a ZTL fehérje által vörös fényben szabályozott hipokotilmegnyúlás folyamatában. A kísérletben pozitív kontrollként egy korábban leírt (Shimizu-Sato és mtsai, 2002), a PHYB N-terminálisával kölcsönható fehérjét is megvizsgáltunk. Ez a fehérje a PIF3, amely élesztőben összekapcsolódik a P_{fr} konformációjú, biológiailag aktív PHYB N-terminális darabjával (5.12.D ábra).

Az élesztő két-hibrid kísérletek során nyert adatok tehát nem minden esetben szolgáltatnak megfelelő információt az egyes fehérjék kölcsönhatásairól és lehetséges funkcióiról. Kísérleti eredményeink azonban, amelyek a mutáns és a vad típusú ZTL fehérjék protein-protein kölcsönhatásainak élesztőben történő vizsgálata során álltak elő, nem mondanak ellent a mutánsok analízise során tapasztalt fenotípusos jegyeknek.

5.12. A cirkadián szabályozás előnyei *Arabidopsis*ban

Számos példát ismerünk, amelyek az élő szervezetekben működő cirkadián szabályozás hasznát és előnyeit mutatják, mégis igen keveset tudunk arról, hogyan vesz részt a cirkadián óra a növények vitalitásának és versenyképességének („fitness”) növelésében,

milyen fiziológiai folyamatokon keresztül fejti ki hatását, és hogyan biztosít előnyt a túlélésért folytatott harcban a növényegyedek számára.

Az újonnan azonosított *ztl* mutánsok részletes jellemzése során ismét felmerült az a kutatókat régen foglalkoztató kérdés, hogyan vesz részt az óra a növények vitalitásának fejlesztésében. A kérdés megválaszolásához olyan növények vizsgálatára van szükség, amelyek cirkadián órája hibásan működik: nagyon hosszú, vagy nagyon rövid periódust, esetleg aritmiát okoz. Munkánk során számos cirkadián óra mutánst azonosítottunk, és rendelkezésünkre állt néhány korábban jellemzett óramutáns is, ami lehetőséget nyújtott arra, hogy megvizsgáljuk, milyen előnnyel jár a cirkadián szabályozás a növényekben.

Tudjuk, hogy állandó körülmények között a *ztl* mutánsok periódushossza jóval meghaladja a 24 órát, extrém hosszú lehet (5.2. táblázat). A természetes környezetben azonban - ahol a nappalok és az éjszakák váltakozása során a fény minden reggel újraállítja az óra fázisát - a mutáció hatása nem tűnik drasztikusnak: fény/sötét ciklusokon a mutánsok cirkadián ritmusának fázisa néhány órával későbbre tolódik, mint a megfelelő vad típusú növényekben megfigyelhető ritmus fázisa (5.5. ábra). Ennek eredményeként azonban a mutáns növény nem tud időben felkészülni a sötét fázist követő fényszakaszra, így igen valószínű, hogy a nappalok során hasznosítható fényt, mint energiaforrást nem tudja oly mértékben kihasználni, mint a vad típusú növény, amely már a sötét fázis végén felkészül a következő fényszakaszra. Ez azt jelentheti, hogy - egy esetleges összehasonlításban - a vad típusú növényekben nagyobb hatékonysággal működik a fotoszintézis, ezáltal a növény több fényenergiát hasznosíthat, ami eltérő növekedési ütemet eredményez a mutáns és a vad típusú növényekben.

A rendelkezésre álló cirkadián óra mutánsok közül kiválasztottuk az erőteljes periódushossz rövidülést mutató *toc1-1* és *toc1-2* (Más és mtsai, 2003), valamint a nagyon hosszú periódusú *ztl-1* és *ztl-27* mutánsokat. Célunk az volt, hogy a mutáns, valamint a vad típusú növények vizsgálatával meghatározzuk, milyen mérhető (kvantitatív) előnnyel jár a növény számára, ha a belső időmérő mechanizmusa a környezettel szinkronban, annak megfelelően közel 24 órás periódussal működik, és ha van ilyen előny, azt mely folyamatok szabályozásán keresztül éri el az óra. Feltételeztük, hogy az endogén óra (cirkadián óra) periódusának egyezése a külső környezet fény-sötét ciklusainak periódusával - azaz az ún. cirkadián rezonancia jelensége – olyan előnyt biztosít az egyedfejlődés során, amely mérhető növekedésbeli és morfológiai különbségekhez vezet a különböző periódusú mutánsok és vad típusú növények között végzett összehasonlításban.

A vizsgált problémát két módon közelítettük meg:

1. vad típusú, 24 órás periódusú növényeket neveltünk 10h fény/10h sötét ($T = 20$), 12h fény/12h sötét ($T = 24$) és 14h fény/14h sötét ($T = 28$) cikluson;
2. hosszú periódusú, *ztl* mutáns növényeket és rövid periódusú, *toc1* mutáns növényeket neveltünk hosszú ($T = 28$) és rövid ($T = 20$) fény/sötét cikluson.

Meghatároztuk az adott körülmények között nevelt növények növekedésének és életfolyamatainak különböző paramétereit, majd ezeket összehasonlítottuk. A növények általános állapotát, ellenállóképességét, vitalitását és versenyképességét - egy szóval a fitneszt - leginkább meghatározó, azt leginkább jellemző paraméterek a növények klorofill tartalma, a széndioxid asszimiláció mértéke, és ennek megfelelően a vegetatív növekedésének üteme. A kísérlet során tapasztaltakat a vizsgált paraméterek szerint a következőkben foglalom össze.

5.12.1. A klorofilltartalom meghatározása

Vad típusú (Col-0) növényeket neveltünk különböző hosszúságú fény/sötét ciklusokon, majd 30 napos korban megmértük a levelek klorofilltartalmát. A növények levele akkor tartalmazta a legtöbb klorofillt, amikor a belső oszcillátor periódushossza (ebben az esetben közel 24 óra) megegyezett a külső fény/sötét ciklusok periódushosszával, tehát $T = 24$ esetén (5.13.A ábra). Bármilyen más hosszúságú ciklus alkalmazása során szignifikánsan kevesebb klorofill akkumulálódott a növények levelében. Hasonló eredményt hozott két periódushossz mutáns, a *ztl-1* és a *toc1-1* növények levelének vizsgálata is: a rövid periódusú *toc1-1* mutánsban 20 órás cikluson történt nevelés eredményeként volt több klorofill, míg a hosszú periódusú *ztl-1* mutánsban a 28 órás cikluson mértünk magasabb klorofilltartalmat (5.13.B ábra). Az endogén óra által generált ritmusok periódusának egyezése a környezet oszcillációjának periódusával tehát jelentősen befolyásolja a növények klorofilltartalmát.

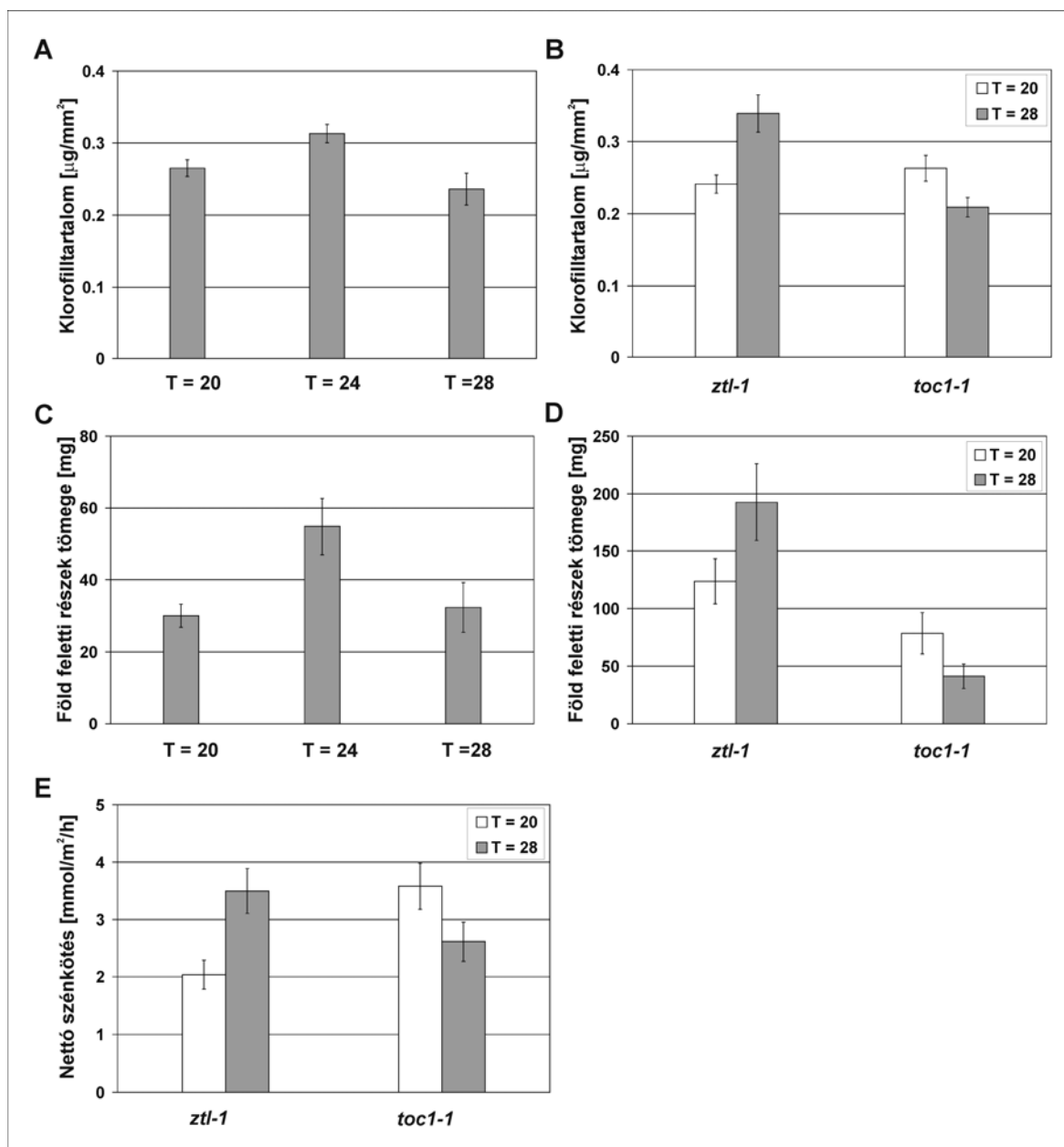
5.12.2. Széndioxid fixálás

Mivel a klorofilltartalom nagyobbban mutatkozott a megfelelő cirkadián rezonancia esetén, megvizsgáltuk, hogyan alakul a fotoszintetikus folyamatok aktivitása, ezen belül a növények széndioxid kötési képessége a különböző periódushosszú mutánsokban rövid, ill. hosszú fény/sötét ciklusokon történt nevelés során (5.13.E ábra). A kísérlet eredményeit tekintve megállapíthatjuk, hogy mindkét vizsgált mutáns közel 40 %-kal több CO_2 -t képes megkötni, ha az endogén biológiai óra által meghatározott periódushossznak megfelelő

környezetbe helyezik őket. A megfelelő széndioxid kötés egyik alapvető feltétele a növényi gázcsere nyitódásának és záródásának tökéletes szabályozása. Normális fény/sötét ciklusokon megfigyelhető, hogy a sztóma konduktancia nappal magas értéket mutat, míg éjszaka erőteljesen lecsökken. Ennek megfelelően a nettó széndioxid asszimiláció a nappal során mutat igen magas értéket. Ez a jelenség nem közvetlen fényreguláció eredménye. Korábbi kísérletek bebizonyították, hogy a gázcsere nyitódása már a hajnal első napsugarainak érzékelését megelőzően megindul, tehát a sztómakonduktancia megemelkedik, mielőtt a növényt reggel megvilágítanánk, ami bizonyítja, hogy a gázcsere nyitódás működése cirkadián szabályozás alatt áll (Gorton és mtsai, 1993). Ennek megfelelően nem meglepő, hogy a cirkadián óra mutánsokban – amelyekben a hajnal időpontjának előrejelzése nem működik tökéletesen - 24 órás fotoperióduson kisebb hatékonysággal működik a fotoszintézis, mint a vad típusú növényekben.

5.12.3. Termésmennyiség

Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a cirkadián rezonancia, illetve ennek hiánya a növény által produkált mag mennyiségére, azaz hogyan befolyásolja az óra működése a terméshozamot. 24 órás fény/sötét ciklusokon neveltünk rövid periódusú *toc1-1* mutáns, hosszú periódusú *ztl-1* mutáns és vad típusú növényeket. A kísérlet végén megszámoltuk az egy növényről származó magokat és összevetettük az így kapott értékeket a különböző genotípusokban. A vizsgálat kimutatta, hogy nincs szignifikáns különbség a mutáns és vad típusú növények terméshozamában, annak ellenére, hogy a mutánsok órája nem a környezetnek megfelelően oszcillál (rezonál). Ez az eredmény nem meglepő, hiszen ismeretes, hogy a cirkadián óra csak egy a virágzást érintő, azt szabályozó folyamatok közül, a cirkadián rezonancia mellett (megfelelő körülmények között nagyobb, egészségesebb, szebb növény) számos egyéb faktor vesz részt a virágzási idő és a várható terméshozam kialakításában.



5.13. ábra. A környezeti ciklusokkal szinkronban működő cirkadián óra által nyújtott előnyök vizsgálata Vad típusú (Col-0) és rövid periódusú (*toc1-1*), valamint hosszú periódusú (*ztl-1*) mutáns növényeket neveltünk 20 órás (T = 20; 10 óra fény/ 10 óra sötét), 24 órás (T = 24; 12 óra fény/ 12 óra sötét), és 28 órás (T = 28; 14 óra fény/ 14 óra sötét) cikluson.

A: 30 napos Col-0 (VT) növények levelének klorofilltartalma.

B: 30 napos *ztl-1* és *toc1-1* növények levelének klorofilltartalma.

C: 32 napos Col-0 (VT) növények föld feletti részek össztömege.

D: 32 napos *ztl-1* és *toc1-1* növények föld feletti részek össztömege.

