

Új cirkadián óra mutánsok azonosítása és részletes molekuláris szintű jellemzése lúdfűben (*Arabidopsis thaliana*)

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette:

Nyári Dóra Vivien

Témavezetők:

Dr. Kozma-Bognár László

Dr. Hajdu Anita

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológia Intézet

Foto- és Kronobiológiai Csoport

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Genetikai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2025

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	5
Bevezetés.....	8
Szakirodalmi áttekintés	10
A cirkadián ritmus mérése és paraméterei:.....	11
A cirkadián óra	14
A cirkadián óra részei	16
A bemeneti rész.....	16
Központi oszcillátor	18
Kimeneti rész	20
A cirkadián óra molekuláris modellje növényekben	23
Az ubikvitin és szerepe a növényi órában	24
A növényi ubp12/13 és egyéb homológok	28
Egyéb organizmusok cirkadián óra modelljei	29
Emlős cirkadián óra	29
A cirkadián óra humán vonatkozásai	30
Az emlős cirkadián óra és az ubikvitin	32
Az UBP12 egyéb szerepei növényben.....	33
A metil-jázmonsav	33
Hiszton 2A (H2A).....	36
Célkitűzések	39
Anyagok és módszerek.....	40
Anyagok.....	40
Növényi táptalajok:	40
Bakteriális táptalajok:	40
Élesztő táptalajok	40
Oldatok.....	41
Módszerek	43
Miniprep.....	43
Midiprep.....	43
Sterilezés, szélesztés	43
Agrobaktériumos transzformálás	44
Élesztő transzformálás	44

Növényi DNS izolálás.....	44
Növényi fehérje izolálás	45
Fehérjeszint meghatározás Western blot módszerrel.....	45
Kompetens sejt készítés	46
Baktérium transzformálás	46
Indukált bakteriális fehérjeexpresszió.....	46
Növényi RNS izolálás.....	46
mRNS-szint meghatározása valós idejű PCR-ral	46
Lumineszcencia mérés élő növényben.....	47
Antibiotikumok.....	47
Keresztezés	48
Hipokotil hossz mérés.....	49
Virágzás	49
Eredmények.....	50
Új óramutánsok felfedezése.....	50
Az <i>rs24</i>	52
Az <i>rs24</i> mutációt nem befolyásolja a fény minősége vagy mennyisége	52
A mutáció által érintett gén megtalálása	53
A mutáció nincs befolyással a mRNS szintjére	54
Az aminosavcsere nem okozott fehérjeszintbeli változást.....	56
A tesztelő keresztezésből F1 populáció létrehozása és a mutáció recesszív voltának bizonyítása	57
Cirkadián órán kívüli UBP12 targetek.....	58
Az <i>ubp12-3</i> mutáció hatása a virágzásra	61
Az <i>ubp12-3</i> mutáció hatása a hipokotilra	63
UBP12 homológok.....	64
Az UBP12 szerepe a növényi órában.....	65
Foszforiláció	67
Az <i>uhd1</i>	69
Élesztő kéthibrid rendszer.....	74
Hiperszenzitív fotomorfogenikus válasz fény mennyiségétől és minőségétől függően ...	76
Az <i>uhd1-1</i> mutáció hatása a virágzásra	77
Eredmények értékelése.....	79
Összefoglaló	85

Summary	91
Idézett közlemények.....	97
Saját közlemények.....	106
Köszönetnyilvánítás	107

Rövidítések jegyzéke

3×HA	A hemagglutinin-elem háromszor ismételve
35S	karfiolmozaik vírus 35S génjének promótere
ABA	Abszcizinsav
AD	(Activating Domain) a GAL4 átírási fehérje átírást serkentő eleme
AM	(Arabidopsis Medium) növényi táptalaj
BD	(Binding Domain) a GAL4 átírási fehérje DNS-kötő eleme
bHLH	bázikus Helix-Loop-Helix fehérjeelem
BLAST	(Basic Local Alignment Tool)
BRASS	(Biological Rhythms Analysis Software System)
CCD	(charge coupled device)
CTAB	Cetil-trimetil-ammónium bromid
DTT	Ditiotreitol
EE	evening element
EMS	Etil-metán szulfonát
FRC	(fluence rate curve) egy jelleg függése a fényerősségtől
IPTG	Izopropil-β-D-galakto-piranozid
LB	(Luria-Bertani) baktérium táptalaj
LOV	(light/oxygen/voltage) fehérjeelem
L ⁻ W ⁻	Leucin- és triptofán hiányos tápoldat
L ⁻ W ⁻ H ⁻ A ⁻	Leucin-, triptofán-, hisztidin- és alanin hiányos tápoldat
MATH domén	Meprin and TRAF Homology domén
MeJA	Metil-jázmonsav
MS	(Murashige-Skoog) növényi táptalaj
Pfr A	fitokróm távoli vörös fényt elnyelő alakja
Pr A	fitokróm vörös fényt elnyelő alakja
PRC	(phase response curve) az óra beállíthatóságát az idő függvényében leíró görbe
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
Tris·HCl	Trisz (hidroximetil) amino-metán klorid sója
UV-A/B	Ultraibolya-A/B sugárzás
YEB	(Yeast Beef) Agrobacterium táptalaj
YPAD	(Yeast Pepton Adenin Dextrose) élesztő táptala

A dolgozatban előforduló gének listája

CAB2	(AT1G29910) CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 2
CCA1	(AT2G46830) CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
CCR2	(AT2G21660) COLD CIRCADIAN CLOCK REGULATED 2
CO	(AT5G15840) CONSTANS
CRY1	(AT4G08920) CRYPTOCHROME 1
CRY2	(AT1G04400) CRYPTOCHROME 2
ELF3	(AT2G25930) EARLY FLOWERING 3
ELF4	(AT2G40080) EARLY FLOWERING 4
FLC	(AT5G10140) FLOWERING LOCUS C
FT	(AT1G65480) FLOWERING LOCUS T
GFP	GREEN FLUORESCENS PROTEIN
GI	(AT1G22770) GIGANTEA
HIPP22	(AT1G22990) HEAVY METAL ASSOCIATED ISOPRENYLATED PLANT PROTEIN 22
JAZ1	(AT1G19180) JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1
LHY	(AT1G01060) LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LNK1	(AT5G64170) NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED GENE 1
LNK2	(AT3G54500) NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED GENE 2
LUC	szentjánosbogár luciferáz
LUX	(AT3G46640) LUX ARRHYTHMO
MAF5	(AT5G65080) MADS AFFECTING FLOWERING 5
MYC2	(AT1G32640) BASIC HELIX-LOOP-HELIX (bHLH) DNA-BINDING SUPERFAMILY PROTEIN
PDF1.2	(AT5G44420) PLANT DEFENSIN 1.2
PHYA	(AT1G09570) PHYTOCHROME A
PHYB	(AT2G18790) PHYTOCHROME B
PHYC	(AT5G35840) PHYTOCHROME C
PHYD	(AT4G16250) PHYTOCHROME D
PHYE	(AT4G18130) PHYTOCHROME E
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1

PRR1	(AT5G61380) = TOC1, PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1
PRR3	(AT5G60100) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 3
PRR5	(AT5G24470) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5
PRR7	(AT5G02810) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7
PRR9	(AT2G46790) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9
TOC1	(AT5G61380) TIMING OF CAB EXPRESSION
TUB2	(AT5G62690) TUBULIN 2
TUB3	(AT5G62700) TUBULIN 3
UBP12	(AT5G06600) UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 12
UBP13	(AT3G11910) UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 13
UHD1	(AT5G64430) UNHURRIED 1
YFP	YELLOW FLUORESCENT PROTEIN
ZTL	(AT5G57360) ZEITLUPE

Bevezetés

A Földön jelenleg körülbelül 382000¹ növény faj van, melyről tudunk és ennek döntő többsége fotoszintézist folytat saját energiaszükségleteinek ellátására. A fotoszintézis egy olyan alapvető folyamat a növények számára, melynek hiánya rövid időn belül a növény pusztulásához vezet.

² A Napból érkező sugárzás, a számunkra is érzékelhető fény szolgáltatja az energiát a fotoszintézishez. A fényt nem csak energiaforrásként lehet hasznosítani, hanem sok élőlény számára külső környezeti jelként szolgál – ahogyan a hőmérséklet is – mely hozzájárulhat biológiai folyamatok szabályozásához.^{3,4} A hőmérsékletnek és a fény erejének növekedésében-csökkenésében megfigyelhetők ismétlődések, van egy ritmusuk.⁵ Legfeltűnőbb jelenség, melyet mi is tapasztalunk, hogy mindkettő esetében beszélhetünk egy napi körforgásról, ez a napi vagy idegen szóval cirkadián (circa=körülbelül, diem=nap)⁶ ritmus. A nap felkeltével a fényerő és a hőmérséklet is emelkedni kezd, majd a nap végére mindkettő értéke fokozatosan lecsökken. Az élő szervezetek számára létfontosságú kérdés a környezethez való alkalmazkodás, melyet ez a napi ritmus valamennyire képes megkönnyíteni. Ennek oka, hogy a legtöbb élő szervezet rendelkezik egy olyan belső rendszerrel, mely a napi ritmusnak megfelelően dolgozik. Ezt a belső, szervezett rendszert nevezzük cirkadián órának, mely segít felkészíteni a szervezetet, hogy előre készen álljanak majd a soron következő biokémiai lépésekre és az élettani folyamatok megfelelő időpontra legyenek időzítve. A cirkadián óra egy óragénekből és órafehérjékből álló rendszer, ezek rendezett egymásra való oda-vissza hatása alakítja ki azt a belső ritmust, mely szerint az adott organizmus élettani folyamatai időzítve vannak.⁷

A cirkadián óra három fő részből áll össze, a bemeneti részből, mely a fotoreceptorokat foglalja magában, amik érzékelik a környezetből érkező információkat. Emellett van az órának egy központi oszcillátor része, mely az óragének és –fehérjék összetett hálózatából áll, valamint egy kimeneti részt is tartalmaz, mely a számunkra is érzékelhető fiziológiai folyamatokat, óra által kontrollált gének kifejeződését jelenti. A fotoreceptorok funkcióját is már sokan kutatták, ahogyan a központi oszcillátor részeit is, azonban bonyolultsága miatt még mindig sok az ismeretlen terület. Ezért is fontos, hogy ezt a területet kutassuk és általa több információt nyerjünk a növényi óráról, vagy akár más rendszertani csoportok órájáról is, hiszen az eltérő fejlődési ágak ellenére sokszor akadnak homológiát mutató területek.

Ahhoz, hogy az órát jobban meg tudjuk ismerni, a legegyszerűbb módszer az alkotórészeinek feltárására a mutánsszűrés, mely folyamat során az egyedi mutációval rendelkező növényeket

vizsgáljuk és kiválasztjuk azokat, melyeknél az óra működésében találunk valamilyen eltérést a vad típushoz képest. Doktori értekezésemben két ilyen mutáns vonalról esik majd szó, egyikben az *UBP12* (*UBIQUITIN PROTEASE 12*) gént, másikban az *UHD1* (*UNHURRIED 1*) gént azonosítottuk, mint a cirkadián óra alkotóeleme. Ugyan az *UBP12*-ről már írtak le korábban jellemzést és ismerjük a nullmutáns fenotípusait ⁸, azonban az általunk megismert mutáns egy aminosavcsere következtében mutatott a nullmutánséhoz hasonló viselkedést, ami feltételezi, hogy az érintett aminosav nagy mértékű hatással lehet a génre vagy a fehérjére. Emellett az *UBP12* egy olyan proteáz, mely ubikvitin molekulákat hasít le más fehérjékről, ezáltal befolyásolva azoknak működését, féléletidejét ^{9,10}. Ez az ubikvitin proteáz ezeken felül ugyanúgy szerepel más organizmusokban – köztük emlősben vagy rovarban –, mint növényben¹¹ Ezáltal feltételezhető, hogy vannak olyan ubikvitin proteázok, melyek homológiát mutatnak különböző élőlényekben és ezek alapján a hasonló mutációt szenvedő géntermékek funkciója ugyanolyan irányban változhat.

Dolgozatomban tehát egyrészt az *UBP12* gén és fehérje jellemzése lesz a fő téma. Másik részét az *UHD1* teszi ki, mely egy új gén, amit a cirkadián órához kapcsolunk. Korábbi munkánk alapján már biztosan tudtuk, hogy ez a gén felelős az általunk észlelt mutáns növény fenotípusáért, további feladatunk az lett, hogy kiderítsük, milyen szerepe van az órában, illetve ha rendelkezik egyéb funkciókkal, akkor azoknak a meghatározása.

Szakirodalmi áttekintés

A környezetünk fontos szerepet játszik minden egyes élőlény életében, ezért érdemes hozzá alkalmazkodni.^{3,12} Ez egyrészt azért fontos, mert vannak külső, káros környezeti hatások, melyekkel szemben ellenállóbbá válik az adott organizmus, amennyiben képes az alkalmazkodásra. Az élőlények a számukra szükséges táplálékokat, tápanyagokat a környezetből tudják felvenni és hasznosítani, ezért elkerülhetetlen ezekkel a hatásokkal való szembesülés.¹³ Másrészt azért is esszenciális a környezethez való igazodás, mert egyes környezeti változásokban megfigyelhető bizonyos ciklusosság, ez lehet például éves vagy akár napi szinten is. Amennyiben ennek az ismétlődésnek megfelelően előre felkészül az élőlény, saját részére képes energiát is megtakarítani, hiszen a ciklusosságot követve, képes prediktálni például a nap folyamán következő eseményt, arra fel tud készülni molekuláris szinten és nem szükséges egy élettani folyamatot állandóan fenntartani.^{5,14}

Erre a molekuláris szinten történő előre felkészülésre egy kitűnő példa az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) és a káposztalepke hernyójának esete. Megfigyelték, hogy a káposztalepke hernyója a nappal közepén mutatja a legintenzívebb táplálkozást, valamint emellett kimutatták, hogy a lúdfűben is ebben az időben éri el kifejeződési szintjének maximumát a jázmonsav - ami egy növényi hormon és többek között mechanikai sérülésre vagy rovarrágásra adott válaszokban vesz részt a növény védelmében.¹⁵ Így a növény herbivórok elleni védekezése hatékonyabb, mert felkészül előre a szöveteket érhető károsodásra. Kutatók kísérleteket végeztek, amikor is ellentétesen váltakozó napokon tartották a hernyókat és a növényeket. Mindez azt jelenti röviden, hogy abban az időben mikor a növények számára éjszakai körülmények voltak beállítva, a hernyónak nappal és fordítva. Pár napon keresztül ilyen körülmények között tartották a növényeket és a hernyókat, utána egy helyre tették őket. A növény ebben a kísérleti rendszerben nem termelt elég jázmonsavat a hernyók legintenzívebb táplálkozásának idején, tehát nem volt, ami megfékezze a hernyókat, a kártétel sokkal nagyobb lett.¹⁵

Más stresszhatásokra is képes előre „felkészülni” a növény, így egy másik példa erre az UV-B sugárzásra adott válasz.¹⁶ Károsító hatása ugyanis nem csak patogéneknek vagy a növényevőknek lehet, hanem akár a fénynek is. A fény energiaforrást jelent a növények számára, azonban egy bizonyos mennyiség felett károsító hatása lehet a fényelnyelő rendszerekre illetve magára a DNS-re is.¹⁷ Legfőképpen az UV-B (280-315 nm) sugárzás bír ilyen hatással. Egy belső mechanizmus segít abban, hogy még napfelkelte előtt elkezdjenek termelődni olyan fényvédő molekulák, mint például az antocianidok¹⁸. A fényen kívül vannak

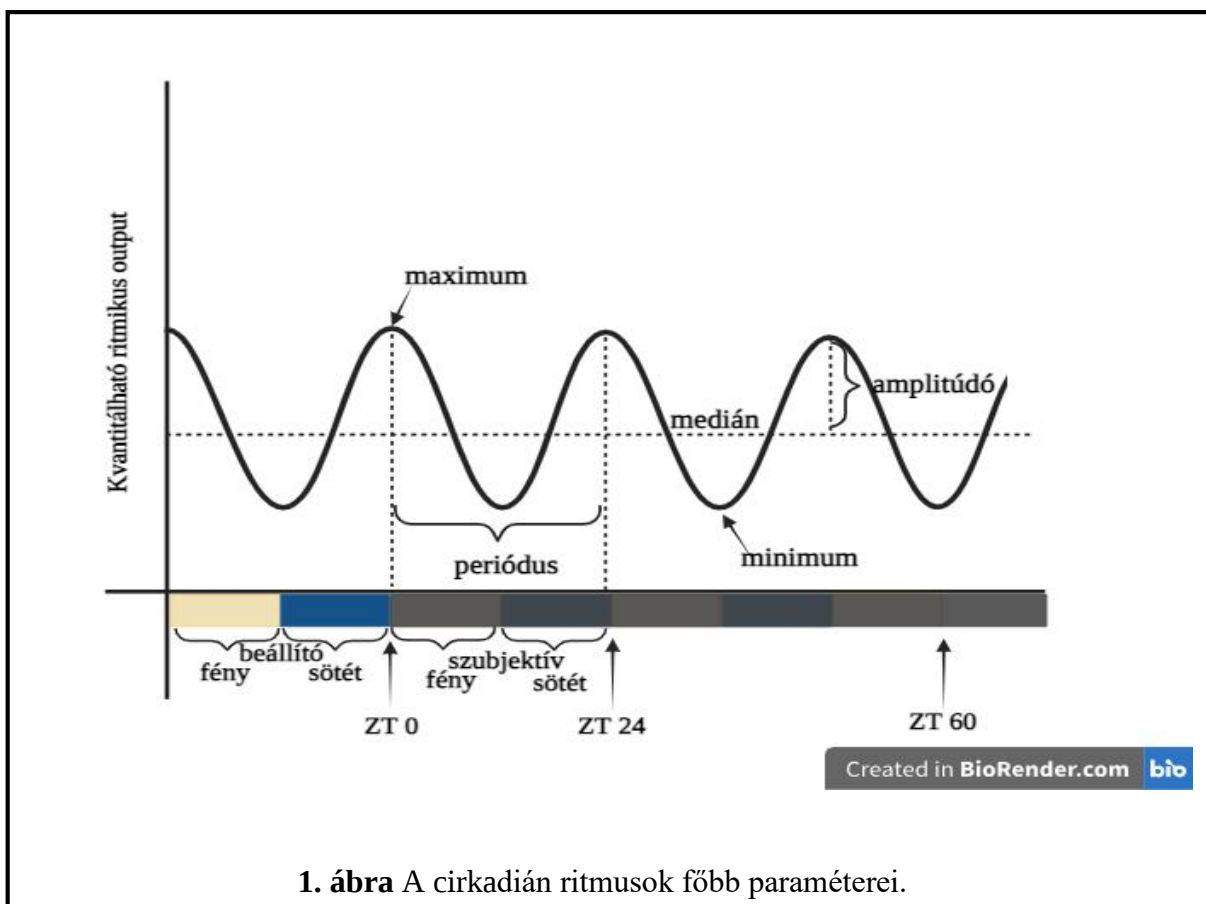
a környezetben előforduló további stresszhatások is, mint a szárazság vagy magas sótartalmú talajok. Azért, hogy ezeknek a káros hatása csökkenjen, a szükséges molekulák termelődéséért felelős enzimek génjeinek kifejeződése is az antocianidokhoz hasonlóan szabályozódik, így segítve az alkalmazkodást.^{19,20}

Amint azt a példákon keresztül is láthatjuk, az alkalmazkodás akkor a leghatékonyabb, ha valamilyen ritmus által szabályozott folyamat és nem csak egy egyszeri alkalom. Ahogy korábban említettem, a ritmusok különféle hosszúságúak lehetnek. Gondoljunk csak például a szívverésünkre, mely egy percen belül többször játszódik le ugyanúgy. Vagy az alvásra, melynek során mélyalvási és REM szakaszok többször váltják egymást. Ugyanilyen rövid a vizelet ürítés, bélműködés, hőháztartás vagy a hormon szabályozás ²¹, illetve nem emlős példát tekintve, az *ecetmuslica* hímjének nászéneke, melynek frekvenciája szintén rövidebb ismétlődéseket mutat. ²² Ezeket a napnál rövidebb ritmusokat ultradián ritmusoknak nevezzük a latin *ultra diem* (=napon túli) szavak után. Ezzel szemben az infradián ritmusok, latinul *infra diem* (=egy nap alatti) periódusa egy napnál hosszabb idő alatt játszódik le. Ide tartozik a főemlősök menstruációs ciklusa, ami körülbelül 28-32 nap, a téli álmot alvó élőlények hibernációja, az állatok vándorlása, vagy az évszakok változása. ^{23,24} Az ultra- és infradián ritmusok mellett, a számunkra is leginkább megfigyelhető a cirkadián ritmus, mely a latin *circa diem* (=körülbelül napi^{6,25} szavakból ered. A legtöbb élőlény rendelkezik valamilyen cirkadián ritmusú életfolyamattal. Találunk rá példát állatok, növények, gombák és cianobaktériumok esetében is. A cirkadián ritmus fontossága így vitathatatlan. A napi ritmust már a távoli múltban megfigyelték az emberek. Időszámításunk előtt 4. századból írásos feljegyzések is vannak, melyben Theophrastus ír egy növény cirkadián ritmusáról. ^{26,27})

A cirkadián ritmus mérése és paraméterei:

Ahhoz, hogy két különböző cirkadián ritmust össze tudjunk hasonlítani, szükséges alapvető fogalmakat, órával kapcsolatos tulajdonságokat mérhető módon meghatározni, hogy a rendszer egységes, összevethető legyen. A kísérletek során egy kvantitatív jelleg kifejeződését vizsgáljuk az idő függvényében, mely egy hullámmintázatot ad. ^{28,29} (1. ábra) A cirkadián ritmusok leggyakrabban szinusz hullámokkal rajzolhatók le és matematikai fogalmak segítségével értelmezhetőek. ³⁰ Leggyakoribb fogalom, melyet mi is használunk és általában ez alapján hasonlítunk össze két vonalat először, az a **periódus**. A periódus egy jelleg ismétlődési gyakoriságát jelenti. Amennyiben az idő függvényében ábrázoljuk egy tulajdonság kifejeződését, akkor a periódust a görbe két azonos pontjának (pl. az egymást követő

maximumoknak vagy minimumoknak) időbeli távolsága adja meg. Egy szabadon futó periódus hossza általában 20-28 óra.^{3,7} Ha a két pont közötti távolság csökken, akkor a periódus rövidebb, ha a távolság növekszik, akkor a periódus hosszabb lesz. Mivel semmi sem lehet tökéletes, a mérések során, a mért periódusok hossza nem szokott mindig pontosan egyforma lenni, emiatt a gyakorlatban átlagot számolunk és így adjuk meg egy periódus hosszát. Egy perióduson belül találkozunk minimum és maximum értékekkel. Ha a kettő közötti különbség felét nézzük, azt megegyezés szerint **amplitúdó**nak nevezzük. Az amplitúdó is nőhet vagy csökkenhet a ritmus során, de ha nem süllyed egy meghatározott minimumérték alá, akkor a



ritmus erőteljesnek mondható. Ellenkező esetben aritmicitásról beszélünk. Következő használt paraméter a cirkadián ritmusok esetében a **fázis**. A ritmus fázisa azt mutatja meg, hogy az adott cirkadián cikluson belül hol tartózkodik a rendszer. Ezt a hullám maximumának és egy viszonyítási időpontnak (általában az utolsó beállító fényszakasz kezdetének) a különbségeként adjuk meg. Legfontosabb fázispontok a minimum és maximum értékek.

Munkánk során *Arabidopsis thaliana* csíranövények cirkadián óráját vizsgáltuk. A kísérleteink során több növény ritmusát mérjük egyszerre és a különböző genotípusok ritmusát több egyed átlagából határozzuk meg. A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében érdemes valamivel beállítani, szinkronba hozni a különböző egyedek ritmusát, ezt pedig fény vagy hőmérséklet

ciklusok alkalmazásával tehetjük meg.^{31,32} Leggyakrabban pár napon (~1 hét) keresztül alkalmazott 12 óra (h) fény- 12 óra (h) sötét (12L/12D) ciklusokkal állítjuk be a ritmust, mindezzel imitálva a természetes környezeti viszonyokat, az objektív nappalokat és éjszakákat.²⁸ Ezt nevezzük beállító szakasznak. Ezt követően állandó körülmények közé helyezzük a növényeket – folyamatos fény vagy folyamatos sötét – innentől nem használunk külső beállító jeleket, hanem hagyjuk az órát szabadon futni. Ha nincs olyan külső hatás, ami beállító jelként szolgálna, akkor ebben az esetben a belső óra a saját ritmusa alapján fog működni, vagyis szabadon fog futni. Természetesen a továbbiakban is megfigyelhető lesz egy olyan ritmusosság, amely emlékeztet egy nappal és egy éjszaka jelenlétére (hacsak nem aritmiás mutánsokat vizsgálunk), ezeket azonban már szubjektív nappalnak vagy szubjektív éjjelnek nevezzük.⁵ Találkozhatunk még a **ZT** (zeitgeber time) kifejezéssel is.³⁰ A ZT betűk után álló számok órákban kifejezve mutatják meg, hogy ahhoz a ponthoz képest mikor volt az az utolsó környezeti jel, ami az órát be tudta állítani. Például ZT0 a 12L/12D ciklusokkal beállított kísérleteknél az utolsó sötét-fény átmenetet jelöli.

Ahhoz, hogy egy biológiai ritmust cirkadián ritmusnak nevezhessünk, annak az alábbi feltételeknek kell, hogy megfeleljen.^{33,34}:

- 1. Endogén, szabadon futó periódussal rendelkezik és ez a periódus 24 órás (egy teljes ritmikus ciklus időtartama, egy jelenség ismétlődési gyakorisága):** Állandó körülmények között is fennmarad a ritmus 24 órás periódusa, mint például folyamatos fényben vagy folyamatos sötétben. Amennyiben egy ritmus nem marad fenn állandó körülmények között, úgy az nem mondható endogénnek. A ritmusnak konstans körülmények között lezajló egy periódusát nevezzük szabadon futó periódusnak, jele: τ (tau). A szabadon futás segítségével kizárjuk a külső környezeti hatásokat.
- 2. A ritmus beállítható.** A ritmust egy külső stimulussal (fény vagy hőmérséklet) be lehet állítani, egy bizonyos pontról újra lehet indítani. Ezt a külső hatást, amivel beállítjuk az órát, Zeitgebernek vagyis időadónak nevezzük. Legkiválóbb példa erre, amit mi magunk is tapasztalhatunk, az az időzónákon való átutazás, mikor a nappalok és éjszakák ideje el van valamilyen irányba tolódva az eddig megszokottakhoz képest. Ekkor érzékeljük a jet lag jelenséget, melyhez pár nap alatt alkalmazkodni tudunk a fény órát beállító képességének köszönhetően.
- 3. A ritmus sebessége nem hőmérsékletfüggő.** Ez azt jelenti, hogy különböző hőmérsékleti skálákon is megmarad a cirkadián periodicitás. Az élőlények elég

széles hőmérsékleti skálán élnek, amik hatással lehetnek a molekuláris folyamatok kinetikájára. Annak érdekében, hogy a megfelelő ritmus megmaradjon és a belső óra tartani tudja a közel 24 órás periódust, szükséges, hogy az óra független legyen a hőmérséklettől. A Q10-es érték az a mérőszám, ami megadja, hogy egy adott kémiai folyamat sebessége hányszorosára gyorsul fel 10 C -kal magasabb hőmérsékleten. A kémiai reakciók többségénél ez az érték 2-4, a cirkadián rendszereknél viszont csak 0.8-1.2, vagyis hőmérséklet-kompenzáltak.

Kísérleteink során számos különböző vonalat vizsgálunk. Modellorganizmusunk, a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) eredetét tekintve több helyről származik, de mind egyazon fajba tartoznak, csak más az ökotípusuk. ³⁵ Az ökotípus egy fajon belül olyan genetikai sajátosságokat mutató populáció, ami alkalmazkodott egy adott környezeti feltételhez, termőhelyhez. ³⁶ *Arabidopsis thaliana* esetében négy fő ökotípus létezik, amit kutatásban használnak: Col-0, Ws-2, Ler-0 és Cvi-0. ³⁷ Mostani kísérleteink során Col-0 (Columbia) és Ws-2 (Wassilewskija) ökotípusokat használunk.

A cirkadián óra

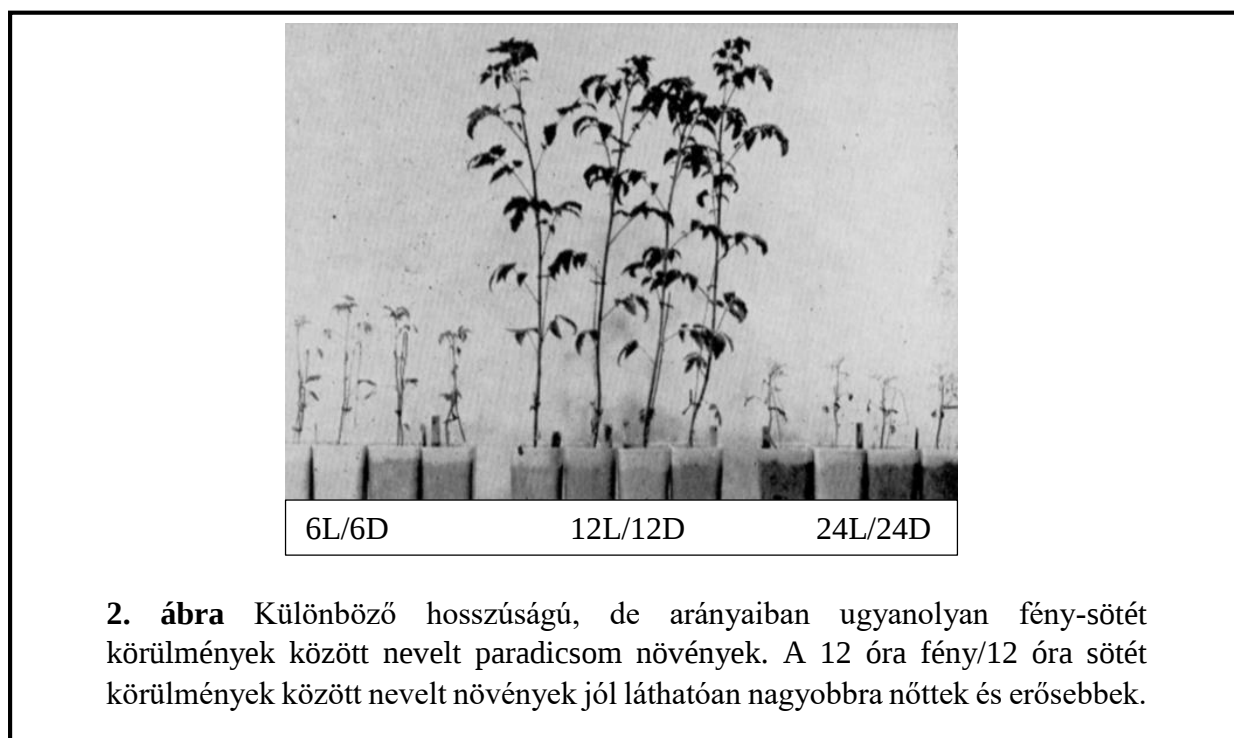
A cirkadián ritmusokat valaminek fenn kell tartania, mert maguktól nem tudnának fennmaradni, ezért felelősek az élőlényekben a cirkadián órák. A cirkadián óra két fő dolog miatt fontos elsősorban: egyik, mert tartja a ritmust állandó környezeti körülmények között is, illetve mert az adott szervezetnek előre jelzi a környezeti tényezők megváltozásának időpontját, ami így arra fel tud készülni. ^{3,12,13,30} Mindezek mellett fontos megemlíteni, hogy az óra működését is felülírhatja egy hirtelen környezeti inger, melyre szükséges a gyors, adekvát válaszadás, amit akkor az óra nem gátol. Emberek körében például ilyen az ébresztőóra hatása. Azonban szükséges gátolnia bizonyos ingereket, hogy ne okozzon csúszást a cirkadián ritmusban vagy egy hamis beállítást (szikrázó napsütés/borús ég). ^{5,38} Mindenesetre tudjuk, hogy a cirkadián óra fontos, mert bizonyítottan növeli az élőlények életképességét. ^{39,40}

Végeztek kísérletet többek között cianobaktériumokkal, ⁴¹) hogy megfigyeljék, hogy a külső és belső idő összehangolása vajon tényleg szükséges a megfelelő fejlődéshez vagy mégsem befolyásolja az alkalmazkodást. Ehhez több különböző cirkadián periódusú baktériumkolóniát mértek különböző hosszúságú napokon. A kísérleteket elvégezték hosszú periódusú (28 óra), és rövid periódusú (20 óra) cianobaktérium törzseken. A kétféle periódusú baktérium törzset rövid (T20) illetve hosszú napos (T28) körülmények között nevelték, ahol 10 óra fény/ 10 óra sötét vagy 14 óra fény/14 óra sötét váltotta egymást. Viszonylag rövid időn belül azt tapasztalták,

hogy rövid napon a rövid periódusú törzsek, hosszú napos körülmények között pedig a hosszú periódusú törzsek maradtak többségében életben, majd szaporodtak fel.⁴¹ *Arabidopsis*-ban is elvégeztek hasonló kísérletet és azt kapták, hogy a rövid periódusú *timing of cab expression 1 (toc1)* mutáns felülmúlja a hosszú periódusú *zeitlupe (ztl)* mutánst, amikor mindkét genotípust rövid nappali/éjszakai ciklusban nevelik³⁹. A fokozott túlélési esély mellett a *toc1* növények több klorofillt termelnek, több szénket kötnek meg és nagyobb a biomassza produkciójuk. Ezzel szemben amikor mindkét növényt hosszú nappalon nevelik, a *ztl* mutánsok felülmúlják a *toc1* versenytársakat. Tehát a megfelelő naphosszhoz való alkalmazkodás tényleg evolúciós előnnyel jár.

Főként növények, illetve fotoszintetizáló szervezetek körében azonban még felmerülhet egy másik kérdés. Ezek az organizmusok a fényt használják, mint energiaforrás, tehát feltehetjük a kérdést, hogy több fény vagy akár állandó fényviszonyok mellett a növekedésük, fejlődésük vajon fokozottabb lenne vagy sem. Ennek felderítésére paradicsomon végeztek kísérleteket⁴². Egyik kísérlet során a növényeket állandó fényviszonyok és állandó hőmérsékleti körülmények között nevelték. Eredményül azt kapták, hogy ilyen viszonyok között nevelve a növények nem fejlődtek rendesen és terméshozamuk is gyengébb volt. Azonban abban az esetben, amikor az állandó hőmérséklet megmaradt, de mellette a fényviszonyokat periodikusan változtatták, ahogy az nappal és éjszaka történne, a növények szépen fejlődtek.

Másik kísérleti elrendezésben a növényeket különböző időtartamú fény-sötét ciklusok mellett nevelték (2. ábra). Volt 12, 24 illetve 48 órás ciklus, melyekben a megvilágítás és a sötétben

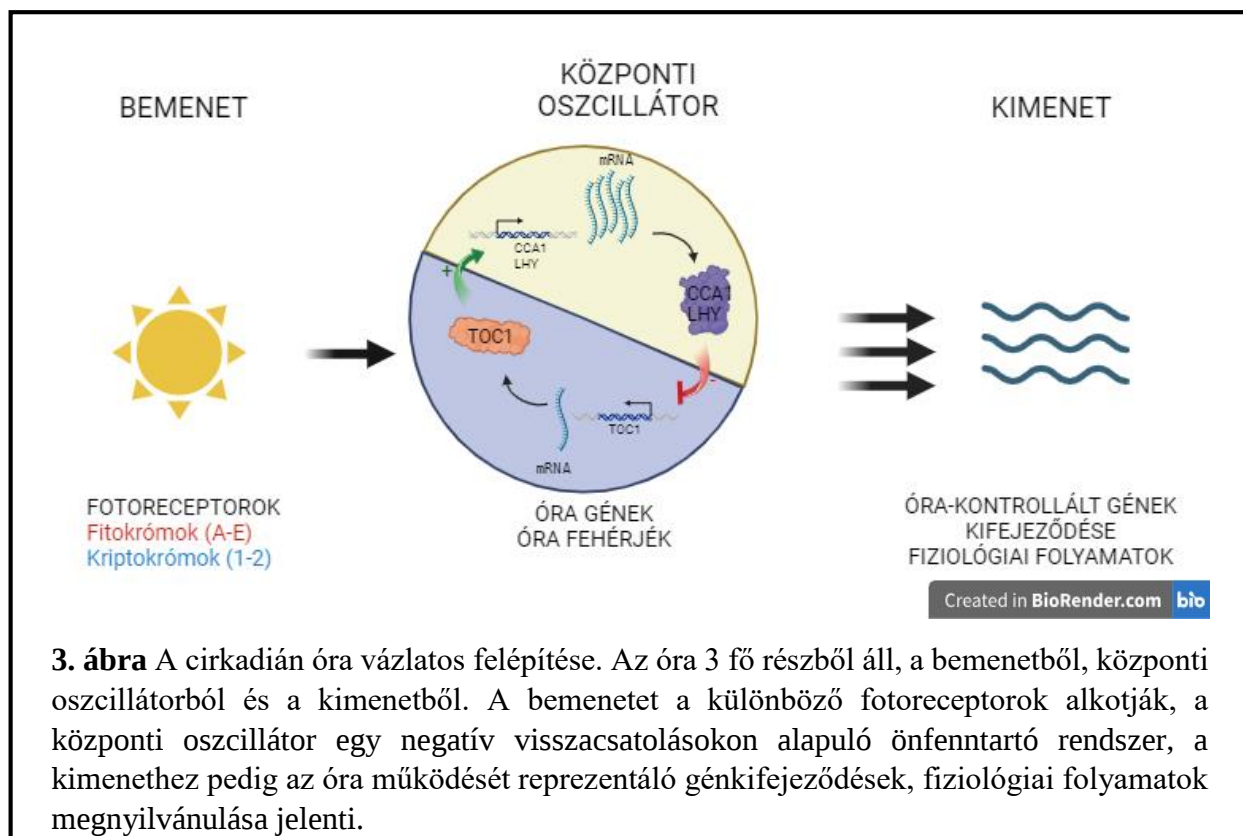


tartott órák aránya mindig ugyanolyan volt.⁴³ Ez azt jelenti, hogy rendre 6 óra fény: 6 óra sötét; 12 óra fény: 12 óra sötét illetve 24 óra fény: 24 óra sötét körülmény volt. A megvilágítás időtartama hosszú távon mindhárom esetben egyforma. Az eredmények azt mutatták, hogy legjobban a 12L/12D körülményen nevelt növények esetében volt megfigyelhető a legnagyobb mértékű fejlődés.³⁹ Mindez valószínűleg annak köszönhető, hogy az evolúció/földtörténeti idő folyamán a közel 24 órás belső ritmus rögzült, így ahhoz képes leginkább alkalmazkodni ilyen rövid idő alatt.⁴⁴ Mindezekből láthatjuk tehát, hogy a belső óra fontos szerepet tölt be és számos biológiai előnnyel jár a külső és belső ritmusok szinkronizálása.

