

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dobos Orsolya Katalin

Témavezetők: Dr. Kozma-Bognár László, Dr. Nagy Ferenc



Szegedi Biológiai Kutatóközpont

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola

Szeged

2019

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

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

A szabályosan ismétlődő események között eltelt időt periódusnak nevezzük, s a biológiai ritmusokat ez alapján több csoportba lehet osztani. A cirkadián ritmusok – a latin „circa” (körülbelül) és „diem” (nap) szavaknak megfelelően - megközelítőleg egy napos (20-28h) periódust mutató ritmusok, melyeket az élőlények belső cirkadián órája diktál.

Maga a cirkadián óra három fő egységből tevődik össze, melyek más-más fontos tulajdonságot kölcsönöznek a cirkadián

ritmusok számára. Az óra magja, a „központi oszcillátor” egy önmagába visszatérő transzkripció/transzláció hálózat, melyben óragének és a róluk kifejeződő órafehérjék vesznek részt. Az óraelemek közötti interakciók külső hatás nélkül is lezajlanak, így a központi oszcillátorhoz kapcsolt élettani folyamatok akkor is ritmikusan működnek, ha az élőlény konstans környezeti körülmények közé kerül. Az óra második fontos egysége a kimenet. Az ezen egységbe tartozó géntermékek (és az általuk előidézett anyagcsere-folyamatok, viselkedési mintázatok) nem hatnak vissza a központi oszcillátor ritmusára. Közös jellemzőjük, hogy folytonos expressziójuk hatalmas erőforrás pazarlás lenne, mert géntermékeik hasznosulásának van egy optimuma a nap folyamán, amelyen kívül a termelés megtérülési rátája elmaradna a maximumtól. A génkifejeződés megfelelő időablakra való korlátozásával mindezen energia megtakarítható. A harmadik egység, a bemenet olyan jelátviteli hálózatok összessége, amelyek a cirkadián szempontból is jelentős környezeti szignálokat, ún. „zeitgebereket” monitorozzák, s az azok ritmusához igazítják a központi

oszillátor által kialakított (nem teljesen 24 órás) ritmust. Ez a szinkronizáció, melyet „entrainment”-ként is nevezünk, molekuláris szinten úgy nyilvánul meg, hogy a bemeneti jelátvitel egyes óraelemek transzkripcióját/transzlációját serkenti vagy gátolja, aminek eredményeképpen az óraelemek közötti interakciók erőssége és sebessége megváltozik, végeredményben pedig az óra által diktált ritmus felgyorsul/lelassul.

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

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

CÉLKITÚZÉS

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

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- Molekuláris klónozási technikák
- *Arabidopsis thaliana* növények nevelése steril és üvegházi körülmények között
- Transzgenikus növények előállítása
- *In vivo* luciferáz enzimaktivitás-meghatározás csíranövényekben
- Kromatin immunoprecipitáció (ChIP)
- Növényi genomi DNS-tisztítás
- Növényi össz-RNS-tisztítás
- Kvantitatív valós idejű PCR
- Növényi összfehérje tisztítás
- Western-blot
- Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EREDMÉNYEK

A munkánkat megelőző kísérletek során folyamatos fehér fényben vizsgálták a *hy5* mutáns és vad típusú vonalak periódusát. Mint tudjuk, a fehér fény többféle hullámhosszú fény keverékeként számos növényi receptort és jelátviteli folyamatot is képes aktiválni, a HY5 pedig mindezen jelátviteli utak szabályozásában egyidejűleg részt vesz, s képes azok információit integrálni. Éppen emiatt azt feltételeztük, hogy a tanulmányokban alkalmazott fehér fény különböző hullámhossz-összetétele magyarázat lehetett az eltérő eredményekre.

Ennek megfelelően a fehér fényt a növények számára külön-külön is értelmezhető tartományaira bontottuk fel, s így folyamatos kék (BL), vörös (RL) és távoli vörös (FR) fényben is megmértük a *hy5*, *hyh* mutáns és a vad típusú (WT) vonalak periódusát. A kísérleti módszerünk (óra-vezérelt expressziójú luciferáz markerek nyomonkövetése) nem tette lehetővé, hogy távoli vörös fényben is összehasonlíthassuk az említett vonalak cirkadián ritmusát, de sikeresen kimutattuk, hogy kék fényben a *hy5* és a *hyh* mutánsok periódusa rövidebb a WT növényekhez

képest, vagyis a HY5 és HYH kék fényben lassítja a cirkadián óra ritmusát. Vörös fényben a periódusok különbsége elhanyagolható volt, fehér fényben pedig egy középértékű fenotípust kaptunk, ami egy várható eredmény volt annak tükrében, hogy a fehér fény kék és vörös hullámhosszú fényt is tartalmaz. Mindez arra utal, hogy a HY5 és HYH valóban részt vesz a cirkadián óra fény általi szabályozásában, s ebben a különböző hullámhossz-tartományok aránya fontos tényező.