E: A széndioxid fixálásának mértéke 32 napos *ztl-1* és *toc1-1* növényekben

5.12.4. Biomassza képződés

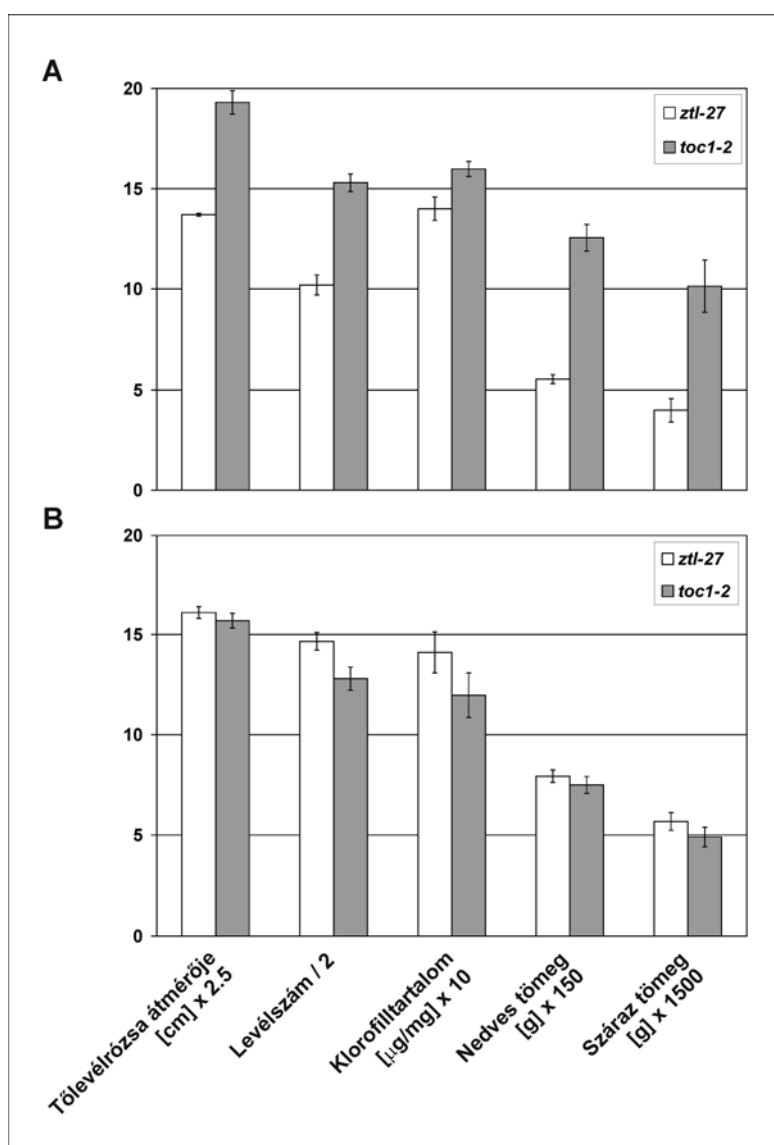
Megvizsgáltuk a vad típusú és periódushossz mutáns növények vegetatív biomassza produkcióját különböző környezeti fotociklusokon történt nevelést követően (5.13.C, D ábra). Ha a vad típusú növényt $T = 20$ vagy $T = 28$ ciklusokon neveltük, a levélfelülete ill. a föld feletti részek összömege körülbelül 45 %-kal csökkent a $T = 24$ cikluson nevelt növényekéhez képest (5.13.C ábra). Ha a *ztl* és *toc1* mutáns növényeket az endogén óra által meghatározott periódushosszú környezeti ciklusokon neveljük, akkor a föld feletti részek összömege nagyobb lesz, azaz robusztusabb növényeket kapunk (5.13.D ábra), mintha az endogén oszcilláció periódusától eltérő hosszúságú környezeti ciklusokon neveljük őket. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a megfelelően működő cirkadián óra fokozza a növény biomassza képződését, ami valószínűleg a fotoszintetikus folyamatok hatékonyságának növekedésével magyarázható.

Mivel a cirkadián rezonancia pozitívan befolyásolja a növekedés sebességét, végrehajtottunk egy kompetíciós kísérletet, amely során a különböző periódushosszú mutánsok kevert populációban történt nevelését követően meghatároztuk a növények vitalitását tükröző különböző paramétereket. A *toc1* génben mutációt hordozó *toc1-2* rövid periódusú ($\tau = 20$) mutánst és a hosszú periódusú ($\tau = 28$) *ztl-27* mutáns növényeket 20 órás ($T = 20$) és 28 órás ($T = 28$) cikluson növesztettük, kevert populációban. Kontrollként az összes növényvonalat monokultúrában is felneveltük a különböző naphosszúságú ciklusokon. 30 nap elteltével megvizsgáltuk a növények klorofilltartalmát, tömegét, levélszámát és a tölevélrózsájának a méretét. Az így nyert adatokat az 5.14. ábrában foglaltuk össze. 20 órás ciklusokon a *toc1* mutáns növények fejlődtek jobban, 28 órás cikluson ellenben a *ztl* mutáns növények nőttek nagyobbra. Vegyes kultúrák esetében megfigyeltük, hogy a növények egy része elpusztul a földben. A mortalitás mindig nagyobbnak mutatkozott abban a mutáns vonalban, amelynek a periódushossza kevésbé egyezett a külső környezet ciklusainak periódusával. A mortalitás értékeket az 5.4. táblázatban tüntettük fel: ezek szerint a *ztl-27* mutánsok körében $T = 20$ esetén volt több életképtelen növény, míg a *toc1-2* mutáns 28 órás fotoperióduson mutatott magasabb letalitás értéket (5.4. táblázat). Ezek az eredmények azt jelentik, hogy a környezettel összhangban működő óra valóban szelekciós előnyt jelenthet az élőlények számára.

Fotoperiódus	Mortalitás [%]	
	<i>ztl-27</i>	<i>toc1-2</i>
10 óra fény/10óra sötét T = 20	2	14
14 óra fény/14óra sötét T = 28	18	8

5.4. táblázat. A *ztl* és *toc1* mutáns vonalak kompetíciója során tapasztalt mortalitási értékek

A növényeket vegyes kultúrában, különböző hosszúságú környezeti cikluson neveltük, majd virágzás előtt megszámloltuk azokat a növényeket, amelyek elpusztultak.



5.14. ábra. A cirkadián szabályozás előnye kompetíció során

A *toc1-2* és a *ztl-27* mutáns növények növekedését, vitalitását jellemző paramétereket kevert kultúrában történő nevelést követően 32 napos növényekben határoztuk meg. A ciklusok hossza 20 óra (T = 20) (A) és 28 óra (T = 28) (B) volt. A növényeket jellemző mennyiségi adatokat az egy grafikonon történő ábrázolhatóság kedvéért a grafikon „x” tengelye mentén feltüntetett módon adtuk meg.

6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

6.1. A mutánszűrés eredményeinek összegzése

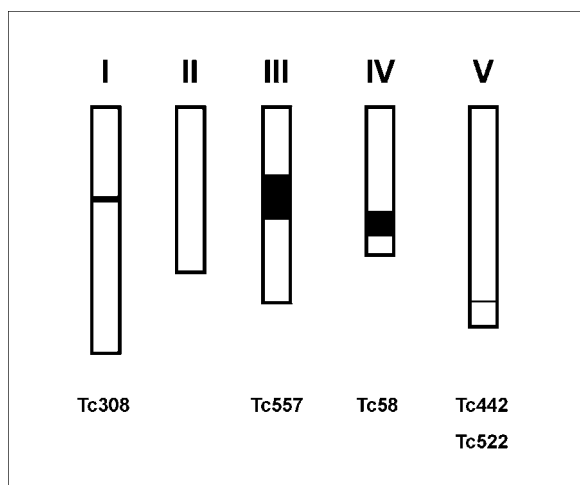
Új növényi cirkadián óra komponensek azonosítása céljából végrehajtottunk egy mutánszűrést, amely során közel 46000 egyedi csíranövényben vizsgáltuk meg a *CAB2:LUC(+)* riporter gén időbeli expressziós mintázatát. A mutánszűrés egyes mérései körülbelül 36 órán keresztül tartottak. A mérés rövideje lehetővé tette nagyszámú növény – hozzávetőleg 4000 csíranövény/hét/luminométer - rövid idő alatti átvizsgálását. A mérések során 104 mutáns növényt találtunk, amelyekben a riporter gén cirkadián kifejeződése a normálistól valamilyen módon eltért, és ez a cirkadián aberráció az utódokban is megfigyelhető volt (5.1. táblázat). Az észlelt cirkadián fenotípusok közül legnagyobb számban a fázis későbbre csúszása fordult elő. Az 1-1.5 óránál kisebb periódushossz változást az általunk létrehozott kísérleti rendszerben nem tudtuk kimutatni, mivel a csíranövények *CAB2:LUC(+)* ritmusának mérésekor másfél-két óránként vettünk fel egy-egy mérési pontot, így a ritmust ábrázoló görbe felbontása nem teszi lehetővé a 1.5 óránál kisebb eltérések észrevételét.

Munkánk eredményeként összesen hat aritmiás mutánst izoláltunk. Alacsony számuk azzal magyarázható, hogy az EMS-sel végzett kémiai mutagenézis pontmutációk keletkezésével jár, amelyek - az esetek többségében - nem eredményezik a mutációt szenvedett gén funkciójának teljes elvesztését, hanem csak részleges funkcióvesztéssel járnak. Egy másik tényező, amely befolyásolhatja a mutáció révén fellépő fenotípus súlyosságát, a géntermékek között fennálló esetleges redundancia. Ilyen jellegű redundáns funkcióra jó példa a korábban leírt LHY és CCA1 fehérje részvétele a cirkadián szabályozásban, amely fehérjék aminosav szinten több mint 60% azonosságot mutatnak egymással (Mizoguchi és mtsai, 2002).

Munkánk során azonosítottunk kettő *toc1*, egy *elf3*, kettő *gi* és 11 *ztl* mutánst. Ezeket az eredményeket tekintve úgy tűnik, hogy a miénkhez hasonló, ún. forward genetikai vizsgálatok - elérve a szaturáció szintjét - lassan kimerülnek. Ezt támasztja alá az is, hogy az ilyen jellegű mutánsizolálási projektekből a *TOC1*, *ELF3* és *ELF4* gének újabb és újabb mutáns alléljai kerülnek elő (Hasen és mtsai, 2005; és nem publikált adatok), míg az újonnan azonosított óraelemek száma hozzájuk képest csökken. Érdekes megjegyeznünk azonban, hogy a párhuzamosan végzett kísérletek során egyetlen csoport sem azonosított *cca1* vagy *lhy* mutáns növényt, habár a vizsgálati körülmények nem zárják ki a lehetőségét ilyen

óramutánsok felismerésének. Az új óraelemek keresése során többek között sok, már ismert óragént érintő mutációt találtunk, a munka mégis sikeresnek tekinthető, hiszen a már ismert génekben talált újabb mutációk lehetővé teszik az adott óraelem működésének részletesebb vizsgálatát és funkciójának megismerését.

A fent említett mutánsok mellett a mutánsszűrés új óraelemek azonosításához is vezetett. Csoportunk azonosított egy olyan gént, amelynek a növényi cirkadián órában betöltött szerepe korábban nem volt ismert. Ez a gén egy, a kis GTP-kötő fehérjéhez hasonlóságot mutató fehérjét kódol. A gén deléciója a ritmusok periódushosszának rövidülését, valamint fotomorfofenikus folyamatok hibás működését okozza. Az új óraelem azonosítása nagy jelentőséggel bír, mivel növényi rendszerben még nem írtak le hasonló struktúrájú fehérjét, amely a cirkadián szabályozásban vesz részt. Csoportunkban jelenleg is folyik a fennmaradó mutánsok vizsgálata és a mutációk genetikai térképezése. Több olyan mutáns növényvel is dolgozunk, amelyekben a mutáció olyan kromoszóma régióra térképeződik, ahol nem található már ismert óragén. Ezeknek a mutációknak a lokalizációját az *Arabidopsis* genomban a 6.1. ábra mutatja. Ezeknek az új óraelemeknek az azonosítása és funkcionális jellemzése gyarapítani fogja a növényi cirkadián szabályozás mechanizmusáról ma rendelkezésre álló ismereteinket, és remélhetőleg hozzájárul a már ismert elemek egymáshoz fűződő viszonyának részletesebb feltárásához is.



6.1. ábra. Az új cirkadián óra gének, ill. mutációk hozzávetőleges térképpozíciója az *Arabidopsis* öt kromoszómáján

A mutánsizolálás során azonosított mutációk egy része még nem ismert óragénben található. A fekete vonallal ill. sávval jelzett kromoszómarégiók a kromoszóma alatt feltüntetett mutációk eddig behatárolt pozícióját jelölik.

Tc = Topcount

Munkánk során nagy számban azonosítottunk *ztl* mutáns növényeket, mivel ezek fenotípusa a vizsgálati körülményeink között igen erősnek bizonyult. A *ZTL* gén mutánsokban történt szekvenálása során kiderült, hogy a 11 *ztl* mutáció szétszórtnan helyezkedik el a három funkcionális fehérjedoménben: 1 LOV/PAS, 1 F-box és 9 „kelch” mutánst azonosítottunk. A *ZTL* fehérjében keletkezett mutációk mindegyike a DNS-ben történt G>A nukleotid csere

eredményeként állt elő. A jövőben érdemes elgondolkodni azon, hogy bármilyen, mutánsok azonosítását célzó kísérlet soron kivitelezésekor a kémiai mutagenézist egyéb mutagénnel (is) végezzünk, ami más jellegű módosítás révén nem G-A tranzíciót eredményez. Ha ugyanis az okozott pontmutáció minden esetben azonos természetű, akkor a létrehozható mutációk száma és elhelyezkedése a genomban korlátozott, ráadásul az ennek eredményeként a fehérjeszekvenciában bekövetkező aminosavcserek száma és típusa is korlátozott (az aminosavak sorrendjét meghatározó kodonok közül csak a G-t tartalmazók potenciális változását eredményezi olyan kodonokká, amelyek A-t tartalmaznak). Egy korábbi számítás alapján, az *Arabidopsis thaliana* kodonhasználatát figyelembe véve, egy EMS mutagenézis eredményeként fellépő G>A tranzíciók hozzávetőleg 5%-a stop kodont, 65%-a aminosavcsert okozó (missense) mutációt hoz létre, 30%-a pedig nem okoz változást a fehérje szekvenciában (silent mutáció) (McCallum és mtsai, 2000). Állati rendszerekben már leírták olyan más mutagének használatát, amelyek eltérő jellegű mutációt okoznak (Anderson, 1995). Ezek bevezetése a növényi vizsgálatokba szélesíthetné a mutagenézis eredményeként létrehozott mutációk skáláját, és így a vizsgált gén funkciójáról is többet tudhatnánk meg.