A cirkadián óra részei

A bemeneti rész

A cirkadián óra három fő részből épül fel. Első ezek közül a bemeneti rész, majd következik a központi oszcillátor, végül az utolsó rész a kimenet (3. ábra). Először is kezdjük a bemenettel. Ez az a rész, mely leginkább kapcsolatban áll a külvilággal, hiszen a fény (vagy a hőmérséklet) beállító tulajdonsága itt jut érvényre a különböző fotoreceptorokon (vagy hőreceptorokon) keresztül.^{3,12} A fotoreceptorok eddigi tudásunk szerint 3 hullámhossztartományban érzékelik a fényt a növényekben: UV, kék, vörös.⁴ Az UV-B fotoreceptorok az UV-B sugárzást érzékelik, a kriptokrómok és fototropinok a kék fényt és az UV-A-t, illetve rajtuk kívül még



3. ábra A cirkadián óra vázlatos felépítése. Az óra 3 fő részből áll, a bemenetből, központi oszcillátorból és a kimenetből. A bemenetet a különböző fotoreceptorok alkotják, a központi oszcillátor egy negatív visszacsatolásokon alapuló önfenntartó rendszer, a kimenethez pedig az óra működését reprezentáló génkifejeződések, fiziológiai folyamatok megnyilvánulása jelenti.

vannak a fitokrómok, amik a vörös és távoli vörös fényt képesek érzékelni.^{45,46} A fotoreceptorok azonban nem csak azért felelnek, hogy a fényt érzékeljék, hanem azt, mint külső környezeti jelet, továbbítják is különféle módokon a központi oszcillátor irányába.

A növények fő fotoreceptorai a fitokrómok, ezek segítségével képes a fény érzékelésére. Arabidopsisban egy 5 tagból álló géncsaládról van szó, ide tartozik a PHYTOCHROME, A, B, C, D és E (PHYA, PHYB, PHYC, PHYL, PHYE).⁴⁵ Felépítésüket tekintve 120-129 kDa móltömegű fehérjék, az apoproteinjük a citoplazmában termelődik. Prosztetikus csoportjuk, a fikocianobilin, autokatalitikusan kötődik az apoproteinhez, melynek következtében létrejön a komplex holoprotein. A fitokrómoknál a holoproteinek homodimerekké állnak össze, így funkcióképesek. Mindkét alkotóegysége rendelkezik N-terminális és C-terminális doménnekkel, melyek összekapcsolásában egy proteolitikusan érzékeny csukló régió vesz részt. Ennek a csukló régióknak köszönhetően két konformere van a fitokrómoknak. Ez a két forma biológiai aktivitásában és spektroszkópiai tulajdonságaiban is eltér egymástól. Az egyik forma az úgynevezett Pr forma, melynek abszorpciós maximuma 660 nm, a vörös tartományban van. Ez a forma sötétben képződik és biológiailag inaktív. Vörös fény hatására megváltozik a fitokróm szerkezete, így felszínre kerülhetnek funkcionális részek. Így alakul ki a másik konformer, melyet Pfr formának nevezünk. Ez már biológiailag aktív forma, abszorpciós maximuma pedig 730 nm-en van, vagyis a távoli vörös tartományban. Ennek megfelelően erre a hullámhosszra a legérzékenyebb és a távoli vörös fénnel való megvilágítás hatással is van rá, konformációja megváltozik, visszaalakul Pr formává. A növényeket érő fény azonban sosem monokromatikus, illetve a két forma abszorpciós spektrumai is átfednek tehát a $Pr \rightleftharpoons Pfr$ átalakulás folyamatos. Ezt az oda-vissza való átalakulást nevezzük fotokonverzióknak, mely a fitokrómok működési alapja.^{46,47} A folyamatos fény hatására egy idő után egyensúlyi állapot, a fotostacionárius állapot alakul ki a két forma között, attól függően, hogy milyen a fény hullámhossz-összetétele.⁴⁴⁸ A növények a zöld fényt képesek legkevésbé hasznosítani, mivel ennek nagy része visszaverődik a levelekről. A kék és a vörös fény azonban kiemelt szereppel bír, mert mikor a fény áthalad a növény részein, az ebbe a hullámhossz-tartományba eső fény nagy része abszorbeálódik a fotoszintetikus apparátus által. A távoli vörös fény a növény szövetein javarészt áthatol, így a vörös és távoli vörös fény arányából, illetve az általuk kialakított Pr és Pfr formák arányából a növény képes információt nyerni a környezetéről.⁴⁹ A távoli vörös fény nagyobb aránya ugyanis vetélytársak jelenlétéről, egy fényhiányosabb helyről adhat információt, ami ellen ezeknek a kromofór formák arányának meghatározásából

származó adatok segítségével különböző jelátviteli útvonalak aktiválódhatnak, melyek segítik a növény árnyékkerülését, a kompetítorok felülmúlását. ⁴

Központi oszcillátor

A központi oszcillátor az a rész, mely tulajdonképpen az óra „lelkének” tekinthető. Az oszcillátorba a fény- és hőreceptorok irányából érkezik jel. ^{3,12} Azt azonban fontos tisztázni, hogy a bemenet irányából érkező jelek pusztán az óra beállítását szolgálják, a központi oszcillátor működése ettől független működési egység. ^{7,50,51} A környezeti jelek segítségével viszont szinkronba kerülhet a külvilággal, mely számos adaptív előnnyel szolgál. A központi oszcillátor egy önfenntartó rendszer. Működését a különböző óragének és óra fehérjék egymásra való pozitív vagy negatív visszacsatolása tartja fenn. ^{3,12,13} Ezt a legkönnyebben úgy lehet elmagyarázni, hogy egy pozitív faktor hat egy másik, negatív faktorra, serkenti annak transzkripcióját. A negatív faktor egyre nagyobb mennyiségben íródik át, egyre több fehérje termelődik belőle. Ezek a fehérjék pedig visszahatva közvetett vagy közvetlen módon a pozitív faktor termelődését gátolják. Így a pozitív faktor mennyisége csökkenni fog, ami majd a negatív faktor csökkenését eredményezi és egy idő után megszünteti a pozitív faktor termelődésének gátlását. Természetesen nem ennyire egyszerű folyamatról van szó, ez csak az alap működési elv elmagyarázására szolgál, de az elmondható, hogy az oszcilláció létrehozásához kell legalább egy serkentő és egy gátló folyamatból álló negatív visszacsatolás ^{33,52-54} és ezen felül a visszahatás késleltetése. A valódi működése a központi oszcillátornak ennél természetesen jóval több óragén és órafehérje egymásra hatásán alapul, ^{55,56} sok ezek közül pedig még számunkra is ismeretlen, de felfedezésük folyamatosan zajlik világszerte. Óragének alatt azokat a géneket tartjuk számon, melyekről a transzkripció során képződő (óra)fehérjék nélkülözhetetlen komponensek a cirkadián ritmus fenntartásához és szabályozásához. Egy-egy fehérje termelődése pozitívan vagy negatívan szabályozhatja más fehérjék génjeinek transzkripcióját, akár magának a fehérjének az inaktiválódását okozhatja - elősegítheti annak működését, illetve fehérje-fehérje kölcsönhatások létrejöttét eredményezheti. ⁵⁰ Ezeken kívül még jellemző erre az oszcillációra, hogy a hatás-ellenhatás ideje többféle lehet. Vannak gyorsan vagy lassan lecsengő, illetve szabályosan vagy szabálytalanul oszcilláló körök, de lényegét tekintve az egész folyamat késleltetésen alapul. Ezzel a precíz késleltetési folyamattal lehet jól időzíteni a megfelelő napszakra a molekuláris mechanizmusokat és elérni a 24 h-s periódushosszat. A központi oszcillátor nem egy, hanem több ilyen visszacsatolási hurokból tevődik össze és ezeknek az együttes működése alakítja majd ki a teljes egészet. Azt, hogy melyik elem tekinthető az oszcillátor részének, azt több szempont alapján szokták

megállapítani.⁵⁵ Elsősorban a legáltalánosabb feltétele, hogy az érintett elem hiányában a ritmus valamiképpen megváltozik vagy teljesen megszűnik. Másik jellemző lehet pedig, hogy fény vagy egyéb beállítójelek hatására az érintett elem szintje vagy működése valamilyen módon megváltozik, és ez kihat az órának a működésére is.

A központi oszcillátorba a bemenet felől érkezik a beállító jel, azonban az oszcillátor vissza is hat a bemenet irányába.^{3,30,57} Gondoljunk csak bele, mekkora szükség lehet arra, hogy egy jelet, ami segít az időzítésben, a folyamatok elindításában vagy éppen leállításában, valamilyen módon lehessen szabályozni? Ahogy arról már röviden szó esett, szükséges az olyan ingerek gátlása, melyek nem hordoznak ténylegesen szükséges információkat az óra beállításához. Ilyen például a nappali perióduson belül az árnyék, a verőfényes napsütés vagy a beborult égbolt. Ha minden egyes ilyen fényváltozásra reagálna az óra, akkor nem tudná betölteni a funkcióját, hiszen az időzítés, a következő lépésre való felkészítés a feladata. Abban az esetben, ha például a délelőtti folyamán hirtelen beborul az ég és ezt az este kezdetének érzékelné, úgy az életfolyamatok is elkezdenének az estéhez alkalmazkodni. Azonban ha elmúlik a borulás, kisüt a nap, akkor mindez az éjjelre való felkészülés hiábavalóvá válik és a növényünk hátrányba került. A bemeneti jel gátlása, más szóval kapuzása (gating) ennek a kiküszöbölését segíti. Segítségével az óra be tudja tölteni a funkcióját és fenntartja a napi ritmust illetve erőteljesebbé teszi a ciklust. A bemeneti jel kapuzása összefoglalva tehát azt jelenti, hogy az óra csak bizonyos időszakokban és megfelelő erősségű jelekre reagál.³⁰

A reakció többféle lehet, attól függően, hogy milyen fázisban éri az órát az inger. Mesterséges körülmények között az éjszaka közepén tudjuk elérni a legnagyobb fáziscsúszást, már egyetlen fényimpulzus alkalmazásával is. A nappal folyamán többnyire érzéketlen a beállító jelekre, a hajnal és az alkonyat tájékán a legérzékenyebb a külső környezetből érkező ingerekre.⁵⁸ Mindez azért lehetséges, mert hajnalban és napnyugtakor történik a legnagyobb fényváltozás (fényerősség és hullámhossz szempontjából is). Az éjszaka során így arra készül az óra, hogy felkeljen a nap és ennek következtében, ha egy fényimpulzust kap, akkor az óra úgy érzékeli, hogy hajnalodik, tehát elkezdődhet a nappal, ami molekuláris szinten be is következik a növényben. Ilyenkor azt tapasztaljuk, hogy az óra ritmusát figyelve, történik benne egy ugrás, a megvilágítás időpontjától kezdődik el az a szakasz, ami egyébként később következne be, tehát az óra siet.³⁸ Attól függően, hogy mikor éri a fényimpulzus az órát – az óra melyik fázisban van – az óra késése és sietése is előfordulhat.⁵⁹ Kísérleti körülményeink között, mikor az óra szabadon futó ritmusát figyeljük meg, akkor annak periódushossza függ az éppen alkalmazott fény erősségétől és minőségétől is. Nagyon jó kísérleti módszer ez arra, hogy kizárhassuk vele

a bemeneti oldali fény szabályozási zavarokat, hiszen ha a periódus fényfüggően változik, biztosak lehetünk abban, hogy nem az oszcillátorban történt eltérés. Növényekben a periódus hossza a fény erősségével fordítottan arányos, tehát minél erősebb a fény, annál rövidebb lesz a periódus (Aschoff-szabály) ⁶⁰. Ha a periódus fényerősségtől való függését akarjuk vizsgálni, akkor azonos módon beállított (ugyanolyan fény-sötét ciklusok azonos fényerősségen) növényeket eltérő erősségű állandó fénybe helyezünk általában egy hétre, majd a kialakuló periódust az alkalmazott fényerősség tízes alapú logaritmusának függvényében ábrázoljuk. Az így kapott görbe a fényerősség-függés görbe vagy angolul Fluence Rate Curve (FRC). ⁵⁸

Kimeneti rész

Az óra harmadik része a kimeneti elem (output). A kimenet jelenti a központi oszcillátor által generált ritmus következtében szabályosan működő élettani folyamatokat, ezeket általában mi is tapasztalhatjuk, megfigyelhetjük. Ezek azok az élettani folyamatok, amiket például régen megfigyelve a tudósok elkezdhettek azon gondolkodni, hogy talán létezik egy, a szervezetben is működő belső óra, ami irányítja ezeket, mint például az alvás-ébrenlét ⁶¹, táplálkozás, növények esetén pedig például a levélmozgás, gázcsere nyílások állapota, csírázás, stb., de természetesen a molekuláris szintű ritmikus oszcilláció is ide tartozik. ^{3,39} A központi oszcillátor szabályozása alatt termelődött óragének ezeknek az élettani folyamatoknak az elindításához és működéséhez, a szükséges elemek kifejeződéséhez szükségesek.

A bemenet és a központi oszcillátor között visszacsatolás van, ami szabályozza, hogy az óra megfelelően tudjon működni és feleslegesen az enyhébb ingerekre ne történjen válaszadás. A kimenetnek ezzel szemben a növényeknél nincs közvetlen visszahatása az órára, összességében itt már csak megfigyeljük az óra működését és annak eredményét.

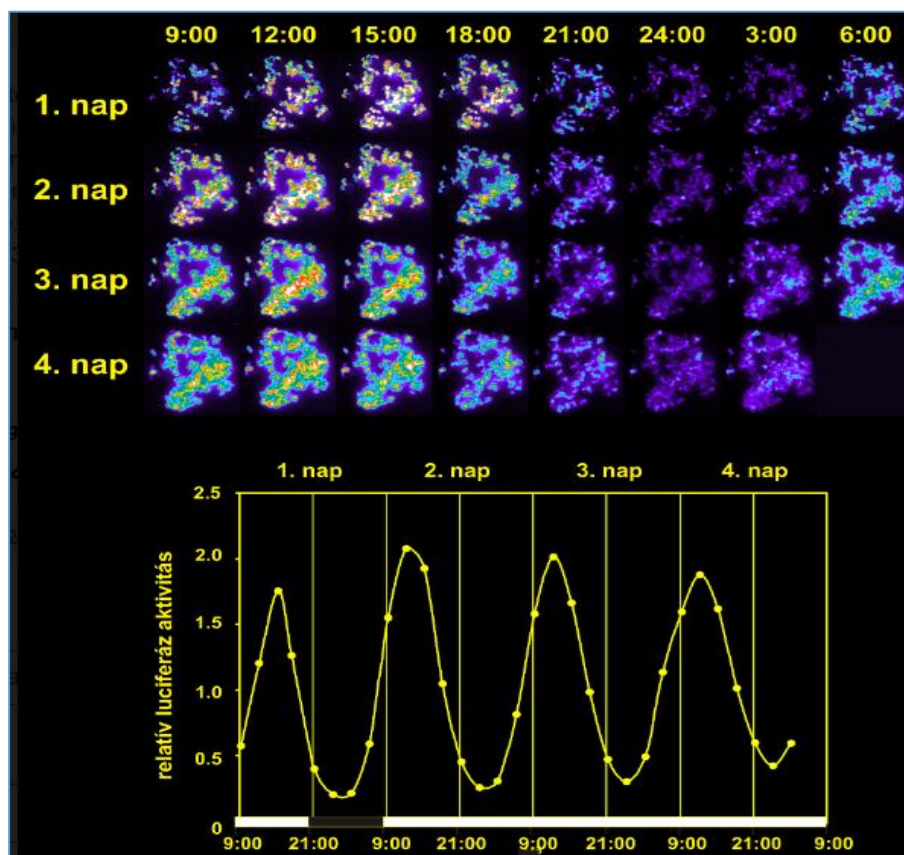
A génkifejeződéstől a viselkedésig minden szinten megfigyelhető cirkadián szabályozás. Növényekben a gének 89 %-ának kifejeződése valamilyen napszakos mintázat szerint változik, ebből pedig 30% állandó körülmények között is ritmikus oszcillációt mutat. ³² Érdekességképpen cianobaktériumok esetében ez 100%, ott minden gén cirkadián szabályozás alatt áll. ⁶² Egy növény életciklusa során a cirkadián óra számos folyamat irányításában részt vesz már egészen a csírázás kezdetétől, amint víz éri a nyugalomban lévő magot. Salomé és munkatársai ⁶³ kimutatták, hogy beáztatott magokat sötétben nevelve, már az áztatás utáni második naptól megfigyelhető egy cirkadián mintázat az óragének kifejeződésében. Számos növény csírázásának elősegítésében fontos a cirkadián óra, hiszen a nappalhosszúság mérésével segít azt megfelelő évszakra időzíteni. A csírázás mellett szabályozza a hipokotil (szik alatti

szár) megnyúlását is, de a növény további élete során egyéb folyamatokban is részt vesz. A hipokotil megnyúlása nem egyforma a nap folyamán.⁶⁴ Általában a kora esti órákban (legyen tényleges vagy névleges este fényviszonyoktól függően) a leggyorsabb és a késő esti, éjszakai órákban a leglassabb. Szabályozza az óra a levelek állását is. Ezt 1729-ben egy francia tudós, Jean-Jacques d'Ortous de Mairan⁴⁰ is megfigyelte. A *Mimosa pudica* levelei állandó sötét körülmények között is napi ritmikus mozgást mutatnak. Ennek célja, hogy a nappal során szinte vízszintes állásban kiterülő levelek a fény felé forduljanak - ezt nevezzük pozitív heliotropizmusnak - ezzel növelve a fotoszintézis hatékonyságát és optimalizálják a hőháztartásukat. Ennek megfelelően a cirkadián óra segíti a növényt az árnyékkerülésben is, hiszen a fényforrásért folyó küzdelem az egyik legfontosabb a növények életében. Érzékelik a vörös és távoli vörös fényt, illetve ezek arányát is, így ezzel képesek felmérni azt is, hogy szomszédjukban mennyi növény van, ami kitakarhatja előlük a fényt, ösztönözve így arra, hogy sejtmegnyúlással, növekedéssel több fényhez jusson majd.^{4,49,65} Egyes növényekben nem csak ez a gyors válasz jelenik meg, hanem egy lassabb is, ennek köszönhetően vannak olyan növények, melyek kora tavasszal virágoznak, mellyel reprodukciós előnyre tesznek szert a többi növényvel szemben. Az órához eljut a bemeneti elemek felől érkező információ a vörös/távoli vörös fény arányáról, ami a közvetlen napfényben mértékhez képest kisebb lesz. Az óra ezt a jelet kapuzni fogja, így az árnyékkerülés a kora esti órákban lesz majd a legintenzívebb. A cirkadián óra még számos életfolyamat szabályzásában részt vesz, akár sejtszinten is, mint például a gázcsere nyitottsági állapota, de ezen kívül még szabályozza a szénmegkötés fázisait, a virágzást, vagy egyéb stresszválaszok időbeli szervezését, mint a jázmonsav felhalmozódását a kártevők ellen vagy az antocianidok termelését a káros sugárzások elleni védelemben, mint azt korábban láttuk.^{13,15,16}

A cirkadián óra sejtszintű működését úgy tudjuk nyomon követni a legkönnyebben, hogy egy óra által szabályzott gén promóterével szabályozzuk a szentjánosbogár (*Photinus pyralis*) luciferáz (LUC) génjét⁵⁸, mely a luciferáz riporter rendszer alapja (4. ábra). Ennek segítségével könnyen meghatározható, hogy egy fehérje milyen időben milyen szinten fejeződik ki. A transzkripció során az adott génünkkel együtt luciferáz enzim is keletkezik, melynek szubsztrátja a luciferin, amit külsőleg adunk a rendszerhez. A luciferáz enzim a természetben is előfordul számos különböző organizmusban, ezt nevezzük biolumineszcenciának. A szentjánosbogár is így képes világítani a potrohával a sötétben és a kutatók ennek az élőlénynek a segítségével tudták kifejleszteni ezt a rendszert.

Ez a módszer több előnnyel is rendelkezik.⁶⁶ Egyik előny, hogy valós időben tudjuk mérni a génexpressziót^{31,67}, mert azt hamarosan követi egy fénykibocsátás a luciferin enzim jelenlétében és ezt a luciferáz reakciót kísérő fénykibocsátást tudjuk detektálni luminométerrel. Amellett, hogy valós időben mérhetjük, az is fontos előnye, hogy viszonylag *in vivo*, élő növényben tudjuk detektálni. A transzkripció szint meghatározása eddig hosszadalmas munka volt, hiszen a hozzá szükséges RNS-t és fehérjét fel kellett tární, majd qPCR-t vagy western blot analízist készíteni belőle. Ráadásul a feltárásból származó eredményeknél megmarad az esély, hogy egy másik növény egyedben már jelentősen különböző expressziós szinteket kapunk. A mérések a luciferáz riporter rendszer esetében ráadásul megismételhetők, hiszen a növények életben maradnak.

Emellett a luciferáz riporter rendszer segítségével több napon keresztül egyszerűen mérhető a növény cirkadián ritmusa, a gének kifejeződése.



4. ábra Növények 4 napon keresztül mért lumineszcenciája. A növények luciferáz riporter gént hordoznak, lumineszcenciájuk CCD kamerával lett mérve, melyet Metamorph program segítségével színezték meg.

A luciferáz riporter rendszer használatával ezenfelül a radioaktív reagensek használatát is ki tudják zárni, vagy legalább csökkenteni, hiszen sokáig ezt a módszert alkalmazták a valós idejű

megfigyelésekhez. A módszer számos területen is alkalmazható, mint például génexpressziós analízisnél, promóter szerkezet analízisnél, SNP analízisnél, antivirális kutatásban és terápiában, gyógyszer kutatásban vagy citotoxicitás mérésben.^{3,68}

A cirkadián óra molekuláris modellje növényekben

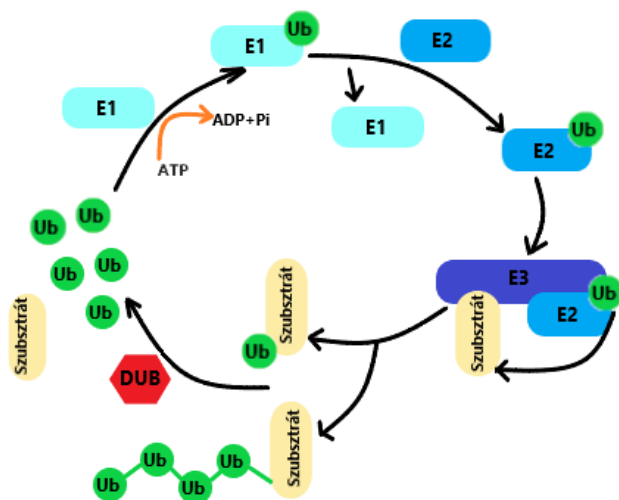
Ahogy arról röviden korábban is szót ejtettem, a növényi cirkadián órák egyéb más organizmusok cirkadián óráihoz hasonlóan transzkripciós/transzlációs szabályozó hurkokból rendeződik össze.³ Az egyik óraalkotó elem, amit elsőként fedeztek fel, a CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) és a vele homológ LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY). Mindkettő MYB-motívumot tartalmazó DNS-kötő fehérjét kódol, a reggeli órákban az első aktív elemek, transzkripciójuk ilyenkor éri el a csúcst.⁶⁹ Transzkripciójukat egy PSEUDO RESPONSE-REGULATOR (PRR) nevű géncsalád és termékei represszálják később a nap folyamán, leginkább az esti órákban. Ebbe a családba tartozik a PRR9, PRR7, PRR5, PRR3 és a PRR1, ennek másik neve TIMING OF CAB EXPRESSION (TOC1).⁷⁰ Korábban úgy gondolták, hogy a TOC1 aktiváló hatással van CCA1/LHY génekre, de Andrew Millar és munkatársai kimutatták, hogy inkább represszor funkcióval rendelkezik. A PSEUDO RESPONSE REGULATOR géncsalád tagjai egymás után cirkadián ritmus szerint fejeződnek ki. Kifejeződésük maximumát egymás után 2-3 órás késésekkel érik el a nap folyamán, a sort pedig elsőként PRR9 kezdi a nap reggelén és utolsóként TOC1 éri el a maximális kifejeződést az este folyamán. Tehát CCA1 és LHY mRNS szintjének maximumai a nap kezdetén, a reggeli órákban figyelhető meg, ezzel szemben a TOC1 mRNS szintje este éri el a legmagasabb szintet.⁷¹ Mindez annak köszönhető, hogy CCA1/LHY gátló hatással van a PRR géncsalád termékeire, így a TOC1-re is. A nap folyamán viszont a CCA1 és LHY foszforilálódnak, majd ennek köszönhetően lebontják őket más fehérjék. Ennek következtében a fehérje szintjük folyamatosan csökken, ami elősegíti a TOC1 transzkripcióját, hiszen annak gátlása folyamatosan kisebb lesz. Így tud az este során a TOC1 fehérje szintje megemelkedni és elérni a maximumot, azonban az este végére a szintje már lecsökken. Mivel a TOC1 és a PRR család többi tagja is gátolja CCA1/LHY transzkripcióját, így az este végére lecsökkenő TOC1 szint már nincs gátló hatással a CCA1/LHY génekre, a transzkripciós szintjük emelkedhet és ez a hurok bezárul.^{7,72}

Ezekon felül CCA1/LHY kettőse a TOC1-gyel egyetemben gátolja másik gének, a LUX ARRHYTMO (LUX), EARLY FLOWERING 3 (ELF3) és EARLY FLOWERING 4 (ELF4) transzkripcióját. Ennek a három génnek a terméke közösen alkotja az úgynevezett esti

komplexet (EC), ⁷³ ami késő este és kora reggel gátolja a PRR gének transzkripcióját, ezzel újra aktiválva a CCA1/LHY duót és így új ciklus tud kezdődni. Mindemellett még van egy pozitív karnak nevezett része az órának, ami egy újabb szabályzó hurok jelenlétét jelenti. ⁷⁴ Az ebben résztvevő gének is MYB-szerű transzkripciós faktorok, név szerint: NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED 1 és 2 (LNK1, LNK2), illetve a REVEILLE8 (RVE8). Ez a három gén közvetlen aktiválja a PRR5 és TOC 1 transzkripcióját, valamint az EC génjeit is. A TOC1 és más PRR-ek viszont gátolják az *RVE8* kifejeződését, ezáltal egy újabb visszacsatolási hurokkal bővül a növényekben lévő óragénhálózat. Bár az elsődleges oszcilláció transzkripciós szinten jön létre, az óra tényleges periódushosszát erősen befolyásolja az órafehérjék metabolizmusa. ^{7,75–77}

Az ubikvitin és szerepe a növényi órában

Az említett rendszeren túl a cirkadián hálózat szabályozásában a poszttranszlációs szabályozás több típusa is kritikus szerepet játszik. Ahhoz, hogy egy fehérje ne halmozódjon fel a termelődése után, a féleletidejének rövidnek kell lennie, különben nem alakulna ki ritmikussága és nem lehetne cirkadián szabályzás alatt. ^{7,51} A poszttranszlációs módosítások többek között ezt is szabályozzák a fehérjestabilizáció és degradáció révén. Degradációs szempontból az egyik fontos útvonal az ubikvitináció. Az ubikvitin egy kisméretű (8,6 kDa; 76 aminosav)



5 ábra. Az ubikvitináció és a deubikvitináció körforgása. E1 az aktiváló enzim, mely E2 ubikvitin konjugáló enzimhez szállítja az ubikvitin molekulákat. E3 az ubikvitin ligáz, ami az E2 enzimről a szubsztrát fehérjére helyezi át az ubikvitint. Az ubikvitinált szubsztrátokról később megfelelő jelek hatására a deubikvitinázok fogják eltávolítani az ubikvitint vagy ennek elmaradásánál a szubsztrát lebontásra kerül. A deubikvitinázok (DUB) hatására az ubikvitin molekulák és a szubsztrát fehérje is felszabadul, a folyamat akár kezdődhet előlről megfelelő szignálok hatására.

szabályozó fehérje, amely az eukarióta szervezetek legtöbb szövetében megtalálható. Az ubikvitint Gideon Goldstein fedezte fel 1975-ben, majd az 1970-es évek végén és az 1980-as években más csoportokkal együtt tovább jellemezte. Ubikvitin molekula hozzáadását egy szubsztrátfehérjéhez ubikvitinációnak nevezzük.⁷⁸ Az ubikvitináció a 26S proteaszórában, illetve a lizoszórában történő lebontásra jelölheti ki a fehérjét. Természetesen a degradáción kívül szabályozza egyes fehérjék aktivitását, sejten belüli lokalizációját vagy fehérjék egymással való kölcsönhatását, mindezt attól függően, hogy milyen sztöchiometriában és konfigurációban és melyik aminosavhoz kötődik az ubikvitin (poliubikvitin láncok kialakítása).^{79,80,79} Az ubikvitináció három fő lépése az aktiváció, konjugáció és ligáció, melyeket külön enzimek végeznek el.^{82,83} Az E1 enzim az aktiváló enzim mely az ubikvitin C-terminális részét aktiválja ATP-függő úton. Az ubikvitin ezután az E2 ubikvitin-konjugáló enzimre kerül át majd végül az E3 ubikvitin ligáz katalizálja a szubsztrát fehérje egy lizin aminosavjával vagy N-terminális α -aminocsoportjával való kapcsolatot egy amidkötést létrehozva. (5. ábra)^{84,85}

Egy-egy fehérje sorsát maga a hozzákapcsolt ubikvitinlánc hosszúsága is képes befolyásolni. A négy vagy több ubikvitinből álló láncok, amelyeknél az egyik ubikvitin C-terminálisa a következő ubikvitin 48-as pozíciójű lizin (Lys48) aminosavához kapcsolódik, segítik a szubsztrát fehérje kötődését a 26S proteaszórához, ami a szubsztrát kis peptidekre történő lebontásával, emellett pedig az ubikvitinek újrahazsnosításával jár.^{86,87} Ezzel szemben a monoubikvitináció vagy a rövid, 63-as lizinhez (Lys63) kapcsolódó ubikvitinláncok fehérjéhez való kapcsolása eredményezheti például az endocitózist és a vakuólumba (lizoszórába) történő szállítást^{80,88–90}. Mivel az ubikvitináció hatására a fehérjék degradálódhatnak és szintjük nagy mértékben csökkenhet, ezért az ubikvitináció ellensúlyozására is szükség van, ezt feladatot pedig a deubikvitinázok látják el. A deubikvitináló enzimek vagy más néven ubikvitin proteázok a fehérjékhez tartozó proteázok nagy csoportját alkotják.^{83,91} Képesek a fehérjékről eltávolítani az ubikvitin molekulákat, a poliubikvitin láncokat pedig rövidíteni, ennek köszönhetően az ubikvitináció hatása, vagyis a fehérjék degradációja ellen dolgoznak. Emellett a deubikvitinázok felelősek azért is, hogy fenntartsanak egy állandó szintű szabad ubikvitin mennyiséget, ami bármikor felhasználható a proteolízishez. Ezenen felül a 26S proteaszóráról is eltávolítja és távol tartja a szabad ubikvitineket, hogy a kötőhely szabad maradjon a degradálandó fehérjék kikötéséhez.⁹² A deubikvitinázok két nagy osztályra bonthatóak, a cisztein proteázokra és a metalloproteázokra. A cisztein proteázok katalitikus diáddal (cisztein és hisztidin) vagy triáddal (cisztein, hisztidin és aszparagin vagy aszparaginsav) rendelkező proteázok, melyek az ubikvitin molekula és a szubsztrát fehérje közti amidkötés hidrolízisét

katalizálják. A metalloproteázok olyan proteázok, melyek a katalitikus mechanizmus ellátása érdekében valamilyen fémmel rendelkeznek. A deubikvitinázok esetében ez a fém a cink, amit hisztidin, aszparagin és szerin aminosavakkal kerül az izopeptid kötések közelébe ahol vízmolekula aktiválásával azokat bontja.⁹³ A cisztein proteázokhoz hat alcsalád tartozik: UBP (ubiquitin-specific protease) alcsalád; OTU (ovarian tumor) alcsalád; MJD (Machado-Josephin domain) alcsalád; UCH (ubiquitin C-terminal hydrolase) alcsalád; valamint a MINDY és ZUFSP családok. A metalloproteázok közé pedig egy alcsalád tartozik, a JAMM/MPN+ (Jab1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal+) proteázok alcsaládja.⁹⁴ Ezek a különböző deubikvitinázok számos különböző targettel rendelkeznek és egy proteáznak több különböző target fehérjeje lehet, ahogyan egy fehérjéről akár több proteáz is eltávolíthat ubikvitin molekulákat, de előfordulnak kifejezetten specifikus kapcsolatok is. Az ubikvitináció-deubikvitináció folyamatos körforgása és a fenntartott egyensúly nagy szerepet tölt be nem csak az általános élettani funkciók és a protein homeosztázis fenntartásában, hanem a cirkadián óra működésében is.^{10,11}

Láthattuk tehát, hogy mennyire bonyolult folyamat az óra szabályozása, így van ez a növényi óra esetén is. A korábban leírt CCA1/LHY, PRR-ek és egyéb említett fehérjék egymásra gyakorolt hatása nem mutatja be a teljes képet. Egyes mRNS-ek stabilitását és transzlációját a cirkadián óra és a fény/hőmérséklet beállító jelek jelátviteli útja is befolyásolja, valamint számos órafehérje mennyisége poszttranszlációs szabályozás alatt áll. Az első növényi óramutánsok kutatása során fedezték fel azt a gént, ami a ZEITLUPE (ZTL) fehérjét kódolja.⁹⁵ A ZTL az F-box protein család tagjai közé tartozik. Feladata, hogy TOC1 és PRR5 fehérjék ubikvitinálódását elősegítse, a Cul1 alapú SCF ubikvitin ligáz komplex F-box komponenseként való működésével. A ZTL F-box proteinhez kapcsolódik Skip és Cullin-1 fehérjék és így keletkezik Skip-Cullin-F-box E3 ligáz komplex. Ligáz funkciója segítségével egyébként a termostabilitásban is közreműködik. A ZTL ezen kívül még rendelkezik egy LOV domén résszel, ami egy flavin mononukleotid-kötőhelyként szolgál, a kék fény érzékelés folyamatában.^{7,72,96} A ZTL fehérje kölcsönhat többek között TOC1 és PRR5 fehérjékkel és kijelöli őket a degradációra. A degradációért külön, specifikus proteaszómák felelősek és egyéb fehérje kölcsönhatások, illetve a fény, mint jel szabályozza a folyamatot. Maga a ZTL stabilitása szintén ubikvitinációtól függően változik. A HSP90 az egyik legáltalánosabb chaperon az eukariótákban, ami központi szerepet játszik a sejt folyamatainak szabályozásában, a proteosztázisban (magába foglalja a szintézist, foldingot, érést, stb.) - egyéb chaperonok mellett. A ZTL ennek a HSP90-nek az egyik szubsztrátja, de csak a GIGANTEA (GI) fehérjével

együttműködve. Ugyanis bár a ZTL transzkripciója folyamatos, a ZTL fehérje szintje önmagában nagy amplitúdóváltozásokkal oszcillál. A GI szükséges a ZTL stabilizálásához, így az éjszaka során fel tud halmozódni, aminek következtében szintje periodikus változást képes mutatni. A ZTL és a GI fehérjék a ZTL flavin-kötő LIGHT, OXYGEN OR VOLTAGE (LOV) doménjén keresztül hatnak kölcsön, ezt a kötést pedig erősen és specifikusan fokozza a kék fény. Nem csak GI stabilizálja ZTL-t, hanem fordítva is. Ahogy sötétedik, a sötét hatására a két fehérje ledisszociál egymásról és szintjük csökkenni kezd. Kimutatták, hogy LOV doménen belüli mutációk nagy mértékben csökkentik a ZTL-GI kölcsönhatásokat, ami erősen lecsökkent ZTL-szintekhez vezet. Mindezek mellett azt is kimutatták, hogy nem elég a GI-val és a HSP90-el való kölcsönhatás, a ZTL stabilizálásában részt vesz valószínűleg még egy elem. Ez a hiányzó láncszem pedig az UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 12 ÉS 13 (UBP12/13).^{96,97} Az UBP12 és 13 poliubikvitin láncokat tudnak lehasítani nem specifikus targetekről. Növényekben ez az egyik legnagyobb csoportja (USPs) a deubikvitinázoknak. Az említettek közül a GI az, ami az UBP12/13-mal kölcsönhat és oda tudja toborozni ezeket az enzimeket a ZTL fehérjéhez. Mindez azért szükséges, mert mint poszttranszlációs módosítás, az ubikvitin molekulák is kijelölhetik a fehérjét degradációra és az ubikvitin proteázok ezeket az ubikvitin molekulákat eltávolítják a target fehérjéről. Ennek köszönhető például, hogy a ZTL stabilizálódik és részt tud venni a cirkadián óra működésében.

