

**AZ UV-B FÉNY ÉS A NÖVÉNYI CIRKADIÁN ÓRA
KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Fehér Balázs

Témavezető: Dr. Nagy Ferenc

**Biológia Doktori Iskola, SZTE TTIK
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**2011
Szeged**

BEVEZETÉS

A cirkadián órák az élővilág egészében elterjedt biokémiai időmérők. Működésükkel nagymértékben segítik az élőlényeket a Föld tengely körüli forgása következtében kialakult, ritmikusan változó környezethez való alkalmazkodásban. Különösen fontos ez az alkalmazkodás a növények számára, hiszen egyfelől, mint helyhez kötött élőlények különösen kiszolgáltatottak a kedvezőtlen tényezőknek; másfelől, a fotoszintézishez szükséges energia minél hatékonyabb felhasználásához szükséges, hogy az életfolyamataikat a fény napi eloszlásának megfelelően időzítsék. A cirkadián óra segítségével képesek ezeket a folyamatokat a megfelelő időpontokra időzíteni, illetve a kedvezőtlenekben gátolni. Ennek az „órarendnek” segítségével energiát takarítanak meg és hatékonyabbá válnak (Dodd és mtsai, 2005).

A cirkadián óra hatékonysága függ attól, hogy mennyire van szinkronban az óra által mért belső idő a külső környezet valós idejével. A szubjektív idő pontosításának érdekében a cirkadián órát a külső környezet periodikus változásai – melyek közül növényekben a fény a legfontosabb - képesek beállítani. A fény így kettős szerepet játszik a növények életében, egyrészt a fotoszintézisen keresztül a fő energiaforrás, másrészt a környezet állapotáról információt hordozó jel. A növények a fényt speciális fehérjék, úgynevezett fotoreceptorok segítségével fogják fel. Az impulzus a jelátviteli láncon keresztül eléri a cirkadián órát, ahol megváltoztatja a szintjét és/vagy aktivitását egy

vagy több órakomponensnek, ezáltal másik fázisba állítva azt (Kozma-Bognár és Káldi, 2008). A vörös/távoli vörös fényelnyelésű fitokrómok, illetve a kék fényelnyelésű kriptokrómok szerepe a cirkadián óra fotoreceptoraként már bizonyított *Arabidopsis*-ban (Somers és mtsai, 1998a; Devlin és Kay, 2000).

Az ultraibolya-B (UV-B, 280-315 nm) sugárzás természetes része a Föld felszínét elérő napfénynek. A felszínre elérő UV-B sugárzás igen változatos fiziológiai folyamatokat vált ki a növényekből. A legismertebbek azok, amiket összefoglalóan stresszhatásoknak nevezünk (DNS-, és fehérjekárosodás, reaktív oxigénradikálok felhalmozódása, lipid peroxidáció) (Jansen és mtsai, 1998). Azonban van egy másik, kevésbé ismert hatása is. Az alacsony intenzitású UV-B fotomorfogénikus hatással is rendelkezik, gátolja a hipokotil megnyúlását, serkenti a sziklevél növekedését, illetve a flavonoid felhalmozódást (Ulm és mtsai, 2004; Brown és mtsai, 2005; Oravecz és mtsai, 2006; Stracke és mtsai, 2010). Vagyis a növények ugyanúgy környezeti jelként érzékelik ezt a sugárzást, mint a fény spektrum látható részét.

Mostanáig még nem sikerült minden kétséget kizáróan egyetlen molekulához, vagy molekulacsaládhoz kötni az UV-B érzékelést. Azt azonban már sikerült igazolni, hogy az alacsony fényintenzitású UV-B által kiváltott fotomorfogénikus folyamatok fotoreceptora az UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) fehérje. Az UVR8 35%-os azonosságot mutat fehérje szinten az emberi REGULATOR OF CHROMATIN CONDENSATION 1 (RCC1) fehérjével. Az RCC1

egy nukleotidcserélő segédfehérjéje (guanin nucleotide exchange factor, GEF) a RAN kis GTP-kötő fehérjéknek, amik például a sejtmagi transzportban, a sejtciklus szabályzásában, vagy a mitózisban játszanak szerepet (Moore, 2001). Az RCC1 és az UVR8 is képes a kromatinnal (elsősorban a H2B hisztonnal) kölcsönhatni (Cloix és Jenkins, 2008), azonban még nem bizonyított hogy az UVR8 esetében ez a kölcsönhatás szerepet játszik-e a jelátvitelben. Az UVR8 fehérje UV-B megvilágítás hatására felhalmozódik a sejtmagban és ott kölcsönhatásba lép a CONSTITUTIV PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) fehérjével.