A *ztl* génben okozott mutációk azonosítását követően célul tűztük ki, hogy a már korábban leírt, de részletesen nem jellemzett ZTL fehérje funkcióját a kezünkben lévő 11 új mutáns allél vizsgálatával részletesebben megismerjük. A mutációk elhelyezkedése lehetővé tette azt is, hogy *in vivo* körülmények között vizsgáljuk a fehérje egyes doménjeinek hozzájárulását a ZTL fehérje funkciójához.

6.2. Az új *ztl* mutáns növények jellemzése

Az elmúlt évek során számos publikáció látott napvilágot, amelyek a ZTL fehérje funkcióját hivatottak leírni, azonban egyetlen kutató csoport sem rendelkezett olyan mennyiségű (11 allél), mindhárom fehérje doménben érintett mutánsgyűjteménnyel, mint a mi csoportunk. Így először nekünk nyílt lehetőségünk arra, hogy a ZTL fehérje és az egyes doménjeinek funkcióját a mutánsok fenotípusának részletes vizsgálatával, *in vivo* körülmények között meghatározzuk.

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a mutáns növények milyen körülmények között mutatnak cirkadián fenotípust. Az összes általunk azonosított és korábban leírt *ztl* mutánsban a cirkadián ritmusok periódushossza megnő (5.2. táblázat). Ez a hatás független a megvilágítási viszonyoktól – tehát sötétben, vörös- kék- és fehér fényben is megfigyelhető -, és független a vizsgált ritmikus folyamat jellegétől is, legyen az a *CAB2* (5.4.C ábra), a *CCR2*

(5.4.E ábra) ill. a *CCA1* gén kifejeződése, vagy akár a levélmozgás ritmusa (5.4.D ábra). A megfigyelt ritmusok amplitúdója a mutánsokban kismértékben csökkent; ez a hatás folyamatos sötétben észlelhető leginkább. A korábbi feltételezéssel (Somers és mtsai, 2000) ellentétben tehát a ZTL nem lehet pusztán a fény „input” folyamatok egyik eleme, mivel a ZTL funkciójának sérülése sötétben ugyanolyan, vagy még erősebb cirkadián fenotípus kialakulásához vezet, mint fényben. Diurnális körülmények között a *ztl* mutánsok késői fázist mutatnak, valamint sérül a hajnal közeledtének cirkadián óra általi előrejelzése, amire a *CCA1* génexpresszió – normálisan - sötét fázis végén jelentkező növekedésének hiányából következtettünk. Ez azt jelenti, hogy természetes környezetben, fény-sötét ciklusokon a *ztl* mutáns növények nem tudnak időben felkészülni a környezet periodikusan ismétlődő változásaira, ezáltal a belső folyamatok időbeli szerveződése a nap során valószínűleg nem lesz olyan tökéletes mint a vad típusú növényekben. Az összes vizsgált mutáns allél közül a *ztl-31* mutatja a legerősebb fenotípust, míg a *ztl-21* tekinthető a leggyengébb hatású mutációnak. Az eredményeket összefoglalva kijelenthetjük, hogy a ZTL mind sötétben, mind állandó fényben fontos eleme a cirkadián órának, ezen belül pedig a periódushossz meghatározásában és a ritmusok amplitúdójának megfelelő szinten tartásában fontos.

Kísérleteink eredménye szerint a ZTL részt vesz az óra normális hőmérsékletkompenzációjának kialakításában is. Erre a megállapításra úgy jutottunk, hogy megvizsgáltuk a mutáns és vad típusú növényekben a *CCR2* kifejeződés ritmusának periódushosszát különböző hőmérsékleti értékek mellett, és azt tapasztaltuk, hogy a ZTL fehérje hibás működése eredményeként a mutánsokban a hőmérséklet 12-13°C-os emelése a vad típushoz képest körülbelül kétszer nagyobb periódushossz változást okoz. Egy nemrégiben megjelent publikáció szintén támogatja azt a feltételezést, hogy a ZTL esetleg részt vesz a hőmérsékletkompenzáció mechanizmusában (Edwards és mtsai, 2005). Az említett közleményben a szerzők az óra hőmérsékletkompenzációjában résztvevő faktorok azonosítását tűzték ki célul. Munkájuk eredményeként azonosítottak számos olyan kromoszóma régiót, amelyeken kódolt egyes gének fontos szereppel bírhatnak a hőmérsékletkompenzáció mechanizmusában. Az egyik ilyen kromoszómaregión belül található a már ismert *ZTL* óragén is. Egy másik kísérleti eredmény a *GIGANTEA* óraféhrje szerepét hangsúlyozza ugyanebben a folyamatban (Gould és mtsai, nem publikált adatok). A *gi* mutáns növények cirkadián fenotípusának megnyilvánulását erősen befolyásolja a kísérletben alkalmazott hőmérséklet értéke. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a *GIGANTEA* fehérje elsődleges funkciója az óraműködésben annak a hőmérsékleti tartománynak a kiszélesítése, amelyen belül az óra még megfelelő pontossággal képes

megbízható ritmust létrehozni és fenntartani a növényi szervezetben. Ezen a hőmérsékleti tartományon belül a cirkadián óra működése hőmérséklet kompenzált.

A ZTL a fentiek mellett részt vesz egyes fény szabályozott folyamatok regulációjában is, mint például a hipokotil elongáció gátlása, a virágzás fotoperiodikus indukciója és a cirkadián óra fényérzékelési folyamata (Somers és mtsai, 2000; 2004). Az általunk vizsgált *ztl* mutánsok hipokotilhossza, a korábban közölt adatokkal összhangban, csak erős vörös fényben mutatott eltérést a vad típusú növényekhez képest. Ilyen körülmények között a *ztl* mutánsok túlérzékenységet mutatnak a fényre, és ez eredményezi a rövid hipokotil fenotípus megjelenését. Az összes mutáns közül csak egy viselkedett másképpen, a LOV/PAS doménben mutációt hordozó *ztl-21*, amelynek hipokotilmegnyúlása a vad típusú növényével egyezett meg (5.7. ábra). A régebben leírt *ztl* mutánsokon megfigyelték, hogy hosszúnappalra kicsit később virágoznak, mint a megfelelő vad típusú növények (Somers és mtsai, 2000). A vizsgálatokba bevont új *ztl* mutánsok szintén későn virágoznak hosszúnappalos megvilágítás alatt. Ez alól csak a *ztl-21* képez kivételt, amelynek virágzási ideje megegyezik a vad típusú növényével (5.8. ábra). Megvizsgáltuk azt is, megváltozik-e a cirkadián óra fényérzékenysége a mutánsokban. Ehhez a mutáns és vad típusú növények egy szabadon futó cirkadián ritmusának periódushosszát határoztuk meg különböző hullámhosszú- és intenzitású, folyamatos fényvel történő megvilágítás során. Régóta ismert jelenség, hogy a cirkadián óra oszcillációjának sebessége az alkalmazott fény intenzitásának emelésével megnő, ezért az általa generált cirkadián ritmusok periódushossza rövidebb lesz. A *ztl* mutánsok vizsgálata során kiderült, hogy a fényintenzitás csökkenésével az óra működése sokkal inkább lassul, mint a vad típusú növényekben, így alacsony fényintenzitáson a mutánsok és a kontroll növények periódushossza közti különbség jóval nagyobb, mint erősebb megvilágítás esetén. Ez annak a következménye lehet, hogy a *ztl* mutánsokban a cirkadián óra fényérzékenysége csökkent. A *ztl-21* ebből a szempontból is eltér az összes többi mutánstól, mivel a *ztl-21* szabadon futó cirkadián ritmusának periódushossza ugyanolyan mértékben változik a fényintenzitás függvényében, mint az a vad típusú növényekben megfigyelhető. A *ztl-21* mutáns vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy a növényben sérül a cirkadián periódushossz szabályozása, de a fényreguláció mechanizmusa érintetlen (vad típusú) marad (5.6. ábra).

Minden általunk vizsgált mutánsban kimutatható a ZTL fehérje jelenléte, így az észlelt mutáns fenotípusok a megváltozott ZTL funkció eredményeként állnak elő, nem pedig a fehérjetermék teljes hiánya következményeként. Ennek ellenére a mutánsok – egy kivétellel – ugyanolyan súlyos aberrációkat mutatnak, mint a null mutánsként leírt *ztl-3* (Somers és mtsai,

2004). Kijelenthetjük tehát, hogy a ZTL fehérje mindhárom doménje hozzájárul a normális ZTL funkció betöltéséhez.

6.3. A ZTL fehérje domének funkciójának vizsgálata

A ZTL fehérje potenciális funkciójára a kutatók először a fehérjeszekvenciában mutató homológia alapján következtettek. A szekvencia analízis során felismert három fehérje domén funkciójának vizsgálatára számos laboratóriumban indultak kutatások. Ezek a kísérletek a ZTL-val kölcsönható fehérjék vizsgálata révén megerősítették azt a korábbi feltételezést, amely szerint a ZTL az SCF komplex részeként, annak szubsztrátspecifitását meghatározó F-box fehérjéként részt vesz bizonyos fehérjék, köztük a TOC1 óraelem irányított degradációjában (Más és mtsai, 2003; Yasuhara és mtsai, 2004; Han és mtsai, 2004). Ezek a kísérleti eredmények azonban többségében fehérjék *in vitro* kölcsönhatásainak vizsgálatán alapultak.

Az általunk izolált 11 új mutáció mind a három domént érinti, így elsőként nyílt lehetőségünk arra, hogy a növények fenotipikus változásának megfigyelése révén meghatározzuk az egyes domének szerepét a ZTL által szabályozott folyamatokban.

6.3.1. Az F-box domén kölcsönhatásának vizsgálata az SCF komplex elemeivel

Az F-box motívum általában fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában vesz részt (Kipreos és Pagano, 2000). Az elsőként leírt F-box fehérjék az SCF ubiquitin-ligáz komplex elemei, amelyben az ubiquitin-mediált proteolízis szubsztrátfelismerő elemeként funkcionálnak. A ZTL fehérje az F-box doménen keresztül kapcsolódik az ASK1 fehérjéhez, amely a Skip-Cullin-F-box (SCF) ubiquitin-ligáz komplex egyik eleme (Han és mtsai, 2004). Az SCF komplex lehetővé teszi az ubiquitin konjugáló enzim és az F-box fehérje által kötött szubsztrátfehérje kölcsönhatását, amelynek eredményeként a célfehérje több ponton is ubiquitinálódik. A degradációra ily módon kijelölt fehérje a 26S proteasómális degradáció révén bomlik le (Hershko és Ciechanover, 1998). A ZTL egyik szubsztrát fehérjéje a TOC1 (Más és mtsai, 2003), amelynek fázisfüggő, a fotoperiódus sötét szakaszában történő degradációja fontos szabályozási pont a növényi cirkadián regulációban.

Az élesztőben elvégzett kölcsönhatás-vizsgálatok kimutatták, hogy a *ztl-22* (F-box) mutáció nincs hatással a TOC1-ZTL kölcsönhatásra (5.12. ábra), így a mutánsban észlelt cirkadián fenotípus nem magyarázható a ZTL csökkent szubsztrátkötő képességével. A *ztl-22*

mutánsban a ZTL fehérje mind reggeli, mind esti fázisban nagyobb mennyiségben halmozódik fel a sejtekben, mint a vad típusú növényekben. Ennek ellenére a *ztl-22* mutáns periódushossza közel megegyezik a *ztl-31* mutánsával, amelyben a ZTL fehérje jóval kisebb mennyiségben akkumulálódik. Ez arra utal, hogy a ZTL^{ztl-22} fehérje, annak ellenére, hogy a szubsztrát fehérjével, a TOC1-gyel (élesztőben) normálisan képes kapcsolódni, funkcionálisan inaktív. A ZTL inaktív állapota valószínűleg egyúttal stabilizálja is a proteint, amelynek eredményeként ebben a mutánsban magasabb fehérjeszint tapasztalható. Han és munkatársai létrehoztak egy mutációt a ZTL F-box doménjében, és megvizsgálták, hogyan változik meg a ZTL fehérje kölcsönhatási képessége és stabilitása a mutáció következtében. Az F-box mutáns ZTL nem volt képes az ASK1 fehérjével sem élesztőben, sem a növényben (*in vivo*) összekapcsolódni (Han és mtsai, 2004). Ugyanez a mutáns ZTL protein, hasonlóan az általunk vizsgált F-box mutáns (*ztl-22*) fehérjéhez, stabilabbá vált, mint a vad típusú fehérje. Habár a *ztl-22* mutáció nem szünteti meg teljes mértékben a ZTL-ASK1 kölcsönhatást, hanem csak csökkenti annak erősségét, mégis, a mutáció ugyanolyan súlyos hibákat okoz a cirkadián szabályozásban, mint a ZTL funkció teljes hiánya a *ztl-3* mutánsban. Ezért valószínű, hogy a *ztl-22* mutáció hatására olyan más, az SCF komplexben funkcionáló ASK fehérjék ZTL-hoz történő kapcsolódása sérül, amelyek szintén fontos szereppel bírnak az SCF^{ZTL} komplex működésében, és egyúttal a cirkadián szabályozásban. Mivel a mutáció hatására a ZTL^{ztl-22} fehérje kevésbé képes a degradációs komplexhez kapcsolódni, ezáltal nemcsak a lebomlásra ítélt célfehérje, hanem saját degradációja is lelassulhat, ami magyarázatot adhat a *ztl-22* mutánsban mérhető magasabb ZTL fehérjeszintre. Összefoglalva tehát elmondható, hogy ha a ZTL nem képes hatékonyan kapcsolódni az SCF komplexhez, akkor ez a ZTL fehérje stabilizálódásához vezet.