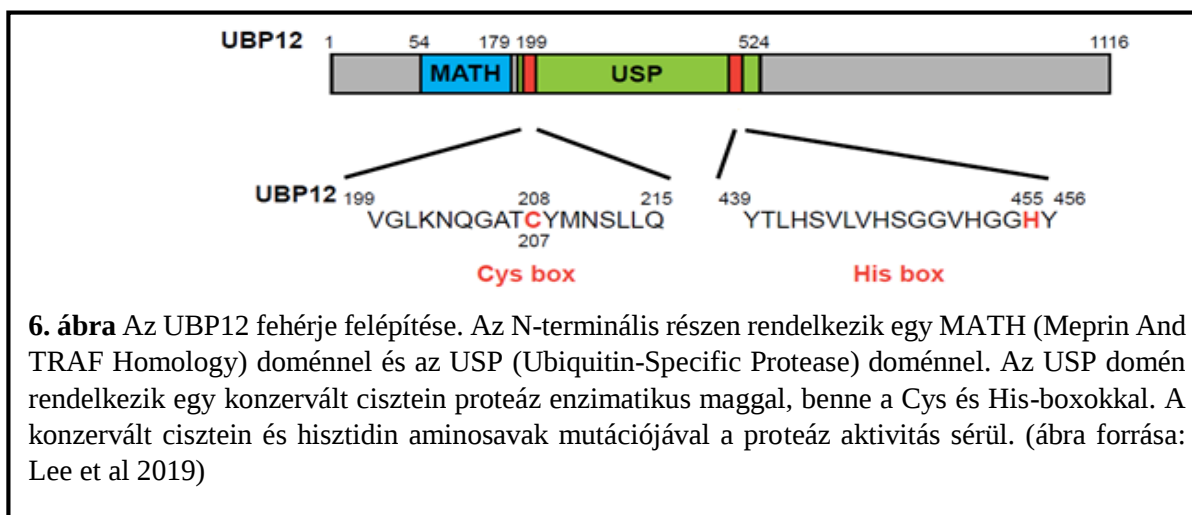
Annak megfelelően tehát, hogy az UBP12/13 stabilizálni képes ZTL-t, egy olyan mutánsban, ahol nincs ubikvitin proteáz, ott ZTL szintje csökkenni fog, ami végül rövid periódus fenotípus kialakulásához vezet, ahogy ezt ki is mutatták *ubp12* növényekben.⁹⁷ Lee és munkatársai kutatásuk során azt is kimutatták, hogy az *ubp12* és *ubp13* nullmutáns növényekben bár ZTL szintje csökken, a TOC1 szintje viszont növekszik, ami megfelelő oka lehet az ezekben a növényekben látható rövid periódushossznak. Mindemellett megfigyelték már *gi* nullmutáns növényekben, hogy a TOC1 szint itt is erőteljesen lecsökken, valamint ezen kívül a ZTL fehérje szintje is csökkent.⁷² Ebből arra következtethetünk, hogy a TOC1 fehérjeszint változása nem közvetlen következményei a ZTL szint változásának. Ugyanakkor azt is bemutatja, hogy az oszcillátoron belüli szabályozó hálózat komplexitása miatt a cirkadián fenotípusok nem jósolhatók meg pontosan egyetlen óraelem szintjének változásaiból.

Az említett két ubikvitin specifikus proteáz - UBP12 és UBP13 - többek között azért is speciálisak, mert cirkadián óra által szabályozottak, valamint több cirkadián órafehérjét szabályoznak valamilyen módon (pl. LHY, CCA1, ZTL, GI és TOC1). Továbbá regulálódnak még egyéb órához nem feltétlen kötődő, illetve annak finom beállítását segítő downstream

folyamatokat, mint a virágzás, hormon szabályzás (jázmonsav, szalicilsav, brasszinoszteroidok, abszcizinsav) vagy a fény kontrollált jelátviteli útvonalak. ⁹⁸.

A növényi ubp12/13 és egyéb homológok

Az Arabidopsis 27 UBP-génnel rendelkezik. Az összes UBP gén olyan fehérjét kódol, amelyek UBP domént tartalmaznak, két rövid, de jól konzervált motívummal, az úgynevezett



cisztein (Cys) és hisztidin (His) boxokkal. ^{93,99} Ezek rendelkeznek egy katalitikus aminosav triádnak nevezett résszel, (Cys a Cys boxban, His és Asp/Asn a His boxban) amik kritikusak a deubikvitinációhoz. Az UBP domének hossza 300 és 900 aminosav között változik; azonban néhány konzervált motívumot leszámítva összességében alacsony szekvencia konzerváltságot mutatnak, ennek ellenére konzervált háromdimenziós szerkezetük van. Úgy vélik, hogy az UBP-domének szekvenciabeli sokfélesége a szubsztrátfelismerés és a funkció specifikusságának sokféleségére utalhat. ^{62,82} A 27 gént 14 alcsaládba rendezték össze, egyikbe tartozik ezek közül az UB12 és az UB13. A két ubiquitin proteáz azért tartozik egy alcsaládba, mert közös tulajdonságuk, hogy rendelkeznek egy MATH (Meprin And TRAF Homology) fehérje interakciós doménnel, mely a receptorokhoz és egyéb fehérjékhez való kötődést szolgálja (5. ábra). Emellett rendelkeznek egy USP (UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASE) doménnel, egy konzervált cisztein proteáz enzimatis maggal, itt található a Cys-box és a His-box is (kimutatták, hogy a cisztein vagy hisztidin aminosavak mutációja megzavarja a proteáz deubikvitináló képességét).

Egyéb organizmusok cirkadián óra modelljei

A növényi óra egymásra épülő visszacsatolási körei jelentős hasonlóságot mutatnak a *Neurospora*, a *Drosophila* és az emlősök cirkadián működésében szerepet játszó transzkripciós és poszttranszlációs mechanizmusokkal.⁵² Noha az óra alkotó részei nem konzerváltak a növények, az állatok és a gombák között, az órának ezekben a különböző szervezetekben mégis hasonló felépítésű hálózatai vannak.^{100,101} Matematikai modellek alapján azt feltételezik, hogy ezek az összekapcsolt visszacsatolási hurkok növelik a hálózat robusztusságát a perturbációval szemben, ami talán megmagyarázza ezeket a hasonlóságokat.^{102,103}

Emlős cirkadián óra

Mint említettem, a növényi és az emlős cirkadián órák alkotóelemei merőben különböznek egymástól, viszont az alap molekuláris funkciókat ugyanúgy töltik be és nagyon hasonló szerveződések figyelhetők meg közöttük. Emlősök esetében jóval kevesebb fényérzékelő molekula van, mint növényekben és ezek a fényérzékelő molekulák is egy helyre, a retinára koncentrálnak, nem a teljes „testfelületet” fedik le, mint a növényeknél a fotoreceptorok.¹⁰⁴ Az emlős órát alkotó komponensek az alapján lettek izolálva, hogy a muslica óragénekkel milyen homológiát mutatnak.¹⁰⁰ Ezért számos azonos nevű komponens szerepel a kétféle órában, valamint szekvencia szinten is nagyon hasonlóak, azonban működésükben sokszor fontos eltérések vannak. Ahogy láthattuk már, az óra legalapvetőbb felépítése egy pozitív és egy negatív körből áll. Az emlős cirkadián órában a pozitív szerepeket a CIRCADIAN LOCOMOTOR OUTPUT CYCLE KAPUT (CLOCK) ÉS A BRAIN AND MUSCLE ARNT-LIKE PROTEIN 1 (BMAL1) transzkripciós faktorok töltik be. A két elem egymással összekapcsolódva képes bejutni a sejtmagba, majd ott egyéb gének transzkripcióját indukálják, mint például a *per* (*period*) vagy a *cry* (*cryptochrome*) génekét.^{105,106} Emlősöknél három egymáshoz hasonló *PER* (*PER1*, 2, 3) gén található, illetve 2 *CRY* gén (*CRY1*, 2). A CLOCK és BMAL1 fehérjék heterodimert alkotva képesek csak kötődni a sejtmagban található *PER* és *CRY* gének promóteréhez, ahol már a nappal elején képesek transzkripciót indukálni. A mRNS szintje ezt követően pár órával éri el a maximumot, aminek következtében a *PER* fehérjék mennyisége az éjszaka második felében lesz a legmagasabb. Ennek a késleltetésnek az okozója lehet még a *PER* fehérjék foszforilációja is. A foszforilációért a CASEIN KINASE 1 ϵ (CK1 ϵ) nevű kináz a felelős, ami így a *PER* fehérjék destabilizálását okozza.¹⁰⁷ Emellett természetesen van még másik szabályozó hurok is, mely segít a finomhangolásban. Ez a kör a *BMAL1*, tehát

a pozitív transzkripciós faktort kódoló gén ritmikus kifejeződését irányítja. Ennek a huroknak az alkotói pedig a *REV-ERB α* és a *ROR α* gének, illetve róluk íródó fehérjék, a REV-ERB α (reverse erythroblastosis virus proteins) és ROR (RAR-related orphan receptor) fehérjék.¹⁰⁸ A génekről átíródó fehérjék sejtmagi receptorfehérjék és transzkripciós faktor funkcióval rendelkeznek, így tudják szabályozni a *BMAL1* gén működését. Míg a REV-ERB fehérjék gátló hatást fejtenek ki a *BMAL1* expressziójára (főleg nappal és az éjszaka közepén), addig ROR fehérjék serkentik az éjszaka második felében. Ezek a fehérjék más géneket is célba vesznek az órán kívül, így ezek a nem óragének is cirkadián ritmust mutatnak. Ezeket nevezzük óra-kontrollált géneknek.^{109,110} A legtöbb sejtípus az emberi testben expresszál óragéneket, tehát megvan a kapacitásuk arra, hogy autonóm cirkadián ritmicitást mutassanak. A testi sejtekben a gének 5-10 %-a fejeződik ki ritmikusán, valamint az emberi gének mintegy 50%-a legalább egy szövetben 24 órás (cirkadián) ritmusban fejeződik ki.¹¹¹ Azonban a szervek között az adott ritmikus gének tekintetében nincs átfedés vagyis jó eséllyel az a feladata a perifériás óráknak, hogy a szervenkénti élettani funkciókat időzítsék.¹¹²

A cirkadián óra humán vonatkozásai

Emlős lévén az emberben is az előbb leírtaknak megfelelően működik a cirkadián óra. A legáltalánosabb, amit mi magunkon is tapasztalunk az alvás/ébredés⁶¹ ciklusok szabályozása. Gondolhatjuk, hogy az igényünk az alvásra attól függ, hogy mikor volt az utolsó nyugalmi fázis (és az meddig tartott), de humán kísérletek során bebizonyították, hogy a cirkadián óra nagyban hozzájárul a folyamat kialakításához.^{113,114} A humán kísérletek során az alanyokat állandó gyenge fény, állandó hőmérséklet és korlátlan mennyiségű táplálék mellett tartották. A megfigyelések szerint a napi ritmus megmaradt, de az nem pontosan 24 óra volt, hanem 24,2, mindez 30 napon keresztül folyamatosan. A kísérlet végére így a valós idő és a kísérleti körülmények közötti szabadon futó óra fázisa eltért. Ezt a fáziseltolódást erős fénykezeléssel vissza lehet állítani, ha azt megfelelő időpontban alkalmazzák. Az alkalmazás időpontjától függően, ha azt a szubjektív éjszaka elején alkalmazzák, akkor negatív fáziscsúszás, ha az éjszaka végén, akkor pedig pozitív fáziscsúszást fognak vele elérni.^{113,115} Fáziscsúszás gyakorlati előfordulásához nem kell sokáig kutatnunk, a hétköznapi élet során is találkozhatunk környezeti zavarokkal, mely az órára hatással lehet. Ilyen például a 24 órás műszakok vagy a repülés utáni „jet lag”. A cirkadián órának ilyenkor szükséges alkalmazkodnia az új környezethez, hiszen számos egyéb élettani folyamatot szabályoz, éppen ezért is nehéz és fárasztó sokszor az átállás.^{116,117} Ahhoz hogy ezen tudjunk segíteni érdemes például kék fénnel való megvilágítást alkalmazni a reggeli órákban, hiszen ennek a hullámhossza 400-450

nm, ami megfelel a szemben található melanopszin fotoreceptor abszorpciós tartományának, így jel érkezik az SCN-be (szuprachiazmatikus nukleusz; az emlősök fotoreceptorként funkcionáló sejtcsoportja), hogy nappal van. Ugyanakkor segíthetjük az elalvást is melatonin hormon szedésével, ami természetes körülmények között a késő délutáni órákban kezd el termelődni a tobozmirigy sejtjeiben és a nyugalmi fázis kialakulását segíti elő. A melatonin receptorokhoz kapcsolódva fejti majd ki hatását a központi idegrendszerben és a perifériás sejtekben. ^{118,119}

A cirkadián órára nem csak a környezet változásai hathatnak ki, hanem egy belső zavar is, ami például mutációk következtében tud kialakulni, ahogy a növények esetén már említettem korábban – rövid- és hosszú periódusú mutánsok. Emberek esetében idetartoznak azok, akik alvászavarokkal küzdenek és a társadalomban kialakult munkarend a saját órájukhoz képest máshogy működik, így az érintett egyének számára nehézséget okoz a napi munkarendhez való alkalmazkodás, ugyanis csökkent teherbírással és koncentrálóképeséssel jár. ^{33,120} Az alvászavar késői elalvásban és ennek megfelelően késői ébredésben nyilvánul meg („éjjeli bagoly”) vagy ennek éppen fordított változata (korai lefekvés, ébredés) („reggeli pacsirta”) és a megfelelő munkavégző képesség elérésének érdekében az érintett alanyoknál szükséges közbe avatkozni és segíteni az alvási ciklus beállításában például melatonin szedéssel. ^{119,121,122} Vannak esetek, mikor ez a cirkadián „betegség” (familiar advanced sleep phase) öröklődik is, ennek a kialakulásáért a *PER2* gén mutációja a felelős. A mutáció következtében a PER2 fehérje egy aminosavja úgy változik meg, hogy a CK1ε-mediált foszforiláció nem tud végbemenni rajta. A foszforiláció hiányában a degradáció foka csökken, a PER2 fehérje gyorsabban fog felhalmozódni, ami az oszcillátor korai fázisát fogja előidézni. ¹²³

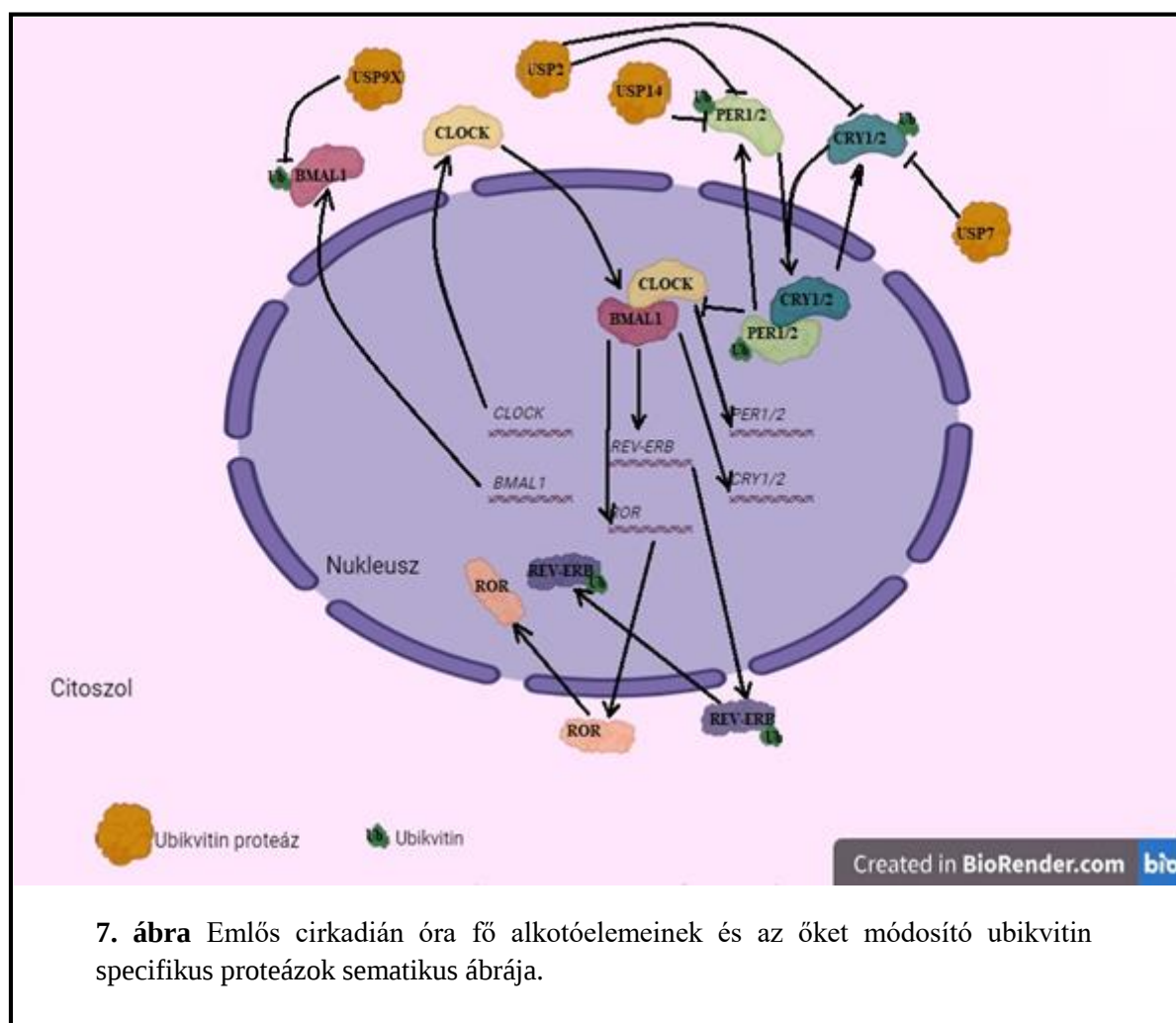
A jet lag-en kívül egy másik, mindenkit érintő cirkadián probléma az órák átállítása a nyári és téli időszámításra. Az esemény körülbelül 2 milliárd embert érint világszerte és kimutatták, hogy nem kis hatással van az emberi szervezetre a hirtelen egy óra elcsúszás, főleg ha az előre állításról (nyári időszámítás) van szó. ¹²⁴ Kimutatták, hogy nyári időszámításra való állásnál az egy órával kevesebb alvás, jobban kifejezve a hirtelen átállás az amerikai emberek körében 24%-al emelte a következő napon a szívrohamok számát. Ezzel szemben a téli időszámításra való állásnál 21%-os csökkenést tudtak kimutatni. A kockázat növekedése kiküszöbölhető ha felkészítették a szervezetüket előre a korábbi lefekvéssel vagy egy héttel előtte fokozatos 10-15 perces időeltolásokkal. ^{125,126}

Az orvostudományban is megfigyelték már, hogy a különböző gyógyszerek vagy rák elleni készítmények meghatározott időben való alkalmazása növeli a hatásfokát a gyógyításnak. ^{127–}

¹²⁹ Az élettani folyamatok nagy része cirkadián hatás alatt áll és eszerint mutat kisebb vagy nagyobb érzékenységet gyógyszeres modulációra a különböző napszakokban. A gyógyszerfejlesztés sikertelenségi rátája körülbelül 96% összesen, és ebből 90% az, ami a klinikai fejlesztések során bukik meg. Az utóbbi évtizedekben ezeken az arányokon nem is sikerült javítani. A gyógyszerek 40-50 %-a az, ami a klinikai hatékonyság hiányában bukik el és 30 %-a pedig a különböző mellékhatások és toxicitás miatt. ^{130,131} A kronoterápia segítségével azonban az utóbbi pár évben sikerül javítani ezeken az arányokon és a cirkadián óra egyre jobb megismerésével növelik a gyógyszerek hatékonyságát és csökkentik a kockázatokat. Így már több területen is sikerült áttöréseket elérni, mint az allergia, asztma, hiperlipidémia, magas vérnyomás, rák vagy neurodegeneratív betegségek gyógyításában. ^{127,128}

Az emlős cirkadián óra és az ubikvitin

Ahogyan a növényi óra esetében, úgy az emlős órában is vannak olyan molekulák, melyek poszttranszkripció vagy poszttranszláció módosítás alá esnek így elérve más funkciót, aktivitási szintet vagy éppen degradációs útvonalat. Ahogy a többi eukariótában is, az emlős



órában is komoly szerepet tölt be többek között az ubikvitináció.^{132–134} Az emlős cirkadián óra több komponense is kitett ubikvitin általi degradációnak, mint például a CRY1/2, PER1/2, REV-ERB vagy a BMAL1 fehérjék. Ezeket a fehérjéket különböző ubikvitin proteázok fogják lebontani az E3 ubikvitin ligázok által létrehozott ubikvitinációs jel hatására. A degradáció elleni lépésekért a deubikvitinázok felelnek, amik a ligázok által ubikvitinnel megjelölt fehérjékről lehasogatják majd az ubikvitin molekulákat.^{91,135} Egyik ilyen deubikvitináz az UBIQUITIN-SPECIFIC PEPTIDASE 7 (USP7), ami a citoszolban jelenlévő CRY1/2 fehérjékről távolítja el az ubikvitint.¹³⁶ A többi deubikvitináz (USP2, USP14, USP9X) is ilyen szerepet tölt be, csak az óra más tagjait deubikvitinálja. Az USP7 azért is különleges számunkra, mert a növényi UBP12/13-al homológiát mutat. A növényi ubikvitin proteázok az UBP12-től nagyon különböző szekvenciával rendelkeznek, az UBP13 kivételével (91% azonosság).⁸ Emellett az Arabidopsis UBP fehérjék közül az UBP12/13-ban jelen van egy MATH domén nevű rész, a többi növényi ubikvitin proteázból ez hiányzik. Ám a HuUSP7 szintén rendelkezik ezzel a doménnel. Ezen kívül USP7-ben is megtalálható az a konzervált szerin aminosav, ami a növényi UBP12-ben a 327-es pozícióban helyezkedik el. A HsUSP7 kristályszerkezete arra enged következtetni, hogy ez a szerin aminosav (S341) szerepet játszik az ubikvitin molekulák szubsztráthoz való hidrogén-kötésekkel történő rögzítésében.^{137,138}

Az UBP12 egyéb szerepei növényben

A metil-jázmonsav

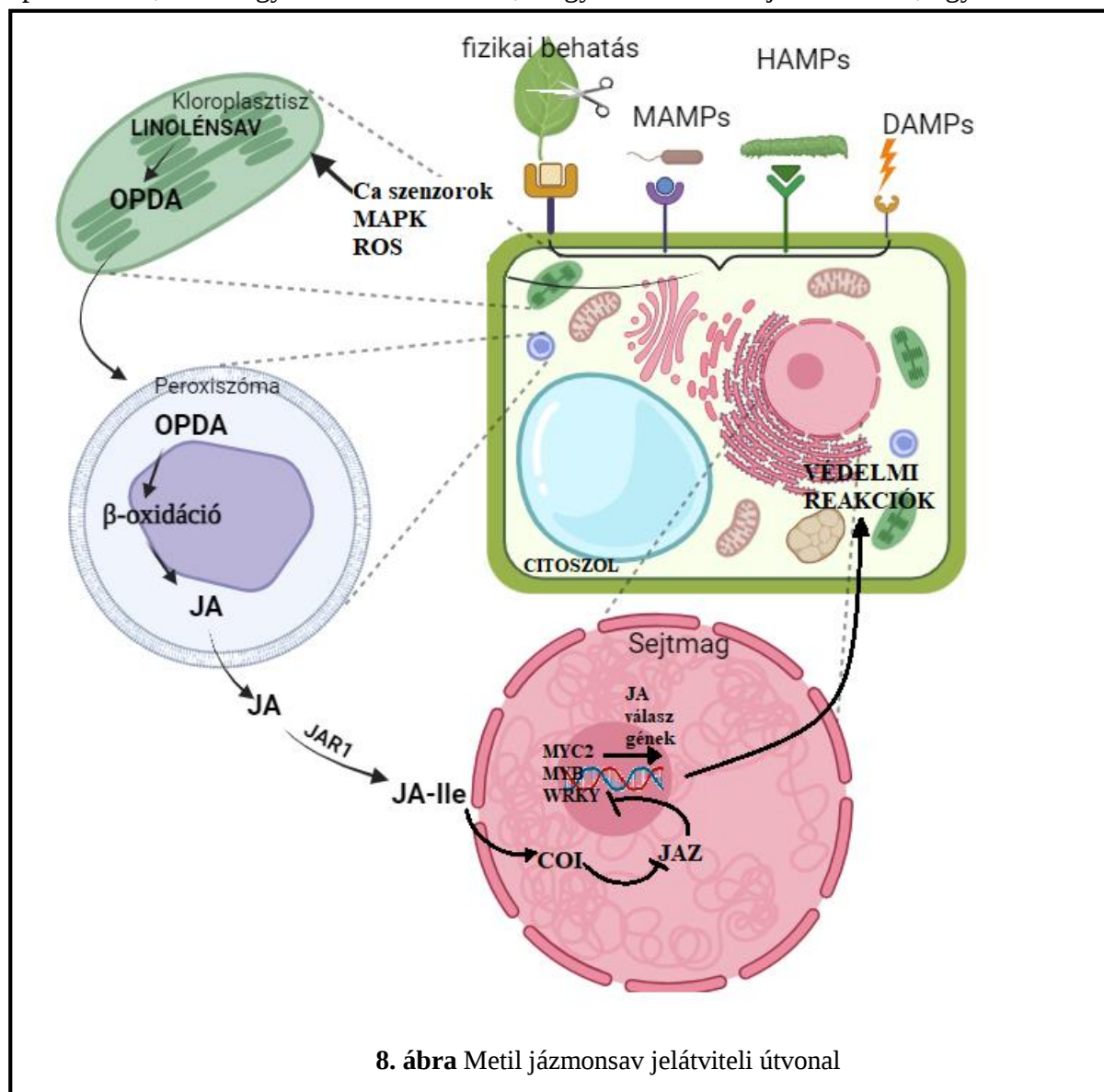
A deubikvitinázok, más néven ubikvitin proteázok vagy ubikvitin hidrolázok a proteázok egyik nagy csoportját alkotják, amik ubikvitint hasítanak le más fehérjékről.⁹¹ Az ubikvitinek a fehérjékhez kapcsolódnak ubikvitin ligázok segítségével, így azok kijelölik a fehérjéket proteoszóma vagy lizoszóma általi degradációra, vagy az ubikvitináció által meghatározzák a fehérje celluláris lokalizációját, inaktiválhatnak proteineket, de fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakításában is szerepet játszhat ez a kis molekula. Egy deubikvitináz ezeket ellentételezi azáltal, hogy eltávolítja az ubikvitin(ek)e-t a fehérjékről. A növényi ubikvitin proteázok (ahogy bármely más deubikvitináz) sokféle targettel rendelkeznek, amikről lehasíthatják majd az ubikvitin molekulákat.⁸⁰

A növények életfolyamatainak szabályozásában többek között részt vesznek (elég nagy szerepet vállalva) a növényi hormonok. Tartoznak közéjük egyszerű és összetett vegyületek. Növényeknél jellemző még, hogy a növények saját maguk termelik őket. Alacsony koncentrációban vannak jelen a növényben, ennek ellenére a növények fejlődésében és

növekedésében minden területen nagy szerepet töltenek be.^{139,140} Részt vesznek az embriogenezistól kezdve a növekedésen, sejt differenciáción keresztül egészen a stresszvédekezésig, szaporodásig számos területen. A hormon szó a görög hormé=mozgat, ösztönöz, serkent szóból ered és ennek megfelelően olyan molekulákról van szó, melyek növekedésre, fejlődésre hatnak. Több növényi hormon is létezik, szerepük lehet részben átfedő vagy teljesen különböző. Ezek a hormonok közé tartoznak például az auxinok, az etilén, a gibberellinek, vagy például még az abszcizinsav. A különböző növényi hormonok számos életfolyamat szabályozásában részt vesznek (csírázás indukálás, virágzás, termésérés, stb.) és alakítják a növények különböző stádiumaiban a fejlődést, növekedést. Egy növény életében azonban ezen kívül még az is fontos, mint más élőlények esetében is, hogy az őt érő káros hatások ellen tudjon védekezni. Ezt a szerepet nagy részben a jázmonsav (JA) tölti be. A jázmonsav egy zsírsav alapú növényi hormon, a jázmonátok közé soroljuk, bioszintézise a linolénsavból indul ki, ami majd oxigenizálódik.^{141–143} Maga a JA tovább metabolizálódhat aktív vagy inaktív származékokká. A metil JA (MeJA) egy illékony vegyület, amely potenciálisan felelős a növények közötti kommunikációért. A jázmonsavnak és metabolitjainak fő funkciója a növények abiotikus és biotikus stresszre adott válaszainak a szabályozása, de emellett részt vesz a növények fejlődésének folyamatában is, mint például a virágfejlődés és csírázás serkentése, gátolja a gyökérnövekedést¹⁴⁴ és részt vesz a rovaremészítő növények fejlődésében is.¹⁴⁵ A jázmonsav indukált jelátvitelnél első lépés a veszély érzékelése, ez különféle receptorokkal (pattern recognition receptors, PRRs) történik a sejt felszínén. A jel sokféle lehet valamint az őket érzékelő receptorok is, attól függően, hogy mi a kártevő: mikrobák esetében a microbe-associated molecular patterns (MAMPs); növényevők esetén a herbivore-associated molecular patterns (HAMPs); egyéb sérüléseknél a damage-associated molecular patterns (DAMPs), gombás fertőzéseknél pedig a mitogen-activated protein kinase (MAPK) lesz a veszélyre figyelmeztető jel.¹⁴⁶ A különféle jelek mind kiváltják a jázmonsav (JA) bioszintézisét. A plasztiszokban történik a linolénsavból a bioszintézis és a peroxiszómában fejeződik be, ahol β -oxidáción és egyéb folyamatokon keresztül kialakul a

jázmonsav. A jázmonsav a citoszolba jutva indukálja a JA-Ile (jasmonoyl-L-isoleucine)termelődését, ami pedig elősegíti a sejtmagban a JAZ-COI1 kölcsönhatást. Így a JAZ (JASMONATE-ZIM domain) fehérje az ubikvitin-proteaszóma rendszer által történő proteolitikus lebontásra lesz kijelölve. A JAZ eltávolítása csökkenti a JA-kapcsolt transzkripciós faktorok represszióját, ezáltal aktiválja a JA-reagáló gének expresszióját, valamint a kémiai és morfológiai védekezések bekapcsolását.¹⁴⁷

Az említett transzkripciós faktorok közé tartozik többek között a MYC család (MYC2, 3, 4) tagja, MYC2. A MYC2-t a JIN1 gén kódolja, szerkezetét tekintve egy alap hélix-loop-hélix DNS-kötő résszel rendelkezik.^{148,149} Kimutatták, hogy a MYC fehérjék egymás hatását erősítik, bármely hiányában az érintett növény védtelenebbé válik a növényevő rovarokkal szemben. Mindhárom MYC hiányának esetében, vagyis egy nullmutánsnál pedig ugyanaz tapasztalható, mint egy coi nullmutánsnál, hogy érzéketlen a jázmonsavra, így védtelen a



8. ábra Metil jázmonsav jelátviteli útvonal

kártevőkkel szemben. ¹⁵⁰ A MYC2 transzkripció faktor nem csak központi szerepet játszik a jázmonsav indukált válaszreakcióban, hanem más szignalizációs útvonalakkal való kapcsolatot is fenntartja. Ahhoz, hogy szerepét betöltse, szükséges lenne egy stabil állandó szint megléte, azonban azt találták számos helyen, hogy a szintje instabil ^{151–153}. Az instabilitás oka pedig, hogy a MYC2 a PUB10 E3 ligáznak egy célpontja, ami instabillá teszi a fehérjét, feltételezték tehát, hogy van egy deubikvitináz is az ubikvitináltsági szint csökkentése érdekében. A kérdéses ubikvitin proteázok pedig az UBP12 és az UBP13 ¹⁵⁴. A MYC2 in vivo és in vitro is szubsztátja az UBP12/13-nak. Az UBP12 és UBP13 túltermelése a növényben jelentősen megnövelte a MYC2 féléletidejét, aminek következtében az érintett növények hiperszenzitívek lettek metil-jázmonsavra (MeJA – a jázmonsav metilálásával keletkező ciklopentanon származék). Ennek megfelelően azok a vonalak, melyekben az ubikvitin proteázok szupresszáva voltak, azok a metil-jázmonsavra hiposzenzitívek voltak, tehát a védelmi útvonal nem működött megfelelően. Ezek alapján az mondható, hogy az UBP12 és az UBP13 pozitív regulátorai a jázmonsav indukált válaszoknak.

Hisztón 2A (H2A)

Már tudjuk, hogy a cirkadián óra szabályozásánál is fontosak a különféle módosítások a fehérjéken, melyeknek következtében megváltozik szerkezetük, aktivitásuk. Ezek általában poszttranszkripció, poszttranszláció módosítások. Azonban a különböző folyamatok már azzal is szabályozhatóak, ahogy azt az óra esetében is láthattuk, hogy egy adott fehérje egy adott gént kódoló DNS szálhoz kötődik, így annak transzkripcióját serkentve vagy éppen gátolva. A sejtek genetikai információját hordozó DNS a kromoszómának nevezett struktúrába van csomagolva, melyeknél a hisztón fehérjék (H1, H2A, H2B, H3 és H4) látják el az elektrosztatikus kölcsönhatás segítségével az összerendeződést. A hisztónok fehérje molekulák, melyeken ugyanúgy, mint más fehérjéken történnek poszttranszlációs módosítások. A DNS-nek a különböző hisztónmódosításoknak köszönhetően többféle állapota létezik. Van tömörebb, zárt állapota, erről nem történik transzkripció. ¹⁵⁵ Ahhoz hogy az átíródás el tudjon indulni, szükséges egy lazább szerkezet visszaállítása, hogy az RNS-polimerázok hozzá tudjanak férni a DNS szálhoz és arról RNS-t tudjanak szintetizálni. Ez a hozzáférhető állapot, ami aktív géneket tartalmaz és amiről folyamatosan történhet a génexpresszió. A nyitott/hozzáférhető vagy éppen a zárt állapot a különböző hisztón módosításokkal érhető el, attól függően, hogy éppen melyik a szükséges. Ezt a folyamatos, szabályozott átrendeződést remodeling-nek nevezzük. A kromatin szerkezetének változtatása epigenetikus eszközökkel lehetséges, ide tartoznak a hisztón módosítások. Ennek során a genetikai információ tartalom nem változik.