A COP1 az egyik fő negatív szabályzója a fotomorfogenezisnek (Chen és mtsai, 2004; Yi és Deng, 2005). A COP1 gátolja a fotomorfogénikus gének kifejeződését sötétben, ezért a *cop1* mutáns sok tekintetben a fényen nőtt növények jellemzőit mutatja. Megvilágítást követően a COP1 inaktiválódik, lassan elhagyja a sejtmagot hagyva, hogy a LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) és a többi transzkripciós faktor felhalmozódjon, és elősegítse a fotomorfogenezist. A fotomorfogenezisben betöltött negatív szabályzó funkciójával szöges ellentétben a COP1 az UV-B válaszok pozitív szabályzója. Génchip kísérletekből kiderült, hogy sok, az alacsony intenzitású UV-B által indukált gén kifejeződése jelentősen alacsonyabb *cop1-4* mutánsban, és az egyik közülük éppen a *HY5*. A COP1 által szabályzott funkciók majdnem felét a *HY5* is szabályozza, vagyis a *HY5* a COP1 jelátvitel kulcsszabályzója. Tehát a COP1 és a

HY5 a sejtmagban együttműködnek az UV-B válaszok kialakításában, míg sötétben a COP1 hatására lebomlik a HY5.

A legfrissebb kutatások szerint az UVR8 fehérjében található triptofánok, legvalószínűbben a 285. triptofán UV-B elnyelésének következtében létrejön egy olyan molekulán belüli változás, aminek eredményeként az UVR8 monomerizálódik, aktiválódik, majd kölcsönhatásba lép a COP1 fehérjével, elindítva a jelátvitelt.

Munkánk során az alacsony intenzitású UV-B kapcsolatát vizsgáltuk a cirkadián órával. Eddig semilyen adat nem volt arról, hogy a fénynek ez a természetes komponense befolyásolja-e a cirkadián óra működését, illetve az alacsony intenzitású UV-B érzékelésében kulcsfontosságú UVR8, COP1, HY5 illetve HY5 HOMOLOGUE (HYH) fehérjék milyen szerepet játszanak az UV-B jelek közvetítésében a cirkadián órához. Vizsgáltuk továbbá, hogy a cirkadián óra szabályozza-e az UV-B által kiváltott élettani folyamatokat, szerepet játszik-e az UV-B védelemben.

CÉLKITŰZÉSEK

A növényi cirkadián óra legfontosabb beállító tényezője a fény. A szabadon futó ritmus periódusa fordított arányban áll fény erősségével, a fényimpulzusok pedig képesek az óra fázisát átállítani. Intenzíven kutatott terület azon jelátviteli utak vizsgálata amelyeken keresztül a fény kifejti a hatását a cirkadián órára. Ennek köszönhetően igen sok információnk van arról, hogy a látható fény egyes komponensei milyen fotoreceptorokon és jelátviteli elemeken keresztül befolyásolják az órát. Azonban mostanáig nem volt adat arról, hogy a fiziológiai mennyiségben jelenlévő UV-B milyen hatással van a növényi cirkadián órára.

Annak vizsgálatára, hogy az UV-B fénynek az UVR8 által szabályozott alacsony intenzitású része hogyan befolyásolja a cirkadián órát. Illetve fordítva, a cirkadián óra hogyan szabályozza az UV-B által kiváltott folyamatokat az alábbi célokat tűztük ki:

1. A cirkadián óra UV-B fényvel való beállíthatóságának a vizsgálata
2. A cirkadián óra hatásának jellemzése az UV-B által kiváltott fényindukciókra
3. Az UV-B jelátvitel hatásának vizsgálata a kapuzásra
4. Cirkadián óra hiányában történő UV-B indukciók jellemzése
5. A Cirkadián óra szerepének vizsgálata az UV-B védelemben