6.3.2. A „kelch repeat” domén funkciója a ZTL fehérje szerkezetének kialakításában

A ZTL génben általunk azonosított mutációk többsége, a „kelch” doménben található (5.2. ábra), valamint itt találjuk a korábban leírt két mutációt is (*ztl-1* és *ztl-2*; Somers és mtsai, 2000). A *ztl* mutációk ily mértékű halmozódása a fehérje egyik doménjében azt mutatja, hogy ennek a fehérjerésznek esszenciális szerepe lehet a ZTL funkciójában. A háromdimenziós szerkezeti modellen (5.3. ábra) betérképezett új „kelch” mutációk mindegyike a domén β -propeller struktúrájának valamelyik külső oldalán helyezkedik el, 6 mutáció pedig a propeller szerkezet egyik oldalfelszínén található meg. Mivel a „kelch” domén funkciója - a hasonló fehérjemotívumok szerepének vizsgálatai szerint - fehérje-

fehérje kölcsönhatások kialakításában van, valószínű, hogy a β -propeller szerkezet külső felszíne, amelyen a mutációk többsége található, normálisan egy protein interakciós felületet képez. Ennek ellenére egyelőre nem találtak olyan fehérjét, amely a ZTL-hoz a „kelch” doménen keresztül kapcsolódik.

Az élesztő két-hibrid kísérletekben vizsgált „kelch” mutáns fehérje (*ztl-27*) nem tud összekapcsolódni a TOC1 fehérjével (5.12.B ábra), annak ellenére, hogy a vad típusú fehérje „kelch” doménje nem vesz részt a ZTL és TOC1 közti interakció kialakításában (Más és mtsai, 2003). Más és munkatársai kimutatták, hogy a TOC1 fehérje a LOV/PAS doménen keresztül kapcsolódik a ZTL fehérjéhez. A *ztl-27* mutáció gyengíti a ZTL és az ASK1 fehérje közti kölcsönhatást is (5.12.A ábra), habár az időközben napvilágot látott adatok szerint az ASK1 protein az F-box doménen keresztül kapcsolódik a ZTL-hoz. Ezek alapján nagyon valószínű, hogy a „kelch” doménnek nélkülözhetetlen szerepe van a LOV/PAS ill. az F-box domén intramolekuláris kölcsönhatásainak, ill. struktúrájának kialakításában, és ebből kifolyólag esszenciális funkciója van a ZTL fehérje megfelelő, aktív szerkezetének fenntartásában.

A *ztl-27* az egyetlen a „kelch” domént érintő mutációk között, amely a ZTL fehérje diurnális felhalmozódását befolyásolja. A ZTL^{ztl-27} fehérje mennyisége a fényszakaszban (ZT1 időpontban) magasabb a vad típusban mérhetőnél, míg a sötétben (ZT13-kor) nem különbözik nagymértékben a kontroll növényekben kimutatható protein mennyiségétől. A korábban jellemzett ZTL^{ztl-1} és ZTL^{ztl-2} mutáns fehérje ilyen jellegű, fázisspecifikus stabilizálódását nem tapasztalták. A ZTL^{ztl-27} fehérje csökkent kölcsönhatási képessége a degradációs komplex (SCF) elemével magyarázatot adhat a fehérje stabilizációjára.

6.3.3. A LOV/PAS domén szerepe a vörös fény indukált jelátviteli folyamatokban és a cirkadián szabályozásban

A ZTL fehérje a fényben nőtt, zöld növényekben, és a teljes sötétségben nevelt, etiolált növényekben is részt vesz a periódushossz meghatározásában. Hiánya minden esetben a periódus hosszabbodását eredményezi, az eddig leírt mutánsokban azonban a periódushossz nagymértékben függ a kísérlet során alkalmazott fény intenzitásától. A *ztl* mutációk hatása sokkal inkább kifejeződik alacsony intenzitású (kék vagy vörös) fényben, ahol a vad típusú növényhez képest akár 8-10 órás különbség is mérhető a periódushosszban (5.6. ábra). A ZTL ennél fogva minden fénykörülményben részt vesz a vele kapcsolódó TOC1 szubsztrát fehérje degradációjában, ezáltal a periódushossz módosításában, és ezen aktivitását a fény

valamelyest szabályozza (Más és mtsai, 2003). Ezzel ellentétben a hipokotil megnyúlás gátlásának folyamata csak erős vörös fényben mutat túlérzékenységet a *ztl* mutánsokban, míg kék fényben nem mérhető szignifikáns különbség a *ztl* és a vad típusú növények hipokotil elongációja között (5.7. ábra; Somers és mtsai, 2004). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *ztl* mutánsokban a vörös fényben észlelhető rövid hipokotil fenotípus nem a cirkadián szabályozás hibás működésének másodlagos következményeként, hanem a ZTL fehérje egy másik funkciójának elvesztése eredményeként áll elő. Ha a ZTL fehérje a hipokotil megnyúlás folyamatát a cirkadián szabályozáson keresztül, mintegy másodlagosan befolyásolná, akkor kék fényben, ahol a *ztl* mutánsoknak tisztán mérhető cirkadián fenotípusa van, a hipokotil elongáció folyamata is sérülne. Kísérleteinkkel tehát bizonyítottuk, hogy a ZTL fehérje kettős szerepet tölt be a növény életfolyamatainak szabályozásában, és ez a két funkció egymástól elkülönül, mint az a LOV/PAS mutáns esetében észlelhető is. A *ztl-21* mutáns (LOV/PAS) periódushossza jelentősen meghaladja a vad típusét (5.2. táblázat), míg a vörös fényben mérhető hipokotilhossza megfelel a vad típusénak (5.7. ábra). Emellett a *ztl-21* cirkadián órája ugyanolyan érzékenységet mutat vörös fényre, mint a vad típusú növény, amit a két vonal párhuzamos FRC görbéje bizonyít (5.6.B ábra). A *ztl-21* mutáns virágzási ideje hosszúnappalon szintén megegyezik a vad típusú kontroll növényekével, holott a vizsgált „kelch” és az F-box mutációk ugyanezen körülmények között késleltetik a virágzást. A korábban leírt *ztl-1* és *ztl-3* mutációk szintén a virágzási idő kismértékű eltolódását okozzák (Somers és mtsai, 2000; Kim és mtsai, 2005).

A *ztl-21* mutáció vizsgálata nyilvánvalóvá tette, hogy a ZTL fehérje két egymástól elválasztható funkcióval rendelkezik:

- egyrészt fénytől független szabályozó szerepet tölt be a cirkadián óra működésében, amelynek során a periódushossz és az amplitúdó meghatározásában van nélkülözhetetlen funkciója;
- másrészt a vörös fény indukált jelátviteli folyamatok elemeként részt vesz a cirkadián óra fényérzékenységének beállításában, a hipokotilmegnyúlás fényfüggő gátlásának mechanizmusában és a virágzás fotoperiodikus szabályozásában.

A *ztl-21* mutáns vizsgálata kimutatta, hogy a vörös fény által szabályozott folyamatokban a ZTL fehérje LOV/PAS doménje nem szükséges a ZTL funkciójának betöltéséhez, míg a fényfüggetlen órafunkcióhoz az intakt LOV/PAS domén jelenléte nélkülözhetetlen.

A TOC1 a ZTL fehérjével a LOV/PAS doménen keresztül kapcsolódik, ez a domén önmagában, a fehérje többi része nélkül is elegendő a TOC1 fehérje megkötéséhez (Más és

mtsai, 2003). Ezzel az eredménnyel összhangban az általunk tanulmányozott ZTL^{ztl-21} mutáns fehérje élesztőben nem mutat kölcsönhatást a TOC1-gyel (5.12.B ábra). Ugyanez a mutáció egyben az ASK1-ZTL kölcsönhatás erősségét is csökkenti (5.12.A ábra), ami arra utal, hogy a LOV/PAS domén elősegíti a ZTL-SCF komplex interakcióját. Magas intenzitású vörös fényben a *ztl-21* mutáns periódushossza megegyezik a többi mutánséval és hosszabb, mint a vad típusé (5.6.B ábra). Ilyen körülmények között tehát, figyelembe véve a korábban közölt eredményeket (Más és mtsai, 2003), a *ztl* mutánsok mindegyikében nagyobb mennyiségű TOC1 fehérjének kell lennie, mint a vad típusban, hiszen a mutáns ZTL fehérje nem képes a TOC1 lebomlását megfelelően irányítani. A feltételezések szerint a *ztl* mutánsokban ez a megemelkedett TOC1 fehérje szint felelős a cirkadián periódushossz-, és a hipokotilhossz megváltozásáért, amit alátámaszt az a megfigyelés, hogy a TOC1 fehérje túltermelése során a cirkadián ritmusok periódushossza megnő, valamint a növények túlérzékenyvé válnak vörös fényre (Más és mtsai, 2003). Ez a megemelkedett TOC1 szint azonban nem elegendő a *ztl* mutánsok többségében erős vörös fényben megfigyelt hipokotil fenotípus kialakításához, mivel a *ztl-21* mutáns hipokotilhossza megegyezik a vad típuséval. Véleményünk szerint a *ztl* mutánsok vörös fény specifikus hipokotil fenotípusának megjelenéséért nem a TOC1 csökkent mértékű degradációja, hanem sokkal inkább egy másik, a ZTL által a degradációs folyamatok felé szállított célfehérje ZTL-val mutatott kölcsönhatásának megváltozása, és ennek következtében módosult degradációja a felelős. Ennek, a ZTL-val kölcsönható másik fehérjének a kötésében nem a LOV/PAS domén, hanem a fehérje valamely másik doménje vesz részt. Feltételezzük tehát, hogy a ZTL fehérje nemcsak a TOC1, hanem többféle fehérje degradációját is irányíthatja, amelyek különböző szabályozási folyamatokban - pl. a cirkadián óra központi oszcillátorában illetve a fotomorfogenezis egyes folyamataiban - töltenek be valamilyen funkciót.

6.4. A cirkadián szabályozás előnyei *Arabidopsis*ban

A különböző szervezetekben található cirkadián órák működési mechanizmusa nagyon hasonló, ezzel szemben az órákat felépítő egyes elemek típusa és struktúrája jelentősen különbözik. Ezek alapján a kutatók feltételezik, hogy a különböző órák eltérő fejlődési utakon jöhettek létre, a cirkadián óra az evolúció során többször, egymástól függetlenül jelent meg. Nagyon valószínű, hogy a cirkadián szabályozás megjelenése az evolúció során adaptív előnyt jelentett azon élőlények számára, amelyekben ez a mechanizmus először kialakult. Az óra legfontosabb szerepe a nappalok és éjszakák váltakozásának előrejelzése, amelynek

eredményeként a szervezet időben felkészülhet a környezeti tényezőkre, pl. hőmérséklet és fény megváltozására, és az elsősorban környezetfüggő belső folyamatait ennek megfelelően képes szabályozni illetve időzíteni.

Munkánk során megkíséreltük meghatározni, milyen fiziológiásan mérhető előnnyel jár az, ha a növényekben a cirkadián óra a környezettel szinkronban, hibátlanul működik. Ehhez különböző hosszúságú fény/sötét ciklusokon, ún. T ciklusokon, neveltünk vad típusú, illetve kétféle periódushossz mutáns növényeket, majd bizonyos idő elteltével megmértük és összehasonlítottuk a növények egyes paramétereit. Tudjuk, hogy a növények normálisan közel 24 órás periódusú cirkadián órája akár 20 vagy 28 órás periódushosszú ciklusokhoz is képes alkalmazkodni, ilyenkor azonban minden nap újra kell állítani az óra fázisát, és a környezet ritmikus változásainak előrejelzése helyett minden reggel a környezeti tényezők megváltozása készíti az órát a normális fázis beállítására. A T ciklusok hosszúságát úgy választottuk meg, hogy mindegyik vizsgált növényvonal cirkadián periódushosszának megfelelő hosszúságú T ciklus legyen. Ennek megfelelően a kísérletek során a növényeket $T = 20$, azaz 10 óra fény/10 óra sötét, $T = 24$, azaz 12 óra fény/12 óra sötét és $T = 28$, azaz 14 óra fény/14 óra sötét cikluson neveltük. A kísérletek során a rövid periódusú *toc1-1* és *toc1-2* mutánst, a hosszú periódusú *ztl-1* és *ztl-27* mutánst, valamint vad típusú növényeket vizsgáltunk.

Kiindulásként feltételeztük, hogy a cirkadián szabályozás okozta előnyök elvesznek abban az esetben, ha a szervezet cirkadián órája nem a környezeti ciklusoknak megfelelően oszcillál, és egy periódushossz változást okozó mutáció oly mértékben megzavarja a környezet és a belső óra szinkronizációját, hogy nem jön létre az ún. cirkadián rezonancia a belső és külső oszcilláció között.