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

megmagyarázzuk, megvizsgáltuk a HY5 és HYH transzkripció és poszt-transzkripció szintjét kék és vörös fényben, amelyek azt mutatták, hogy a kék fény mindkét szinten erősíti a HY5 és HYH expresszióját. Az ebből következő magasabb HY5 és HYH fehérjeszint magyarázatot adhat az erősebb mértékű kromatin-asszociációra, illetve a *hy5*, *hyh* mutánsok cirkadián fenotípusának kékfény-specifikus jellegére is.

Bár a HY5 szinte valamennyi óra- és óra-asszociált gén promoter régiójánál jelen van, mRNS-expressziós kimutatásaink alapján elmondhatjuk, hogy a HY5 csupán három óragén (*PRR5*, *LUX*, *BOA*) transzkripció rátáját befolyásolja, mégpedig negatív irányban. Ez az eredmény elsőre nem illeszkedik a korábbi eredményeink sorába, ugyanis a *hy5 hyh* mutáns cirkadián hálózatának matematikai modellezése (azaz a *PRR5*, *LUX* és *BOA* fokozott transzkripciója) hosszú periódusú fenotípust jósolt, ami épp az ellentéte az általunk mért rövid periódusnak. Ugyanez a modell megnövekedett *CCA1* mRNS-szinteket is becsült, amelyeket semmilyen kísérleti körülményben nem észleltünk a *hy5 hyh* mutánsban. Érdekes módon, amikor a szimulációs programban a *CCA1* mRNS-szinteket (a

tapasztaltaknak megfelelő) WT-szerű szintre állítottuk, a szimuláció rövidebb periódust adott a WT-nél, az alapkísérletünk eredményeivel összhangban. Ez arra utalhat, hogy a HY5 valójában a *CCA1* génátírására is hatással van, csupán e kölcsönhatás nem kimutatható, mert a HY5 egyidejűleg olyan szabályozásokat is végrehajt a cirkadián hálózat egyéb pontjain, melyek összességében a HY5 *CCA1*-re gyakorolt hatását kioltják. Amennyiben e gondolatmenetet helytálló, úgy az is elképzelhető, hogy ez az eset a cirkadián óra más elemeinél is fennáll, vagyis a HY5 a *PRR5*, *LUX* és *BOA* géneken kívül számos más ponton keresztül is összekötheti a kétfény-függő bemenetet a cirkadián oszcillátorral.

A munkánkat megalapozó alapkísérlet egy másik fontos megfigyelése az volt, hogy a *hy5* és *hyh* mutánsok perióduscsökkenése kiváltképp olyan növények esetében volt mérhető, melyek alacsony cukorkoncentrációjú médiumon voltak nevelve, magasabb szacharóztartalmú növények esetében a perióduskülönbség sokkal csekélyebb volt. Mivel a növények cukor-ellátottságot monitorozó rendszere a cirkadián óra felé is szolgáltat információkat, úgy gyanítottuk, hogy a cukor-

bemenet valamilyen ponton, és valamilyen módon zavarhatja a fény-bemenet HY5-függő ágát. Ennek tisztázása érdekében magas és alacsony szacharóz-tartalmú médiumon nőtt növényeknél vizsgáltuk, hogyan változik a *hy5* mutáns növények mRNS-profilja, a bennük expresszálandó HY5 transzkripció és poszt-transzkripció rátája, valamint annak kromatin-asszociációs képessége. Eredményeink alapján a cukor jelenléte/hiánya egyik aspektusban sem érintette a HY5 működését, így további kísérletek szükségesek a *hy5* cirkadián fenotípus cukorfüggésének megmagyarázához.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat alapját képező közlemény:

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

Egyéb közlemények:

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

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

*megosztott első szerzők

MTMT azonosító: 10052999