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Molekuláris klónozási technikák
- *Arabidopsis thaliana* növények nevelése steril és üvegházi körülmények között
- Transzgenikus növények előállítása
- *In vivo* luciferáz enzimaktivitás-meghatározás csíranövényekben
- Cirkadián ritmusok periódushossz-mérése BRASS szoftver alkalmazásával
- Növényi genomiális DNS tisztítás
- Növényi össz-RNS tisztítás
- kvantitatív valós idejű PCR
- Növényi össz fehérje tisztítás, Western-blot analízis

AZ ELÉRT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A cirkadián óra UV-B fényel való beállíthatóságának vizsgálatához CCR2:LUC+ jelzőgént kifejező vad típusú, valamint *uvr8*, *cop1*, és *hy5 hyh* mutáns növényvonalakat használtunk. Megvizsgáltuk a folyamatos UV-B fény, illetve az UV-B pulzusok hatását az állandó körülmények között, szabadon futó cirkadián óra periódushosszára és fázisára. A kísérletek alapján kapott adatok és a belőlük levonható következtetések a következők:

- Vad típusú növényekben a cirkadián óra periódusa alacsony intenzitású UV-B hatására fényintenzitás függő módon rövidül.

- Az *uvr8* mutáns növényben a periódus nem rövidül alacsony intenzitású UV-B hatására, viszont a látható fény a vad típushoz hasonlóan rövidíti a periódust. A kísérlet megerősíti azt a korábbi megfigyelést, miszerint az *uvr8* mutáns UV-B hiányában megkülönböztethetetlen a vad típustól.
- A *cop1* mutáns növények periódusa sem rövidül alacsony intenzitású UV-B hatására.
- A *hy5 hyh* mutáns növények periódusa nem tér el a vad típusától, sem fehér, sem UV-B-vel kiegészített fehér fényben. Mivel a HY5-ről korábban leírták, hogy *in vivo* kötődik több óragén (*CCA1*, *LHY*, *TOC1*, *ELF4*) promóteréhez, felvetődik, hogy ennek ellenére sem vesz részt a cirkadián szabályozásban.
- Alacsony intenzitású UV-B pulzusok hatására vad típusú növényekben fáziskésés figyelhető meg a szubjektív éjszaka során és nem tapasztalható fázisváltozás a szubjektív nappal alatt.
- Sem az *uvr8*, sem a *cop1* mutáns növények nem mutatnak fázisváltozást alacsony intenzitású UV-B pulzusok hatására.
- Az *uvr8* mutáns növények látható fénypulzusokra adott fázisváltozásaikban vad típusú válaszokat adnak minden általunk vizsgált körülményben. Látható fényben szintén nem okoz fenotípust a mutáció.

A cirkadián óra UV-B által kiváltott fényindukciókra gyakorolt hatásának vizsgálatához vad típusú, *uvr8*, *cop1*, *hy5 hyh*, és *elf3* mutáns valamint CCA1 túltermelő növényvonalakat használtunk. A kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy milyen mértékű a cirkadián óra szabályozása a nap különböző pontjain alkalmazott UV-B pulzusok által kiváltott génindukciókra. Ezen kapuzási (gating) kísérletek eredményei a következők:

- Minden általunk vizsgált fényérzékeny óragén (*CCA1*, *PRR9*, *GI*, *ELF4*) indukálható volt alacsony intenzitású UV-B vel is. Az indukciójuk kapuzott mintázatot mutatott. A legnagyobb mértékű indukciót a *PRR9* mutatta, a megemelkedett *PRR9* szint magában magyarázhatja a periódus rövidülését
- Az *uvr8* mutánsban a központi óra általunk vizsgált minden eleme a vad típusnak megfelelő szinten volt UV-B hiányában és egyik sem volt indukálható UV-B pulzusokkal.
- A *cop1* mutáció az *uvr8* hoz hasonlóan eltörölte az óragének UV-B indukálhatóságát.
- Az általunk vizsgált kettős (cirkadián és közvetlen fény) szabályozású gének nagy része kapuzott indukciót mutatott alacsony intenzitású UV-B fénypulzusok hatására.