Ahogy a DNS szál feltekeredik a hisztonokra, akkor a hisztonok N-terminális végei hosszan kinyúlnak az oktamerből, és az ezen helyet foglaló aminosavak a módosítást végző enzimek célpontjai. A hisztonok módosítására több lehetőség is van, egyik legáltalánosabb a metiláció. A metilálás következtében a szerkezet jóval összezártabbá válik és a gének nehezebben lesznek hozzáférhetőek. Meg kell azonban jegyezni, hogy a metiláció végeredménye attól is függ, hogy milyen aminosav metilálódik és az milyen pozícióban van, hiszen ettől függően okozhat nyitottabb vagy zártabb állapotot is. Amennyiben szükségessé válik a génekhez való hozzáférés, akkor hiszton-acetilázok (HISTONE ACETYL TRANSFERASE, HAT) fognak acetilcsoportokat kötni a hisztonok N-terminális végi lizin vagy arginin fehérjékre. Ezzel az acetilációval eléri, hogy az oldalláncok pozitív töltése semlegessé váljon, így a hiszton-DNS közötti kötés lazulni fog. Végeredményképpen megkezdődhet a transzkripció. Az acetiláció megszüntetésére hiszton-deacetilázok fognak az acetilált hisztonhoz csoportosulni és az acetil csoportokat lehasítják, amivel zártabb állapotot idéznek elő. Jellemző epigenetikus módosítás még a kinázok által történő foszforiláció. Ez szintén a hisztonok töltésének megváltoztatását veszi célba, pozitívból negatív töltésűvé változtatják a hisztonokat, ezzel azt okozva, hogy szinte letaszítják majd magukról a nukleinsavat. Végül, de nem utolsó sorban epigenetikus módosítás még a hisztonok ubikvitinálása is. Ennek a folyamatnak a során ubikvitin ligázok (poli)ubikvitint kapcsolnak a hisztonhoz, aminek eredménye az érintett hisztontól és az ubikvitinációs helytől függően többféle kimenetelű lehet (például H2BK120ub - transzkripció elonagáció, H2A N-terminális részénél a DNS javítást segíti). Az aktuális változások visszaállítására az ubikvitin proteázok lépnek közbe.¹⁵⁶

Ilyen deubikvitinázok a már említett UBP12 és UBP13. Növények és állatok esetében is találkozhatunk a Polycomb csoport (PcG – Polycomb Group) fehérjéivel, melyek epigenetikai memória rendszerként funkcionálnak. Ezek a fehérjék többféle folyamatban is represszorként működnek a célgének irányában. A stabil génrepresszió nélkülözhetetlen a normális fejlődéshez és növekedéshez. A PcG fehérjék hatalmas protein komplexekbe állnak össze, ilyen például a Polycomb repressive complex 1, 2 (PRC1, PRC2). Ezek a komplexek katalizálnak trimetilációt (PRC2: H3 hiszton 27-es lizin, H3K27me3) vagy monoubikvitinációt is (PRC1:H2A hiszton 118-as lizinje, H2AK118ub).¹⁵⁷ Növényeknél is a PRC1 fehérje komplex a hiszton 2A monoubikvitinációját (H2Aub1) végzi. Az ubikvitináció hatására azonban nem történik meg a H2A degradációja. Eleinte úgy gondolták, hogy a monoubikvitináció már önmagában egy represszív jelként szolgál. Azonban további kutatások során rájöttek, hogy ez egy epigenetikai markerként szolgál a PRC2 számára, ami majd előidézi a hiszton 3, 27-es lizinjének a

trimetilációját, ami pedig az érintett gének kifejeződésének gátlását eredményezi. Azt is megfigyelték, hogy az ubikvitin jel önmagában nem elég a represszáshoz, illetve a trimetilációval együtt is kisebb hatásfokú a gátlás, mint a trimetiláció önmagában. Ennek értelmében a deubikvitináció következtében a trimetiláció hatása nőhet, ami az érintett gének represszióját idézi elő. Ezen okból kifolyólag esszenciális az UBP12 és az UBP13, amelyek eltávolítják a monoubikvitint a hiszton 2A-ról. Tehát az UBP12 és UBP13 együtt működik a PRC1 és PRC2-vel, adott gének kromatin-szintű repressziójában. Az érintett gének közé tartoznak például az *FT* (*FLOWERING TIME*) és *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*). A két gén kifejeződése a deubikvitináció, majd az ezt követő hiszton trimetiláció hatására csökken. Így következtetésképpen, ha van egy olyan mutáns, amelyből az UBP12/13 funkció hiányzik (*ubp12*, *ubp13*, *ubp12ubp13*), akkor a célgén repressziója növekedni fog, vagyis azon gének kifejeződése, amelyek a PRC2 által szabályozott trimetilációs rendszere által érintett, csökkenni fog a mutánsban a vad típushoz képest.^{157,158}

Célkitűzések

A növények szesszilis életmódjuk miatt jobban ki vannak téve a környezeti hatásoknak és ezért különösen fontos számukra a gyors, megfelelő válaszadás. Ha egy növényi szervezet képes alkalmazkodni, az előnyre tesz szert a többi fajtársával szemben és szaporodási esélye megnövekszik. Az evolúció során kialakult egy olyan rendszer, mely segít az olyan környezeti változásokhoz való alkalmazkodásban, melyek egy rendszert követnek, mint például a naponta ismétlődő folyamatok állandó egymásutánja. A rendszer, ami segít ebben, az a szinte minden élőlényben előforduló cirkadián óra, ennek köszönhetően alakul ki egy napi ritmus, ami előre felkészíti a szervezetet és a megfelelő napszakra időzíti a különböző életfolyamatokat. Az időzítés és alkalmazkodás fontossága miatt növényekben kiemelt szerepe van az órának. Kutatásunk ezért is összpontosul a növényi cirkadián órára, annak megismerésére. Ahhoz, hogy pontos képet kapjunk az óra működéséről, fel kell tárnunk annak alkotórészeit és feltérképezni, hogy a rendszerben hol és milyen szerepet töltenek be ezek az elemek, illetve mennyire fontosak az óra működéséhez.

Eddigi munkánk során több olyan cirkadián ritmusban eltérést mutató mutáns növénnyel találkoztunk, melyeknél a mutáns fenotípusért felelős hibás gén még nem volt a cirkadián óra működéséhez kapcsolva. Ilyenek voltak az eleinte *rs24* és *rs2* elnevezésű mutáns növényi vonalak, melyeknél kiderítettük, hogy az *UBP12* és az *UHD1* voltak a változást elszenvedett gének. A gének meghatározása után fő céljaink:

- Ellenőrizzük, hogy az óra bemeneti vagy központi oszcillátor részében történt a változás.
- Leírjuk a gének molekuláris jellemzőit.
- Az *ubp12-3* esetében ellenőrizzük azokat a kapcsolatokat, melyeket már korábban leírtak *UBP12* nullmutánsokban az óra működésénél.
- Meghatározzuk az *ubp12-3* és az *UBP12* publikált, egyéb targetjeivel való kapcsolatából eredő funkciók megváltozását.
- Leírjuk az *ubp12-3* mutációt okozó aminosavcserénél a foszforiláció funkcionális és élettani szerepét.
- Megfigyeljük a foszforiláció hatását más fajokban található *UBP12* homológ fehérjéknél.
- Leírjuk az *uhd1* mutáns jellemzőit.
- Meghatározzuk az *UHD1* cirkadián órában való szerepét.

Anyagok és módszerek

Anyagok

Növényi táptalajok:

MS0/0,5/1/2/3 (Murashige-Skoog Medium) (pH 5.6)

4,3 g/l MS por

0/0,5/1/2/3% szacharóz

1% agar

AM (Arabidopsis Medium) (pH 5.6)

2,15 g/l MS por

1% szacharóz

0,2% fitagél

Bakteriális táptalajok:

LB (Luria-Bertani medium) (pH 7.0)

1% tripton

0,5% élesztő kivonat

1% NaCl

szilárd táptalajhoz: 1,5% agar

YEB (Yeast Extract Beef) (pH 7.0)

0,5% Difco™ beef extract

0,1 % élesztő kivonat

0,5% szacharóz

0,1 % pepton

0,75 mM MgCl₂ (sterilre szűrve)

szilárd táptalajhoz: 1,5% agar

Élesztő táptalajok

YPD, YPAD táptalaj

500 ml-hez

5 g élesztő kivonat

10 g bakto pepton

10 g glükóz

8,3 g baktoagar

desztillált víz

pH=6,5

YPAD – 50 ug adenin

I. oldat

-50 mM glükóz

-25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

-10 mM EDTA (pH 8.0)

II. oldat

-0,2 M NaOH

-1% SDS

III. oldat

-3 M KoAC

Oldatok

CTAB

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1,42M NaCl

20 mM EDTA

1% PVP40

1% CTAB

Fehérje extrakciós puffer

50 mM TRIS-HCl pH 6,8

4 M urea

3% SDS

10% glicerin

brómfenolkék

felhasználás előtt: 100 mM DTT

SOB, SOC tápoldat

2% tripton

0,5% élesztő kivonat

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl_2

10 mM $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

SOC – SOB + 20 mM glükóz

Luciferin STOCK

500 mg D-luciferin (C-8200)

35,68 ml 0,1 M Tris-foszfát puffer pH=8,0

Felhasználás előtt: 20x-ra hígítani

Módszerek

Miniprep

Előzetesen antibiotikumos lemezre szélesztett és felnőtt telepeket egyesével leoltjuk antibiotikumos tápoldatba, 2-2 ml-be. Kémcsőben rázatjuk egy éjjelen át, majd másnap reggel 1,5 ml-es Eppendorf csőbe átöntve centrifugáljuk 2 percig. Ezután a felülúszót leöntve a csapadékhoz 100 µl I. oldatot öntünk, és felfuszpendáljuk a sejteket. 200 µl II. oldat hozzáadása után 5 percre jégre rakjuk, hozzáadunk 150 µl III. oldatot és újabb 15 percre jégre helyezzük. Centrifugáljuk 5 percig, majd a felülúszót új Eppendorfba mérve hozzáadunk 500 µl izopropanolt, összeforgatjuk. Szobahőn hagyjuk állni 30 percig, majd 5 perc centrifugálás után a felülúszót leöntjük és 500 µl 70%-os etilalkohollal mossuk a csapadékot, amit utána vákuum szárítóban szárítunk, végül 40 µl desztillált vízben vesszük fel.

Midiprep

Nagyobb mennyiségű DNS izolálásához.

Előzetesen antibiotikumos lemezre szélesztett és felnőtt telepeket egyesével leoltjuk antibiotikumos tápoldatba, 50-50 ml-be. Ráztatjuk egy éjjelen át, majd másnap reggel 50 ml-es Falcon csőbe átöntve hűtve (4°C) centrifugáljuk 6 percig 4000 rpm-el. A csapadékhoz 1 ml I. oldatot és spatulányi lizozimet adunk, majd vortexeljük és 5 percet szobahőmérsékleten tartjuk. Utána 2 ml II. oldatot mérünk rá, 1-2 percet várunk, majd a III. oldatból mérünk rá 1,5 ml-t és 15 percre jégre helyezzük. Hűtve centrifugáljuk (8 perc, 4500 rpm), a felülúszó 15 ml-s Falcon csőbe kerül át és hozzáadunk 3 ml izopropanolt. Hagyjuk állni 30 percen keresztül szobahőmérsékleten, fugáljuk (4°C, 8 min, 4500 rpm) és a csapadékot mossuk 70%-os alkohollal és vákuum szárítás után 1 ml desztillált vízben felvesszük. Hozzáadunk 20 µl RNázt és 20 µl sárga puffert, majd 1 órára 37°C-os vízfürdőbe helyezzük. Ehhez adunk ezek után 500 µl fenolt és ugyanennyi kloroformot, összerázzuk, 5 percig centrifugáljuk 13000 rpm-en. A felülúszó új 2 ml-s eppendorf csőbe kerül és 800 µl kloroform kerül mellé. Újabb fugálás (13000 rpm, 7 perc) után 800 µl izopropanol kerül hozzá, 30 percet vár szobahőn, fugálás 5 percen keresztül (13000 rpm), majd újra etanollal mossuk. Ha ezzel végeztünk, leöntjük a felülúszót, vákuum szárítóba helyezzük, végül pedig felvesszük 100 µl desztillált vízben.

Sterilezés, szélesztés

A kísérletekhez kiválasztott magvonalakból a megfelelő mennyiséget beáztatjuk a nekik megfelelő mennyiségű desztillált vízben és pár napig (2-5 nap), de általában 3 napig hidegben

(4°C), sötét helyen tároljuk. Miután a vernalizáció megtörtént, a magokat sterilezzük, mielőtt táptalajra szélesztjük őket. A sterilizálás 30%-os Domestos oldattal történik, magmennyiségtől függően 1-30 ml-ben hagyjuk állni 8-15 percig. Ezután steril fülke alatt steril desztillált vízzel mossuk 4-5-ször. A sterilizálás után a megfelelő táptalajra szélesztjük a magokat, amin majd nőnek.

Agrobaktériumos transzformálás

Az Agrobacterium-mediált transzformációt Clough és Bent 1998-ban leírt virágmártogatásos technikájával hajtottuk végre. Első lépésként a transzformálni kívánt növényeket szükséges kivetni az üvegházba. Amikor elérkeznek a virágzás fázisába, akkor történhet a transzformálás, melyhez előre felnövesztett agrobaktérium törzset használunk. Az agrobaktériumot 4-5 nappal a transzformálás előtt kikenjük masszívan a megfelelő szelekciós lemezre. Ezután a felnőtt agrobaktérium telepeket átoltjuk 15 ml YEB folyékony tápoldatba, vágott tippel szuszpendáljuk, és lassan adagolva hozzáadunk 250 µl 3%-os szacharóz oldatot és 30 µl sylvetet. Ebbe az oldatba mártjuk a virágokat, majd egy hét múlva megismételjük. A magok érése után ezeket szelektáljuk lemezen, a bejuttatott szelekciós markernek megfelelő antibiotikummal (higromicin) vagy növényi gyomirtóval (BASTA). Az így felnőtt, kiszelektált egyedeket vittük tovább.

Élesztő transzformálás

A kompetens sejtnak használni kívánt élesztő törzseket átkenjük és 30°C-on 3-4 napig növesztjük. Ezt követően a felnövesztett friss élesztő telepekből leoltunk 5 ml YPD oldatba és éjszakán át 30 °C-on rázatjuk (250 rpm). Másnap reggel az 5 ml élesztő kultúrát átöntjük 50 ml 30°C-os YPD oldatba és fugáljuk 4000 rpm-el 5 percen keresztül. A felülúszót leöntjük, majd hozzámérünk 40 ml steril desztillált vizet, amivel összeforgatjuk, mossuk a sejteket. Fugáljuk 5 percig 4000 rpm-el, majd a felülúszót leöntjük. Hozzáadunk 40 ml 1x TE/LiAc oldatot, mellyel szintén mossuk a sejteket. Ismételtén lefugáljuk a sejteket (4000 rpm, 5 perc), majd a felülúszó leöntése után 1-1,5 ml 1x TE/LiAc oldatban felvesszük a sejteket.

Növényi DNS izolálás

A növényi DNS izoláláshoz körülbelül 100 mg mennyiségű növényi mintát szedünk le Eppendorf csőbe acélgolyóval, folyékony nitrogénben lefagyasztjuk majd fagyasztva rázatjuk a mintákat 2 percig. Rámérünk 500 µl CTAB puffert és 2 µl β-merkaptó-etanol, majd újabb 2 percig rázatjuk, hogy jól összekeveredjen a mintánk a pufferrel. Ezután 65 °C-on hőkezeljük

30 percen keresztül, következő lépésben pedig 5 percig fugáljuk, hogy elváljon egymástól a felülúszó és a csapadék. A felülúszót átmérjük új Eppendorf csőbe és hozzáadunk 500 µl kloroformot, rázzuk, vortexeljük, majd 10 percig fugáljuk 13000 rpm-en. A felülúszót átmérjük, 500 µl izopropanolt adunk hozzá, szobahőmérsékleten hagyjuk állni 10 percet, majd újabb 10 percig centrifugáljuk. A csapadékot etanollal mossuk, majd vákuumszáritóban szárítjuk, végül pedig 50 µl deszt. vízben oldjuk fel.

Növényi fehérje izolálás

A növényi össz-fehérje tisztításhoz a mintánkat üveggolyót tartalmazó 2 ml-s eppendorf csőbe szedjük, folyékony N₂-be tesszük, majd a fagyott mintát rázatjuk 2 percig (30 Hz, Retsch), majd 95°C-os fehérje extrakciós puffert adunk hozzá, 100 mg mintához 200 µl puffert. Újabb 2 percig rázatjuk a mintákat majd 3 percre 95°C-ra tesszük őket, ezután 20 percig 13000 rpm-en fugáljuk és a felülúszót átmérve új Eppendorf csőbe kész a fehérjemintánk. Ahhoz, hogy egymáshoz hasonlíthatók legyenek a különböző vonalak, szükséges tudnunk a minták fehérje koncentrációját. Ehhez a mintákból 5-5 µl fehérje kivonathoz 45 µl desztillált vizet és 200 µl Amido Black oldatot adunk, összeforgatjuk. Centrifugáljuk 20 percig 13000 rpm-en, leöntjük a felülúszót, majd a csapadékot mossuk Amido Black mosó oldattal. Szárítás után a csapadékot 0,2 M NaOH-ban felvesszük és 610 nm-en mérjük az optikai denzitását, ami alapján majd fehérje koncentrációt számolunk. Kalibráláshoz BSA hígítási sorozatot használunk.

Fehérjeszint meghatározás Western blot módszerrel

A fehérjék elválasztásához 7-10-12-15%-os SDS-poliakrilamid denaturáló gél alkalmaztunk, a futtatás 1x-es Tris/glicin/SDS futtató pufferben történt és mintánként 20-20 µg összfehérjét vittünk fel a gélre. Az elválasztást követően a gél néhány percig transzfer pufferben (TBST) áztattuk az SDS és urea maradványok eltávolítására, amíg metanollal equilibráltuk az Immobilon® -P PVDF (polivinilidén-difluorid) műanyag membránt (Merck Millipore). A gélből az elválasztott fehérjéket elektroblot készülékkel (BioRad) vittük át a PVDF membránra (100V, 1,5h). Ezek után a membránt egy éjszakán keresztül 4°C-on, blokkoló pufferben áztattuk a szabadon maradt kötőhelyek elfedésére: 5% (w/v) sovány tejpor, 1% (w/v) TBST pufferben feloldva. Másnap a membránt 1 órán keresztül mosópufferben oldott anti-GFP (Clontech, Living Colors A.v. Monoclonal Antibody JL-8, 2000x-es hígítás) elsődleges ellenanyaggal vagy anti-aktin ellenanyaggal (Sigma-Aldrich) mostuk szobahőmérsékleten. Ezt a lépést 3x10 perc mosás követte mosópufferrel. A mosás után mosópufferben oldott 5000x-esre hígított, torma peroxidáz kapcsolt egér-IgG elleni másodlagos ellenanyagot adtunk a

membránhoz és 1 órán át inkubáltuk, majd újabb TBST pufferes mosás következett 3x10 percen át. Végül a leitatott membránt áztattuk Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate Peroxidáz és Luminol reagensek 1:1 arányú oldatában, majd CCD kamera (iBright™ FL1500 Imaging System) segítségével detektáltuk a kemilumineszcens reakcióból származó jeleket.

Kompetens sejt készítés

A kompetens sejt készítése ¹⁵⁹ és ¹⁶⁰ által leírt protokollok alapján történt.

Baktérium transzformálás

A baktérium transzformálás ¹⁵⁹ és ¹⁶⁰ által leírt protokollok alapján történt.

Indukált bakteriális fehérjeexpresszió

Első lépésként S818 és pACYC184 plazmidokat transzformáltunk E.coli BL21 kompetens sejtekbe, a fentebb részletezett baktérium transzformálás módszerrel.

Az előzetesen lemezen felnevelt, konstrukciókat hordozó baktérium telepeket este leoltjuk lemezről 3-3 ml LB tápoldatba a megfelelő antibiotikumokkal. Ráztatással inkubáljuk éjszakán át 37 °C-on. Másnap reggel ebből átolttunk 1,5 ml baktériumszuszpenziót 30 ml LB + antibiotikum tápoldatba és ráztatással inkubáljuk 37 °C-on, amíg el nem érik az OD₆₀₀ = 0.6 sűrűséget. Ha elérték, akkor mindegyik kultúrából kivettünk 2x 1-1 ml szuszpenziót, lefugáltuk (1 perc, 13000 rpm), majd felszuszpendáltuk 50 µl 4R pufferben és -20 °C-on tároltuk. A megmaradt kultúrát indukáltuk, 1 mM végkoncentrációjú IPTG hozzáadásával. Az indukálás 3,5 órán át tartott, 30 °C-on történő inkubálással. Ezek után az indukált baktérium kultúrából is mintát vettünk, 2x 1-1 ml-t, lefugáltuk (1 perc, 13000 rpm) és 100 µl 4R pufferben szuszpendáltuk fel. Végül -20 °C-on tároljuk.

Növényi RNS izolálás

A növényi össz-RNS tisztításhoz első lépésként 2 ml-s Eppendorf csőbe szedünk növényi mintát, fagyasztva rázatva porítjuk, majd a Qiagen RNeasy Plant Mini Kittel, a gyártó által megadott protokollt követve folytatjuk az RNS izolálását. A kinyert RNS mennyiségét a minta 260 nm-en mért fényelnyeléséből határoztuk meg.

mRNS-szint meghatározása valós idejű PCR-ral

Első lépésként cDNS-t készítettünk a Thermo Fisher Scientific RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kitjének használatával, a gyártó útmutatásainak megfelelően 1 µg RNS-ből, amit a

növényi mintáinkból izoláltunk. A kapott termékeket térfogatuk ötszörösére hígítottuk RNázmentes vízzel. A kérdéses mRNS-ek szintjét valós időben mért PCR-al, BIO-RAD C1000 Touch® Thermal Cycler gépen határoztuk meg, 384-es PCR plate-en, qPCRBIO SyGreen Mix Hi-ROX alkalmazásával (PCR Biosystems), 10 µl végtérfogatban. Templátnak reakciónként 1-1 µl cDNS-t használtunk, melyhez 5 µl SYBR Green, 3 µl desztillált víz és 1 µl primer adódott hozzá. Minden kísérletnél készült egy, a mintákból keverékként előállított cDNS hígítási sor, mely 1-, 10-, 100-, 1000-szeres hígítási pontokat tartalmazott. A belőlük kapott adatokra egy egyenest helyezve megkapjuk annak az egyenletét, melynek segítségével pedig kalibrálhatjuk a minták mRNS mennyiségének számítását. A kapott értékeket ezen felül a minták TUB2/3 mRNS-szintjére normalizáltuk.

Lumineszcencia mérés élő növényben

Első lépésként a riporterkonstrukciót hordozó növényeket felneveljük a méréshez, ezt előtte általában egy héttel tesszük. A magokat sterilizzuk, majd szélesztjük MS3 lemezre, egy hetes korukban pedig átrakjuk a növényeket 96 well-es lemezekbe, amikbe előzetesen 0,25 ml MS3 táptalajt tettünk, zsebenként 1-1 növényt. A növényekre 20 µl 2,5 mM-os luciferin oldatot cseppentünk. A méréseket TopCount NXTTM luminométerrel (Perkin Elmer) végeztük el. A 7 napos mérés során a műszer adott időközönként rögzítette a növények által kibocsájtott fény mennyiségét. A luminométerben a mintákat sötétben vagy vörös fényben tartottuk. A kapott eredményeket Microsoft Excel TopTemp makró segítségével dolgoztuk fel.

Antibiotikumok

Modellszervezet	Szelekciós ágens	Végkoncentráció (60 °C-ra hűtött tápoldatba keverve)
<i>Escherichia coli</i>	Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Karbenicillin (Cb)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
	Rifampicin (Rf)	25 µg/ml
	Tetraciklin (Tc)	100 µg/ml

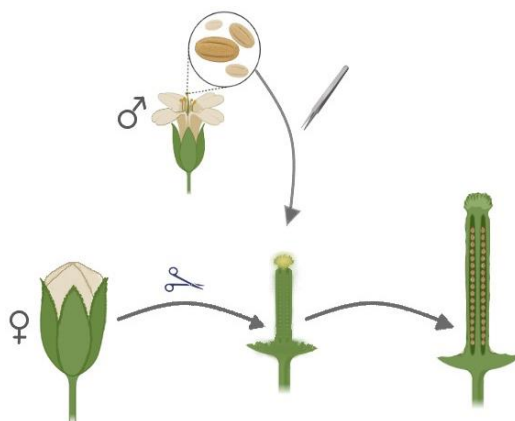
	Gentamicin (Gm)	100 µg/ml
	Kloramfenikol (Cm)	30 µg/ml
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Higromicin (Hyg)	15 µg/ml
	Klaforán (Cf)*	200 µg/ml
	BASTA**	10 µg/ml

*Növényi táptalajok bakteriális fertőzésének visszaszorítására használtuk

**Gyomirtó, nem antibiotikum. Az EgrEvo (Bad Soden, Németország) cég által forgalomba hozott oldatot permetszerként alkalmaztuk virágföldön csíráztatott Arabidopsis magvak szelektálásához.

Keresztezés

A keresztezéshez a magokat elszórjuk virágföldre és neveljük a virágok megjelenéséig külön a növényeket. Anya növénynek nevezzük azokat a növényeket, melyek bibéjét beporozzuk idegen növényről származó pollennel, az apa növények pedig a pollent szolgáltató növényeket nevezzük. Egyik legfontosabb lépés a keresztezés során, hogy az anya növényeken a fiatal



9. ábra Keresztezés lépéseit bemutató ábra

bibék önmegtermékenyítését megakadályozzuk, így azokról a virágokról a csésze és szirmleveleket, valamint a porzókat eltávolítjuk. Egy virágzati tengelyen 3-4 bibét hagyunk megtermékenyítésre. A feltisztított bibékre az apa növényről leszedett, érett porzóról származó polleneket juttatunk ecsetelő mozdulattal, majd várunk, hogy a megtermékenyített bibék beérjenek, majd a magokat begyűjtjük.

Hipokotil hossz mérés

A kiválasztott növényi vonalak magjait Petri csészébe helyezett szűrőpapírra (4 réteg) szórjuk, majd a lemezeket lezárjuk és 4 °C-ra, sötétbe helyezzük 3 napra. Ezt követően a lemezeket áthelyezzük a kiválasztott fényforrás alá 4 napra, 22°C-ra. A különböző erősségű fényintenzitásokon való méréseket a lemezek egymásra helyezésével tudjuk egy időben elvégezni. Az egymáson levő lemezeket érő fényintenzitását az alábbi empirikus képlettel számoltuk ki:

P_n = plate (lemez) helye az oszlopban

P_1 = $x \text{ } \mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ (a legfelső lemez)

P_2 = $0,256 \times P_1$

P_3 = $0,418 \times P_2$

P_4 = $0,418 \times P_3$

P_n = $0,418 \times P_{n-1}$

A 4 nap leteltével a növényeket 1% agarra helyezzük fektetve, a megfelelő feliratokkal ellátva, majd a lemezeket beszkeneljük (EPSON Perfection V30). A képeken a hipokotilok hosszát (vonalként 30-40 növény) ImageJ program segítségével mérjük, majd Excel táblázatban összegezzük.

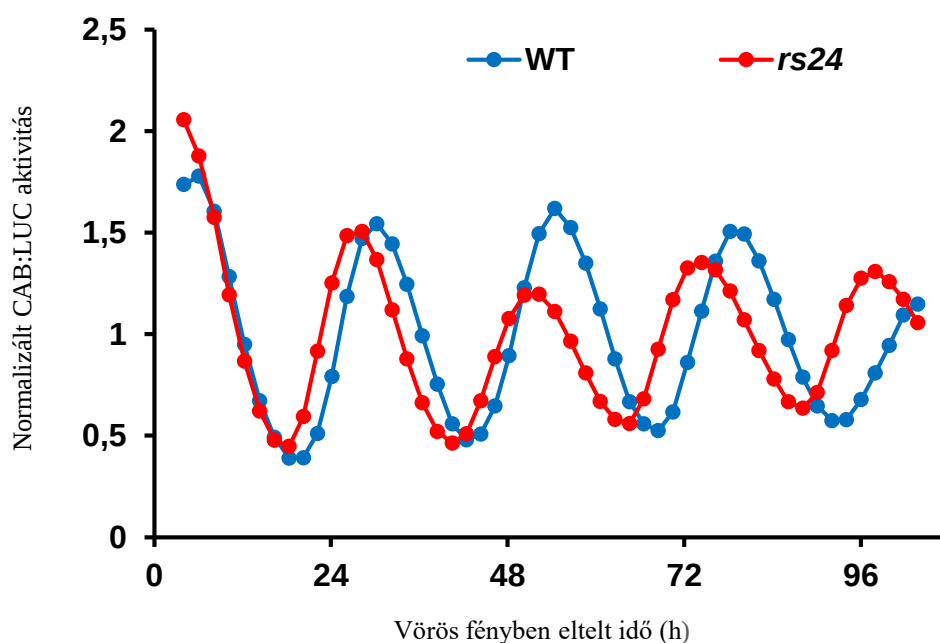
Virágzás

A virágzási idő megméréséhez a kiválasztott növényi vonalakból magot szórunk ki virágföldre és 1 hétig sötétben, 4°C-on tartjuk. Ezt követően fényre, 22°C-ra helyezzük őket növénynevelő kamrákba (FITOCLIMA D 1200) és a virágzati tengelynek 1 cm-es magasságát elérve megszámoljuk a növény egyedek rozetta leveleit. Vonalként 30-40 növény rozetta leveleit számoljuk meg és átlagoljuk az eredményeket Excel táblázatban.

Eredmények

Új óramutánsok felfedezése

Az etil-metánszulfonát (EMS) egy karcinogén anyag, mely a nukleinsavban úgy okoz eltérést, hogy a guanin-citozin párokat felbontva a hármas hidrogénkötés helyett a guaninon csak kettő hidrogénhíd tud képződni. Így a guanin a citozin helyett timinnel vagy adeninnel fog párosodni, majd ez tovább alakul timin-adenin/adenin-timin párokká. Az így megváltozott nukleotid miatt pedig változhat a kódolt aminosav, ami már a fehérje szerkezetének vagy működésének szerepében is nagy változásokat okozhat.^{161–163} Az EMS széles körben használt random mutagenézisre. A random mutagenézis egyszerű és hatékony módszer új tulajdonságokkal rendelkező mutáns sejtek létrehozására. Megfelelő és jól működő eszköz az enzimek tulajdonságainak megváltoztatására. A mutáció létrehozásához nem szükséges előre ismerni a célfehérjék szerkezetét és funkcióit. Az organizmusokról nincs szükség előzetesen nagy mennyiségű adatra, ellenben a célzott mutagenézishez képest, ahol egy konkrét, ismert gént akarnak kiütni vagy megváltoztatni molekuláris módon.¹⁶¹ A random mutagenézis segítségével pedig lehetővé válik a természetes szelekció laboratóriumi léptékű szimulációja. Ezen túlmenően a véletlenszerű mutagenézis lehetővé teszi olyan összetett és erősen szabályozott



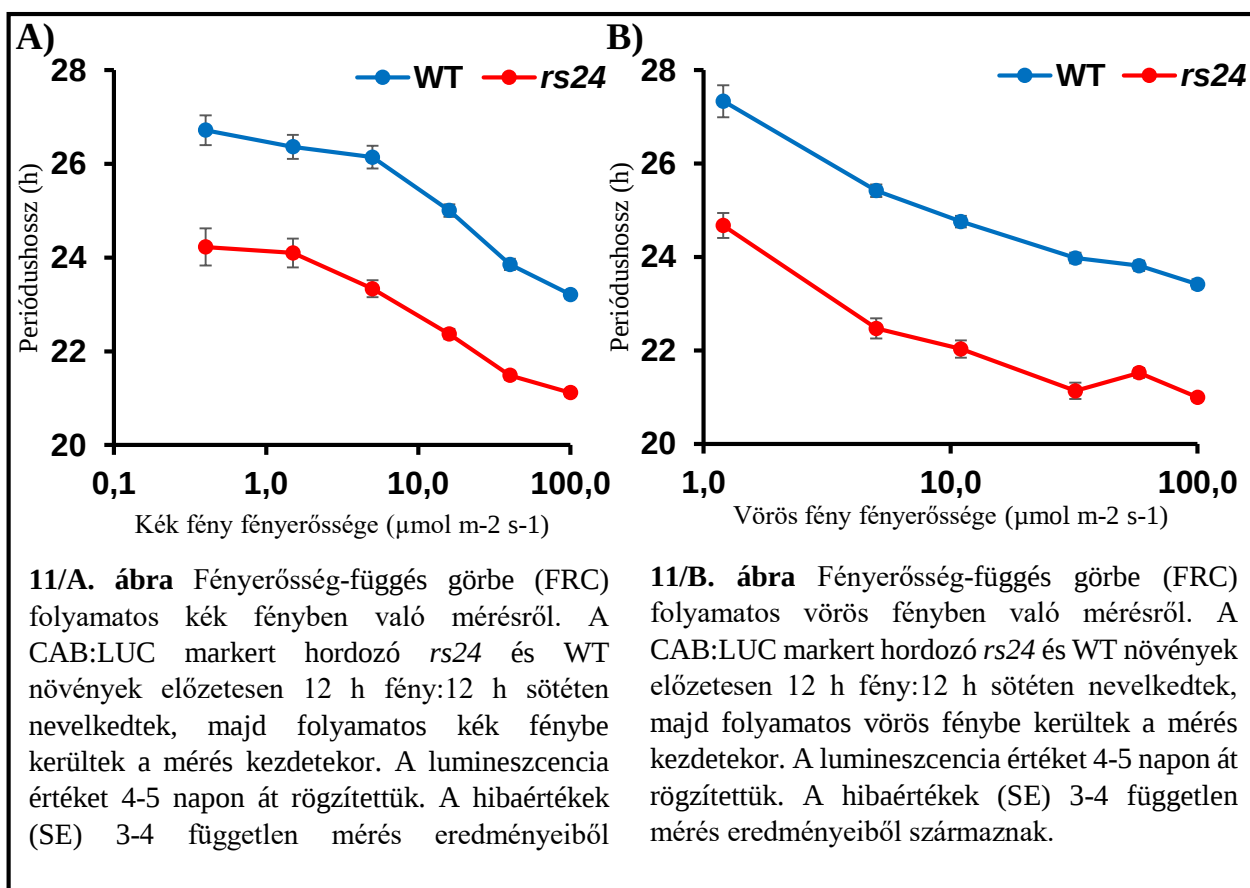
10. ábra Az *rs24* nevű cirkadián óra mutáns azonosítása periódushossz mérés alapján. Az ábrán a CAB2:LUC konstrukció kifejeződését látjuk vad típusú (WT) és az *rs24* mutáns növényekben. A mérés vörös fényben történt ($10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A görbék 24 növény periódusának átlagából lettek ábrázolva.

anyagcsere- vagy szabályozási útvonalak tervezését, amelyekben a célzott mutagenézis az útvonal nem megfelelő ismerete és következésképpen a jól meghatározott és ismert célpontok hiánya miatt nem működik. ^{164,165} Számos kémiai mutagén létezik, például N-etil-N-nitrozourea (ENU), etil-metán-szulfonát (EMS), metil-metán-szulfát (MMS), nitrozoguanidin (GTN), etil-nitrozourea (ENU) és N-metil-N-nitrozourea (MNU), amelyek felhasználhatók véletlenszerű mutációk létrehozására. Az EMS-en keresztül végzett véletlenszerű mutagenézis hatékony és ígéretes technika olyan pontmutációk létrehozására, mint például az adenin-timin (A-T) guanin-citozin-ra (G-C) történő cseréje. ¹⁶⁶ Kutatócsoportunk korábban EMS mutagenézist hajtott végre nagyszámú növénypopuláción. Ezek Wassilewskija-2 (Ws-2) ökotípusú, CAB2:LUC riporterrendszerrel rendelkező növények voltak. A periódusok mérése folyamatos vörös fényben történt, hiszen állandó körülmények között a belső órának csak az önálló működését látni és ez alapján lehet kiválogatni a vad típustól eltérő cirkadián fenotípusú növényeket, ezt nevezzük mutáns szűrésnek. A folyamat során több új cirkadián óra mutáns lett azonosítva, köztük egy, a vad típushoz képest körülbelül 2 órával rövidebb periódusú *rs24* (*red screen 24*) nevezetű és egy másik, a vad típushoz képest körülbelül 2 órával hosszabb periódusú, *rs2* (*red screen 2*) nevű vonal.

Az *rs24*

Az *rs24* mutációt nem befolyásolja a fény minősége vagy mennyisége

A fény sokszor erős hatással lehet a cirkadián órára, emiatt nem lehetünk benne teljesen biztosak, hogy a rövid periódust maga a cirkadián óra, azon belül is a központi oszcillátor mutációja okozza-e. A kialakult fenotípusért felelős lehet akár a megvilágítás minőségének (kék, vörös, távoli vörös hullámhossz tartományok) vagy mennyiségének (fényintenzitás) érzékelésében bekövetkezett változás is. Annak okáért, hogy ezt kizárjuk, CAB2:LUC riportert hordozó vad típusú és *rs24* mutáns növények periódusát mértük meg különböző intenzitású, folyamatos vörös és kék fényben. A kísérletek elvégzéséhez először 12 óra fény, 12 óra sötét fotocikluson nevelkedtek a növények egy héten keresztül, majd folyamatos vörös vagy folyamatos kék fény alá kerültek. A mérés során többféle erősségű kék vagy vörös fényt alkalmaztunk, és 4-5 napon keresztül történt a periódushossz mérése.