A különböző hosszúságú fény/sötét ciklusokon végzett kísérleteink során kimutattuk, hogy a környezettel szinkronban működő cirkadián szabályozás mellett a növényekben mérhető fotoszintetikus aktivitás nagyobb volt, mint abban az esetben, amikor az endogén óra periódusa eltért a környezeti ciklusok periódusától. Ez azt jelenti, hogy 20 órás cikluson a rövid periódusú *toc1* mutáns növények mutattak magasabb CO_2 aszsimilációt, míg 28 órás cikluson a *ztl* mutánsok. A vad típusú növények fotoszintetikus folyamatai akkor működtek a leghatékonyabban, amikor a belső óra által meghatározott hozzávetőleg 24 órás periódusnak megfelelő T cikluson neveltük őket. Ezzel összhangban megállapítottuk, hogy megfelelő cirkadián rezonancia (azaz külső és belső periódusok egyezése) esetén, függetlenül attól, hogy mutáns vagy vad típusú növényt vizsgáltunk, a növények klorofilltartalma magasabb volt. A vizsgált növények produktivitása a föld feletti részeik össztömegének összehasonlítása alapján

akkor volt maximális, amikor a T ciklus hossza megfelelt a cirkadián óra periódushosszának. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a cirkadián óra környezettel összehangolt működése akár 50%-kal is növelheti a növény méreteit ahhoz az állapothoz képest, mikor a cirkadián rezonancia nem áll fenn. Ez azt is jelenti, hogy a 24 órás cirkadián oszcilláció akár hátrányt is jelenthet egy olyan környezetben (pl. más bolygókon, illetve mesterséges környezetben történő nevelés során), ahol a környezeti ciklusok periódushossza nem 24 óra, hanem ennél több, vagy kevesebb. Az óra által az egyedfejlődés során biztosított előnyök maximális kihasználásához tehát az a legfontosabb, hogy a belső óra által irányított ritmikus folyamatok periódusa a lehető legjobban megközelítse a környezeti ciklusok periódusát, ami földi körülmények között éppen 24 órának felel meg.

A cirkadián óra szelekció során biztosított előnyének a vizsgálatára végrehajtottunk egy kompetíciós kísérletet. Ez a kísérlet jól reprezentálja azt, hogyan lehetett pozitív szelekciós tényező a cirkadián szabályozás megjelenése az evolúció során olyan esetekben, amikor hasonló élőlények ugyanakkor, ugyanazon az élőhelyen éltek, és ugyanazért a táplálékért versenyeztek. A kísérletben kevert kultúrában neveltünk egy hosszú és egy rövid periódusú mutáns vonalat hosszú és rövid fény/sötét cikluson, majd több hét eltelte után megvizsgáltuk a kétféle mutáns növekedését és túlélési arányát a populációban. A kísérlet eredménye azt mutatta, hogy függetlenül a mutáns fenotípus jellegétől, mindig azok a növények nőttek nagyobbra, amelyek cirkadián periódusa közelebb állt a környezeti ciklusok hosszához, egyik mutáció sem jelentett univerzális előnyt a másikkal szemben. A vegyes kultúras nevelés során az a mutáns mutatott nagyobb mortalitási értéket, amelynek órája nem a környezetnek megfelelő periódussal oszcillált.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a cirkadián óra – a fotoszintetikus fénybegyűjtő komplexek fehérjéi és a klorofill bioszintézisének összehangolásán, valamint a fotoszintetikus folyamatok megfelelő időzítésén keresztül - növeli a fotoszintézis hatékonyságát, ezáltal lehetővé teszi a gyorsabb növekedést, fokozza az egyedek túlélőképességét, amely határozott kompetitív előnyhöz juttatja a növényeket.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk elsődleges célja új cirkadián óra elemek azonosítása és jellemzése volt *Arabidopsis*-ban, amelynek kivitelezésére egy mutánsizolálási projektet indítottunk el. A mutánszűrés során azonosítottunk több, már ismert óragénben mutációt hordozó növényt is, amelyek között 11 új *ztl* mutáns volt. A csoportunk által izolált *ztl* mutánsok nagy száma lehetővé tette, hogy a ZTL fehérje egyes doménjeinek közreműködését a ZTL fehérje által szabályozott különböző folyamatokban *in vivo* körülmények között vizsgáljuk.

Kísérleti eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. A cirkadián óra mutánsok azonosítását célzó munka során körülbelül 46000 EMS mutagenizált növény cirkadián ritmusát vizsgáltuk, és 104 cirkadián óra mutánst azonosítottunk. Ezek közül két mutáció a *TOC1* génben, kettő a *GI*-ban, egy az *ELF3*-ban és tizenegy mutáció a *ZTL* génben található. Munkánk eredményeként izoláltunk legalább hat olyan mutánst, amelyekben a mutáció még nem ismert óragént érint.
2. Megállapítottuk, hogy a 11 új *ztl* mutáció közül egy a ZTL fehérje LOV/PAS doménjében, egy az F-box doménjében, kilenc pedig a „kelch repeat” doménjében található.
3. A *ztl* mutánsok cirkadián rendszerének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a ZTL fehérje mind fényben, mind sötétben részt vesz a cirkadián ritmusok periódushosszának és amplitúdójának szabályozásában. A ZTL tehát nem egyszerűen a fény „input” folyamatok eleme, hanem a körülményektől függetlenül fontos komponense az oszcillátor mechanizmusának.
4. Megállapítottuk, hogy a *ztl* mutánsokban - egy mutáns kivételével - a cirkadián óra csökkent fényérzékenységet mutat vörös ill. kék fényvel szemben. A LOV/PAS doménben mutációt hordozó *ztl-21* mutánsban az óra fényérzékenysége megegyezik a vad típusú növényével. Ebből arra következtettünk, hogy a cirkadián óra fényérzékenységének szabályozásában a ZTL fehérje LOV/PAS doménje nem játszik szerepet.
5. Erős vörös fényben, egy mutáns kivételével, az összes *ztl* mutáns hipokotilja rövidebb a vad típusú növény hipokotiljánál. A LOV/PAS (*ztl-21*) mutáns hipokotilhossza vörös fényben megegyezik a vad típusú növényével, ezért úgy gondoljuk, hogy a ZTL fehérje LOV/PAS doménjének nincs funkciója a fényszabályozott hipokotil elongáció regulációjában.
6. Hosszú nappalon - egy kivétellel - az összes vizsgált *ztl* mutáns később virágzik, mint a vad típusú növény. A *ztl-21* mutáns virágzási ideje megegyezik a vad típusú növényével,

ami arra enged következtetni, hogy a ZTL fehérje LOV/PAS doménjének nincs funkciója a virágzás fotoperiodikus regulációjában.

7. Megállapítottuk, hogy a *ztl* mutáns növényekben fény- és hőmérsékletciklusokkal is be lehet állítani a cirkadián óra működését, és a ZTL fehérje fényben nőtt, aktív fotoreceptorokkal rendelkező zöld növényekben és etiolált növényekben is részt vesz a ritmusok periódushosszának meghatározásában.
8. Megállapítottuk, hogy a ZTL részt vesz az óra normális hőmérsékletkompenzációjának kialakításában.
9. Western analízissel kimutattuk, hogy mindegyik, általunk azonosított *ztl* mutáns növényben kifejeződik a ZTL fehérje. A ZTL fehérje mennyisége, a *ztl-31* kivételével, minden vizsgált *ztl* mutánsban eléri, vagy meghaladja a vad típusú növényben mért proteinszintet. A mutánsokban tapasztalt fehérjemennyiségben mutatkozó eltéréseket a mutáns fehérjék megváltozott stabilitása okozza.
10. Élesztő két hibrid rendszerben megvizsgáltuk a különböző doménekben mutáns ZTL fehérjék kölcsönhatását a korábban leírt, ZTL-val kölcsönható ASK1, TOC1 és PHYB-C terminális fehérjékkel. A kísérleteink során a következőket állapítottuk meg:
 - az F-box mutáció az ASK1-ZTL kölcsönhatást gyengíti;
 - a „kelch” és a LOV/PAS mutáció gyengíti az ASK1-ZTL kölcsönhatást, és megszünteti a ZTL-TOC1 interakciót;
 - a három vizsgált mutáció közül (*ztl-21*, *ztl-22*, *ztl-27*) egyik sem befolyásolja a ZTL és PHYB-C-terminális között létrejövő kölcsönhatás erősségét; sem a teljes hosszúságú PHYB, sem a PHYB funkcionális N-terminális fragmentje nem képes a ZTL-val kölcsönhatásba lépni.Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a korábban közölt ZTL-PHYB-C terminális kölcsönhatásnak nincs *in vivo* fiziológias jelentősége.
11. Megállapítottuk, hogy a ZTL fehérje kettős funkcióval rendelkezik:
 - egyrészt fénytől független módon szabályozza a cirkadián ritmusok periódushosszát és amplitúdóját;
 - másrészt fontos szabályozó eleme a vörös fény indukált jelátviteli folyamatoknak; ezen belül részt vesz a cirkadián óra fényérzékenysége beállításában, a hipokotilmegnyúlás regulációjában és a virágzás fotoperiodikus indukciójában.

12. A ZTL fehérje három különböző doménjének funkcióját az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- A LOV/PAS domén a ZTL fényfüggetlen órafunkciójához szükséges. A ZTL LOV/PAS doménje a TOC1 fehérje kötéséért felelős. A ZTL az óraműködés szabályozásában a TOC1 fehérje degradációjának irányításával vesz részt.
- Az F-box domén a fehérje mindkét funkciójához szükséges. Az F-box domén az ASK1 fehérjének a megkötésében játszik fontos szerepet, és valószínű, hogy más, az SCF komplexben működő ASK fehérjék ZTL-hoz történő kapcsolódási pontjaként is szolgál.
- A „kelch” doménnek nélkülözhetetlen szerepe lehet a LOV/PAS ill. az F-box domén intramolekuláris kölcsönhatásainak, ill. struktúrájának kialakításában, és ebből kifolyólag esszenciális funkciója van a ZTL fehérje megfelelő, aktív szerkezetének fenntartásában.

13. A *ztl* és *toc1* mutáns valamint vad típusú növényeken végzett kísérletek eredményeként megállapíthatjuk, hogy a megfelelő cirkadián rezonancia - azaz a környezeti ciklusok és az endogén oszcilláció periódusának egyezése - a növény produktivitásának akár 50%-os növekedését is eredményezheti ahhoz az állapothoz képest, amikor az endogén óra nem a környezet ciklusainak megfelelő periódushosszal oszcillál. A növény produktivitásának növekedése többek között a fotoszintetikus folyamatok hatékonyságának növelésén keresztül valósul meg, amely a megnövekedett klorofilltartalom, a nagyobb CO₂ asszimilációs képességen és a nagyobb biomasszaprodukción keresztül mérhető le. Ugyanezen mechanizmusok befolyásolásán keresztül a megfelelő cirkadián rezonancia kompetíciós előnyt is jelent.

Eredményeink lehetővé tették a ZTL fehérje funkciójának részletesebb megismerését. Legfontosabb eredményünknek azt tekintjük, hogy a LOV/PAS mutáns azonosítása és jellemzése révén bebizonyosodott, hogy a ZTL fehérje két különböző funkcióval rendelkezik a növényi folyamatok szabályozásában. A ZTL a kétféle funkcióját valószínűleg más-más fehérjék degradációjának irányításán keresztül látja el. A cirkadián óra periódushosszának meghatározásában a ZTL elsődleges szerepe a TOC1 fehérje lebomlásának szabályozása lehet. A ZTL további célfehérjéit, amelyek lebomlásának irányítása révén a ZTL részt vesz bizonyos fényszabályozott folyamatokban, egyelőre nem ismerjük. A jövőbeni kutatások egyik fontos célja lehet ezeknek a fehérjéknek az azonosítása.

8. SUMMARY

8.1. Introduction

The circadian systems that drive 24h biological rhythms in many organisms evolved as an adaptation to the Earth's rotation and its attendant changes in light and temperature conditions. Plants were the first organisms for which the observation of a circadian rhythm was published (de Mairan, 1729). The main advantage of having a daily biological clockwork is that it organizes a temporal program that cues processes to occur at specific phase relationships to the daily environmental cycle. This programming can enable the organisms to anticipate the forthcoming rhythmic changes in the environment and allow them to respond appropriately. Photosynthetic organisms such as plants depend upon sunlight. The availability of this energy is a 24-h cyclic phenomenon, and therefore it is not surprising that plants rhythmically mobilize many processes so as to optimally collect every possible drop of the sun's energy. Consequently, there are many circadian-controlled processes in photosynthetic organisms. In plants, circadian rhythms appear to control gene expression, physiological and biological processes - including circadian rhythms of leaf movements, hypocotyl elongation, stomatal conductance, photosynthetic capacity, chloroplast movements, nitrogen fixation, ion fluxes and many more - and the timing component of photoperiodism, which regulates seasonal reproduction. Clocks with similar properties and regulatory architecture have evolved at least four times, which could indicate that circadian rhythms confer a selective advantage (Young and Kay, 2001); however, the basis for their contribution to fitness remains undetermined (Yanovsky and Kay, 2001; Michael et al., 2003).

Under constant conditions circadian rhythms "free-run" with a period close to, but never exactly 24 h. This free-running behavior under constant conditions is one of three diagnostic features of circadian rhythms. The other two are temperature compensation and entrainment. The core of the circadian system of every model organism can be described as an oscillator. The components of the oscillator rhythmically regulate their own and each other's expression/activity through one or more negative feedback mechanisms at the transcriptional/translational level, generating a self-sustained oscillation (Young and Kay, 2001). Additional clock-associated factors, which do not carry temporal information and which may not be rhythmic are required to set the period length of this oscillation close to 24h

and to adjust other rhythmic properties. The oscillator regulates the expression of overt rhythms through „output” pathways. The phase of the oscillator (subjective time) is set to the objective time of the environment by periodic environmental signals (light and temperature) transduced by input pathways. Light signalling to the plant clock is mediated by several photoreceptors of the phytochrome and cryptochrome families, which themselves are regulated by the clock (Fankhauser and Staiger, 2002; Millar, 2003; Toth et al., 2001). Increasing light fluence rates shorten the free-running period length in *Arabidopsis* (Millar et al., 1995), likes in many diurnal animals (Aschoff, 1979).

According to the current model (Salome and McClung, 2004), the central oscillator in *Arabidopsis* involves the mutual regulation of three genes: *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) and *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*) are morning-expressed genes that repress transcription of *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*). The evening-expressed genes *TOC1*, *GIGANTEA* (*GI*), *EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*) and *EARLY FLOWERING 4* (*ELF4*) are each required for expression of *CCA1/LHY* to reach normal levels on the following morning (Hicks et al., 1996; Doyle et al., 2002; Fowler et al., 1999; Alabadi et al., 2001), though the mechanism of this gene activation is unclear. The majority of known components of the *Arabidopsis* circadian system have been identified by forward genetics (Southern and Millar, 2005), several from limited screens for mutants with altered circadian timing under constant light, and others from flowering time screens. Each gene was represented by one or at most two alleles. Recently, a large-scale screen was reported for mutants with altered rhythmicity of several clock-regulated luciferase (*LUC*) reporter genes under constant light (Onai et al., 2004); one of the mutated genes has been identified as an allele of a putative DNA-binding protein gene, *PHYTOCLOCK1* (Onai and Ishiura, 2005). In contrast, a *LUC* screen preceded by a screen for long-hypocotyl seedlings and followed by rapid array-based mapping identified several alleles of *TOC1*, *ELF3*, *ELF4* and the same putative DNA-binding protein gene, here termed *LUX ARRHYTHMO* (Hazen et al., 2005a; Hazen et al., 2005b).