- A *HY5* UV-B indukcióját nem szabályozza a cirkadián óra. A *HYH* átíródását viszont igen. Elképzelhető, hogy a két fehérje heterodimerként összekapcsolódva működik és ez esetben a *HYH* cirkadián átíródási szabályzása kihat a komplex működésére.
- Az általunk vizsgált nem cirkadián kifejeződésű, de UV-B indukálható gének szintén kapuzott indukciót mutattak alacsony intenzitású UV-B pulzusok hatására. A maximális indukciók – akár a többi vizsgált nem óragén esetében - a reggeli/délelőtti órákban voltak, ami feltételezi azt, hogy a növény számára ekkor a legfontosabb az alacsony intenzitású UV-B jel érzékelése. Ennek hatására építi fel UV-B elleni védelmét a később érkező nagyobb intenzitású sugárzással szemben.
- A megvizsgált aritmiás növényekben (*elf3*, *CCA1-OX*) nem volt tapasztalható kapuzás, azonban majdnem minden megvizsgált gén magasabb indukciót mutatott, mint a vad típusban. A minden időpontban magasabb indukció azonban nem tette védettebbé ezeket a növényeket a nagy intenzitású UV-B sugárzással szemben. Ez arra utal, hogy egy rövid idejű, alacsony intenzitású UV-B függő génexpresszió és az azt követő flavonoid felhalmozás a nap egy rövid szakaszán elégséges a normális védelemhez a nagy intenzitású UV-B káros hatásaival szemben.

Összegezve az eredményeket megállapítható, hogy a növényi cirkadián óra beállítható UV-B fényel, és ebben az UVR8 és COP1 fehérjék kulcsfontosságúak. A HY5 és HYH transzkripciós faktorok nem komponensei a cirkadián óra fénybemenetének sem UV-B-ben sem látható fényben. A központi óra fényindukálható génjei UV-B indukálhatóak is, a cirkadián óra pedig kapuzza a legtöbb UV-B indukálható gén UV-B indukcióját, a nem cirkadián kifejeződésű génekét is beleértve. Az egyetlen általunk talált kivétel a *HY5* UV-B indukciója volt, mely nincsen cirkadián szabályozás alatt, szemben a gén vörös indukciójával, mely kapuzott. Az *uvr8* és *cop1* mutánsokban nem figyelhető meg egyáltalán UV-B génindukció, míg a *hy5 hyh* kétszeres mutánsban a központi óra génjeinek UV-B indukciója nem változott a vad típushoz képest. A vizsgált aritmiás mutánsokban nincs kapuzása az UV-B indukcióknak. A vizsgált gének indukciós szintje általánosan magasabb a mutáns növényekben a vad típushoz képest. A nagyobb indukció viszont nem ad számukra nagyobb védettséget a nagy intenzitású UV-B sugárzással szemben.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat anyagából megjelent publikáció:

Fehér B, Kozma-Bognár L, Kevei E, Hajdu A, Binkert M, Davis SJ, Schäfer E, Ulm R, Nagy F.: Functional interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE LOCUS 8-controlled UV-B signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 2011, **67**(1):37-48.

Egyéb publikációk:

Kiss I., Kesserű P., **Fehér B.**, Bihari Z. és Polyák B.: Co-immobilization of symbiotic green algae and *Saccharomyces unispora*. *Symbiosis* 2002, **32**(3): 247-256.

Kevei, E., Gyula, P., Hall, A., Kozma-Bognar, L., Kim, W.-Y., Erikson, M.E., Toth, R., Hanano, S., **Fehér, B.**, Southern, M.M., Bastow, R.M., Viczian, A., Hibberd, V., Davis, S.J., Somers., D.E., Nagy,F. and Millar, A.J: Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of ZEITLUPE. *Plant Physiology* 2006, **140**(3): 933-945.

James C.W. Locke, Laszlo Kozma-Bognar, Peter Gould, **Balazs Fehér**, Eva Kevei, Ferenc Nagy, Matthew S. Turner, Anthony Hall, Andrew J. Millar: Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology* 2006, **2**:59.

Kevei E, Gyula P, **Fehér B**, Tóth R, Viczián A, Kircher S, Rea D, Dorjgotov D, Schäfer E, Millar AJ, Kozma-Bognár L, Nagy F.: *Arabidopsis thaliana* circadian clock is Regulated by the small GTPase LIP1. *Current Biology* 2007, **17**(17):1456-1464.

Safrany J, Haasz V, Mate Z, Ciolfi A, **Fehér B**, Oravec A, Stec A, Dallmann G, Morelli G, Ulm R, Nagy F.: Identification of a novel cis-regulatory element for UV-B induced transcription in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 2008, **54**(3):402-414.