A kísérletek elvégzése után azt találtuk az *rs24* mutáns esetében, hogy a fény minősége és mennyisége sem befolyásolta a fenotípust. Ezek jól láthatóak az alábbi ábrákon (10/A és 10/B ábrák), külön grafikonokon a kék és vörös fényen mért adatok, a különféle fényintenzitások függvényében ($0,1-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A késsel jelölt vad típus a pirossal jelölt *rs24* mutánshoz képest mindig körülbelül 2 órával hosszabb és ugyanennyi marad a fény erősségének

megváltoztatásai során is. A kérdéses periódushossz különbség a mutáns és a vad típus között megmaradt, ebből pedig következhet az a feltételezés, hogy a mutáció nem az óra bemeneti oldalát, hanem a központi oszcillátor egy vagy több elemét érinti, aminek köszönhetően a munka tovább folytatódhat a cirkadián óra érintett elemeinek keresésével.

A mutáció által érintett gén megtalálása

Ezek után genetikai térképezés lett elvégezve annak céljából, hogy fény derüljön rá, hol található az *RS24* lókuszt, melyik génben történt mutáció, ami felelős a bemutatott 2 órával rövidebb periódus fenotípus kialakításáért. Ehhez *Ws* (Wassilewskija) ökotípusú *rs24* mutáns növény lett *Col-0* (Columbia) vad típusú növényvel keresztezve, amiből keletkezett az *F2* populáció a térképezéshez. Ezekből kiválogatásra kerültek a mutáns fenotípusú egyedek. Tudjuk, hogy az *F2* egyedek homológ kromoszómájából az egyik *Ws*, a másik pedig *Col* ökotípusú. Ezek után szelektálni kell a növényeket fenotípus alapján, most esetünkben a 2 órával rövidebb periódusra. Így tudható, hogy az érintett gén, amit szeretnénk kiszzelektálni, homológ formában szerepel és mindkét szálon a *Ws* ökotípus jelenik meg, ezen a részen tehát az 50-50 százalékos aránya a két ökotípusnak eltolódik a *Ws* irányába. Mindezt szekvencia analízis során tudjuk kideríteni és így lehet választ kapni arra, hogy mely gének lehetnek érintettek a mutáció kialakulásában. Az *rs24* az *V.* számú kromoszóma felső karján, egy körülbelül 50 kbp hosszúságú részen helyezkedik el. Ezen a területen lehetséges több olyan potenciális gént is találni, melyekben történt mutáció és így okozói lehetnek a megváltozott fenotípusnak. Ezek SNP, azaz Single Nucleotide Polymorphism mutációk. Az SNP olyan mutáció, amikor egy-egy nukleotid megváltozik. Jelen esetben ennek következtében a kódolt aminosav is más lett. Az *rs24* mutáns esetében 4 lehetőség volt (12. ábra).

kromoszóma és pozíció	nukleotid csere	aminosav csere	gén/fehérje azonosítója	gén/fehérje neve
V., 2025743	G->A	S->F	AT5G06600	UBP12, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12
V., 5774083	G->A	A->V	AT5G17520	MEX1, Maltose excess protein 1
V., 8061193	G->A	D->N	AT5G23890	UC, Uncharacterized protein
V., 14817718	G->A	Q->STOP	AT5G37380	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein

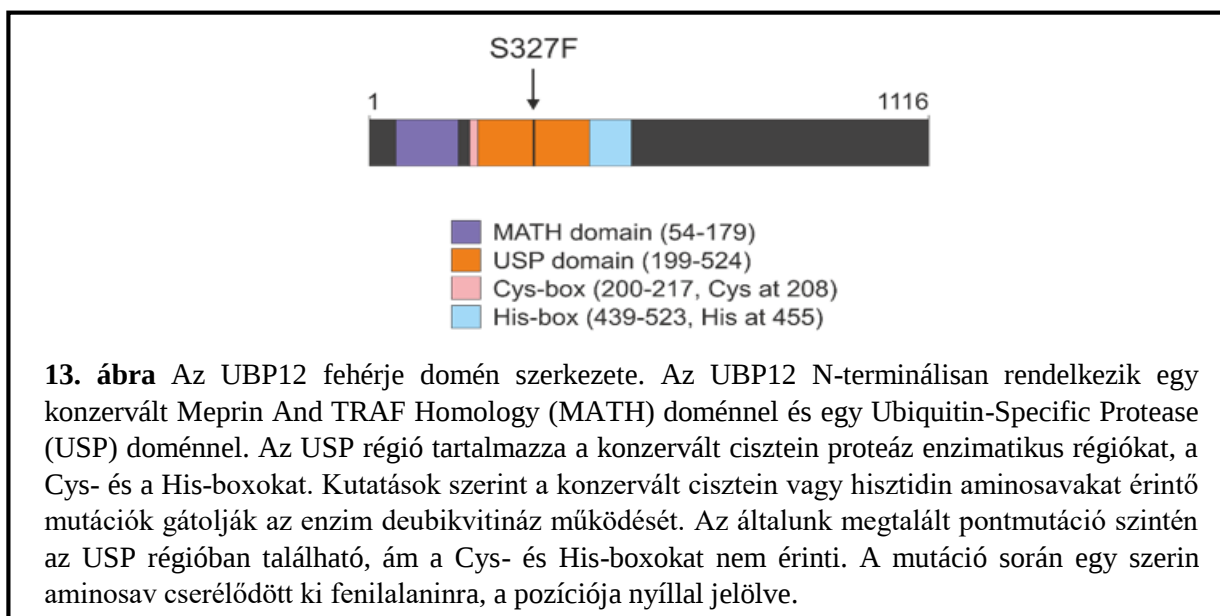
12. ábra A négy lehetséges gén, mely a fenotípust okozó mutációért lehet felelős.

A mutáns fenotípusért felelős gént végül komplementációval sikerült azonosítani. Egy korábbi munkánk során mutáns háttérben kifejeztettük az adott gén vad típusú kópiáját. A vad fenotípus helyreállításával sikerült igazolni, hogy az *rs24* esetében az *ubp12* génről van szó, az ebben megtalált mutáció okozza az eltérő periódushosszt. A nukleotid csere egy guaninról adeninre történő tranzíció volt, a 2025743-as genomi pozícióban. Ez az V-ös kromoszómán található és ez az SNP az UBP12-t kódoló gén hetedik exonjában található. A predikciók szerint szerinről fenilalaninra történő aminosav cserét okozott a 327. pozícióban.

Az *UBP12* gén egy ubikvitin proteázt kódol (13. ábra). Az UBP12 fehérje strukturálisan rendelkezik egy konzervált MATH fehérje interakciós doménnel és egy USP doménnel, ami deubikvitinációért felelős Cys-box és His-box részekkel rendelkezik. Kimutatták, hogy a cisztein vagy hisztidin aminosavak mutációja megzavarja a proteáz deubikvitináló képességét.^{8,97} A mi mutánsunk, az *rs24* esetében ebben a proteáz doménben történt egy pontmutáció, ami aminosav változást eredményezett. A mutáció ugyan nem érinti se a Cys- se a His-boxokat, de ennek ellenére feltételezhető, hogy okoz valami változást a fehérje funkciójában.

A mutáció nincs befolyással a mRNS szintjére

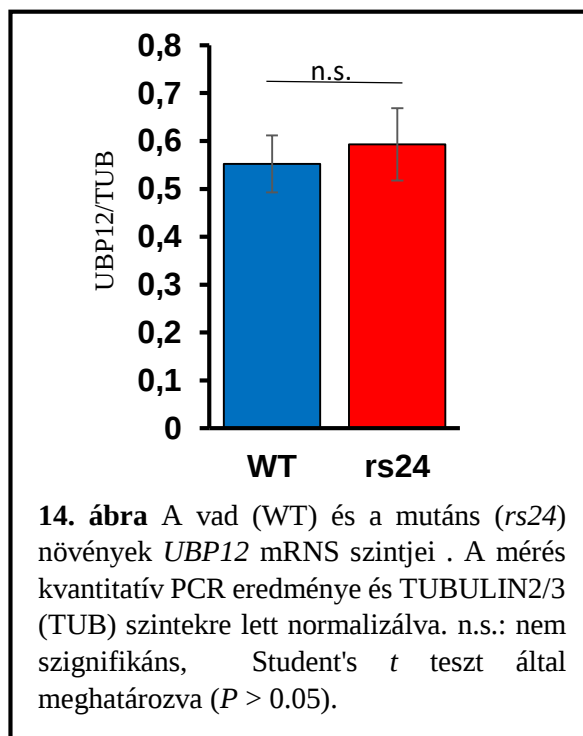
Az ubikvitin proteáz ubikvitin molekulákat hasít le más fehérjékről, így elősegítve azok degradációját vagy akár éppen ellenkezőleg, a stabilizálását. Egy fehérje működése függhet



annak szerkezetétől, stabilitásától. A jelenlegi mutáns esetében egy aminosav csere történt a 327-es pozícióban és ez a fehérje aktív centrumát jelenti, az USP domént. Az USP domén pedig a Cys box-al és a His-box-al van közrefogva, amikben helyet foglalnak a katalitikusan esszenciális cisztein és hisztidin aminosavak. Az aminosavcsere során a 327-es pozícióban egy szerin aminosav cserélődött fenilalaninra. A szerin egy közismerten sok esetben foszforilálódó

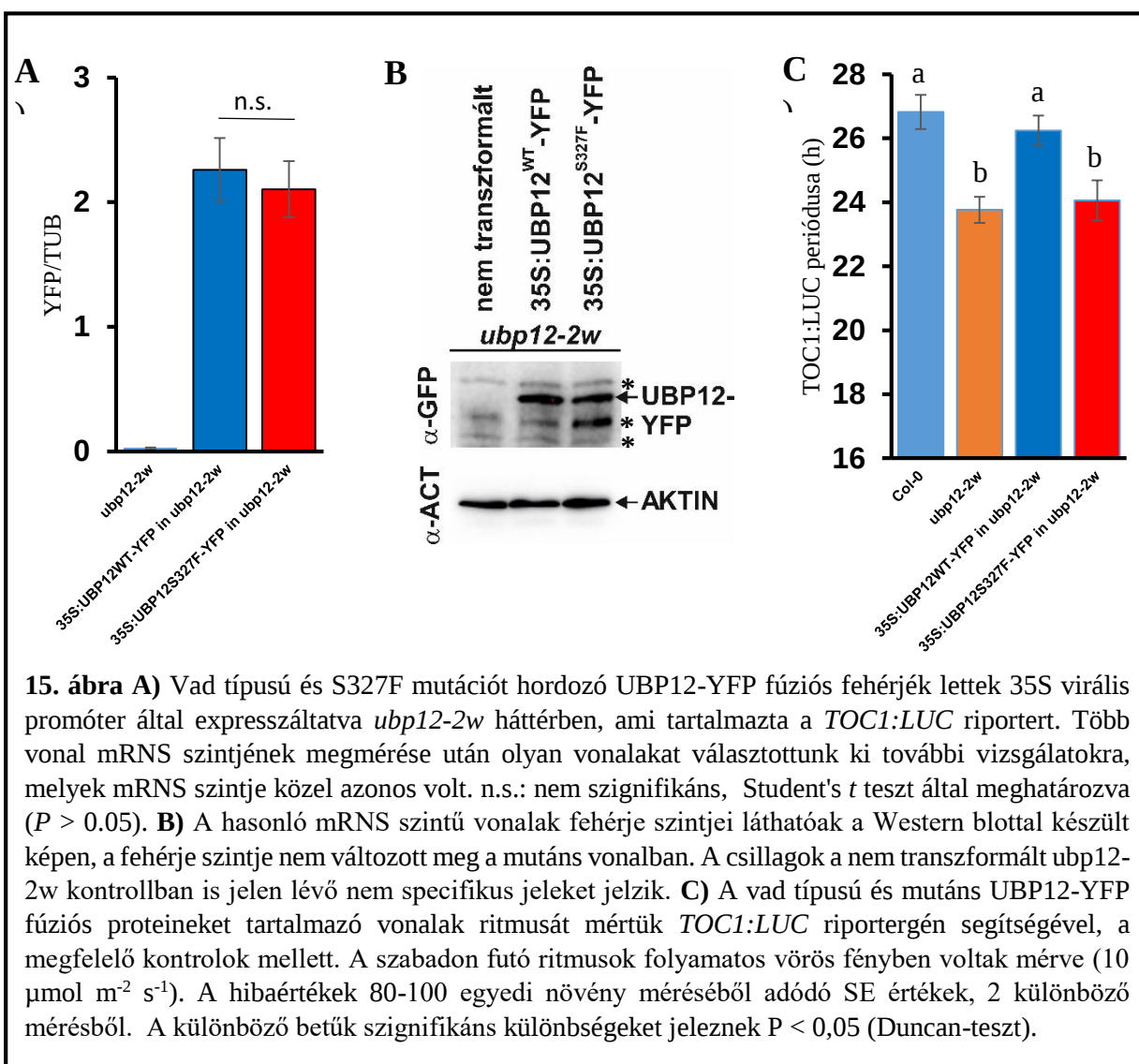
aminosav, a fenilalanin ezzel ellentétben pedig nem foszforilálható. A foszforiláció mint azt tudjuk, okozhat stabilitásbeli vagy funkcionálisbeli eltérést úgy, mint bármelyik más poszttranszkripció vagy poszttranszlációs módosítás.^{85,167} Tehát ha ilyen okból adódóan az ubikvitin proteáz fehérje nem tud megfelelő szerkezetet felvenni és így nem annyira stabil vagy éppen nem látná el megfelelően a funkcióját, akkor az okozhatná a mutáns fenotípust. Ennek ellenőrzésére, hogy stabilitás vagy funkcióbeli változás áll a háttérben, megnéztük az mRNA és a fehérje szinteket. Az mRNA valamint a fehérje szinteket összehasonlítva a mutánsban és a vad típusban kikövetkeztethetjük, hogy a fehérje szintézis melyik lépcsőjénél okozott problémát az aminosav cseréje. Amennyiben azt látjuk, hogy az mRNA vagy a fehérje szintek különböznek valamilyen módon a mutánsban és a vad típusban, akkor valószínű, hogy a stabilitása sérült a fehérjéknek.

Így első lépésként elvégeztük az mRNA szintek méréséhez szükséges mintaszedést és feltártuk a mintákat. Eredményként azt kaptuk, hogy az *UBP12* mRNA szintje azonos szinten van mind a vad típusú (Ws), mind pedig az *rs24* növényekben (14. ábra), ez pedig arra utal, hogy ezen a molekuláris szinten a mutáció nem okozott változást. Így elmondhatjuk, hogy a transzkripció út vonal nem sérült, az *UBP12* mRNA poszttranszkripcionálisan változatlan maradt, valamint az mRNA féléletideje sem változott.



Az aminosavcsere nem okozott fehérjeszintbeli változást

Az mRNS szintek meghatározása után következő lépésben a fehérjeszintek ellenőrzése jött soron (15. ábra). Ehhez elsősorban létre kellett hozni a megfelelő konstrukciókat, hogy a kívánt fehérjénk valamilyen jelöléssel legyen ellátva, így biztosan nyomon tudjuk követni, hogy történt-e valamilyen változás az UB12 akkumulációjában a mutáció hatására. Ezeket agrobaktérium mediált génátvitellel sikerült létrehozni, epitópjelölt UB12 fehérjék lettek használva. A vad és a mutáns típusok esetében is az YFP toldalékot az UB12 fehérje C-terminálisához fuzionáltattuk (UB12^{WT}-YFP és UB12^{S327F}-YFP), a fúziós fehérjét pedig a virális 35S promóterrel fejeztettük ki olyan T-DNS inszerciós mutáns növényekben, melyek hordozzák a TOC1:LUC+ riportergént. Néhány generáció után homozigóta T3 növényi

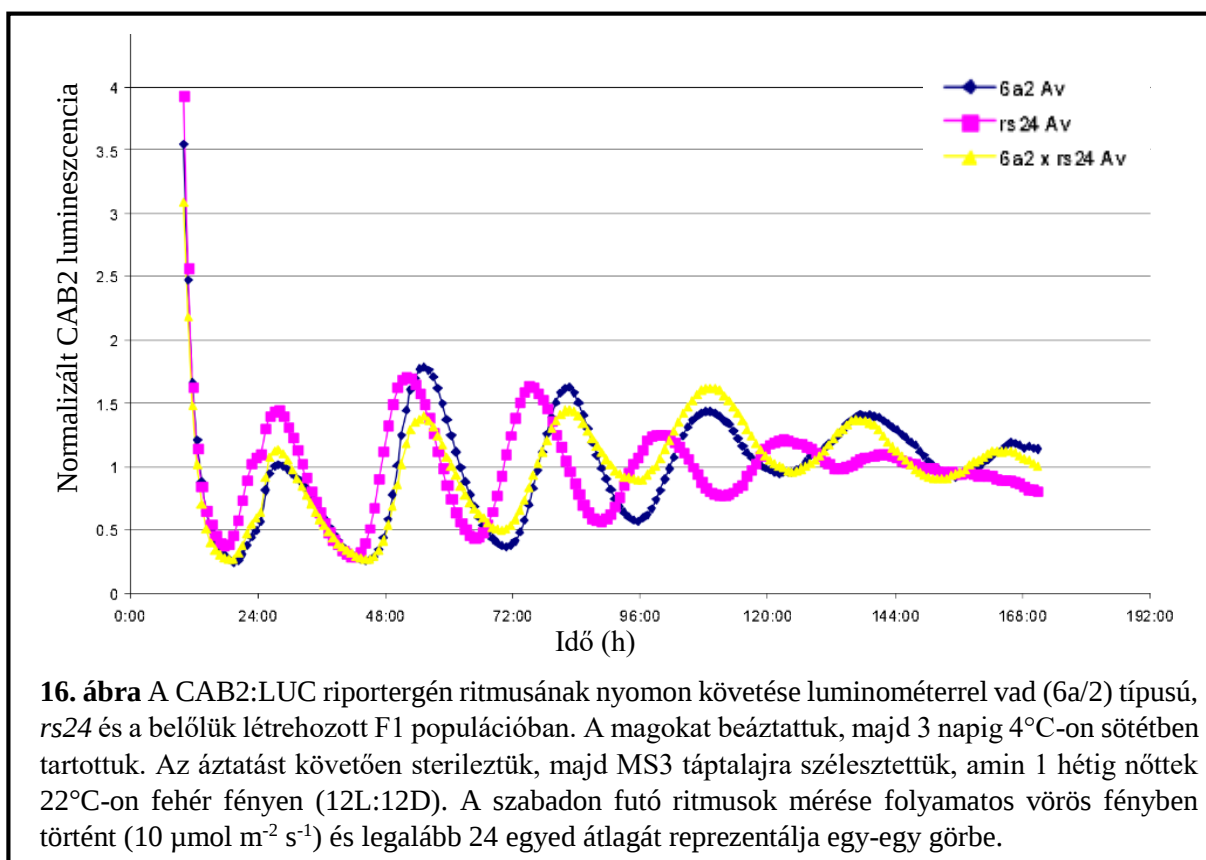


vonalakban vizsgáltuk meg először az mRNS szinteket, majd azonos szintű UB12-YFP transzkripteket expresszáló vad és mutáns vonalokból vettünk mintát fehérje vizsgálathoz. A minták feltárása, futtatása és előhívása után azt az eredményt kaptuk, hogy a vad és mutáns

párok között a fehérje szintekben nincs különbség, vagyis az UBP12 expressziójára nem volt hatással a mutáció. Mindemellett az előbb említett vonalak periódusát is megvizsgáltuk és az UBP12^{WT}-YFP in *ubp12-2w* vonalban sikerült visszaállítani a mutáns háttérű (*ubp12-1* nullmutáns) növény rövid periódusát a vad típusnak megfelelő periódusra, egyszóval komplementáltuk. Ezzel szemben az S327F mutációt hordozó transzgén esetében a komplementáció nem volt sikeres, ugyanúgy megmaradt a rövid periódus fenotípus azonos fehérjeszintek mellett. Mindez azt mutatja, hogy a mutáció nincs hatással se a transzkripcióra sem pedig a translációra, a fehérje stabilitása nem változik. Így a mutáció hatását poszttranszlációs módosításban vagy egyéb más jelátviteli útvonalban betöltött szerepében érdemes tovább kutatni.

A tesztelő keresztezésből F1 populáció létrehozása és a mutáció recesszív voltának bizonyítása

Egy új mutáns esetében felmerül az a kérdés is, hogy a mutáció öröklődése mit mutat, hogyan öröklődik tovább az utódokba, és azokban hogy jelenik meg. Azért, hogy ezt kiderítsük, tesztelő keresztezéseket hajtottunk végre, azaz a mutánsunkat az ismert homozigóta vad típusú növényvel kereszteztük. Tehát ennek megfelelően kereszteztük egymással az *rs24* mutánst és a neki megfelelő ökotípusú, azaz Wassilewskija vad típust (6a2). A keresztezéseket elvégeztük



mindkét irányban. A magok beérése után luminométerben megmértük mindegyik egyed periódushosszát és az átlag periódushosszokat hasonlítottuk össze egymással (16. ábra). A vad típus a már ismert közel 24 órás ritmust mutatta, *rs24* pedig az ehhez képest két órával rövidebb periódust. A vad és a mutáns típusú növények keresztezéséből létrejött heterozigóta F1 populáció periódusa pedig a vad típussal azonos hosszúságú periódust mutatott. Nem hasonlított a mutáns fenotípusra, illetve heterozigóta révén lehetőség lett volna egy köztes periódushossznak a megjelenése, de nem így történt. Ezek alapján azt állíthatjuk, hogy a mutációnk recesszív, hiszen egyértelműen csak az egyik fenotípust mutatja a szülők fenotípusa közül, méghozzá a vad típusét.

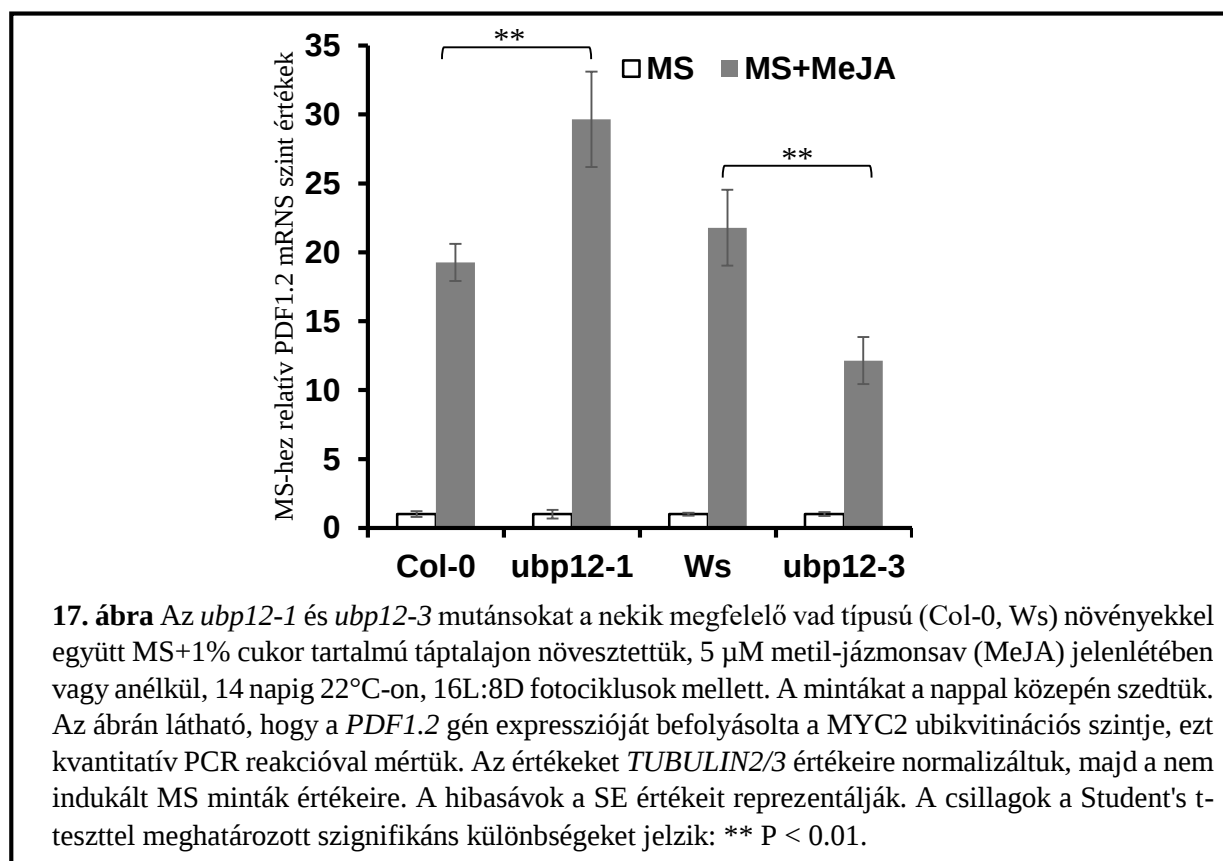
Az eddig bemutatott kísérletek és eredményeik azt mutatták számunkra, hogy az *UBP12* génben felfedezett új mutáció valószínűleg az óra központi oszcillátorát érinti. Az mRNS és fehérje szintekben nem történt változás és a mutációnk recesszív öröklődést mutat. A cirkadián óra működésének az eltéréseért az *UBP12* génben található S327F mutáció az oka. A kapott eredmények azt jelzik, hogy a mutáns fenotípus kialakulása nem az *UBP12* szintjének megváltozása miatt jelenik meg, hanem egyéb posztrankripció/transzlációs változások vagy esetleg a deubikvitináz enzim molekuláris kölcsönhatásának vagy aktivitásának/funkciójának változása miatt. Ezeknek megfelelően az *rs24*-et *ubp12-3*-nak neveztük el. Az *UBP12*-nek ez egy új allélja, *ubp12-1* néven ismert az enzimet egyáltalán nem termelő null mutáns, illetve van egy másik T-DNS inszerciós allél, ami *ubp12-2w* névre hallgat. Így lett a mi mutánsunk *ubp12-3*.

Cirkadián órán kívüli *UBP12* targetek

Az *UBP12* nem csak a cirkadián óra felé mutat aktivitást, hanem más, pleiotróp funkciókkal is rendelkezik, mivel ubikvitin proteázként több más targettel is rendelkezik. Ez a pleiotróp hatás pedig kiváló lehetőséget ad arra, hogy össze tudjuk hasonlítani az *ubp12-1* null mutánsal az *ubp12-3*-at, esetleg hogy megfejtsük az egész rendszer működési alapelvét, valamint, hogy fény derüljön arra, hogy az új mutáció csak egy specifikus részt érint a jelátviteli útvonalak közül, vagy általános hatással van mindenre.^{83,157} A továbbiakban az UBIKVITIN PROTEÁZ 12-nek legfőképp két olyan célpontjáról lesz szó, melyekre az bizonyítottan hatással van. Ez a MYC2 és H2A, azonban ezeken kívül természetesen még számos más szerepe is van például a virágzásban, patogének elleni védekezésben, gyökér differenciációban vagy hormon szignalizációban.¹⁵⁴

Metil-jázmonsav jelátviteli útvonala

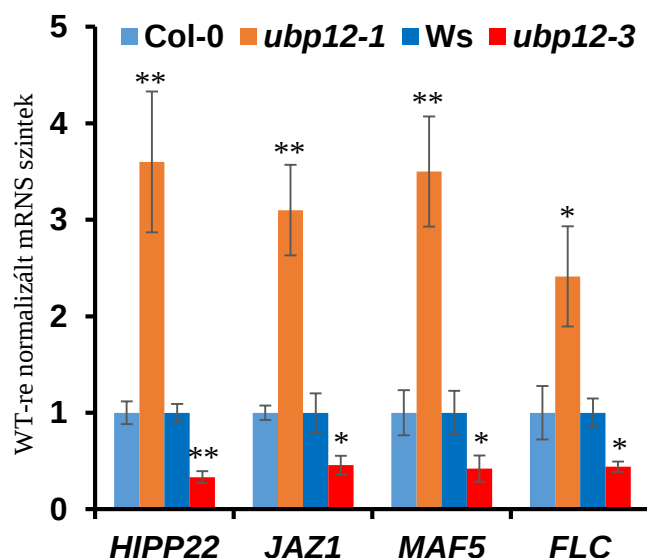
A MYC2 egy transzkripciós faktor és a fehérje szintje egy lényeges meghatározó egyes fejlődési folyamatokban vagy a kórokozók elleni védelemben, mivel a jázmonsav jelátviteli útvonala játszik fontos szerepet. A MYC2 fehérje sötétben és távoli vörös fényben destabilizálódik, azonban a vörös és kék fény, illetve a metil-jázmonsav stabilizálja.^{148,149,168} A jázmonsav a PUB10 mediált ubikvitinációval tudja a MYC2 fehérje szintjét szabályozni. A



PUB10 E3 ligázként ubikvitin molekulákat kapcsol a MYC2 fehérjéhez, így azt kijelölve a degradációra. Ez az egyetlen eddigi ismert molekula, ami a MYC2 instabilitását tudja okozni.¹⁶⁹ Ahhoz, hogy a MYC2 stabilizálódhasson és így fel tudjon halmozódni, szükség van arra, hogy az ubikvitin molekulák el legyenek róla távolítva. Ezt a szerepet tölti be az UBP12. Az UBP12 stabilizálja MYC2-t, ennek hatására pedig a PLANT DEFENSIN 1.2 (*PDF1.2*) expressziós szintje csökken.^{111,149,154} A *PDF1.2* gén egy etilénre és jázmonátra reagáló növényi defenzint kódol, mely véd a kártevők ellen. Kimutatták, hogy *ubp12-1* null mutáns esetében, amikor egyáltalán nincs UBP12 expresszió, akkor a *PDF1.2* fehérje szint magas marad, hiszen a MYC2 nem képes stabilizálódni, így pedig a *PDF1.2* szintje nem csökken. Elvégeztük mi is a kísérletet ugyanígy az *ubp12-3* mutánsal, azonban ebben az esetben erősen csökkent a *PDF1.2* szintje, teljesen ellentétes hatást jelezve (17. ábra).

Hiszton 2A

Az UBP12 másik célpontja a hiszton 2A (H2A). A hisztonok a kromatin összerendezésében játszanak szerepet, a hisztonokat érintő módosítások pedig a kromatin állapotára vannak hatással, hogy az milyen kompakt legyen. A minket érintő UBP12 egy ubikvitin proteáz ubikvitint, hasít le más molekulákról, többek között így a hiszton 2A-ról is. A hiszton 2A-ról monoubikvitint tud lehasítani, ennek eredménye pedig kromatin kondenzáció, aminek



18. ábra Az *ubp12-1* és *ubp12-3* mutánsokat a nekik megfelelő vad típusú (*Col-0*, *Ws*) növényekkel együtt ½ MS táptalajon növesztettük, 14 napig 22°C-on, 16L:8D fotociklusok mellett. A mintákat a nappal közepén szedték. Az ábrán látható, hogy a kiválasztott gének (*HIPP22*, *JAZ1*, *MAF5*, *FLC*) expresszióját befolyásolta a hiszton 2A ubikvitinációs szintje, ezt kvantitatív PCR reakcióval mértük. Az értékeket *TUBULIN2/3* értékeire normalizáltuk, majd a megfelelő vad típusú minták értékeire. A hibasávok a SE értékeit reprezentálják. A csillagok a vad típushoz viszonyított szignifikáns különbségeket jelzik, Student's t-tesztel meghatározva: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

következményeként egyes gének transzkripciója gátlódik. Ilyen gének a *HEAVY METAL ASSOCIATED ISOPRENYLATED PLANT PROTEIN 22* (*HIPP22*), *JASMONATE-ZIM-DOMAIN 1* (*JAZ1*), *MADS AFFECTING FLOWERING 5* (*MAF5*) és a *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*).^{157,158} Értelmeszerűen, ha nincs proteáz, akkor nincs ami lehasítsa ezeket a monoubikvitin molekulákat, azaz nincs heterokromatinizáció és a gének szabadon átíródhatnak. Így ennek megfelelően a null-mutáns *ubp12-1* esetében, ahol nincs ubikvitin proteáz, ott a vad típushoz képest, a mutánsnál magasabbak a fentebb említett gének expressziója. Mi is ezt kaptuk, mikor elvégeztük a kísérletet az *ubp12-1* esetében. Azonban az *ubp12-3* új allélnál, ahol ugyanezt várnánk, hogy alacsony lesz ezeknek a géneknek az expressziója, nem ezt kaptuk eredményül. Itt ugyanis a vad típushoz képest is alacsonyabb a transzkripciós szint. Ez arra

enged következtetni, a MYC2 eredményeivel együtt összevetve, hogy az *ubp12-3* egy olyan új allél, amely az UBP12 túlműködését okozza a mi kísérleti körülményeink között.

Az *ubp12-3* mutáció hatása a virágzásra

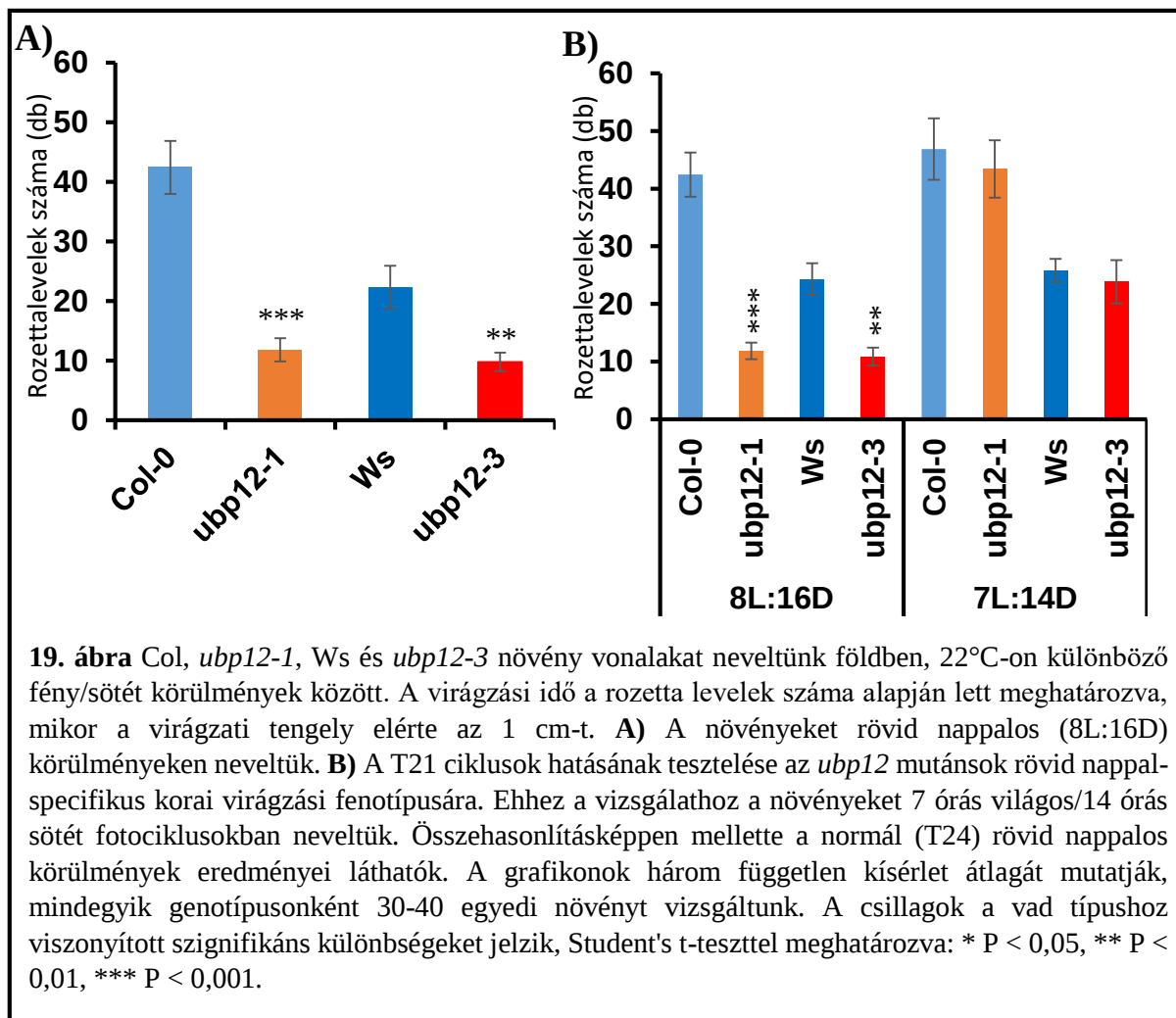
Láthattuk a már leírt kísérletek eredményei során, hogy vannak olyan folyamatok, melyekben az UBP12 direkt hatása volt megfigyelhető, mint a MYC2 és a H2A esetei. Ezeknél az *ubp12-3* és a null mutáns *ubp12-1* fenotípusai különbözőek voltak. Azonban abban az esetben mikor az UBP12 indirekt módon befolyásol valamilyen folyamatot, akkor a két *ubp12* mutáns allélnál hasonló fenotípus kialakulását is elképzelhető, ilyen a megváltozott cirkadián óra működése is, hisz mindkettő mutáns két órával rövidebb periódussal rendelkezik.

Az eddig említett tulajdonságain kívül az *ubp12-3* mutáns még rendelkezik más fenotípusokkal is, egyik ilyen a korai virágzás. Ez a korai virágzás azt jelenti, hogy rövid nappalos (8L:16D) körülmények között tartva a növényeket, az *ubp12-3* korábban kezd el virágozni, mint a vad típusú társaik. Növényeknél az óra által időzített folyamatok közül az egyik legjobban tanulmányozott terület a virágzás fotoperiodikus szabályozása.

