Ph.D. értekezés tézisei

A növényi cirkadián óra szerepének vizsgálata a fotoreceptor gének kifejeződésének szabályozásában

Tóth Réka

Témavezető: Dr. Nagy Ferenc

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

Szeged
2003.

BEVEZETÉS

A fény fontos szerepet játszik a magasabbrendű növények életében: szabályozza a fejlődést a csírázástól egészen a mag éréséig. Ezért a növények az egész életciklusuk alatt igen érzékenyen reagálnak a környezet fényviszonyainak változására. A növények a fényreceptorok segítségével képesek pontosan érzékelni a fény intenzitását és annak változását, a hullámhosszának eloszlását, a beeső fény irányát valamint a megvilágítás időtartamát. A magasabbrendű növényekben 3 fotoreceptor-családot azonosítottak: az fény UV-A és kék hullámhossza-tartományt érzékelő kriptokrómokat (cry) és fototropinok (phot) valamint a vörös és távoli vörös fényt érzékelő fitokrómokat (phy).

Arabidopsis thaliana-ban a fitokróm receptor-családnak 5 tagja van: fitokróm A-E (Sharrock és Quail, 1989; Clack és mtsai., 1994). A fitokróm fehérjék egy kovalensen kötött lineáris tetrapirrol kromofórt tartalmaznak. A fitokrómok két egymásba átalakítható formában léteznek: a biológiailag inaktív ún. P_r formában, mely vörös fény hatására aktív, ún. P_{fr} formába alakul át. Ez a folyamat megfordítható a távoli vörös fénnyel (Furuya, 1993). A phyA fehérje egy fotolabil molekula, mely fényben gyorsan degradálódik, ezért a szerepe az etiolált növényekben a legjelentősebb. Ez a fényreceptor közvetíti a nagyon alacsony és a magas fényintenzitású távoli vörös fényre adott fényválaszokat. A phyB, C, D és E meglehetősen fénystabil molekulák, melyek közül a phyB a domináns a fényen nőtt növényekben. Ez a négy fotoreceptor a felelős az alacsony és a magas intenzitású vörös fény érzékeléséért.

A növényi kriptokrómok homológiát mutatnak egyes bakteriális és állati fotoliázokkal, viszont fotoliáz aktivitással nem rendelkeznek (Cashmore és mtsai., 1999). Két nem kovalensen kötött kromofórt tartalmaznak: egy fénybegyűjtő pterint és egy katalitikus aktivitású FAD-ot. A kriptokrómok fontos szerepet játszanak a kék fény által indukált növekedési és fejlődési folyamatok irányításában. Arabidopsisban a család két tagja ismert: a kriptokróm 1 és 2 (cry1, 2). A cry2 jelentősége az alacsony intenzitású kék fényre adott válaszreakciókban, míg a cry1-é elsődlegesen az erős kék fény által indukált válaszokban mutatkozik meg (Lin, 2002).A cry2-vel ellentétben, mely a kék fényen gyorsan degradálódik, a cry1 fehérje szintjét nem szabályozza a fény (Cashmore és mtsai., 1999; Lin és mtsai., 1998). Ez lehet a magyarázata annak, hogy miért eltérő intenzitású fényre érzékenyek.

A fényreceptorok funkciója részben átfedő, részben egymást kiegészítő. Egy fényindukált folyamatot nemcsak egy receptor irányít, és ez visszafelé is igaz, egy fotoreceptor számos fényválaszban játszik kisebb-nagyobb szerepet; így egymással együttműködve irányítják a megfelelő folyamatokat. A fotoreceptorok egy bonyolult hálózatot alkotva igen pontosan képesek leképezni a fénykörülményeket, és ennek megfelelően vezérelni számos élettani jelenséget (Casal, 2000).

Sok biológiai organizmus rendelkezik egy belső molekuláris időmérő mechanizmussal, az ún. cirkadián órákkal, melyek lehetővé teszik a legfontosabb természeti körülmények rendszeres változásához való alkalmazkodást. Az óra közel 24 órás periódust biztosít számos élettani folyamatnak, így azok a nap folyamán az optimális időpontban jelenhetnek meg. A fiziológiai folyamatok igen széles skáláját befolyásolja a cirkadián óra: a levélmozgástól, a fejlődési folyamatokon és a virágzás indukcióján át a fotoszintézisig (Harmer és mtsai., 2000). Ezen folyamatok ritmikus jellege néhány kulcsfontosságú gén aktivitásának napi oszcillációján alapul.