ZEITLUPE (ZTL) was the first component of the plant circadian system to be implicated in regulated proteolysis. ZTL, LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) and FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) form a protein family with a unique signature of three protein domains: an N-terminal Period-ARNT-Sim (PAS)-like LIGHT, OXYGEN, VOLTAGE (LOV) domain, a central F-box motif and a C-terminal domain of six kelch repeats that are predicted to form a beta-propeller (Somers et al., 2000; Kiyosue and Wada, 2000; Nelson et al., 2000; Schultz et al., 2001). F-box proteins are important target-

specifier components of the Skp1/Cullin/F-box (SCF) type of E3 ubiquitin ligases (Vierstra, 2003). The F-box motif interacts with the Skp1 protein, whereas the C terminal is often responsible for binding the target protein. ZTL is assembled into an SCF^{ZTL} complex *in vivo* together with ASK1 (an *Arabidopsis* SKP1-like protein), AtCUL1 (*Arabidopsis thaliana* CULIN 1) and AtRBX1, which are core components of characterized SCF complexes in *Arabidopsis* (Han et al., 2004). Complex formation requires the presence of a functional F-box domain in ZTL. Transient reduction in AtRBX1 levels phenocopies the long-period phenotype of *ztl* mutants, strongly supporting the role of an SCF^{ZTL} complex in the regulation of circadian rhythms (Han et al., 2004). The proposed function of ZTL is to target the TOC1 protein for degradation (Mas et al., 2003). Surprisingly, TOC1 can interact with ZTL through the LOV/PAS domain and not the kelch repeats (Mas et al., 2003; Yasuhara et al., 2004). The mutation in the kelch domain nonetheless abolished the ZTL-TOC1 interaction, suggesting that the beta-propeller supports protein interactions at the LOV/PAS domain. The unusual LOV/PAS domain of ZTL suggested that *ZTL* function could be light-regulated, because the equivalent domain in other proteins (notably FKF1, Imaizumi et al., 2003) can bind a flavin chromophore that is photoactive in blue light. Circadian rhythms in *ztl* mutants have a long-period phenotype that is light-dependent: circadian period is longer under low than under high fluence rates of constant red or blue light (Somers et al., 2000). This is broadly consistent with the more rapid degradation of TOC1 protein in darkness than in light (Mas et al., 2003). The putative ZTL chromophore was not expected to absorb red light significantly, but a physical interaction was demonstrated between ZTL and the C terminal fragments of phytochrome B (PHYB) and cryptochrome 1 (CRY1) photoreceptor proteins (Jarillo et al., 2001), such that these photoreceptors might be involved in ZTL function. All known *ztl* mutants also had short hypocotyls, because the red-light-controlled inhibition of hypocotyl elongation was hyper-responsive in the mutants; for this phenotype, the *ztl* mutations did not affect blue light responsiveness (Somers et al., 2000 and 2004).

The working model of the *Arabidopsis* oscillator largely conforms to the expected negative feedback loop model that has emerged from studies in other model systems. With the establishment of *Arabidopsis* as a model plant system and the use of luciferase as a noninvasive reporter gene (Millar et al., 1992), plant circadian clock research has gathered speed, although there is still a lot to find out about the function and the relationships of the clock elements identified in plants.

8.2. Research objectives

At the beginning of our work only limited information was available about the plant circadian system. Although the core oscillator loop has emerged, it was clear that additional components remained to be identified and that only the outlines of the workings of the *Arabidopsis* clock had been established. The details of resetting by light and temperature were also only incompletely known. The main goal of our work was therefore to perform a large-scale screen to identify new circadian clock mutants. For this, we screened *Arabidopsis* plants for altered circadian behaviour by using a reporter system consisting of the firefly *LUCIFERASE* reporter gene under the control of the *CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN*-encoding gene promoter (*CAB2* promoter) that itself is regulated by the circadian clock. The screen was carried out in constant darkness. The 104 mutants recovered identify several new clock-affecting genes. In addition, eleven new *ztl* mutants were indentified by our screen. Mutations in all of the three predicted domains of ZTL protein were recovered, which provided an opportunity to obtain more detailed information on the function of the different domains.

Therefore the main objectives of our work were the following:

1. We wished to examine and compare the circadian, photomorphogenic and flowering phenotypes of the newly indentified and the previously described *ztl* mutants. By the characterization of the new alleles of *ztl* we planned to obtain new information on the function of ZTL *in vivo*.
2. Using the yeast two-hybrid system we wanted to test the interaction of the mutated and wild-type ZTL protein with the known interacting partner proteins of ZTL. With this expreiment we hoped to define the role of the different protein domains in the formation of functional protein complexes.
3. By comparing the data obtained from the phenotypical tests and the protein interactions in yeast we wished to define the role of the three protein domains of ZTL in the circadian clock and in light regulation.
4. Finally, we wished to quantify the advantage gained by matching the endogenous rhythm with that of the light-dark cycles of the environment, and to identify potential mechanisms by which the circadian clock confers adaptive advantage in light-dark cycles.

8.3. Methods

- Molecular cloning techniques
- Creation and maintenance of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants
- EMS mutagenesis
- Genetic mapping
- Plant total RNA extraction, Northern blotting
- Total plant protein isolation, Western blotting
- Yeast two-hybrid test for protein interactions
- In vivo luciferase enzyme activity measurements in intact seedlings
- Determination of period length of circadian rhythms by using BRASS software
- Measuring quantitative traits of plants (hypocotyl length, flowering time, chlorophyll accumulation, leaf size, plant weight, CO₂ fixation) under different light, temperature and day-length conditions

8.4. Results and discussion

1. To identify new components of the *Arabidopsis* circadian system, we screened ~46,000 M2 seedlings from two EMS-mutagenised populations, recovering 104 mutants with altered temporal patterns of *CAB2:LUC(+)* reporter gene expression. Among the mutants we identified two new *timing of cab 1* (*toc1*), one *early flowering 3* (*elf3*), two *gigantea* (*gi*) alleles and eleven new alleles of *ZTL*. Six mutant lines were identified that did not map close to any already known clock-associated genes.
2. Sequencing of the *ZTL* gene from the eleven *ztl* mutants revealed one mutation within the LOV/PAS domain, one in the F-box domain and nine new mutations within the kelch repeat domain of the protein. The positions of the mutated residues in the *ZTL* kelch repeats mapped on the external surface of the β -propeller structure of this domain. Mutations were recovered in all of the three predicted domains of *ZTL* protein, which provided an opportunity to obtain more detailed information on the function of the different domains.
3. We studied circadian clock function in the *ztl* mutants under constant light and temperature conditions (free-running conditions). The rhythmic expression of well-characterized promoter:*LUC+* fusions (*CAB2*, *CCR2* or *CCA1*) and the leaf movement

rhythm were examined in the *ztl* mutants under different free-running conditions. All the *ztl* alleles displayed long-period phenotypes and lowered amplitude of rhythms under all conditions. We concluded from these experiments that ZTL is involved in circadian regulation in both light and darkness, therefore ZTL is not a light input component of the clock.

4. We found that the strength of the circadian phenotype of the new *ztl* mutants is light-dependent. The circadian periods of the mutants are longer under all light intensities examined, but the difference between the wild-type and mutant periods is more pronounced under low than under high fluence rates of constant red or blue light. Consequently, in agreement with a previous publication (Somers et. al, 2000), we observed that the circadian clock of the *ztl* mutant plants shows reduced sensitivity to red and blue light, with the exception of the *ztl-21* (LOV/PAS) mutant, the clock of which shows normal (wild-type-like) sensitivity to red light. The period length of *ztl-21* differs from the wild-type by ~3.5 hours throughout the entire intensity scale of red light, which suggests that the LOV/PAS domain is not involved in the determination of the red light sensitivity of the clock.
5. In addition of the circadian function ZTL is also involved in the control of hypocotyl elongation by red light (Somers et. al, 2000). At high fluence rates of red light the inhibition of hypocotyl elongation was enhanced in all *ztl* mutants - except in *ztl-21* (LOV/PAS), which showed normal response to red light. In blue light there was no significant alteration in the hypocotyl elongation response in the mutant plants compared to wild-type. It follows, that the role of ZTL in red light regulation of hypocotyl elongation does not require an intact LOV/PAS domain.
6. We observed that mutations in the kelch or the F-box domain delayed flowering in long days, as previously reported for the null allele *ztl-3* (Kim et al., 2005) and the kelch mutation *ztl-1* (Somers et al., 2000). In contrast, flowering time in long days was unaffected in the *ztl-21* (LOV/PAS) mutant, which led to the conclusion that the LOV/PAS domain is not essential for the photoperiodic control of flowering by ZTL.
7. Previously we demonstrated that ZTL affects the circadian period of light-grown plants transferred to constant darkness, however we had no information about the function of ZTL in plants which had never seen light. Light-grown plants initially have a light-adapted complement of photoreceptors, some of which are thought to remain active for hours to days in darkness. To test the dependence of ZTL function on photoreceptor signaling, *ztl* mutant and wild-type seedlings were grown in constant darkness, under

thermo cycles. The circadian rhythms of *CCR2:LUC+* activity were tested in constant darkness in the dark-grown seedlings and compared to seedlings grown under light/dark (LD) cycles. We observed that temperature cycles, similarly to LD cycles, can properly entrain the mutants' clocks. After entrainment with temperature cycles, in constant darkness, *ztl* mutants showed an identical, long period like after entrainment with photocycles, indicating that ZTL regulates the circadian system without ongoing photoreceptor signalling. To assess the impact of *ztl* mutations on the temperature compensation of the clock, we determined the period length of mutant and wild-type plants in constant light keeping them at different temperatures. We observed that the *ztl* mutants show increased sensitivity to temperature changes: with increasing temperatures the period of the mutant plants increased faster than in wild-type plants. This means that ZTL is involved in the temperature compensation mechanism of the clock, although it is not an essential component.

8. ZTL protein levels were measured in the mutant plants by Western analysis. The results showed that all mutants tested expressed at least the wild-type level of the protein, except for *ztl-31*. ZTL mRNA levels showed little or no effect of the mutations, therefore the alteration in protein levels in the mutants could be the result of a change in protein stability. Two mutations (*ztl-22* and *ztl-27*) caused elevated levels of ZTL in the mutant plants as compared to wild-type. It is possible that both mutations inactivate the protein, which results in slower degradation of the ZTL protein, making it more stable, and this may have led to the observed higher levels of ZTL in these two mutants.
9. The domain structure of the ZTL protein family, together with published data, suggests that ZTL function might be understood at the molecular level in terms of its physical interactions with degradation targets, the SCF complex and the phytochrome and cryptochrome photoreceptors. To test this notion, representative mutations located in the three different domains of ZTL were introduced into the full length ZTL cDNA. The corresponding mutant proteins were expressed in yeast and tested for interaction with ASK1, TOC1 and the N-terminal domain (PHYBN, amino acids 1-621), C-terminal domain (PHYBC, amino acids 645-1272) or full-length phytochrome B. During the experiment we made the following observations:
 - the mutation in the F-box domain reduced the interaction between ASK1 and ZTL;
 - the kelch mutant protein (ZTL^{*ztl-27*}) cannot interact with TOC1 and shows reduced ability to bind ASK1;

- the LOV/PAS mutant protein does not interact with TOC1 and shows strongly reduced binding activity to ASK1;
 - neither of the three examined mutations (*ztl-21*, *ztl-22*, *ztl-27*) influenced the strength of the interaction between ZTL and PHYB-C; full length PHYB and the N-terminal functional PHYB fragment cannot bind ZTL; it follows that the *in vivo* significance of the ZTL-PHYB-C interaction detected *in vitro* is unclear.
10. We compared the data obtained from the phenotypical tests and the yeast two-hybrid experiments and established that the ZTL protein has a dual role:
- first, ZTL is involved in the regulation of the period length and amplitude of the circadian rhythm; this function of ZTL is independent of light;
 - second, ZTL is an important component of red light signalling: it is involved in the adjustment of the red light sensitivity of the clock, the regulation of red light-dependent hypocotyl elongation and the photoperiodic induction of flowering.
11. The functions of the three domains of ZTL protein can be summarized as follows:
- Mutation in the LOV/PAS domain caused the loss of the circadian, light-independent function of ZTL. In contrast, the LOV/PAS mutant protein can normally fulfil ZTL function in light regulated processes. Accordingly, the LOV/PAS domain and its interaction with TOC1 are not essential components of the red light signalling function of ZTL. It is possible that ZTL functions in light regulated processes by targeting substrates other than TOC1 to the proteolytic degradation mechanism. The LOV/PAS domain is indispensable for the light-independent circadian clock function of ZTL.
 - The F-box mutation affected both functions of ZTL. This domain is involved in binding ASK1, an element of the SCF complex, and probably also interacts with other ASK proteins.
 - All kelch mutations caused the complete loss of ZTL function. The kelch repeat domain is probably required to maintain the proper structure of the entire ZTL protein, allowing normal interactions with both TOC1 and ASK proteins. This structural role might depend on intramolecular interaction of the other ZTL domains with the surface of the beta-propeller.
12. Using *ztl* and *toc1* mutant plants we wished to quantify the advantage gained by matching the endogenous rhythm with that of the light-dark cycles of the environment, and to identify potential mechanisms by which the circadian clock confers advantage in light-dark cycles. We hypothesised that matching the endogenous clock period (τ) with the

period of the exogenous light-dark cycle (T) (so called ‘circadian resonance’) provides a quantifiable advantage due to optimization of phase relationship between clock-controlled biology and exogenous day-night cycles. To test this hypothesis, we compared the performance of wild-type plants with that of lines with mutations that alter clock period length in a range of environmental period lengths that were either matched or unmatched to the endogenous clock period. Our data demonstrated that the circadian clock allows plants to increase net photosynthesis. We showed that the circadian clock underlies a 50 % improvement in *Arabidopsis* productivity. This may be achieved by correct anticipation of dawn and dusk, and the synchronization of the synthesis of light harvesting complex proteins and chlorophyll, both of which are unstable in their unbound state. Failure to correctly match the endogenous rhythm to the environmental rhythm leads to reduced leaf chlorophyll content, reduced assimilation, reduced growth and increased mortality. We propose that optimisation of these parameters by circadian resonance may represent one of mechanisms that has selected for circadian clock function in evolution.