A virágzást két fő gén és azok génterméke szabályozza, a *CONSTANS (CO)* és a *FLOWERING TIME (FT)*. A nappal folyamán elkezd termelődni a CO fehérje. A CO mRNS átíródása a cirkadián óra által szabályozott, majd a termelődött fehérjét a fény stabilizálja, így a nap során egyre magasabb lesz a szintje. A felhalmozódott CO az *FT* transzkripcióját indukálja levélben, majd FT az apikális merisztémába szállítódik és bekapcsolja a virágzást indukáló géneket. Az *FT* expressziója kizárólag hosszú nappalon tud aktiválódni, mert ekkorra halmozódik fel megfelelő szintre a CO. Ha rövid nappalos körülmények között neveljük a növényeket, akkor a CO fehérje nem tud kellő mennyiségűre felhalmozódni, hiszen hamarabb lesz sötét, vagyis nincs fény, ami stabilizálja a megtermelődött CO fehérjét és így az *FT* transzkripciója sem fog indukálódni. Így a virágzás kései lesz olyan növényekben, melyeknek a periódusa közel 24 óra. A kései virágzás a hosszú nappalos körülményekkel (16L:8D) összehasonlításban értelmezhető. A hosszú nappalok során a fény hatékonyan stabilizálja a CO fehérjét, amelyek indukálhatják az *FT* gén transzkripcióját.

Az *ubp12-3* mellett az *ubp12-1* nullmutánst is megfigyeltük hosszú nappalos körülmények között. Korábbi kutatómunkák során már leírták, hogy *ubp12-1* korai virágzású és ezt a H2A által okozott kromatin-kondenzációval magyarázták, ami ubikvitinációtól függ, és egyes gének, mint például *FLC*, nem tudnak megfelelően kifejeződni. Ezért ellenőriztük az *ubp12-1* mutáns fenotípusát az *ubp12-3* mutánsunkkal együtt (19/A. ábra) és azt kaptuk, hogy rövid nappalos

(SD) körülmények között a kettőnek nagyon hasonló volt a fenotípusa virágzás szempontjából. Mindez arra utalhat, hogy a virágzási időt az UBP12 közvetett módon szabályozza, valószínűleg a cirkadián óra sebességének befolyásolása (növelése) révén. A 8 óra fény, 16 óra sötét rövid nappalos körülmények között a két mutáns a tizedik nap környékén kezdett el virágozni, viszont a nekik megfelelő ökotípusú vad típusok (Ws és Col) esetében több mint 20

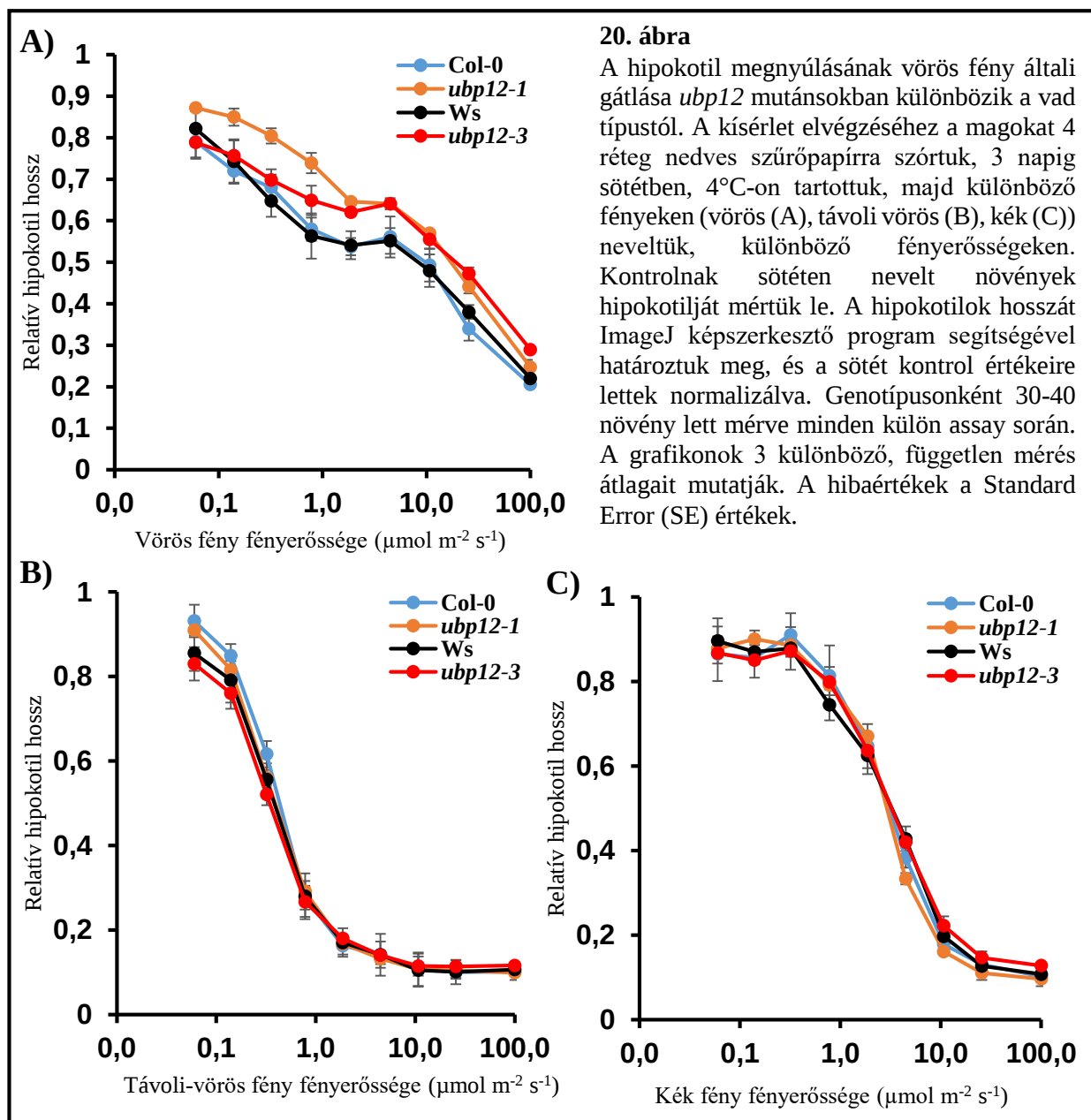


nap volt szükséges a virágzati tengely megjelenéséhez. Mivel mindkét mutánsról tudjuk, hogy rövidebb periódusúak a vad típushoz képest, ezért megnéztük a virágzást olyan körülmények között is, ahol a fény/sötét ciklusok hossza (vagyis a nap időtartama) megfelel a mutánsok óra által meghatározott értéknek (19/B. ábra). Ez a T-ciklus kísérlet, rövid nappalos körülményeket állítottunk be, rövidebb napon, azaz 7 óra fényt követően 14 óra sötét következett, egy nap hosszúsága így 24 óra helyett 21 óra volt, de a nappal-éjszaka arányai megfeleltek a 24 órás rövid nappalnak. A T21 cikluson nevelt növények esetében megállapítottuk, hogy a mutánsok ugyanannyi idő után kezdtek el virágozni, mint ahogyan a nekik megfelelő ökotípusú vad típusok is. Ilyenkor a rövid periódusú növények olyan körülmények közé kerülnek, ami számukra normális hosszúságú napnak tekintendő, ugyanúgy ahogy a vad típusú növényeknek

a 24 óra hosszúságú nap. Itt tehát elértük azt, amit már korábban más kutatók is megmutattak, hogy amikor a növény azt a nappal/éjszaka ciklust érzékeli, ami a cirkadián órájának működésével egyezik, akkor az addigi észlelt virágzás fenotípus eltűnik, hiszen a külső és belső környezet periódusa megegyezik, ez pedig visszaállítja a normál virágzási időt.¹⁷⁰ Összeségében kísérletünknek eredménye azt mutatja, hogy a T-ciklus megszünteti a korai virágzás fenotípust, tehát ennek a fenotípusnak a kialakulásáért legnagyobb valószínűséggel a megváltozott óra a felelős, az UBP12 funkció megváltozása közvetett módon járul hozzá.

Az *ubp12-3* mutáció hatása a hipokotilra

Mivel a cirkadián órának van egy bemeneti oldala, amin keresztül a fény hatással lehet az óra működésére, ezért a cirkadián órára eső vizsgálatok közül az egyik fontos és kihagyhatatlan lépés a fotomorfogenikus válasz megfigyelése, jelen esetben a hipokotil hosszának megmérése. Ennek megfelelően cselekedtünk mi is és megmértük a hipokotil megnyúlás fény általi gátlásának mértékét vörös, távoli vörös és kék fényeken is, különböző fényintenzitásokon. Ahogy az az ábrákon is látható, távoli vörös és kék fény (20/ B, C ábra) esetében egyik fényintenzitáción sem volt különbség a vad típusú és az *ubp12* mutáns növények hipokotil hosszában. Azonban vörös fényen (20/ A. ábra) már megfigyelhető egy jelentősebb különbség mind a vad típushoz képest, mind a két mutáns között. Az *ubp12* mutánsoknál a hipokotil megnyúlás vörös fényre hiposzenzitív választ adott, vagyis a megnyúlás gátlása kevésbé volt sikeres, a vad típushoz képest hosszabb hipokotillal rendelkeztek. Az *ubp12-1* mutáns az összes fényintenzitáción mérve a vad típushoz képest hosszabb hipokotillal rendelkezett. Az *ubp12-3* mutánsnál a hipokotil megnyúlás alacsonyabb fényintenzitásokon nem volt egyértelműen megfigyelhető, de magasabb fényintenzitásokon az *ubp12-1* mutánséhoz hasonló választ adott. A két mutáns közti fenotipikus hasonlóság arra utalhat, hogy a hiposzenzitivitás valószínűleg a virágzáshoz hasonlóan a megváltozott óraműködés eredménye lehet.



UBP12 homológok

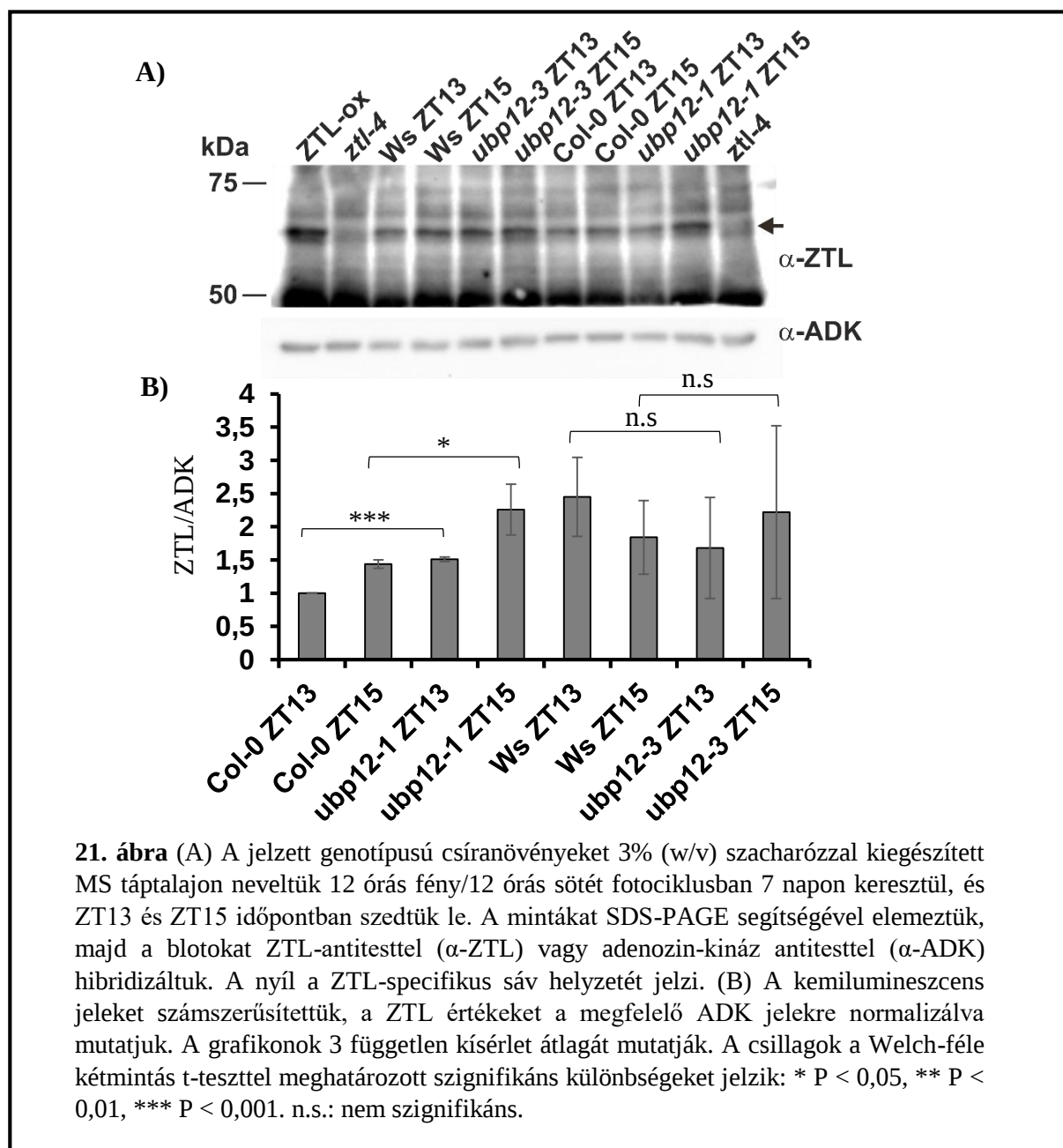
Ahogy arra már fény derült, az új mutánsunkban, a nukleotid cserének köszönhető aminosavcsere az *UBP12* gént érinti. Az *Arabidopsis* genomban több *UBP*-t kódoló szakasz is van, közülük az *UBP12* és *UBP13* ketten alkotnak egy alcsaládot közös tulajdonságuk, az N-terminálisan elhelyezkedő MATH domén jelenléte miatt. A MATH domén jelentősége, hogy egy fehérje interakciós domén és receptorokhoz vagy egyéb fehérjékhez való kötődést szolgálja. Egy másik jelentős különbség a MATH domén jelenlétén túlmutatva, hogy a többi *UBP* az *UBP26* kivételével nem rendelkezik azzal a szerin aminosavval, ami az *USP* doménben található és mutáció során fenilalaninná cserélődött.

Érdekes, hogy *Arabidopsis*-on belül UBP12-vel csak az UBP13 homológ, a többi növényi ubikvitin proteázzal nem, viszont más eukarióta organizmusokban találkozhatunk UBP12-höz hasonló USP-vel, ami MATH doménnel is rendelkezik. Továbbá az is meglepő, hogy nagyobb fokú homológiát mutat ezekkel, mint az *Arabidopsis* UBP-vel. MATH domén mellett a többi eukarióta organizmusban megnéztük a 327-es pozíciójú szerin aminosavat is homológia kérdése okán és azt kaptuk, hogy nagy fokú konzerváltságot mutat. Az, hogy ilyen magas szintű konzerváltságot mutat ez a szerin aminosav talán azt jelzi előre, hogy mennyire fontos szerepet tölt be a fehérje funkciójában. Ezt igazolják az eddigi eredményeink is, melyek során láthattuk, hogy a mutáció jelentősen változtatott UBP12 funkcióján.

Az UBP12 szerepe a növényi órában

Ahogy arról már szó esett, az UBP12 részt vesz a növényi óra működésében. A növényi cirkadián óra egyik fő eleme a ZEITLUPE. Ez a fehérje GIGANTEA-val kölcsönhatva stabilizálódik, melynek következtében szintje növekedni fog. A ZTL is stabilizálja GI-t. Korábban már egy másik kutatócsoport bemutatta, hogy szerintük az UBP12 ennek a két elemnek a deubikvitinációjával és az ezáltal való stabilizációjukkal vehet valószínűleg részt a cirkadián órának a működésében.⁹⁷ Kíváncsiak voltunk, hogy a két *ubp12* mutáns, amik ugyanolyan periódus fenotípussal rendelkeznek, vajon ugyanolyan molekuláris mechanizmussal is vesznek részt a cirkadián órában? Ennek tesztelésére megnéztük a ZTL szinteket az *ubp12-1* és az *ubp12-3* mutánsokban is, természetesen a nekik megfelelő vad típusú növények ZTL szintjével együtt. Az *ubp12-1* mutánsnál korábban azt írták le, hogy az *ubp12* és *ubp13* mutánsokban csökkent a ZTL fehérje szintje, azonban ezzel együtt ZTL targetjének, TOC1 fehérje mennyisége is.^{7,8,95} Ugyanezt a hatást már leírták *gi* funkcióvesztéses mutánsokban is. Mindebből arra következtettek, hogy GI az UBP12 és 13 proteázokkal képes ellensúlyozni ZTL aktivitását, így tud felhalmozódni a TOC1 szintje még a degradációja előtt. Valamint ZTL szintje is bár lecsökkent, mégis maradhatott egy olyan szinten, ami fényben csökkenthette a TOC1 szintjét. Ez különbözött attól, amit a HSP90 aktivitás gátlásakor tapasztaltak, alacsonyabb ZTL, de magasabb TOC1-szinteket eredményezett. Vagyis szerintük a HSP90 szükséges a ZTL fehérje éréséhez és aktivitásának elősegítéséhez. Így kutatásukkal azt bizonyítják, hogy GI szerepe kettős. Egyrészt HSP fehérjéket toboroz ZTL érésének elősegítéséhez, másrészt az UBP12 segítségével segít a ZTL targetjeinek deubikvitinálásában. Ezek alapján gondolhatjuk, hogy a mi mutánsunk esetében is hasonló ZTL, TOC1 és GI szinteket kapnánk, hiszen a fenotípus hasonló a két mutánsnál. Ennek ellenőrzése érdekében néztük meg a ZTL szinteket (21. ábra). A minták ZT13 és ZT15-nek megfelelő időpontokban

lettek leszedve, ugyanis ez az az időpont, amikor 12-12 óra fény/sötét ciklusok alatt növesztve,



a növényekben a legmagasabb a ZTL fehérje szintje. A korábban közölt adatokkal ellentétben⁹⁷ azt kaptuk, hogy *ubp12-1* mutánsban a ZTL szintje nem lecsökkent, hanem megemelkedett, az *ubp12-3* mutánsban pedig nem változott. Ezen adatok alapján úgy gondoljuk, hogy a mi kísérleti körülményeink között nem a ZTL fehérje stabilizálásán keresztül vesz részt az óra működésében az UB12. A GI szinteket sajnos - jól működő ellenanyag hiányában - nem tudtuk ellenőrizni. Így a tényleges folyamat, aminek során egy alul- és egy túlműködő UB12 ugyanazt a cirkadián fenotípust képes okozni, feltáratlan marad.

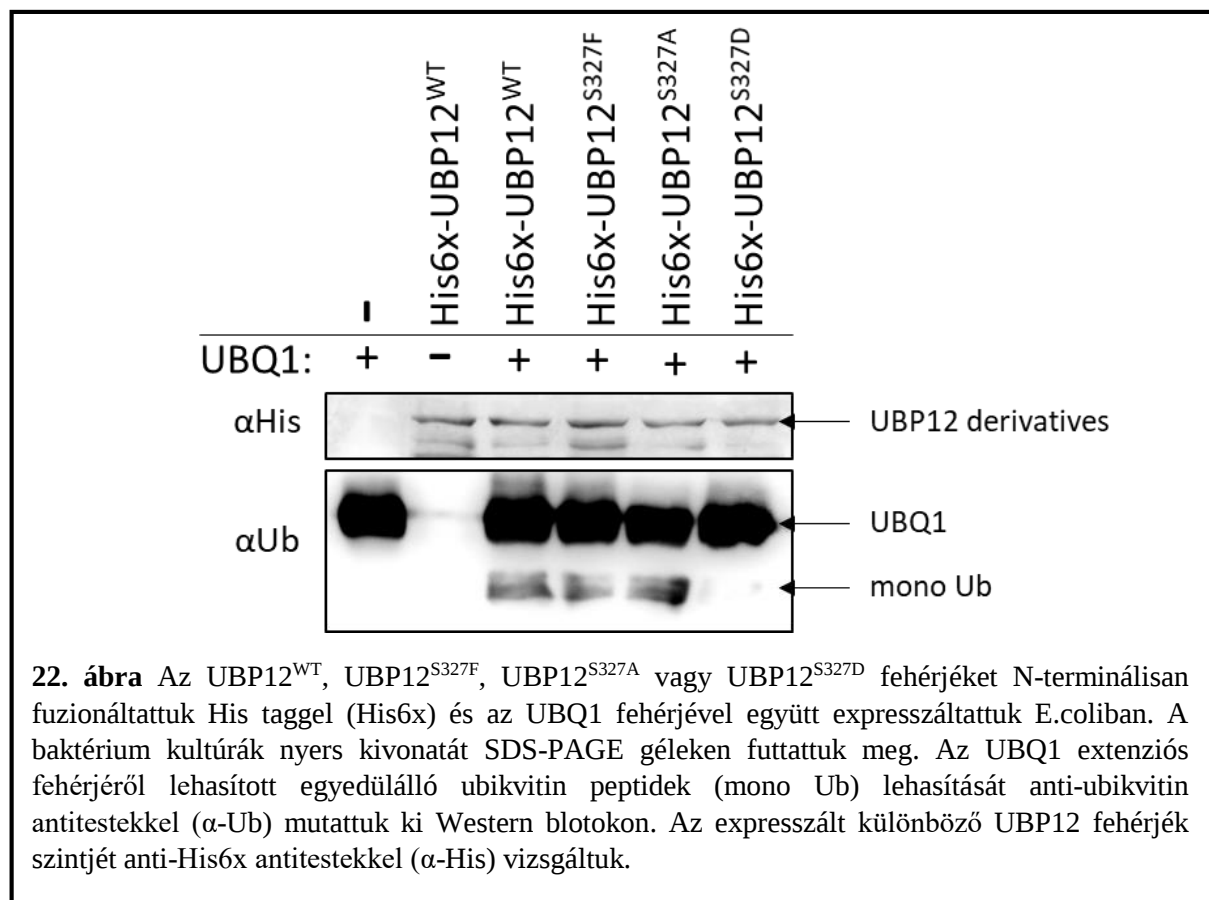
Foszforiláció

Az eddigi eredményeink alapján arra következtettünk, hogy mivel az S327F mutáció az UBP12 több funkciójára is valamilyen hatást gyakorolt, legnagyobb valószínűséggel egy olyan problémáról lehet akkor szó, mely az egész fehérjére, funkciójára, de leginkább az aktivitására van hatással. Mindennek tesztelésére fehérjét termeltettünk bakteriális rendszerben. Koexpresszáltattuk baktériumban az UBP12^{WT} és UBP12^{S327F} géneket az Arabidopsis ubikvitin extenziós fehérjével (UBQ1). Az UBQ1 természetes szubsztrátja az ubikvitin proteázoknak. A fehérje N-terminális részén található egy ubikvitin peptid és egy alfa-peptid kötés segítségével tudnak a fehérje ismeretlen funkciójú C-terminális részéhez kapcsolódni. Azt már több helyen is megmutatták, hogy az ubikvitin proteázok az N- és a C-terminális részek között hasítják az UBQ1 ubikvitin extenziós fehérjét, melynek következtében egy ubikvitin peptid szabadul fel. Ez Western blot analízis segítségével jól detektálható, így mi is ezt a módszert alkalmaztuk. Eredményeink alapján a teszt megfelelően működött, az UBP12^{WT} esetében a proteáz aktivitás egyértelműen detektálható a hasítási termék megjelenése révén (21. ábra). Azonban ugyanezt tapasztaltuk az UBP12^{S327F} mutánsnál is. A mutáció így meglepő módon, de közvetlenül nem befolyásolta az enzimaktivitást.

Korábban szót ejtettem arról, hogy a szerin egy olyan aminosav, mely gyakran foszforilálódik. Olyannyira gyakran, hogy eukariótákban ez a leggyakrabban foszforilálódó aminosav. Figyelembe véve, hogy az UBP12 S327F mutációjának van fenotípusa, nem teljesen alaptalan az a feltételezés, hogy az UBP12 327. pozíciójú szerin aminosava foszforilálódik a növényi sejtekben, és ez hatással van az enzim aktivitására. Hosszú ideje ismert és alkalmazott módszer, mikor egy adott aminosav foszforilációjának a fehérje biokémiai/funkcionális tulajdonságaira gyakorolt hatását bizonyos aminosavcserékkel utánozzák. Ha azt szeretnék elérni, hogy az egy nem foszforilált szerin aminosavat mimikáljon, akkor lehet például alanint (A) vagy fenilalanint (F) használni, de ha ennek éppen ellenkezője a kívánatos, akkor tökéletesen megfelelő a glutaminsav (E) vagy az aszparaginsav (D) az állandóan foszforilált állapotban lévő szerin utánzásához. Az általunk azonosított S327F mutáció esetében a fenilalanin mimikálhat egy nem

foszforilált szerint, ez a mutáció megakadályozhatja a foszforilációt ebben a pozícióban, és így megváltoztathatja az UBP12 működését a növényben.

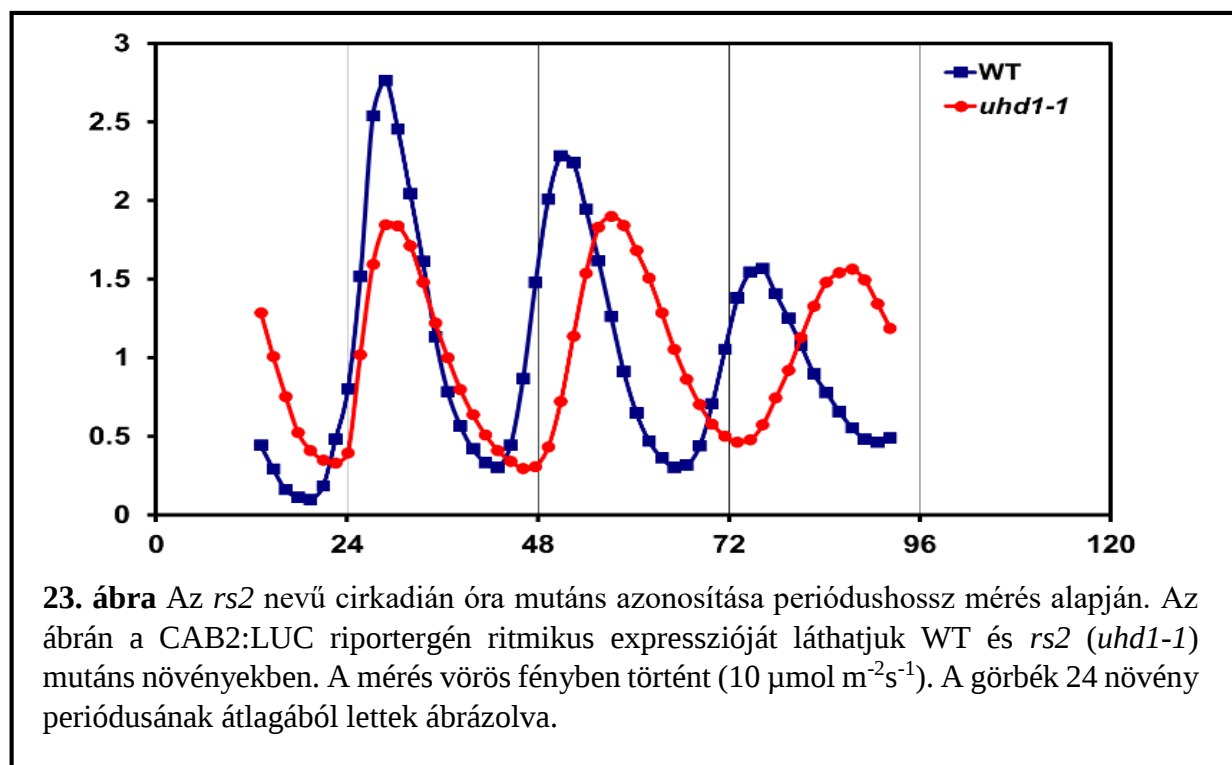
Ezért a hipotézisünk tesztelésére a már meglévő UBP12^{WT} és UBP12^{S327F} változatok mellett



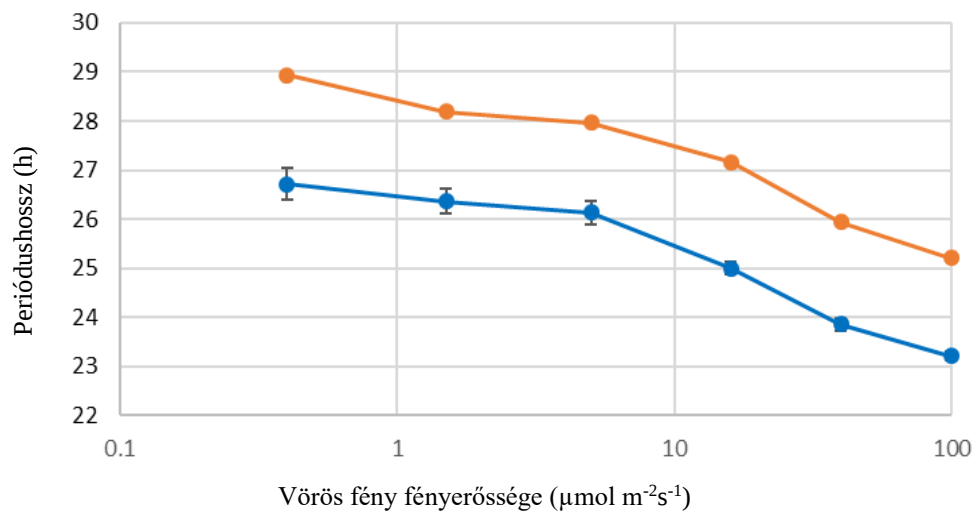
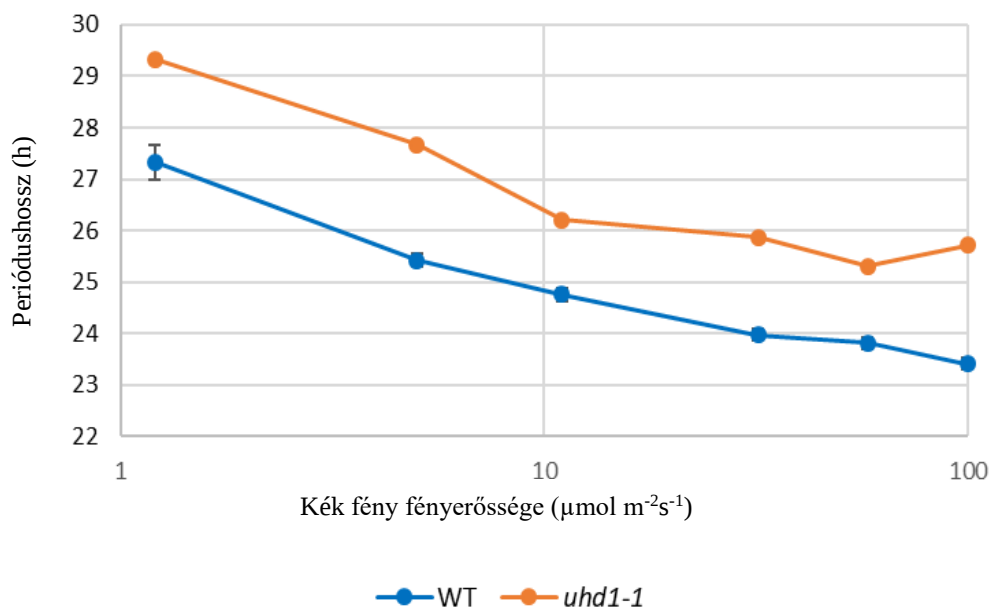
létrehoztuk UBP12^{S327A} és UBP12^{S327D} változatokat is, majd kifejeztettük a bakteriális expressziós rendszerben (22. ábra). A Western blot analízis elvégzése után azt kaptuk, hogy az UBP12^{S327A} hasonló proteáz aktivitást mutatott a UBP12^{WT} és UBP12^{S327F} változatokhoz képest. Azonban ez az aktivitás már egész mást mutatott a UBP12^{S327D} vágási hatékonyságának megfigyelésénél. Az eddigiekhez képest szignifikánsan kevesebb mennyiségű lehasított ubikvitin molekulát láthatunk, vagy a proteáz aktivitása csökkent. Ezeket összegezve azt adatok arra engednek következtetni, hogy az S327 foszforilációja gátolja az UBP12 aktivitását. Továbbá valószínűsíthető, hogy az S327F mutáció az UBP12 látszólagos túlműködését okozhatja növényben a gátló foszforiláció megakadályozásával.

Az *uhd1*

A nagy volumenű mutáns szűrés során egy másik észlelt cirkadián óra mutánsunk az *rs2* (red screen 2) volt. Ez a vad típushoz képest körülbelül 2-3 órával (23. ábra) volt hosszabb periódusú, ami annyit jelent, hogy a periódushossza $26,67 \pm 0,25$ óra.



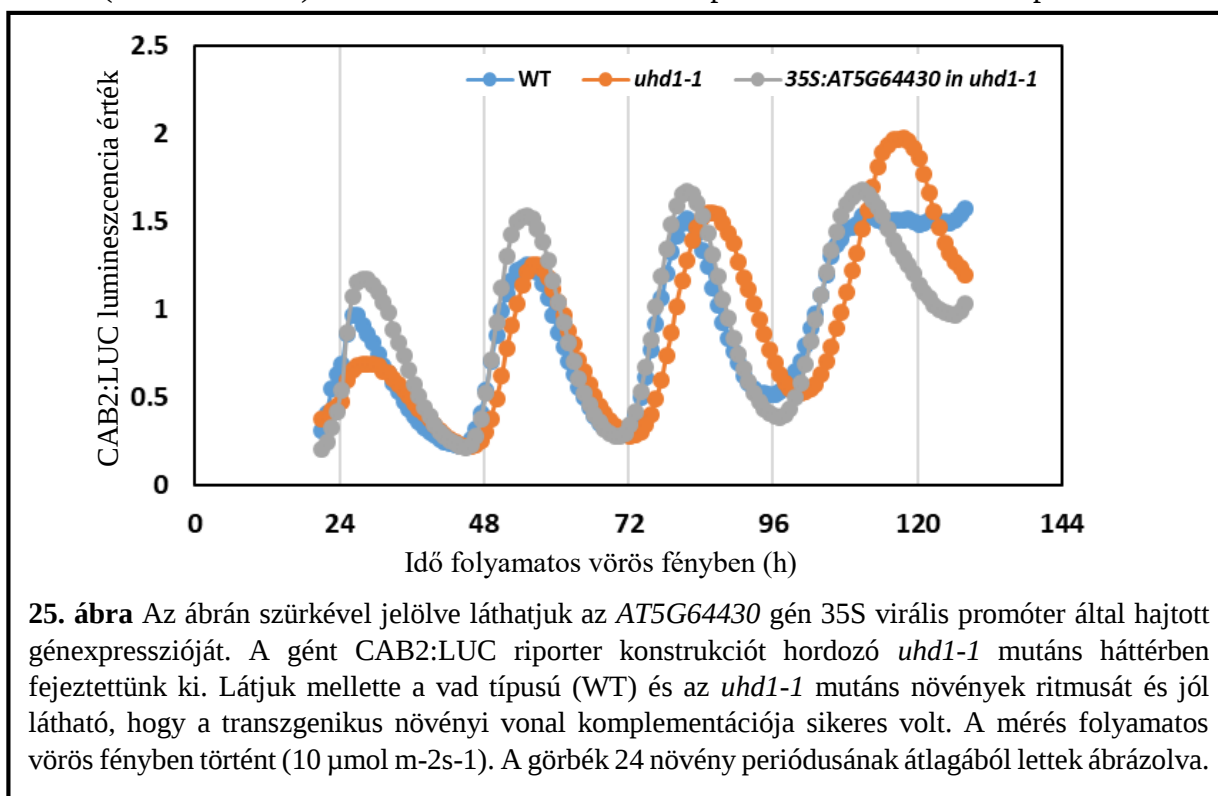
Ahogy az *ubp12-3* esetében is tettük, itt is érdemes megnézni, hogy a fény milyen hatással van erre a mutáció fenotipikus megnyilvánulására, mivel a fény erős befolyással van a cirkadián óra sebességére, így a különböző fényerősség vagy más hullámhosszon való megvilágítás is okozhatta a fent látott fenotípust a bemeneti oldalon keresztül. A tesztelésére ismét a CAB2:LUC riporter konstrukció által láthatóvá tett periódusokat mértük (23. ábra) folyamatos vörös és kék fényeknek, illetve különböző fényerősségeknek kitéve. Mindkét esetben azt kaptuk eredményül, hogy az *rs2* növények periódusa a leírt 2-3 órával volt hosszabb a vad típushoz képest minden fényerősségen, vörös és kék fényen is. Ebből következőleg a mutáció nem a fény bemeneti oldalt érinti, hanem az óra központi oszcillátorának egy vagy több elemére lehet hatással.