A cirkadián rendszerek egyszerűsített, klasszikus modellje három fő részre tagolható. A cirkadián óra „szíve" a <u>központi oszcillátor</u>, melyet az ún. óraelem gének és azok fehérjéinek negatív visszacsatoláson alapuló szabályozó köre alkot. Ennek feladata a ritmus létrehozásán túl a cirkadián jel továbbítása egy több ágon futó jelátviteli lánc segítségével - amelyeket összefoglalóan <u>output</u>nak vagy kimenetnek neveznek - az általa szabályozott folyamatokhoz. A pontos működéséhez az órát hozzá kell igazítani a környezet napi periodikus változásaihoz (például a nappal/éjszaka vagy a hideg/meleg ciklusok). Az órát beállító mechanizmusban résztvevő molekulák, az <u>input</u> vagy bemeneti elemek közvetítik a környezeti jeleket a központi oszcillátorhoz. A klasszikus óramodell szerint az input elemek és a központi oszcillátor között lineáris a kapcsolat, az oszcillátor nem szabályozza a beállító folyamatait.

A növények számára a legjelentősebb beállító környezeti tényező a fény. Már számos fotoreceptor részvételét igazolták a fény input útban Arabidopsisban (Somers és mtsai., 1998; Devlin és Kay, 2000). A fitokrómok (phy A, B, D, E) és a kriptokrómok (cry1, 2) is szerepet játszanak az óra beállításában és a megfelelő periódushossz fenntartásában. Ezek alapján a fotoreceptorokat eddig input út elemeinek csoportjába sorolták.

KÖZVETLEN ELŐZMÉNYEK, CÉLKITŰZÉSEK

A fotoreceptorok kifejeződésének szabályozásában a fény reguláló funkcióját már bebizonyították (Somers és Quail, 1995a, 1995b; Goosey és mtsai, 1997), viszont más külső vagy belső szabályozó faktor hatása még ismeretlen volt. Pár évvel ezelőtt munkacsoportunkban kimutattuk (Kozma-Bognár és mtsai., 1999), hogy az Arabidopsis *PHYB* génexpressziója a cirkadián óra kontrollja alatt áll. Mivel az ismert, hogy a fény input útban számos fotoreceptor közreműködik, felmerül a kérdés, vajon a cirkadián óra szabályozza-e - a phyB mellett - többi fényreceptor kifejeződését is.

Munkánk célja az Arabidopsis fitokróm és kriptokróm fotoreceptorok kifejeződésének vizsgálata volt a cirkadián szabályozás szempontjából. A tervezett munka fő lépései a következők voltak:

1. A fitokrómok és kriptokrómok génátíródásának szövetspecifikus vizsgálata, összehasonlítása.
2. Annak megállapítása, hogy a *PHYB* mellett a többi fotoreceptor kifejeződése is cirkadián ritmust mutat-e, s ha igen, a kifejeződés mely szintjein jelenik meg az óra szabályozó hatása.
3. Ritmikus kifejeződés esetén egy kiválasztott fotoreceptor cirkadián szabályozásának kor- és szövetspecifikus vizsgálata.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Molekuláris klónozási technikák
- Növényi össz-RNS tisztítás
- Northern hibridizáció, RNáz protekciós analízis
- *Arabidopsis thaliana* növények nevelése steril és üvegházi körülmények között
- Transzgénikus növények előállítása
- *In vivo* luciferáz enzimaktivitás-meghatározás

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

1. A fitokrómok és kriptokrómok promóter aktivitásának vizsgálatára transzgénikus *Arabidopsis thaliana* növényeket hoztunk létre, melyek a különböző fotoreceptorok promóterei által vezérelt luciferáz riporter gént hordozták. A transzgénikus növényekben *in vivo* luciferáz enzimaktivitás mérésével megfigyeltük a promóter-aktivitás szövetspecifikus megjelenését. A csíranövényekről készült felvételek megmutatták, hogy - a CRY1 kivételével - a gének kifejeződése az összes szervben detektálható szintű volt. A 7 napos, fény/sötét perióduson nőtt csíranövényekben a promóter-aktivitás a levélben és a hajtáscsúcsban volt domináns, míg az ugyanilyen korú etiolált növényekben az aktivitás a sziklevélre és a hipokotil felső harmadára tevődött át. A gyökérben tapasztalható expresszió a gyökércsúcsban volt a legjelentősebb. Az etiolált PHYA gyökérről nagy-felbontású CCD kamera segítségével készült felvételek tanúsága szerint a gyökérsüveg sejtek termelték a fotoreceptorok nagy részét. A felvételek lehetőséget nyújtanak az egyes fényreceptorok szervezet szintű megjelenésének összehasonlítására, ezáltal az azonos helyen és időben rendelkezésre álló receptorok egymásra hatásának, akár közvetlen interakciójának lehetőségét is alátámasztva.