8.5. Conclusions

The performed mutant screen resulted in the identification of new clock components and new mutant alleles of already known clock elements, including eleven new alleles of the *ZTL* gene. We isolated mutations in all three predicted functional domains of *ZTL*, which provided an opportunity to obtain detailed information on the function of the different protein domains *in vivo*. The main result of our work is that we could separate the two functions of *ZTL* by analysing the mutant phenotypes and the interaction capability of the mutant proteins with known interacting partner proteins. Performing two distinct functions *ZTL* is most probably involved in targeting different substrates to proteasomal degradation. In the regulation of the circadian clock’s period, *ZTL* acts mainly through the direction of TOC degradation, whereas in light signalling *ZTL* plays a role in the degradation of other, currently unknown proteins. Although it was previously published that *ZTL* can interact with the C-terminal part of *PHYB*, we have no evidence that any *ztl* mutant phenotype is due to impaired interaction with this photoreceptor; it is also possible that the *ZTL*-*PHYB*C interaction detected *in vitro* has no effect *in vivo*.

9. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat anyagából megjelent publikációk:

1. Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., **Kevei, É.**, Tóth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J., Webb, A.A.R. (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, 309: 630-633.
2. **Kevei, É.**, Gyula, P., Hall, A., Kozma-Bognár, L., Kim, W-Y., Eriksson, M.E., Tóth, R., Hanano, S., Fehér, B., Southern, M.M., Bastow, R.M., Viczian, A., Hibberd, V., Davis, S.J., Somers, D.E., Nagy, F., Millar, A.J. (2006) Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of ZEITLUPE. *Plant Physiol.*, 140 (nyomtatásban; DOI:10.1104/pp.105.074864).

Egyéb publikációk:

3. Varga, J., **Kevei, É.**, Rinyu, E., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (1996) Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4461-4464.
4. Varga, J., **Kevei, É.**, Palágyi, A., Tóth, B., Téren, J. (1997) Genetic variability within the toxigenic *Petromyces* genus. *Cer. Res. Comm.*, 25: 285-289 (Part 1).
5. Téren, J., Palágyi, A., **Kevei, É.**, Varga, J. (1997) Isolation of variants of *Petromyces albertensis* with altered ochratoxin production. *Cer. Res. Comm.*, 25:305-306 (Part 1).
6. Varga, J., Rinyu, E., **Kevei, É.**, Tóth, B., Kozakiewicz, Z. (1998) Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections *Circumdati* and *Fumigati*. *Can. J. Microbiol.*, 44:569-574.
7. Varga, J., Tóth, B., **Kevei, É.**, Palágyi, A., Kozakiewicz, Z. (2000) Analysis of genetic variability within the genus *Petromyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 771:83-89.
8. Varga, J., **Kevei, É.**, Tóth, B., Kozakiewicz, Z., Hoekstra, R.F. (2000) Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. *Can. J. Microbiol.*, 46:593-599.
9. Nagy, F., **Kevei, É.**, Schäfer, E. (2001) Light regulation and signal transduction. In: *EPS book* (Ed.: Batschauer, A.):1-21.
10. Tóth, R., **Kevei, É.**, Hall, A., Millar, A., Nagy, F., Kozma-Bognár, L. (2001) Circadian Clock-Regulated Expression of Phytochrome and Cryptochrome Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 127:1607-1616.
11. **Kevei, É.**, Nagy, F. (2003) Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 117:305-313.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Adams, J., Kelso, R., Cooley, L.** (2000) The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol.*, 10:17-24.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., Kay, S.A.** (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 293:880-883.
- Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Mas, P., Harmer, S.L., Kay, S.A.** (2002) Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, 12:757-761.
- Anderson, P.** (1995) Mutagenesis. *Methods Cell Biol.*, 48:31-58.
- Aschoff, J.** (1979) Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z. Tierpsychol.*, 49:225-249.
- Ashburner, M.** (1990) *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Bell-Pedersen, D.** (2000) Understanding circadian rhythmicity in *Neurospora crassa*: from behavior to genes and back again. *Fungal Genet. Biol.*, 29:1-18.
- Borland, A.M., Hartwell, J., Jenkins, G.I., Wilkins, M.B., Nimmo, H.G.** (1999). Metabolite control overrides circadian regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and CO₂ fixation in Crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol.*, 121:889-896.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Briggs, W.R., Beck, C.F., Cashmore, A.R., Christie, J.M., Hughes, J., Jarillo, J.A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rudiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M., Watson, J.C.** (2001a) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell*, 13:993-997.
- Briggs, W.R., Christie, J.M., Salomon, M.** (2001b) Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxid. Redox Signal.*, 3:775-788.
- Bünning, E.** (1935.) Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primarblättern von *Phaseolus multiflorus*. *Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik*, 81:411-418.
- Carpenter, C.D., Kreps, J.A., Simon, A.E.** (1994) Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.*, 104:1015-1025.
- Carre, I.A., Kim, J.Y.** (2002) MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. *J. Exp. Bot.*, 53:1551-1557.

- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., Liu, D.** (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284:760-765.
- Chang, D.C., Reppert, S.M.** (2001) The circadian clocks of mice and men. *Neuron*, 29:555-558.
- Chen, M., Chory, J., Fankhauser, C.** (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.*, 38:87-117.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S.** (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582.
- Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., Briggs, W.R.** (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:8779-8783.
- Clack, T., Mathews, S., Sharrock, R.A.** (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.*, 25:413-27.
- Clough, S.J., Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735-43.
- Covington, M.F., Panda, S., Liu, X.L., Strayer, C.A., Wagner, D.R., Kay, S.A.** (2001) ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13:1305-1315.
- Crews, S.T., Fan, C.M.** (1999) Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9:580-587.
- Crosthwaite, S.K., Loros, J.J., Dunlap, J.C.** (1995). Light induces resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell*, 81: 1001-1012.
- Dean, C., Sjödin, C., Page, T., Jones, J., Lister, C.** (1992) Behaviour of the maize transposable element Ac in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2:69-81.
- Devlin, P.F., Kay, S.A.** (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell*, 12:2499-2510.
- Dowson-Day, M.J., Millar, A.J.** (1999) Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 17:63-71.
- Doyle, M.R., Davis, S.J., Bastow, R.M., McWatters, H.G., Kozma-Bognar, L., Nagy, F., Millar, A.J., Amasino, R.M.** (2002) The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 419: 74-77.
- Dunlap, J.C.** (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96:271-290.
- Edmunds, L.N.** (1988) Cellular and molecular bases of biological clocks. New York, Springer-Verlag

- Edwards, K.D., Lynn, J.R., Gyula, P., Nagy, F., Millar, A.J.** (2005) Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Genetics*, 170:387-400.
- Engelmann, W., Johnsson, A.** (1998). Rhythms in organ movement. In: Lumsden, P.J., Millar, A.J., eds. Biological rhythms and photoperiodism in plants. Oxford: Bios Scientific.
- Engelmann, W., Simon, K., Phen, C.J.** (1994). Leaf movement in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 47:925-928.
- Eriksson, M.E., Hanano, S., Southern, M.M., Hall, A., Millar, A.J.** (2003) Response regulator homologues have complementary, light-dependent functions in the *Arabidopsis* circadian clock. *Planta*, 218:159-162.
- Fankhauser, C., Staiger, D.** (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta*, 216:1-16.
- Farré, E.M., Harmer, S.L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J., Kay, S.A.** (2005) Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr. Biol.*, 15:47-54.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., Putterill, J.** (1999) GIGANTEA: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several membrane-spanning domains. *EMBO J.*, 18:4679-4688.
- Furuya, M.** (1989) Molecular properties and biogenesis of phytochrome I and II. *Adv. Biophys.*, 25:133-167.
- Furuya, M., Schäfer, E.** (1996) Photoperception and signaling of induction reactions by different phytochromes. *Trends. Plant Sci.*, 1:301-307.
- Gorton, H.L., Williams, W.E., Assmann, S.M.** (1993) Circadian rhythms in stomatal responsiveness to red and blue light. *Plant Physiol.*, 103:399-406.
- Green, R.M., Tobin, E.M.** (1999) Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4176-4179.
- Guo, H., Duong, H., Ma, N., Lin, C.** (1999): The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J.*, 19:279-287.
- Hall, A., Bastow, R.M., Davis, S.J., Hanano, S., McWatters, H.G., Hibberd, V., Doyle, M.R., Sung, S., Halliday, K.J., Amasino, R.M., Millar, A.J.** (2003) The TIME FOR COFFEE gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis* circadian clocks. *Plant Cell*, 15:2719-2729.

- Hall, A., Kozma-Bognar, L., Bastow, R.M., Nagy, F., Millar, A.J. (2002) Distinct regulation of CAB and PHYB gene expression by similar circadian clocks. *Plant J.*, 32:529-537.
- Halliday, K.J., Salter, M.G., Thingnaes, E., Whitelam, G.C. (2003) Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *Plant J.*, 33:875-885.
- Han, L., Mason, M., Risseuw, E.P., Crosby, W.L., Somers, D.E. (2004) Formation of an SCF(ZTL) complex is required for proper regulation of circadian timing. *Plant J.*, 40:291-301.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, 290:2110–2113.
- Harmer, S.L., Panda, S., Kay, S.A. (2001) Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17:215-253.
- Hayama, R., Coupland, G. (2003) Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:13-19.
- Hazen, S.P., Borevitz, J.O., Harmon, F.G., Pruneda-Paz, J.L., Schultz, T.F., Yanovsky, M.J., Liljegren, S.J., Ecker, J.R., Kay, S.A. (2005a) Rapid array mapping of circadian clock and developmental mutations in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 138:990-997.
- Hazen, S.P., Schultz, T.F., Pruneda-Paz, J.L., Borevitz, J.O., Ecker, J.R., Kay, S.A. (2005b) LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:10387-10392.
- Heintzen, C., Nater, M., Apel, K., Staiger, D. (1997) AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:8515-8520.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:425-479.
- Hicks, K.A., Albertson, T.M., Wagner, D.R. (2001) Early flowering3 encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13:1281–1292.
- Hicks, K.A., Millar, A.J., Carre, I.A., Somers, D.E., Straume, M., Meeks-Wagner, D.R., Kay, S.A. (1996) Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis* early-flowering 3 mutant. *Science*, 274:790-792
- Highkin, H.R., Hanson, J.B. (1954) Possible interaction between light-dark cycles and endogenous daily rhythms on the growth of tomato plants. *Plant Phys.*, 29:301-302.
- Huq, E., Tepperman, J.M. and Quail, P.H. (2000) GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97:9789–9794.

- Hurd, M.W., Ralph, M.R.** (1998) The significance of circadian organization for longevity in the golden hamster. *J. Biol. Rhythms*, 13:430-436.
- Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., Kay, S.A.** (2005) FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science*, 309:293-297.
- Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., Kay, S.A.** (2003) FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 426:302-306.
- Ito, S., Matsushika, A., Yamada, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yamashino, T. Mizuno, T.** (2003) Characterization of the APRR9 pseudo-response regulator belonging to the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 44:1237–1245.
- Jansen, M.A.K.** (2002) Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiologia Plantarum*, 116:423-429.
- Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.H., Yang, H.Q., Alonso, J.M. Cashmore, A.R.** (2001) An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature*, 410: 487–490.
- Johnson, C.H., Golden, S.S., Kondo, T.** (1998a) Adaptive significance of circadian programs in cyanobacteria. *Trends Microbiol.*, 10:407-410.
- Johnson, C.H., Knight, M., Trewavas, A., Kondo, T.** (1998b) in Biological rhythms and photoperiodism in plants, P. L. Lumsden, A. J. Millar, Eds. *Bios Scientific, Oxford*, 1-34.
- Johnson, P.H.** (1990). PRC Atlas.
<http://johnsonlab.biology.vanderbilt.edu/prcatlas6prcatlas.html>
- Kaczorowski, K.A., Quail, P.H.** (2003) *Arabidopsis* PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock. *Plant Cell*, 15:2654–2665.
- Kenigsbuch, D., Tobin, E.M.** (1995) A region of the *Arabidopsis* Lhcb1*3 promoter that binds to CA-1 activity is essential for high expression and phytochrome regulation. *Plant Phys.*, 108:1023-1027.
- Khanna, R., Kikis, E.A., Quail, P.H.** (2003) EARLY FLOWERING 4 Functions in Phytochrome B-Regulated Seedling De-Etiolation. *Plant Phys.*, 119:1530–1538.
- Kim, B.C., Tennessen, D.J., Last, R.L.** (1998). UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 15:667–674.
- Kim WY, Hicks KA, Somers DE.** (2005) Independent roles for EARLY FLOWERING 3 and ZEITLUPE in the control of circadian timing, hypocotyl length, and flowering time. *Plant Physiol.*, 139:1557-1569.
- Kim, W.Y., Geng, R., Somers, D.E.** (2003) Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:4933-4938.