A**B**

24. ábra Fényerősség-függés görbe (FRC) folyamatos vörös (A) és kék (B) fényben való mérésről. A CAB:LUC markert hordozó *rs24* és WT növények előzetesen 12 h fény:12 h sötétben nevelkedtek, majd folyamatos vörös fénybe kerültek. A lumineszcencia értékek 4-5 napon át lett rögzítve. A hibaértékek 3-4 független mérés eredményeiből származnak.

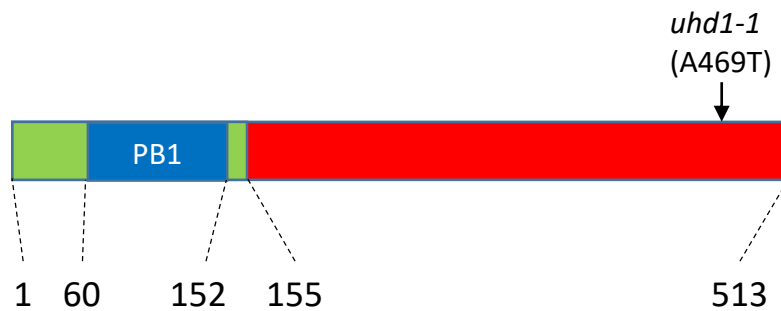
Annak felderítésére, hogy melyik gén szenvedett mutációt, ami az észlelt fenotípust okozta, kutatócsoportunk szekvencia alapú térképezést hajtott végre. A térképezés során 6 lehetséges lókuszt volt, ami SNP mutációval rendelkezett. A potenciális gének a következők voltak: HIPP3, NEN2, PP7, VPS20.1, At5g64430, ABC1K8. A mutációt okozó SNP-t tartalmazó gén egyszerűbb módon történő azonosítására komplementációs tesztet végeztünk el. A 6 jelölt gént *Agrobacterium* mediált géntranszfer segítségével kifejeztettük *rs2* mutáns háttérben és megmértük a periódusokat *rs2* és vad típusú növényekkel együtt. Mikor ezekkel a lehetséges génekkel elvégeztük a komplementációt (25.ábra), közülük csak az AT5G64430 névre hallgató

gén esetében volt ez sikeres, a többi gén nem hozta helyre a fenotípust. Így ennek a génnek UHD1 (UNHURRIED) lett a neve a 2 órával hosszabb periódus miatt és ezért kapta mutánsunk



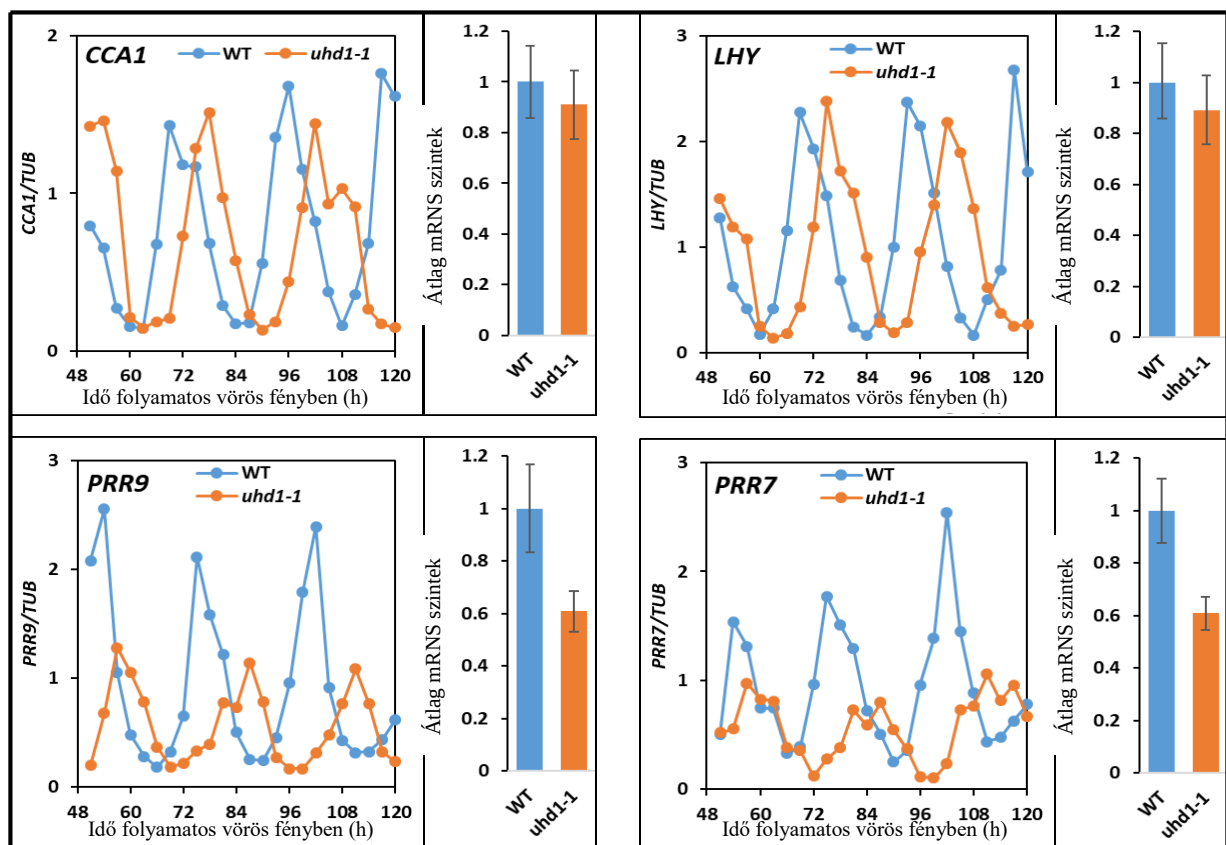
az *uhd1-1* nevet, mint első észlelt allélt.

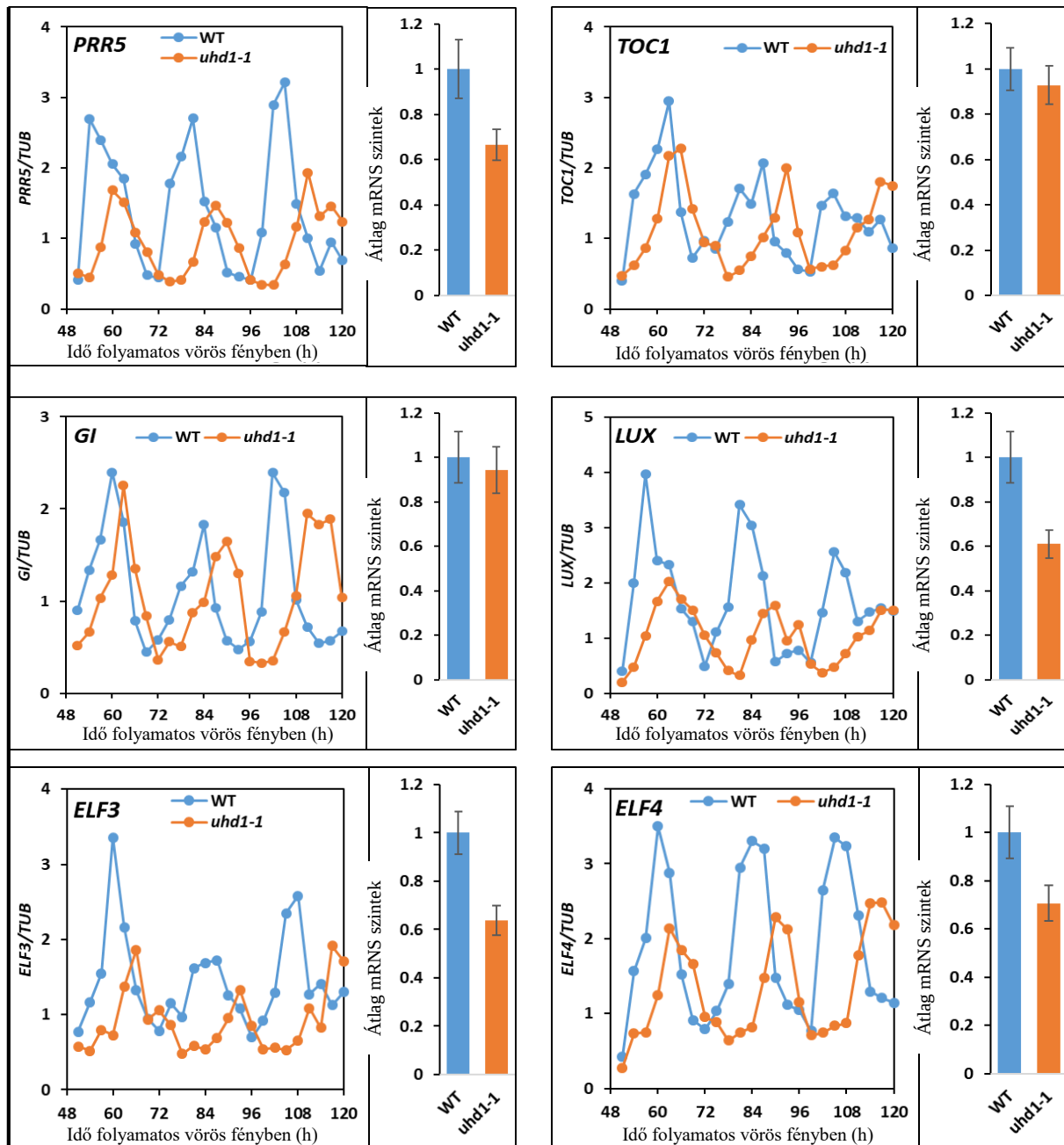
Ennél a mutánsunknál, az *ubp12-3*-hoz hasonlóan szintén az V. kromoszómán, annak alsó karján helyezkedik el a mutációval érintett gén (26. ábra). Az általa kódolt fehérje tartalmaz az N-terminális részen egy úgynevezett Phox-Bem1 (PB1) domént.¹⁷¹ A PB1 domén 80-100 aminosav hosszúságú és a törzsfajlás több rendszertani kategóriájában is széles körben elterjedt. Az oligomerizáció egyik kulcsszereplője, fehérje-fehérje kölcsönhatások létrejöttében segít proteinkötő képességével. Növények esetében a PB1 domént tartalmazó fehérjék 8 családba vannak csoportosítva attól függően, hogy a PB1 domén mellett a fehérje milyen más funkciójú doménnel rendelkezik. Egyik család ezek közül a Kinase-derived család, mely 13 taggal rendelkezik és közös jellemzőjük, hogy PB1 doménon kívül nem rendelkeznek egyéb ismert vagy karakterizált motívummal. Az UHD1 is ilyen egyedi struktúrával rendelkezik, N-terminális részén található a PB1 domén, a C-terminális részen viszont nincs semmi eddig leírt funkcionális domén. Az *uhd1-1* cirkadián fenotípusát egy tranzíció okozza, amely az UHD1 fehérje C-terminális részén eredményez egy alanin→treonin cserét. Ez a megfigyelés így egy eddig ismeretlen biokémiai funkcióját jelentheti a C-terminális résznek.



26. ábra Az UHD1 fehérje sematikus felépítése. A számok aminosav pozíciókat jelölnek. A zölddel jelzett N-terminális részen található a Phox-Bem1 (PB1) domén (kék), mely fehérje interakciókért felel. A prolin gazdag C-terminális részen (piros) található a mutációt okozó aminosavcsere (nyíllal jelölve), ez a rész nem rendelkezik ismert domén funkcióval.

Eddig tudjuk, hogy a hosszú periódusú *UHD1* gén mutációja a felelős, azt azonban még nem tudjuk, hogy a géntermék az órának melyik részére vannak hatással. Befolyásolja az óragének transzkripcióját? Valamelyik központi óraféhrjével hat kölcsön? Más óraféhrjék aktivitását/stabilitását változtatja meg? Annak okáért, hogy feltárjuk a feladatát, első lépésként megnéztük, hogy talán az óragének expresszióját befolyásolva vesz-e részt az óra bonyolult hálózatában. Ezt ismert központi óragének mRNA szintjeinek ellenőrzésével (27. ábra) kezdtük. A mérések folyamatos vörös fényben nevelt növényekből szedett mintákon lettek elvégezve, így megvizsgálhattuk órájuk szabadon futó ritmusát.





27. ábra WT és *uhd1-1* mutáns növényeket neveltünk 12:12 LD körülmények között 7 napon keresztül, majd folyamatos vörös fénybe lettek helyezve (15 μ mol m⁻²s⁻¹). A mintaszedés 3 napon keresztül történt, az ábrákon látható időpontokban. A mintákból mRNA szinteket határoztunk meg qPCR assay segítségével a következő géneken: *CCA1*, *LHY*, *PRR9*, *PRR7*, *PRR5*, *TOC1*, *GI*, *LUX*, *ELF3* és *ELF4*. A mért mRNA szintek a megfelelő *TUBULIN* (*TUB*) mRNA szintekre lettek normalizálva. A hibaértékek 3 független mérés eredményeiből összegzett standard hibát jelölik.

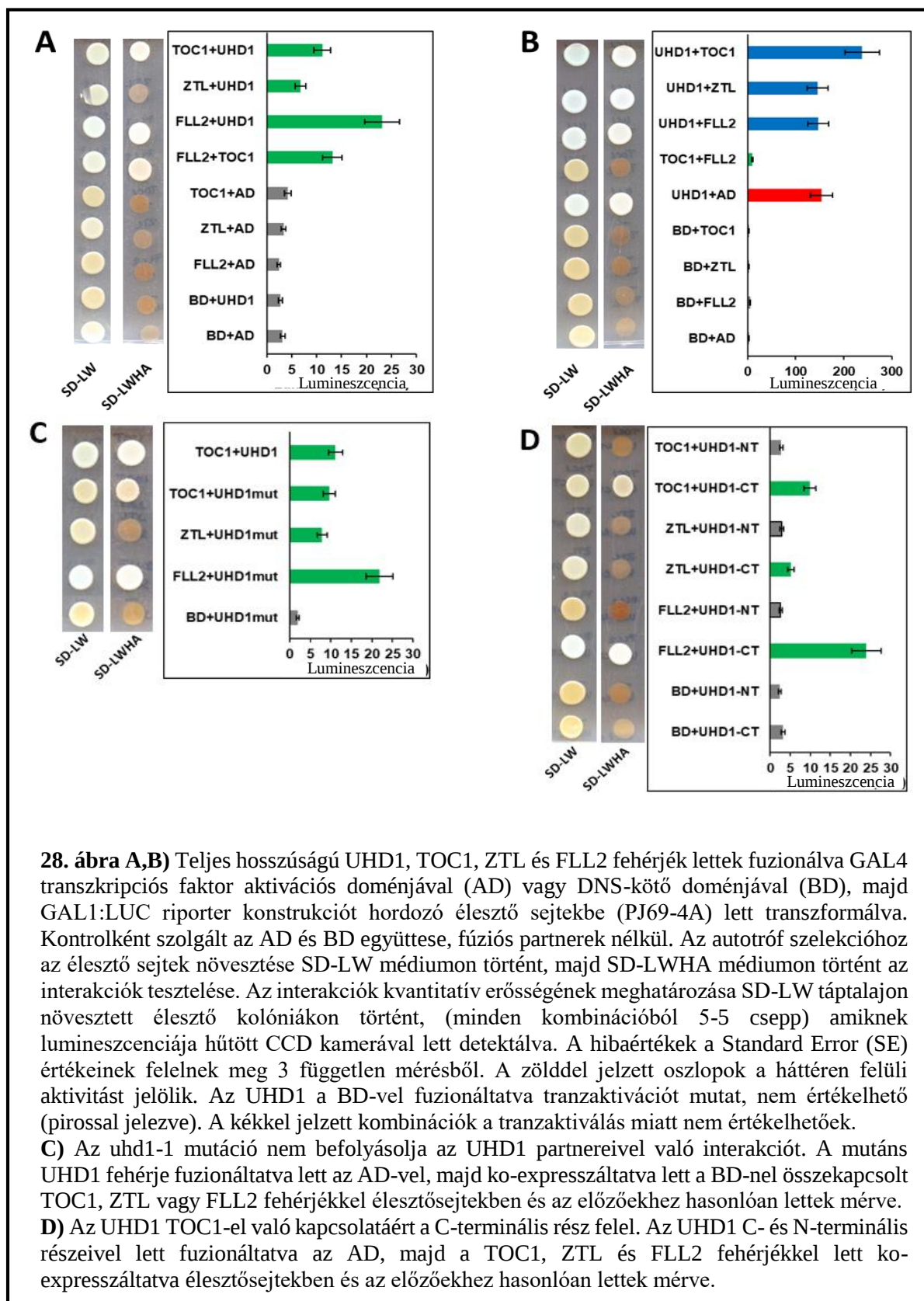
Ahogy azt láthatjuk az ábrák alapján, *CCA1*, *LHY*, *TOC1* és *GI* gének mRNS szintjei nem változtak, azonban a *PRR* gének (*PRR9*, *PRR7*, *PRR5*) és az esti komplex (*LUX*, *ELF3*, *ELF4*) elemeinek expressziós szintje lecsökkent a mutáns verziók esetében. Korábban publikált adatok alapján a represszált gének mindegyike a *TOC1* órafehérje transzkripció szabályozása (gátlása) alatt áll. Nagy eséllyel tehát a fenotípusnak köze lehet *TOC1* funkció megváltozásához valamilyen módon. Azonban ahogy láthattuk, a *TOC1* mRNS szintje nem változott, így valószínűleg poszttranszkripció/poszttranszlációs módosításnak lehet kitéve.

Élesztő kéthibrid rendszer

Az mRNS mérések során kapott eredményekből tehát láthattuk, hogy *UHD1* valamilyen módon szabályozza *TOC1* funkcióját. A molekuláris mechanizmusok részleteinek feltárására élesztő két-hibrid rendszerben teszteltük az *UHD1* kapcsolatát *TOC1*, *ZTL* és *GI* fehérjékkel. Utóbbi két fehérjét a *TOC1* fehérjével való ismert kapcsolatuk miatt teszteltük. A *ZTL* egy F-box fehérje, ami *TOC1* fehérje mennyiségét szabályozza, *GI* pedig ennek a *ZTL* fehérjének a stabilizációját valamint a hatékony akkumulációját segíti elő. A kísérlethez létrehoztunk élesztő transzformánsokat (28. ábra). A rendszerben a *GAL4* transzkripció faktor DNS-kötő – (BD) és a transzkripció aktivátor doménjeit (AD) használtuk, melyekhez egyenként fuzionáltattuk a teljes hosszúságú *UHD1*, *TOC1*, *ZTL*, *GI* és *FLL2* fehérjéket. A kétféle domén különböző plazmidokon lett bejuttatva az élesztő sejtekbe (PJ69-4A), amik hordozták a *GAL1:LUC* riporter konstrukciót. A különböző fehérjék kombinációnál egyikhez az AD, másikkhoz rendre a BD fúziós tag lett kapcsolva, valamint az AD és BD önmagában kifejeztetve, fúziós fehérje nélkül alkotta a negatív kontrollt. Az élesztők növesztése SD-LW táptalajon történt, melyben nem található leucin és triptofán, ezzel szelektálhatunk a plazmidok jelenlétére. A kölcsönhatás kialakulása pedig SD-LWHA táptalajon való növesztéssel tesztelhető, ha kialakul a kölcsönhatás, hisztidin és alanin hiányában is nőnek a telepek. A kölcsönhatás erősségére a mérhető luciferáz aktivitás utal.

Az összekombinált fehérjepárok közül *TOC1* és *FLL2* már publikált adatok alapján egymással biztosan kölcsönható partnerek, melyet a tesztjeink során mi is igazolni tudtunk. Ezen kapcsolaton kívül léteznek olyan publikált adatok, melyekben az *UHD1*-el élesztőben kölcsönható fehérjékről számoltak be. Ezek a kölcsönhatások is sikeresen lettek igazolva saját rendszerünkben. Így történt ez az *FLL2* fehérje esetében is, mely folyadék-folyadék fázisok elkülönítéséért, ezáltal pedig különböző citoszolikus és sejtmagi testek kialakításáért felel. Élesztőben *UHD1* kölcsönhat *FLL2*¹⁷² és mivel tudjuk azt is, hogy *TOC1* is *FLL2* kölcsönható

partnere, feltételezhető, hogy UHD1 közvetlenül vagy akár közvetett módon, FLL2-n keresztül is kötődni tud TOC1-hez.

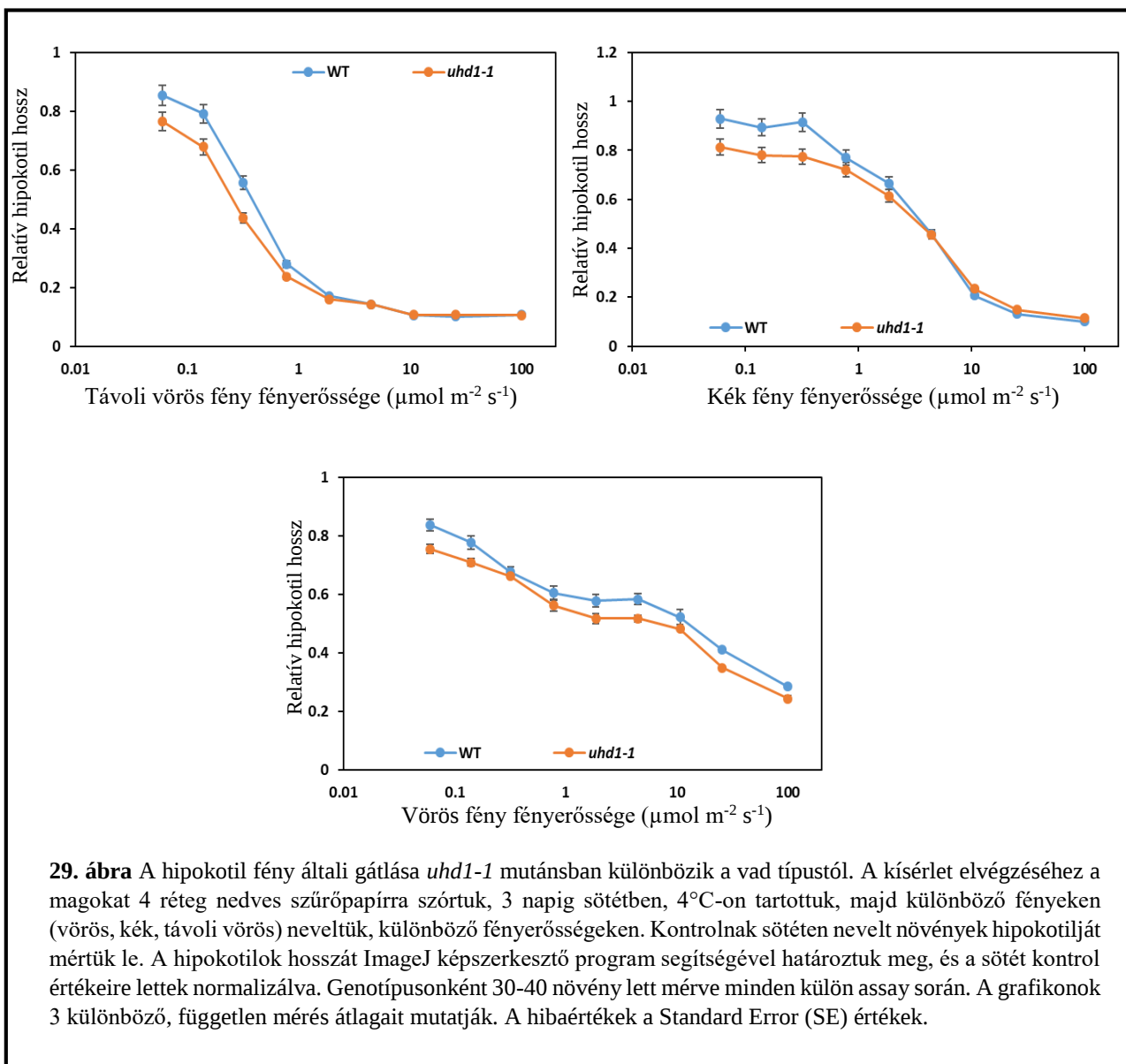


Mindezek mellett olyan interakciókat is sikerült feltárni, melyekről eddig nem volt közlemény. Ilyen volt az UHD1 és TOC1 valamint az UHD1 és a ZTL közötti kapcsolat.^{72,96,97} Mindkét proteinnel viszonylag gyenge, de egyértelmű kölcsönhatást mutatott, azonban csak abban az esetben állítható ez biztosan, mikor UHD1-hez volt fuzionáltatva az AD rész, a többi fehérje pedig a BD fúziós toldalékkal volt ellátva. Ugyanis eredményeink azt is megmutatták, hogy UHD1 binding doménnel való fúziójánál az UHD1 saját transzkripció aktivátor (tranzaktiváló) funkcióval rendelkezik (28/ B ábra), így a fehérjék között kialakuló viszonyt nem tudjuk validálni, ebben a fordított elrendezésben. Ahhoz, hogy kiderítsük milyen módon befolyásolja a fehérje kölcsönhatásokat az UHD1 fehérjében történt mutáció (A469T), a mutáns fehérjével is létrehoztuk a fentebb leírt párosításokat. A mutáció nem volt hatással a fehérje interakciókra (28/ C ábra), ami egyértelműen azt jelzi, hogy a mutáns fenotípus kialakulása nem megváltozott fehérje kötődési képességektől függ. Mindezek felül tudjuk, hogy UHD1 rendelkezik N-terminálisan a PB1 doménnel, ami fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításáért felel. Feltételezhetjük, hogy ez a része a fehérjének felelős lehet a fehérje kölcsönhatások kialakításáért TOC1 és ZTL esetében, ezért ennek a feltárására megfelelő élesztő kísérletek is el lettek végezve (28/ D ábra). Az elvégzett munkák után az eredményt az ábrákon láthatjuk, miszerint az UHD1 C-terminális része érintett a kölcsönhatások kialakításánál, nem pedig az N-terminális rész, ahol a PB1 domén található. Az azonosított *uhd1-1* mutánst létrehozó missense mutáció (A469T) éppen ezen a C-terminális részen található, viszont ahogy azt láthattuk, a mutáns fehérjéknél ugyanazokat az eredményeket kaptuk, mint vad típusú párjaiknál. Ennek megfelelően a mutáció nincs hatással a kölcsönhatásokra, ami után feltételezhető, hogy az UHD1 rendelkezik egy eddig ismeretlen funkcióval is, amin keresztül hatást gyakorol a cirkadián órára.

Hiperszenzitív fotomorfofenikus válasz fény mennyiségétől és minőségétől függően

Az óramutánsokban a megváltozott órafunkció vagy a mutáns fehérje megváltozott funkciója különböző fotomorfofenikus válaszokat válthat ki. Ez is egy olyan célpont, mely ki lehet téve a mutáció közvetlen vagy közvetett hatásának és vizsgálatának segítségével átfogóbb képet kapunk a rendszer működéséről. Egyik ilyen fotomorfofenikus válasz a fényre történő hipokotil megnyúlás gátlása. Hogy ezt teszteljük az *uhd1-1* mutánsban (29. ábra), különböző fényerősségű vörös, távoli vörös és kék fényben voltak a növények növesztve, majd megmértük a hipokotil hosszokat. Vörös fényben a mutáns gyenge, de jól megfigyelhető hiperszenzitivitást mutatott, vagyis a vad típushoz képest erősebb volt a hipokotil megnyúlás gátlása, ez rövidebb

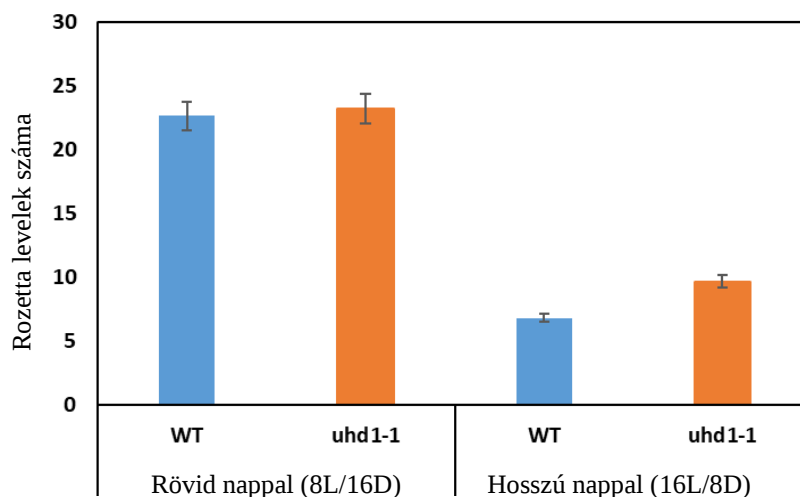
hipokotilokat eredményezett. Ez a válasz a teljes fényerősség tartományra jellemző volt. Távoli vörös és kék fény esetében a válasz már különbözött a vörös fényben látottaktól. Ezeknél a fényeknél is volt hiperszenzitív válasz, azonban ez csak az alacsonyabb fényerősségeknél mutatkozott meg. Ezek a megfigyelések összhangban lehetnek a fitokróm A által közvetített jelátvitel mérsékelt fokozódásával.



Az *uhd1-1* mutáció hatása a virágzásra

Ahogy azt már az *ubp12* esetében láthattuk, a virágzás is nagymértékben függ a cirkadián periódus hosszától. Fény-sötét ciklusokon nevelve a növényeket a rövid és hosszú periódusú növények fenotípusosan el fognak különülni amennyiben a virágzásukat vesszük figyelembe.

Ennek fő oka a CONSTANS (CO) gén kifejeződése, mely az elsődleges virágzási gén. Vad típusú növényekben kifejeződésének csúcsa hosszú nappalon fény szakaszra esik, rövid nappalon sötétre. A CO felhalmozódása fényfüggő, ennek tekintetében így a rövid periódussal rendelkező növények rövid nappalon korán, a hosszú periódussal rendelkező növények pedig hosszú nappalon későn fognak virágozni.¹⁷³ Az *uhd1-1* mutáns hosszú periódusú, így azt



30. ábra Az *uhd1-1* mutánsban a virágzás késleltetett hosszú nappalos körülmények között. A vad típusú (WT) és *uhd1-1* mutáns magok földre lettek kiszórva, majd 1 hétig 4°C-on tartottuk. Az idő letelte után a növényeket 22°C-on neveltük rövid (8L/16D) vagy hosszú (16L/8D) nappalos körülmények között. A virágzási idő a rozetta levelek megszámlálásával történt, amikor a virágzati tengely elérte az 1 cm hosszúságot. A hibaértékek a Standard Error (SE) értékeinek felelnek meg.

várjuk, hogy ennek megfelelően a virágzása kései lesz hosszú nappalos körülmények között. Ehhez a megfelelő körülmények között való kísérleteink elvégzése után (30. ábra) a vártak megfelelő eredményeket kaptunk, vagyis rövid nappalon a virágzás a vad típusú növényhez hasonlított, hosszú nappalon viszont a vad típushoz képest később virágzott. Ez a fenotípus összhangban van azzal a modellel, amely szerint a késői virágzást a CO expressziójának késleltetett fázisa okozza a hosszú periódusú *uhd1-1* mutánsban.

Eredmények értékelése

A cirkadián óra egy meglehetősen bonyolult szerkezet. Alkotóelemei a különböző élőlény csoportokban változóak, azonban jellemző egy általános egység a működési elvében és számos olyan elem található benne, mely a különböző fejlődési ágak ellenére homológiát mutat. A résztvevő molekulák feltárásával egy átfogóbb képet kaphatunk az óra működéséről. Mindez azért fontos számunkra, mert bár a napok hossza nem változik, de a környezetünk igen és egyre gyorsabb tempóban. Felgyorsult életmódunk és a technikai fejlődés rengeteg olyan hatással bírnak, melyek nagy értékű környezeti változásoknak minősülnek (éjszakai fényszennyezés) főként a növények részére, melyek helyhez kötött életmódot folytatnak. Természetesen emellett bármely más alkalmazkodásban és az életfolyamatok megfelelő időzítésének megismerésében nagy segítséget jelenthet az óra alkotóelemeinek feltárása, hiszen a cirkadián óra számos élettani folyamatban tölt be irányító szerepet.

Munkám során két új cirkadián óra gén azonosításával és szerepének feltárásával foglalkoztam. Ezek közül egyik a kezdetben *rs24* elnevezésű mutáns volt, melyről kiderítettük, hogy az *UBP12* egyik új allélja, immár *ubp12-3* névvel. Az *UBP12* egy ubikvitin proteáz, mely ubikvitin molekulákat hasít le célfehérjéről. Az ubikvitin molekulák eltávolítása, egyszóval a deubikvitináció egy olyan poszttranszlációs módosítás, mely jelentős mértékben képes befolyásolni fehérjék sorsát, mégpedig az ubikvitin ligázok működésével ellenkező módon. Ez jelenthet aktivitásváltozást, sejtbeli lokalizáció megváltozását vagy például degradációs útvonalak elkerülését. Az *UBP12*, melynek izoláltuk egy missense allélját *-ubp12-3-*, bizonyítottan részt vesz a cirkadián óra szabályozásában, jázmonsav jelátviteli útvonalban és bizonyos gének epigenetikai szabályozásban is. Ezt az új allélt összehasonlítottuk egy másik, nullmutáns alléllal, mely az *ubp12-1*. A két allél elsőre a cirkadián periódus szerint és egyéb az órához köthető funkcióknál ugyanolyannak tűnt, de további jellemzésük során előkerültek olyan fenotípusok, melyek ellentétes irányba mutattak. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy az *ubp12-3* mutánsban az *UBP12* aktivitása megemelkedett egy enzimaktivitást gátló foszforiláció megszüntetésével, ez pedig jól magyarázhatja az *ubp12-1* és az *ubp12-3* molekuláris hatása közötti különbséget.

Az *ubp12-3* mutáns allélról először is bebizonyítottuk, hogy a központi oszcillátort érinti. A *CAB2:LUC* riportergén segítségével nyomon tudtuk követni vad típusú és mutáns növények periódusát kék és vörös fényen is, különböző fényintenzitásokon. Az eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy fény minőségétől és mennyiségétől függetlenül megmaradt az új mutánsunk

fenotípusa. Ennek köszönhetően ki tudtuk zárni, hogy a mutációt a fény befolyásolná valamilyen módon, amiből pedig következik, hogy a központi oszcillátor az érintett rész. Ezt követően azonosítottuk az érintett gént, mely az *UBP12* volt, innentől nevezhattuk új óra mutánsunkat *ubp12-3* néven. Az *UBP12* felépítését tekintve rendelkezik MATH doménnel valamint C-terminálisan egy USP doménnel, ami tartalmaz Cys- és His-boxokat konzervált cisztein és hisztidin aminosavakkal, melyek szükségesek a proteáz funkció ellátásához. A genetikai térképezés után azt is tudjuk, hogy az *ubp12-3* egy missense allél, a 327-es pozícióban található szerin aminosav kicserélődött egy fenilalaninra (S327F). Mindezekből kiindulva feltételezhető volt, hogy az aminosavcsere hatással lehetett a fehérje funkciójára, hiszen két olyan aminosav is van már ezen kívül, ami funkcióváltozást képes okozni, ráadásul a mutáns rendelkezik óra fenotípussal is. Első lépésekben azt zártuk ki, hogy transzkripció során alakul ki a fenotípus, az mRNS szintek nem változtak a vad típushoz képest. Így ezt követően gyanakodtunk fehérjeszintű expressziós változásokra, de Western blot analízist követően már tudjuk, hogy a transláció/degradáció folyamata valószínűleg nem módosult. Tehát a mutáció nem okozott transzkripciós vagy translációs módosítást, a mRNS és a fehérje szintek is ugyanolyanok maradtak a mutáns növényben, mint a vad típusban. A fenotípus megjelenése tehát feltételezhetően egy későbbi, poszttranszlációs módosításnak köszönhetően alakult ki, ami hatással van például a fehérje funkciójára vagy aktivitására.

A proteáz enzimatis aktivitásának megváltozásából kiindulva és hogy ezt bizonyítsuk, teszteltük az *UBP12* két, órától független célpontját, melyekről tudjuk, hogy *ubp12-1* mutánsnál milyen változások láthatóak a proteáz aktivitásának hiányában. A target transzkript szintek a két mutánsban teljesen eltérőek voltak egymástól, amiből feltételezhető, hogy az S327F mutáció megváltoztatja a fehérje általános funkcióját, inkább gain-of-function irányba. Mivel ennyire eltérő eredményeket kaptunk a két mutáns esetében, az aminosavcsere valószínűleg nem egy hipo- hanem hiper morf allélt hozott létre. Azonban azt se felejtjük el, hogy a két mutáns periódusa megegyezik. Ezen felül azt is kimutattuk, hogy virágzási idejükben is megegyeznek, rövid nappalon ugyanis korai virágzás fenotípussal rendelkeznek. Ha a korai virágzás kialakításában közvetlen módon venne részt az *UBP12* megváltozott aktivitása, akkor ennek megfelelően a két mutánsnak különböző virágzási időt kéne mutatnia. Mivel nem ezt láttuk, valószínűnek gondoltuk, hogy ennek a fenotípusnak a kialakítását az óra rövid periódusa okozza. A T-ciklus segítségével bebizonyítottuk, hogy a korai virágzást valóban a megváltozott óra okozza és nem az *UBP12* fehérje missense mutációja

Így a kérdés az, hogy hogyan képes egy hipomorf és egy hiper morf mutáns ugyanazt a cirkadián fenotípust okozni? Másik kérdés, hogy a mutációnk recesszív a tesztelő keresztezés eredményei alapján, ennek ellenére viszont túlműködést mutat? Utóbbi kérdéseinkre választ adhat egy fitokróm mutáns. A phyB-401 mutáns egy recesszív mutáció, de hiperaktivitást mutat. A fitokróмок a működésükhöz dimereket alkotnak. Úgy gondolták, hogy a mutációval rendelkező heterozigóta növényekben a fitokróмок heterodimereket alkotnak, így a vad típusú része el tudja nyomni a recesszív allél működését, de homozigótaként nincs gátló vad típus és hiperaktivitás megjelenik.