2.1 A fotoreceptor promóter-luciferáz inszertet hordozó transzgénikus csíranövényekben a vizsgált öt fitokróm és két kriptokróm promóter-aktivitása diurnális jellegű volt fény/sötét perióduson. Cirkadián körülmények között, azaz állandó hőmérsékleten, állandó fehér fényben vagy folyamatos sötétben a *PHYC* kivételével mindegyik fényreceptor gén promóter-aktivitásában megfigyelhető volt a napi oszcilláció, de a ritmus lefutása és amplitúdója lényeges különbségeket mutatott. Erős ritmus jellemezte a *PHYA, PHYB* és *CRY1* gének promóter-aktivitását, míg kisebb erősségű volt az oszcilláció a *PHYD, PHYE* és a *CRY2* gének esetében. Mindegyik fényreceptor ritmusa a szubjektív nappal folyamán, pár órás eltolódással érte el a maximumát. Az amplitúdó és fázisbeli eltérések azt jelzik, hogy a fotoreceptor gének promóter-aktivitását a cirkadián óra nem egységes séma szerint szabályozza, hanem egyedi kifejeződési mintázatot biztosít számukra. A folyamatos fényben és folyamatos sötétben mért promóter-aktivitás összehasonlításával a fény szerepére is következtethetünk. A *PHYC* gén transzkripciója fény hatására fokozódott; a *PHYA, CRY2*, valamint kis mértékben a *PHYB* és a *CRY1* gének

transzkripcióját negatívan szabályozta a fény; a *PHYD* és *PHYE* gének kifejeződése pedig fény-függetlennek bizonyult.

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

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

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

megállapíthatjuk, hogy a cirkadián óra egy általa vezérelt gén átíródását szerv- vagy szövetfüggően is különböző mértékben befolyásolja.

KÖVETKEZTETÉSEK

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

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

IRODALOMJEGYZÉK

Casal, J.J. (2000) *Photochem Photobiol*. 71:1-11.

Cashmore A. R. és mtsai. (1999) *Science,* 284:760-765.

Clack, T. és mtsai (1994) *Plant Mol. Biol.,* 25:413-427.

Devlin, P.F., Kay, S.A. (2000) *Plant Cell,* 12:2499-2510.

Furuya, M. (1993) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol,* 44:617–45.

Furuya, M., E. Schäfer (1996) *Trends Plant Sci.,* 1:301-307.

Goosey, L. és mtsai (1997). *Plant Physiol,* 115:959-69.

Harmer, S.L. és mtsai (2000) *Science,* 290: 2110-3.

Kozma-Bognar, L. és mtsai (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A,* 96(25):14652-7.

Lin, C.T. és mtsai (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 95:2686-2690.

Lin, C. (2002) *Plant Cell,* S207-S225.

Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1989) *Genes Dev,* 3(11):1745-57.

Somers, D.E., Quail, P.H. (1995a) *Plant J,* 7:413-427.

Somers, D.E., Quail, P.H. (1995b) *Plant Physiol*., 107:523-534.

Somers, D.E. és mtsai (1998) *Science,* 282:1488-1490.

Yanovsky, M.J. és mtsai (2000) *Curr Biol*, 10(16):1013-5.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

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

1. Kim, L., Kircher, S., **Tóth, R**., Ádam, É., Schäfer, E., Nagy, F. (2000) Light-induced nuclear import of phytochrome-A:GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis. *Plant J,* 22:125-33.

2. **Tóth, R**., Kevei, É., Hall, A., Millar, A., Nagy, F., Kozma-Bognár, L. (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes *Arabidopsis. Plant Physiol*, 127:1607-1616.

3. Hall, A., Kozma-Bognár, L.**, Tóth, R**., Nagy, F., Millar, A. (2001) Conditional circadian regulation of *PHYTOCHROME A* gene expression. *Plant Physiol*, 127:1808-1818.