- Kipreos, E.T., Pagano, M.** (2000) The F-box protein family. *Genome Biol.*, 1:Review 3002.
- Klarsfeld, A., Rouyer, F.** (1998) Effects of circadian mutations and LD periodicity on the life span of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms*, 13:471-478.
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J.** (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In *Plant Molecular Biology Manual*, Gelvin, B.S., Schilperoot, R.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-22.
- Kondo, T., Ishiura, M.** (2000) The circadian clock of cyanobacteria. *Bioessays*, 22:10-15.
- Kreps, J.A., Kay, S.A.** (1997) Coordination of Plant Metabolism and Development by the Circadian Clock. *Plant Cell*, 9:1235-1244.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F.** (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.*, 130:2129-2141.
- Kuno, N., Moller, S.G., Shinomura, T., Xu, X., Chua, N.H., Furuya, M.** (2003) The novel MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:2476-2488.
- Kiyosue, T., Wada, M.** (2000) LKP1 (LOV kelch protein 1): a factor involved in the regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 23:807-815.
- Kyriacou, C.P., Hall, J.C.** (1980) Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:6729-6733.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Li, X., Zhang, D., Hannink, M., Beamer, L.J.** (2004) Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1. *J. Biol. Chem.*, 279:54750-54758
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn A.R.** (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.*, 11:591-596.
- Lin, C.** (2002) Phototropin blue light receptors and light-induced movement responses in plants. *Sci. STKE*, 118:PE5
- Lin, C., Shalitin, D.** (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54:469-496.
- Liu, X.L., Covington, M.F., Fankhauser, C., Chory, J., Wagner, D.R.** (2001) ELF3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell*, 13:1293-1304.

- Lumsden, P.J., Youngs, J.A., Thomas, B., Vinceprue, D.** (1995.) Evidence that photoperiodic, dark time measurement in *Pharbitis nil* involves a circadian rather than a semidian rhythm. *Plant Cell Environ.*, 18:1403-1410.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Oda, Y., Mizuno, T.** (2001) Light response of the circadian waves of the APRR1/TOC1 quintet: When does the quintet start singing rhythmically in *Arabidopsis*? *Plant Cell Physiol.*, 42: 334-339.
- de Marian, J.** (1729). Observation botanique. *Histoire de l'Academie Royale des Sciences*: 35-36.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., Quail, P.H.** (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*. 288:859-863.
- Mas, P., Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Oyama, T., Kay, S.A.** (2003) Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:223-236.
- Mas, P., Devlin, P.F., Panda, S., Kay, S.A.** (2000). Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature*, 408:207–211.
- Matsushika, A., Imamura, A., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2002) Aberrant expression of the light-inducible and circadian-regulated APRR9 gene belonging to the circadian-associated APRR1/TOC1 quintet results in the phenotype of early flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 43:833-843.
- Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M., Mizuno, T.** (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators: Insight into the plant circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 41:1002–1012.
- Mazzella, M.A., Bertero, D., Casal, J.J.** (2000) Temperature-dependent internode elongation in vegetative plants of *Arabidopsis thaliana* lacking phytochrome B and cryptochrome 1. *Planta*, 210:497-501.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., Henikoff, S.** (2000) Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.*, 18:455-457.
- McWatters, H.G., Bastow, R.M., Hall, A., Millar, A.J.** (2000) The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature*, 408:716-720.
- Merrow, M.W., Garceau, N.Y., Dunlap, J.C.** (1997) Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3877-3882.
- Michael, T.P., Salome, P.A., Yu, H.J., Spencer, T.R., Sharp, E.L., McPeck, M.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., McClung, C.R.** (2003) Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science*, 302:1049-1053.
- Millar, A.J.** (2003) A suite of photoreceptors entrains the plant circadian clock. *J. Biol. Rhythms*, 18:217-226.

- Millar, A.J., Kay, S.A.** (1991) Circadian Control of cab Gene Transcription and mRNA Accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 3:541-550.
- Millar, A.J., Carré, I.A., Strayer, C.A., Chua N.-H., Kay, S.A.** (1995) Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science*, 267:1161-1163.
- Millar, A.J., Short, S.R., Chua, N.-H., Kay, S.A.** (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell*, 4:1075-1087.
- Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Arai, T.** (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, 323:720-722.
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A., Coupland, G.** (2002) LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*, 2:629-641.
- Mizuno, T.** (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J. Biochem.*, (Tokyo) 123:555-563.
- Murakami, M., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2004) Characterization of circadian-associated APRR3 pseudo-response regulator belonging to the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 45:645-650.
- Murakami-Kojima, M., Nakamichi, N., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2002) The APRR3 component of the clock-associated APRR1/TOC1 quintet is phosphorylated by a novel protein kinase belonging the WNK family, the gene for which is also transcribed rhythmically in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 43:675-683.
- Nagy, F., Kay, S.A., Chua, N.-H.** (1988b) A circadian clock regulates transcription of the wheat Cab-1 gene. *Genes Dev.*, 2:376-382.
- Nagy, F., Kay, S.A., Chua, N.-H.** (1988a) Gene regulation by phytochrome. *Trends Genet.*, 4:37-42.
- Nagy, F., Schafer, E.** (2000) Control of nuclear import and phytochromes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:450-454.
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 46:686-698.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., Bartel, B.** (2000) FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, 101:331-340.
- Ni, M., Tepperman, J.M., Quail, P.H.** (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95:657-667.

- Oka, Y., Matsushita, T., Mochizuki, N., Suzuki, T., Tokutomi, S., Nagatani, A.** (2004) Functional analysis of a 450-amino acid N-terminal fragment of phytochrome B in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16:2104-2116.
- Onai, K., Ishiura, M.** (2005) PHYTOCLOCK 1 encoding a novel GARP protein essential for the *Arabidopsis* circadian clock. *Genes Cells*, 10:963-972.
- Onai, K., Okamoto, K., Nishimoto, H., Morioka, C., Hirano, M., Kami-Ike, N., Ishiura, M.** (2004) Large-scale screening of *Arabidopsis* circadian clock mutants by a high-throughput real-time bioluminescence monitoring system. *Plant J.*, 40:1-11.
- Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S., Johnson, C.H.** (1998) Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8660-8664.
- Panda, S., Hogenesch, J.B., and Kay, S.A.** (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417:329-335.
- Park, D.H., Somers, D.E., Kim, Y.S., Choy, Y.H., Lim, H.K., Soh, M.S., Kim, H.J., Kay, S.A., Nam, H.G.** (1999) Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* GIGANTEA gene. *Science*, 285:1579-1582.
- Pittendrigh, C.S.** (1954) On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 40:1018-1029.
- Plautz, J.D., Straume, M., Stanewsky, R., Jamison, C.F., Brandes, C., Dowse, H.B., Hall, J.C., Kay, S.A.** (1997) Quantitative analysis of *Drosophila* period gene transcription in living animals. *J. Biol. Rhythms*, 12:204-217.
- Quail, P.H.** (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 140:180-188
- Rensing, L., Ruoff, P.** (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol. Int.*, 19:807-864.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R.** (2000) Comparing clockworks: mouse versus fly. *J. Biol. Rhythms*, 15:357-364.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G.** (2000a) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290:2105-2110.
- Riechmann, J.L., Ratcliffe, O.J.** (2000b) A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2000 Oct; 3(5):423-434.
- Risseuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E., Crosby, W.L.** (2003) Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *Plant J.*, 34:753-767.

- Robson, F., Costa, M.M., Hepworth, S.R., Vizir, I., Pineiro, M., Reeves, P.H., Putterill, J., Coupland, G.** (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J.*, 28:619-631.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M.J., Malpica, J.M., Leyva, A., Paz-Ares, J.** (1998) More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 14:273-284.
- Roenneberg, T., Foster, R.G.** (1997.) Twilight times: light and the circadian system. *Photochemistry and Photobiology*, 66:549-561.
- Salome, P.A., McClung, C.R.** (2004) The *Arabidopsis thaliana* clock. *J. Biol. Rhythms*, 19:425-435.
- Salome, P.A., McClung, C.R.** (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 17:791-803.
- Sambrook, J., Fritsch, F.E., Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sato, E., Nakamichi, N., Yamashino, T. and Mizuno, T.** (2002) Aberrant expression of the *Arabidopsis* circadian-regulated *APRR5* gene belonging to the *APRR1/TOC1* quintet results in early flowering and hypersensitiveness to light in early photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol.*, 43:1374–1385.
- Saunders, D.S.** (1972) Circadian control of larval growth rate in *Sarcophaga argyrostoma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2738-2740.
- Schafer, E., Bowler, C.** (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Rep.*, 11:1042-1048.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M., Wisman, E.** (2001) Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13:113-123.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A., Coupland, G.** (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*, 93:1219-1229.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., Kay, S.A.** (2001) A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13:2659-2670.
- Scully, A.L., Kay, S.A.** (2000) Time flies for *Drosophila*. *Cell*, 100:297-300.
- Sharrock, R.A., Quail, P.H.** (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.*, 11:1745-1757.

- Shimizu-Sato, S., Huq, E., Tepperman, J.M., Quail, P.H.** (2002) A light-switchable gene promoter system. *Nat. Biotechnol.*, 20:1041-1044.
- Somers, D.E.** (2001) Clock-associated genes in *Arabidopsis*: a family affair. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 356:1745-1753.
- Somers, D.E., Devlin, P.F., Kay, S.A.** (1998b) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 282:1488-1490.
- Somers, D.E., Kim, W.Y., Geng, R.** (2004) The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell*, 16:769-782.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., Kay, S.A.** (2000) ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell*, 101:319–329.
- Somers, D.E., Webb, A.A., Pearson, M., Kay, S.A.** (1998a) The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 125:485-494.
- Southern, M.M., Millar, A.J.** (2005) Circadian genetics in the model higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol.*, 393:23-35.
- Staiger, D., Allenbach, L., Salathia, N., Fiechter, V., Davis, S.J., Millar, A.J., Chory, J., Fankhauser, C.** (2003) The *Arabidopsis* SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes Dev.*, 17:256-268.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N.** (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 69:183-215.
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B.** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:447-456.
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J.A., Kay, S.A.** (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289:768-771.
- Sugano, S., Andronis, C., Green, R.M., Wang, Z.Y., Tobin, E.M.** (1998) Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:11020-11025.
- Sugano, S., Andronis, C., Org, M.S., Green, R.M., Tobin, E.M.** (1999) The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96:1362–1366.
- Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P., Macino, G.** (1999) Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J.*, 18:4961-4968.

- Thain, S.C., Murtas, G., Lynn, J.R., McGrath, R.B., Millar, A.J.** (2002) The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant Physiol.*, 130:102-110.
- Thomas, B.** (1998) Photoperiodism: an overview. in: Lumsden, P.J., Millar, A.J. eds, *Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants*. Bios Scientific Publishers, Oxford:151-165.
- Toth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A.J., Nagy, F., Kozma-Bognar, L.** (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Phys.*, 127:1607-1616.
- Viczian, A., Kircher, S., Fejes, E., Millar, A.J., Schafer, E., Kozma-Bognar, L., Nagy, F.** (2005) Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 for the *Arabidopsis thaliana* circadian clockwork. *Plant Cell Physiol.*, 46:1591-1602.
- Vierstra, R.D.** (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends. Plant Sci.*, 8:135-142.
- Wang, Z-Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S., Tobin, E.M.** (1997) A MYB-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* lhcb gene. *Plant Cell*, 9:491-507.
- Wang, Z-Y., Tobin, E.M.** (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, 93:1207-1217.
- Went, F.W.** (1960) Photo- and thermoperiodic effects in plant growth. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25:221-230.
- Whitmore, D., Cermakian, N., Crosio, C., Foulkes, N.S., Pando, M.P., Travnickova, Z., Sassone-Corsi, P.** (2000) A clockwork organ. *Biol. Chem.*, 381:793-800.
- Yamamoto, Y., Sato, E., Shimizu, T., Nakamichi, N., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Nagatani, A., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2003) Comparative genetic studies on the APRR5 and APRR7 genes belonging to the APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythm, control of flowering time, and early photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol.*, 44:1119-1130.
- Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimari, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Mizuno, T.** (2003) A link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 44:3-13.
- Yang, Y., Cheng, P., He, Q., Wang, L., Liu, Y.** (2003) Phosphorylation of FREQUENCY protein by casein kinase II is necessary for the function of the *Neurospora* circadian clock. *Mol. Cell. Biol.*, 23:6221-6228.
- Yanovsky, M.J., Kay, S.A.** (2001) Signaling networks in the plant circadian system. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:429-435.

Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A., Casal, J.J. (2000) A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr. Biol.*, 10:1013-1015.

Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A., Whitelam, G.C., Casal, J.J. (2001) Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Rhythms*, 16:523-530.

Yasuhara, M., Mitsui, S., Hirano, H., Takanabe, R., Tokioka, Y., Ihara, N., Komatsu, A., Seki, M., Shinozaki, K., Kiyosue, T. (2004) Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 55:2015-2027.

Young, M.W. (1998) The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:135-152.

Young, M.W., Kay, S.A. (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.*, 2:702-715.

Zagotta, M.T., Hicks, K.A., Jacobs, C.I., Young, J.C., Hangarter, R.P., Meeks-Wagner, D.R. (1996) The *Arabidopsis* ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J.*, 10:691-702.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban bemutatott kísérletek nagy részét a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetében, a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjaként végeztem el. Köszönettel tartozom téma- és csoportvezetőmnek, Dr. Nagy Ferencnek jelentős anyagi és szellemi támogatásáért, amellyel mindvégig segítette munkámat. Köszönöm Dr. Dudits Dénes főigazgató és Dr. Vass Imre igazgató uraknak, hogy munkámat lehetővé tették.

Köszönöm továbbá Dr. Andrew Millar-nek (University of Edinburgh, UK), hogy kísérleteim egy részét laboratóriumában végezhettem.

Köszönettel tartozom a Foto- és Kronobiológiai csoport minden tagjának a munkám során nyújtott segítségükért. Külön köszönöm Dr. Kozma-Bognár Lászlónak munkám során nyújtott segítségét és dolgozatom megírását kísérő tanácsait. Köszönöm Dr. Ádám Évának, Dr. Fejes Erzsébetnek és Dr. Viczián Andrásnak a doktori értekezésem írásakor adott építő jellegű és kritikus megjegyzéseket, valamint Paul Brown-nak, hogy megismerttetett a BRASS nevű szoftver használatával. Köszönet illeti továbbá laboratóriumunk asszisztensét, Józai Katalint, a kísérletek előkészületeiben nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak a munkámat végigkísérő biztatást és támogatást.