Másik kérdéseinkre pedig, hogy két hasonló mutáns hogy okoz hasonló fenotípust egyrészt az UBP12 cirkadián órában betöltött szerepe adhat magyarázatot. Az UBP12 fehérjéről tudjuk, hogy GI fehérjével hat kölcsön, valamint rajta keresztül kapcsolatban áll a ZTL és a TOC1 fehérjékkel és a deubikvitinációval képes ennek a három fehérjének a stabilitását és a felhalmozódását befolyásolni. Az ubikvitináció visszafordításával közvetlenül ugyan csak a GI stabilitását képes befolyásolni, de mivel ez a fehérje felelős a ZTL és rajta keresztül a TOC1 stabilitásáért, így GI meglehetősen fontos szerepet tölt be. Korábbi kísérletekből is láthatjuk ezt, mikor *gi* nullmutáns növényeket vizsgáltak és alacsony ZTL szinteket mértek benne. Ezen felül az is érdekes felfedezésnek bizonyult, hogy találtak hasonlóságot *gi* nullmutáns és GI túltermelő vonalak cirkadián fenotípusában. Ez azt mutatja, hogy az *ubp12-1* és *ubp12-3* esetében is előfordulhat olyan, hogy bár cirkadián fenotípusuk ugyanaz, mégis egy nullmutáns és egy UBP12-t túltermelő vonalról van szó, amelyekben csökken, vagy megemelkedik a GI fehérje szintje. Szerettük volna ezt a hipotézisünket igazolni GI mennyiségének vagy akár ubikvitinációs állapotának megméréseivel, azonban ezt a kísérletet technikai okokból kifolyólag nem tudtuk elvégezni. A kölcsönható partner, a ZTL szintjét azonban meg tudtuk mérni. Eredményeink azt mutatták, hogy *ubp12-1* mutánsban várakozásaink ellenére a ZTL szintje nem mutatott csökkenést, valamint *ubp12-3* esetében is változatlan maradt a szintje. Ezek alapján úgy gondoltuk, hogy a mi körülményeink között nem ezen az útvonalon fejti ki hatását az UBP12 a cirkadián óra működésére, ezért annak vizsgálatát tovább folytatjuk.

Az általunk azonosított *ubp12-3* allél egy S327F mutációt hordoz az UBP12 fehérje proteáz-aktivitásért felelős doménjében. Magától értetődő feltételezés volt, hogy a mutáció az enzim biokémiai funkcióját befolyásolja. A mutáció enzimatisz aktivitásra való hatását úgy teszteltük, hogy koexpresszáltattuk baktériumban a vad vagy a mutáns UBP12 fehérjét egy ubikvitin extenziós fehérjével (UBQ1). A Western blot analízis során a monoubikvitinek hasítási képessége nem mutatott különbséget a vad és a mutáns fehérje esetében, ami látszólag

ellentmond az UBP12^{S327F} emelkedett aktivitásának, amelyre a fenotípus és molekuláris adatokból következtettünk. Ezért elképzelhetőnek tartottuk, hogy valamilyen folyamat, amelyet a mutáció befolyásol, a baktérium sejtben nem úgy játszódik le, mint a növényi sejtben. A szerin egy olyan aminosav, mely kiemelt foszforilációs tulajdonságokkal bír, így feltételeztük, hogy ez a bizonyos folyamat a szerin foszforilációja lehet, ami valószínűleg nem valósul meg prokariótákban olyan specifikus módon, mint növényekben. Ebből kifolyólag létrehoztunk az UBP12^{WT} és UBP1^{2S327F} mellett két másik mutánst. Az egyiknél szerin helyett alanin (UBP12^{S327A}) aminosavra módosítottuk, másiknál pedig ugyanez aszparaginsavra (UBP12^{S327D}) módosult. Az alanin megfelel a fenilalanin változatának, egyik sem képes közülük foszforilációra, de szerkezetüket tekintve hasonlítanak a nem foszforilált szerinre. Az aszparaginsav ezzel szemben egy olyan aminosav, mely egy állandóan foszforilált állapotban lévő szerin aminosavat mimikál. Ezen újabb variánsok tesztelése kimutatta, hogy az UBP12^{S327A} mutáció sem volt hatással az enzim aktivitására. A foszforilációt mimikáló aszparaginsav esetében viszont láthatóan csökkent a hasított monoubikvitin molekulák mennyisége. Tehát a foszforiláció hatással van az enzim működésére, a mutáns fenotípust a szerin fenilalaninra történő cseréjéből fakadó foszforiláció hiánya okozza. Ezzel magyarázható a túlműködés is. Baktériumsejtekben valószínűleg nem történik meg ez a specifikus foszforiláció, ezért nem látjuk az S327F vagy az S327A variánsok aktivitásának növekedését. Vad típusú növényekben az UBP12 fehérjék egy része foszforilált, így gátolt állapotban lehet. Mutáns (ubp12-3, S327F) növényekben a foszforiláció gátolt, így az UBP12 fehérjék teljes mennyisége aktív, ezáltal nagyobb az össz-enzimaktivitást és túlműködést fogunk látni.

UBP12-rokon fehérjeszekvenciák összehasonlítása felfedte, hogy az UBP12 S327-es pozíciójában lévő szerin evolúciósan konzervált aminosav. Növényekben az UBP12 csak UBP13-al homológ, azonban a fehérje MATH doménjének és a konzervált aminosavnak köszönhetően bír emlős, *Drosophila* és *Neurospora* homológ ubikvitin proteázokkal is. Ez tovább növeli az új allélunk, pontosabban a konzervált szerin és a foszforiláció fontosságát. Így egyik fő feladatunk a jövőbe nézve, hogy a foszforiláció fontosságát megvizsgáljuk ezekben a homológ ubikvitin proteázzal rendelkező organizmusokban.

Másik mutánsunk, mely segít a cirkadián óra részletesebb megismerésében, az *uhd1*. Az UHD1 fehérjéről tudjuk, hogy egy Phox-Bem1 (PB1) doménnel rendelkező fehérje. A PB1 domén fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításában tölt be fontos szerepet. Eddigi kutatómunkák során olyan fehérje, mely rendelkezik ezzel a doménnel, még nem volt a cirkadián órához kapcsolva. Arabidopsisban a PB1 doménnel rendelkező fehérjék több családba vannak sorolva, az UHD1

ezek közül a Kinase-derived családba tartozik, melynek jellemzője, hogy PB1 doménen kívül nem rendelkezik más ismert funkciójú doménnel. Ez nehézséget jelent szerepének pontos meghatározásában, de az óragének transzkripciójának ellenőrzése jó támpont lehet ehhez. Vizsgálataink szerint az *uhd1-1* mutánsban olyan gének transzkript szintje változott, melyek a TOC1 target fehérjéi között szerepelnek, így valószínűleg UHD1 a TOC1 fehérje funkciójára vagy szintjére van hatással. A TOC1 órával való kapcsolatát már ismerjük, ezért élesztő kéthibrid rendszerben teszteltük UHD1 és az érintett óragének kapcsolatát. A TOC1 és ZTL interakcióba lép UHD1 fehérjével, azonban arra is fény derült, hogy nem a PB1 doménen keresztül, így annak funkciója az UHD1-en egyelőre ismeretlen maradt. ZTL és TOC1 fehérjéken kívül interakciót mutatott még hat másik proteinnel, melyet mi is igazoltunk, azonban az órához nem köthetők az FLL2-t leszámítva, mely TOC1-el hat kölcsön. Az FLL2 folyadék-folyadék fázisok elkülönítésében játszik szerepet és több olyan órafehérje van, melynek ehhez kapcsolódó működése ismert (ELF3, TOC1 – fázis szeparáció sejtmagi testekbe). Egyik feltételezett szerepe így az UHD1-nek a TOC1-et tartalmazó sejtmagi testek kialakulásában való segítség.

A transzkript szintek ellenőrzésén felül, az *uhd1-1* mutáns molekuláris és fiziológiai jellemzése során több fenotípus is a TOC1 szabályozásának megváltozására emlékeztetett. Az *uhd1-1* periódusa körülbelül 2-2,5 órával volt hosszabb a vad típushoz képest, az enyhe TOC1 túltermelő mutáns szabadon futó periódusa folyamatos kék vagy vörös fényben 3-3,5 órával hosszabb a vad típusénál. További hasonlóság még mutánsunk és a TOC1 túltremelő vonal között, hogy a TOC1 megnövekedett szintje a hipokotil megnyúlás gátlásához vezet folyamatos vörös és távoli vörös fényen minden fényintenzitáson, illetve kék fényen az alacsonyabb fényintenzitásokon. Az *uhd1-1* is mutatott hipokotil megnyúlásban gátlást a TOC1 túltermelőhöz egészen hasonló módon, viszont nem akkora fényintenzitás tartományban, csak az alacsonyabbakon távoli vörös és kék fényben, bár vörös fényen végig volt különbség. Valamint végül, de nem utolsó sorban a virágzás fenotípust is össze tudjuk vetni. A virágzás szabályozását a rövid periódusú *toc1-2* mutáns segítségével tárták fel, de az is egyértelművé vált, hogy TOC1 közvetlenül nem vesz részt a folyamatban. Az *uhd1-1* későn virágzó fenotípussal rendelkezik, vad típusnál később virágzik hosszú nappalon, azonban rövid nappalos körülmények között nem, ez pedig TOC1 túlműködő növényre utal.

Mindent összegezve tehát UHD1-ről úgy gondoljuk, hogy TOC1 kölcsönható partnere és kofaktora, ami gátolja TOC1 fehérje transzkripcionális repressziós hatását annak célgénjeire. Figyelembe véve az FLL2 kölcsönhatását a TOC1-gyel és az UHD1-gyel, kézenfekvő lenne a

feltételezés, hogy ez a szabályozás a folyadék-folyadék fázisszétválasztáson alapuló sejtmagi testekben történik.

Összefoglaló

A növényi cirkadián óra szabályozása a növények valamennyi sejtjére és azoknak működésére hatással van. Egészen már a mag csírázásától kezdve részt vesz a különböző élet- és anyagcsere folyamatok irányításában, kezdve a növekedéstől és fejlődéstől egészen a metabolomikai és fiziológiai folyamatokig. Legfőbb feladata a különböző életfolyamatok külső környezetnek megfelelően a legalkalmasabb időpontra való időzítése. A cirkadián óra három fő részre bontható: bemeneti rész, központi oszcillátor és kimeneti rész. A központi oszcillátor az egyik legösszetettebb rész, mely elemeinek egy része máig ismeretlen számunkra. Az oszcillátor fő mechanizmusát az órát alkotó gének és fehérjék egymásra való hatása alkotja. Azonban ezen elemek olyan aprólékos finomsággal képesek egymást szabályozni, hogy ezen folyamatok nagy részének megértése még valószínűleg sokáig vártni fog magára. Ennek ellenére a kutatások folyamatosan zajlanak és a különböző módszereknek köszönhetően lassan egyre több részletre derül fényt tudunk meg. Kutatócsoportunk fókuszában is a növényi cirkadián óra működésének feltárása áll, éppen ezért volt lényeges lépés, mikor EMS mutagenizált növények cirkadián periódusának meghatározása alapján a vad típustól eltérő periódusú, periódusú, nagy valószínűséggel óramutáns növényeket választottak ki munkatársaink. Dolgozatomban két óramutáns vonalról esett szó, az *rs24* és *rs2* mutánsokról. Mindkét esetben sikerült meghatározni, hogy a központi oszcillátor működésében történt változás, tehát a cirkadián óra alkotórészeinek feltárásához közelebb kerülhetünk. A végső eredményekig hosszú folyamat és több lépés vezetett, melyeket a következőkben lehet az *rs24* esetében összefoglalni.

A mutáns szűrés csupán különböző növények periódushosszának mérésén alapult. Így az első meghatározó lépés a további kutatások megkezdéséhez az volt, hogy megnézzük vajon a központi oszcillátor egyik alkotóelemét kódoló génben történt-e változás. A cirkadián óra egy olyan rendszer, mely önmagában működőképes, azt a külső elemek nem befolyásolják, csak kapcsolatban vannak vele a bemeneti rész segítségével. Viszont a bemeneti részhez tartozó elemek, például növényeknél a fotoreceptorokban történő változások kihatással lehetnek a központi oszcillátor működésére, ezért fontos legelsőként tisztázni, hogy melyik részt érinti egy adott mutáció. Egy jól bevált kísérleti rendszer ennek meghatározására a különböző mennyiségű és minőségű fények általi megvilágítás, mindeközben pedig az adott növények monitorozása, a periódusuk folyamatos mérése. A növények számára főként a vörös, távoli vörös valamint a kék fény fontos, ezeket képesek elsősorban érzékelni, így mi is ezeket a minőségű fényeket használjuk a kísérleteink során. Vörös és kék fényben, különböző fényintenzitásokon lett megmérve az *rs24* mutáns és *Ws* vad típusú növények periódushossza.

Az eredmények azt mutatták, hogy a periódushossz különbségek a fény mennyiségétől és minőségétől is függetlenek, tehát bizonyítottuk, hogy a változás a központi oszcillátort érinti.

Mivel így már biztos, hogy a központi oszcillátor egyik része az érintett a mutáns fenotípus kialakításában, következő lépésünk, hogy megtaláljuk az ezért felelős gént. Ezt genetikai térképezéssel majd pedig komplementációs tesztekkel derítettük ki, melynek eredményeképpen az V. kromoszómán elhelyezkedő, SNP mutációt hordozó UBP12 gént találtuk meg. Az SNP az UBP12-t kódoló gén hetedik exonjában található és egy szerin → fenilalanin cserét okoz a 327-es pozícióban. Az UBP12 egy ubikvitin proteázt kódol és a megváltozott aminosav éppen a fehérje proteáz (USP) doménjét érinti. Noha azt már tudjuk, hogy a katalitikusan esszenciális cisztein és hisztidin aminosavak a Cys- és His-box-ban helyezkednek el, az USP domén a kettő között található. Mindemellett a szerin egy olyan aminosav, mely sok esetben foszforilációs célpont viszont a helyette kialakult fenilalanin nem foszforilálható, és szerkezetileg a nem foszforilált szerinre hasonlít. Maga a foszforiláció pedig egy olyan módosítás, mely okozhat stabilitásbeli vagy funkcionálisbeli különbséget. Így ezeket az információkat figyelembe véve fennállt a lehetősége annak, hogy a mutáció következtében sérült a fehérje funkciója, stabilitása. Ezért megvizsgáltuk, hogy az UBP12 kifejeződésére vagy működésére milyen hatást gyakorol ez a mutáció. Első lépésként az mRNA szinteket ellenőriztük. Vad típusú és mutáns növényekben vizsgáltuk az *UBP12* mRNA szintjét és az eredmények alapján ugyanolyan szinten fejeződött ki mindkettőben a gén, tehát a fehérje transzkripciójára vagy az mRNA stabilitására nem volt hatással a mutáció. Ezután következett a fehérjeszintek meghatározása és összehasonlítása. Létrehoztuk a megfelelő konstrukciókat, melyekben a fehérjét elláttuk valamilyen jelöléssel, melynek segítségével könnyen detektálhatóvá váltak a fehérjeszintek. Olyan vonalakat hasonlítottunk össze, melyekben az mRNA szint azonos volt. A vad és a mutáns vonalakban a fehérje szintek azonosak voltak, tehát a mutáció nincs hatással a fehérje expressziójára. Összeségében tehát a mutáció nem befolyásolja a transzkripciót és a transzlációt, valamint a fehérje stabilitására sincs hatással. Ezért úgy gondoltuk, hogy poszttranszlációs módosítás vagy más jelátviteli útvonalban betöltött szerepre van hatással a mutáció.

Az UBP12 ubikvitin proteáz nem csak az óra működésére van hatással, hanem részt vesz több jelátviteli útvonalban is. Ennek a fehérjének egy nullmutáns alléljáról (*ubp12-1*) már voltak információink és a fehérje pleiotróp funkciójának köszönhetően egy összehasonlítást kaphattunk az *ubp12-3*-al, hogy annak tulajdonságait jellemezni tudjuk. Két fő célpontjával való kapcsolatára tettünk betekintést, egyik a MYC2 transzkripciós faktor, másik pedig a

hiszton 2A (H2A). A MYC2 esetében a nullmutáns esetében nincs ubikvitin proteáz, ami stabilizálja a MYC2 fehérjét, így annak mennyisége csökken, ennek következtében pedig a *PDF1.2* gén transzkripciója emelkedni képes. Ezzel szemben az új allél esetében azt tapasztaltuk, hogy *PDF1.2* szintje nem növekszik, hanem jelentős mértékben csökken. A hiszton 2A esetében is hasonló eltéréseket fedeztünk fel. Az *ubp12-1* mutáns esetében nincs deubikvitinizáció a hiszton 2A fehérjén, ez nyitottabb kromatinszerkezet kialakulásához vezet, így egyes gének transzkripciója (*HIPP22*, *JAZ1*, *MAF5*, *FLC*) emelkedhet. Az *ubp12-3* allél esetében hasonló működést vártunk, azonban nem ezt tapasztaltuk, hanem éppen ellentétesen a génexpresszió szintje visszaszorult. A két jelátviteli útvonalban látott aktivitása szerint az *ubp12-3* tehát egy olyan allélja az UBP12-nek, melynél az UBP12 túlműködése látható a mi kísérleti körülményeink között.

Az UBP12 a MYC2 és a H2A szabályzására direkt, közvetlen módon hat és a két mutáns allél esetében így különböző fenotípusok alakultak ki. A cirkadián óra működésére közvetett módon vannak hatással az UBP12, valószínűleg ez az oka annak, hogy a periódushossza a nullmutánsnak és az új allélunknak egyformán két órával rövidebb a vad típushoz képest. Cirkadián ritmusok vizsgálatokor szinte rutineljárásnak számít a virágzási idő megmérése. Az *ubp12-1* és az *ubp12-3* hasonló virágzás fenotípussal rendelkezik, hosszú nappalos körülmények között korai virágzást mutatnak. Korábbi kutatások során azt feltételezték, hogy *ubp12-1* mutáns esetében a korai virágzás az erősebben monoubikvitinált H2A által okozott kromatin de-kondenzációnak köszönhetően. Emiatt teszteltük a két mutáns virágzási idejét és a hasonló eredmények arra engedtek következtetni minket, hogy a hasonló periódushossz, vagyis a megváltozott óra működése is okozhatta ezt a fenotípust. Ezért pedig elvégeztünk egy T-ciklus kísérletet, melynél a rövid periódusú vonalakat rövid cikluson neveljük és amennyiben a belső óra megváltozása okozta a korai virágzás fenotípust, akkor ez meg fog szűnni. A T-ciklus kísérlet elvégzése után ezt is kaptuk eredményül, tehát mindkét mutánsnál eltűnt a korai virágzás fenotípus, tehát ezen fenotípus kialakításáért az óra megváltozása a felelős.

A cirkadián óra esetében egy másik szinte állandóan elvégzett kísérlet a hipokotil hossz mérése, mivel a fény- és óra-jelátviteli utak bonyolult kölcsönhatásai miatt az óra megváltozott működése hatással lehet a fény által szabályozott folyamatokra is. A hipokotil hosszokat távoli vörös, vörös és kék fényen mértük meg különböző fényintenzitásokon. A kék és a távoli fényeken nem tapasztaltunk eltérést a két mutánsnál a vad típushoz képest, azonban vörös fényen igen. A nullmutáns minden fényintenzitásnál hiposzenzitív választ adott, tehát a hipokotil megnyúlt, az *ubp12-3* esetében azonban ez a megnyúlás csak a magasabb

fényintenzitásoknál volt megfigyelhető. Tehát bár nem teljesen azonos a két mutáns, azonban ez a fenotípus is nagymértékben hasonlóságot mutat, amit pedig a virágzáshoz hasonlóan úgy gondolunk, hogy a megváltozott óraműködés okoz.

Az *UBP12* egy olyan gén, mely a növényi ubikvitin proteázt kódoló gének közül csak az *UBP13*-al mutat homológiát és a MATH domén jelenlétén kívül csak ennél a kettő génnél található meg az a szerin aminosav, ami az új allélban már fenilalaninként szerepel. Ez a szerin aminosav azért ennyire különleges, mert más organizmusokban találkozhatunk hasonló ubikvitin proteázokkal, ahol ez az aminosav konzerváltságot mutat. Ebből adódóan úgy gondoltuk fontos szerepe lehet ennek az aminosavnak a fehérje funkciójában és kutatásunk erre irányuló kísérletekkel folytatódott. A növényi óra működésében a ZTL és GI fehérjékkel kölcsönhatva vesz részt, melyet már korábban leírtak. Az *UBP12* a két fehérjét deubikvitinálja, ezáltal pedig stabilizálja. Az *ubp12-1* nullmutánsnál csökkent ZTL szintet mutattak ki. Mi is meghatároztuk a ZTL szinteket, azonban a korábban közölt adatoktól eltérő eredményeket kaptunk. A nullmutáns esetében a ZTL szint nem csökkent, hanem kissé emelkedett, az *ubp12-3*-nál pedig nem változott a szintje. Mivel GI szinteket ellenanyag hiányában nem lehet ellenőrizni, így az eddig kapott eredményeket összegezve úgy gondoltuk, hogy a mi kísérleti körülményeink között az *UBP12* nem a ZTL stabilizációján keresztül vesz részt az oszcillátor szabályozásában. A megoldást így a konkrét S327F aminosavcsere hatásában kerestük tovább. Bakteriális rendszerben fejeztettünk ki *Arabidopsis* ubikvitin extenziós fehérjét és *UBP12*^{WT} és *UBP12*^{S327F} fehérjéket. Ha működik a fehérje, akkor az *UBQ1* fehérjéről monoubikvitin szabadul fel. A vad típusú és a mutáns fehérjét expresszáltatva is ugyanazt az eredményt kaptuk, a fehérje megfelelően működött. Ez az eddigi eredményeket nem magyarázza, viszont ha arra gondolunk, hogy a szerin egy olyan aminosav, mely gyakran foszforilálódik, feloldhatóvá válik az ellentmondás. Így szintén bakteriális rendszerben koexpresszáltattunk olyan fehérjéket, melyeknél szerin helyett alanin (*UBP12*^{S327A}) szerepelt a nem foszforilált aminosav mintájára vagy pedig aszparaginsav (*UBP12*^{S327D}), mely egy állandóan foszforilált állapotban lévő szerint mimikál. Miután elvégeztük a Western blot analízist, csak a szerin-aszparaginsav csere esetében tapasztaltunk változást, mégpedig erős proteáz aktivitás csökkenést.

Az *rs24* mutáns eredményeit összegezve tehát úgy gondoljuk, hogy az S327 foszforilációja az *UBP12* aktivitására gátló hatással van. A bakteriális rendszerben a specifikus poszttranszlációs módosítások elmaradnak, ami megmagyarázza, hogy a fenilalanin vagy alanin aminosavakat tartalmazó fehérjék miért nem tértek el aktivitásukban a vad típusú fehérje aktivitásától. Az viszont jól látszódik, hogy egy olyan aminosavat alkalmazva mely állandó foszforilációs

állapotot jelöl, az aktivitás csökken. Mindebből következően ha egy növényi rendszerben a specifikus foszforiláció megtörténik, és a foszforiláció gátolja az enzimaktivitást, akkor a szerin fenilalaninra, mint nem foszforilálódó aminosavra történő cseréje nagy valószínűséggel fokozhatja a fehérjénk aktivitását. Ez megmagyarázza a MYC2 és H2A esetében is látott túlműködést. Tehát az *ubp12-3* egy olyan új allélja az *UBP12* génnek, melynél a 327-es pozícióban lévő szerin fenilalaninná történő változása és így a fehérje foszforiláltsági állapotának megváltozása a fehérje túlműködését okozza.

A másik mutáns, mellyel foglalkoztunk, a kezdetben *rs2* névre hallgató, a vad típushoz képest két órával hosszabb periódusú mutáns volt. A kísérletek terén hasonlóan jártunk el, mint az *ubp12-3* esetében, tehát első lépésként megvizsgáltuk a fenotípus fényfüggését. Ehhez vörös és kék fényt alkalmaztunk különböző fényerőségekkel és a hosszú periódus fenotípus minden esetben fennmaradt, tehát a mutáció független a fény mennyiségétől és minőségétől. A mutáció így a központi oszcillátorra van valamilyen hatással. A gén azonosításához itt is genetikai térképezés lett végrehajtva, mely során 6 potenciális gén közül az *At5g64430* volt az, mely növénybe transzformálva komplementációt mutatott. A gén az V. kromoszóma alsó karján található, a mutáció a fehérje 469-es pozíciójában okozott egy alaninról treoninra történő aminosavcserét. A génről és a róla képződő fehérjéről még alig volt található valamilyen információ, az *UHD1* nevet adtuk neki, mint *UNHURRIED1* a hosszabb cirkadián periódus miatt.

Ezen gén esetében tehát az alapoktól kellett kezdeni így első kérdésünk az volt, hogy bár tudjuk ebben a génben való eltérés okozza a fenotípust, az még ismeretlen, hogy az óra melyik elemével áll kapcsolatban. Több központi óragén expressziós szintjét megmérve eredményeink arra utaltak, hogy az *UHD1* a *TOC1* fehérje poszttranszlációs módosításán keresztül kapcsolódik az órához. A kapcsolat feltárására készült egy élesztő kéthibrid teszteket végeztünk az *UHD1*-gyel specifikusan kölcsönható fehérjék azonosítása céljából. Korábbi kísérletekben már írtak le ezzel a fehérjével kölcsönható partnereket, ezeket a kölcsönhatásokat sikeresen igazoltuk. Ilyen volt az *FLL2* is, melyen keresztül az *UHD1* kapcsolatba hozható a *TOC1*-gyel. Viszont részben azt is megmutattuk, hogy *TOC1*-el és *ZTL*-al is kapcsolódik *UHD1*, de saját transzaktiváló hatása miatt ez a két kapcsolat még megerősítésre szorul. Az *UHD1*-et érintő mutáció a fehérje kölcsönhatások kialakításában nem okozott változást, tehát a fenotípus kialakítása a fehérje kötődési képességektől független. Az *UHD1* N-terminálisan rendelkezik *PB1* doménnel, mely fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításáért felel, azonban az élesztő kéthibrid rendszerben ezt is ellenőriztük és eredményeink szerint az *UHD1* C-terminális része

volt érintett a kölcsönhatások kialakításában. Az *uhd1-1* mutáns éppen ezen a C-terminális részen hordozza a pontmutációt, de mivel kimutattuk, hogy a fehérje kölcsönhatásokra nincs befolyással, ezért úgy gondoljuk, hogy az UHD1 egy olyan eddigi ismeretlen funkcióval is rendelkezik, melyen keresztül hatással van az órára, amit eddigi kísérleteink során még nem sikerült tisztázni.

Mindezek mellett még sikerült karakterizálnunk az *uhd1-1* mutánst hipokotil és virágzás szempontjából. Vörös fényben a hipokotil megnyúlás gátlása a vad típusénál erős volt, minden fényerősségben hiperszenzitivitás volt jellemző. Ezzel szemben távoli vörös és kék fények esetében hiperszenzitív válaszreakció csak alacsony fényintenzitásoknál volt látható. Mindez a reakció utalhat arra, hogy a fitokróm A által közvetített jelátvitel mérsékelten fokozódik a mutánsban. Virágzás szempontjából a vártak megfelelő eredményeket kaptuk, vagyis az *uhd1-1* mutáns hosszú nappalos körülmények között kései virágzás fenotípust mutat.

Összeségében tehát doktori disszertációmban két új óragén allél azonosításáról és szerepének megismeréséről esett szó, melyek hozzájárulnak a cirkadián óra működésének jobb megismeréséhez és az *ubp12-3* allél egyéb pleiotróp funkcióinak megismeréséről, mely új értelmezést adhat a mutációk által bekövetkezett aminosavcserék fontosságának.

Summary

The regulation of the plant circadian clock affects all plant cells and their function. Right from seed germination, it is involved in the control of various life and metabolic processes, from growth and development to metabolomics and physiology. Its main task is to time the various life processes to the most appropriate time in accordance with the external environment. The circadian clock can be divided into three main parts: an input part, a central oscillator and an output part. The central oscillator is the most complex part, most of the components are still unknown to us. The main mechanism of the oscillator is the interaction of the genes and proteins that comprise the clock. However, these elements are able to regulate each other with such subtle finesse that understanding much of this process is likely to be a long way off. Nevertheless, research is ongoing and, thanks to a variety of methods, we are slowly learning more about it. The focus of our research group is also on the understanding of the plant circadian clock, which is why it was an important task to measure the circadian period of EMS mutagenized plants and to select those plants with different periods and high probability of being clock mutants. In my dissertation, two clock mutant lines, the *rs24* and *rs2* mutants, were investigated. In both cases, we were able to determine that there was a change in the function of the central oscillator, and thus we are closer to unraveling the components of the circadian clock. The final results were obtained after a long process and several steps, which can be summarised in the following for *rs24*.

The mutant screening was based only on the measurement of the period length of different plants. So the first crucial step to start further research was to see if there was a change in the gene encoding a component of the central oscillator. The circadian clock is a system that works on its own, unaffected by external elements, but only connected to it by the input. However, changes in the input components, for example in plant photoreceptors, can affect the functioning of the central oscillator, so it is important to first clarify which component is affected by a particular mutation. A well-established experimental system to determine this is to illuminate the plants with different quantities and qualities of light, while monitoring the plants and measuring their periodicity. Red, far-red and blue light are of main importance to plants, and these are the main light sources they can detect, so we use these qualities in our experiments. The period length of *rs24* mutant and Ws wild type plants was measured in red and blue light at different light intensities. The results showed that the differences in period length were independent of both the amount and quality of light, thus demonstrating that the central oscillator is affected.

Since it is now certain that a part of the central oscillator is involved in the development of the mutant phenotype, our next step is to find the gene that is involved. We revealed this by genetic mapping followed by complementation testing, which resulted in the identification of the *UBP12* gene on chromosome V carrying the SNP mutation. The SNP is located in the seventh exon of the gene encoding UBP12 and causes a serine → phenylalanine substitution at position 327. UBP12 encodes a ubiquitin protease and the altered amino acid overlies on the protease domain of the protein. Although it is already known that the catalytically essential amino acids cysteine and histidine are located in the Cys- and His-boxes, the USP domain is located in between them. In addition, serine is an amino acid that is often a phosphorylation target, but the phenylalanine that is substituted is not phosphorylatable. Phosphorylation itself is a modification that can cause a difference in stability or functionality. Thus, taking this information into account, there was a possibility that the mutation may have compromised the function and stability of the protein. We therefore investigated the effect of this mutation on the expression or function of UBP12. As a first step, mRNA levels were checked. In wild-type and mutant plants, we examined the mRNA levels of *UBP12* and the results showed that the gene was expressed at the same level in both, so that protein transcription or mRNA stability was not affected by amino acid substitution. Protein levels were then determined and compared. The corresponding constructs were created, in which the proteins were tagged with some kind of marker that allowed easy detection of the protein levels. Lines were compared with identical levels of mRNA, so the amount of mRNA expressed must not determine protein levels. In the wild-type and mutant lines, protein levels were identical, so the mutation had no effect on protein expression. Thus the mutation does not affect transcription and translation, nor does it affect protein stability. Therefore, it was thought that post-translational modification or a role in a different signalling pathway was affected by the mutation.

The UBP12 ubiquitin protease not only affects the function of the clock, but is also involved in several signaling pathways. We already had information on a null mutant allele of this protein (*ubp12-1*) and due to the pleiotropic function of this protein, a comparison with *ubp12-3* was obtained to characterise its characteristics. We have obtained insights into its relationship with two of its main targets, one is the transcription factor MYC2 and the other is histone 2A (H2A). In the case of MYC2, the null mutant lacks ubiquitin protease, which stabilizes the MYC2 protein, so its amount is reduced and as a consequence PDF1.2 levels can increase. In contrast, we found that PDF1.2 levels of the new allele do not increase, but decrease significantly. Similar differences were found for histone 2A. In the *ubp12-1* mutant, there is no

deubiquitination on chromatin, so transcription of some genes (*HIPP22*, *JAZ1*, *MAF5*, *FLC*) can occur continuously. We expected a similar function for the *ubp12-3* allele, but on the contrary, gene expression levels were downregulated. Hence, according to the activity seen in the two signalling pathways, *ubp12-3* is an allele of UBP12 with an overactivity of UBP12 in these pathways under our experimental conditions.

UBP12 regulates MYC2 and H2A in a direct manner and thus different phenotypes have been observed for the two mutants. They affect the circadian clock function indirectly, which is probably the reason why the period length of the null mutant and our new allele are both two hours shorter than the wild type. One of the more common measures of circadian rhythms is the time of flowering. Both *ubp12-1* and *ubp12-3* have similar flowering phenotypes, showing early flowering under long day conditions. Previous research has suggested that early flowering in the *ubp12-1* mutant is due to H2A condensation. For this reason, we tested the flowering times of the two mutants and the similar results led us to the conclusion that a similar period length i.e. altered clock function could also cause this phenotype. Therefore, we performed a T-cycle test, in which the short period lines were grown on a short cycle and if the change in the internal clock caused the early flowering phenotype, it would cease. After performing the T-cycle test, this was also the result, so the early flowering phenotype disappeared in both mutants, meaning that the change in the clock is most likely responsible for the development of this phenotype.

Another experiment that is almost routinely performed on the circadian clock is the measurement of the hypocotyl length, as light can affect the clock's function through the input side. Hypocotyl lengths were measured in far red, red and blue light at different light intensities. No differences were observed in the two mutants in blue and far-red light compared to wild type, but differences were detected in red light. The null mutant showed a hypo-sensitive response at all light intensities, i.e. hypocotyl elongation, but in *ubp12-3* this elongation was only observed at higher light intensities. Although the two mutants are not exactly identical, there is a high level of similarity in phenotype, which is thought to be caused by altered clockwork, as in flowering.

UBP12 is a gene that shows homology only with *UBP13* of the genes encoding the plant ubiquitin protease and, apart from the presence of the MATH domain, only these two genes have the serine amino acid that is now present as a phenylalanine in the new allele. This serine amino acid is unique because similar ubiquitin proteases are found in other organisms where this amino acid is conserved. Therefore, we thought that this amino acid may play an important

role in protein function and our research continued with experiments to investigate this. It is involved in the function of the plant clock by interacting with ZTL and GI proteins, which has been described previously. UBP12 deubiquitinates both proteins, thereby stabilizing them. Reduced ZTL levels were detected in the *ubp12-1* null mutant. We also examined ZTL levels, but obtained different results from previously reported data. In the null mutant, ZTL levels increased, while *ubp12-3* levels remained unchanged. Since GI levels cannot be controlled in the absence of antibodies, so summarizing the results obtained so far, we considered that under our experimental conditions UBP12 is not involved through ZTL stabilization. Thus, we further searched for a solution in the effect of specific S327F amino acid exchange. In a bacterial system, we expressed Arabidopsis ubiquitin extension protein with UBP12^{WT} and UBP12^{S327F} genes. When the protein is functional, monoubiquitin is cleaved from the UBQ1 protein. The same results were obtained when both the wild type and mutant protein were expressed, showing that the protein functioned correctly. This does not explain the results so far, but if we consider that serine is an amino acid that is frequently phosphorylated, the question becomes soluble. Thus, also in a bacterial system, we co-expressed proteins with alanine (UBP12^{S327A}) instead of serine as a template for the non-phosphorylated amino acid or aspartic acid (UBP12^{S327D}) mimicking an amino acid that is constantly phosphorylated. After performing Western blot analysis, no protease activity was seen except for aspartic acid.

Thus, summarizing the results of the *rs24* mutant, we suggest that phosphorylation of S327 has an inhibitory effect on UBP12 activity. In the bacterial system, posttranslational modifications are not observed because these modifications are absent in bacteria. This explains why the proteins containing phenylalanine or alanine amino acids in Western blot images did not vary in activity from the wild-type protein. However, using an amino acid that indicates a steady state phosphorylation clearly shows a decrease in activity. Therefore, if we look at a plant system and we know that phosphorylation inhibits enzyme activity, then it is possible that replacing serine with phenylalanine as a non-phosphorylatable amino acid could increase the activity of our protein. This explains the overactivity with MYC2 and H2A. Thus, *ubp12-3* is a novel allele of the UBP12 gene in which switching the serine at position 327 to phenylalanine and so causing a change in the phosphorylation state of the protein leads to protein overactivity.

The other mutant we were concerned with was a mutant called *rs2*, which had a two-hour longer period than the wild type. We followed a similar approach to *ubp12-3*, so we started by looking at the effect of light on the circadian clock. Red and blue light were used at different light intensities and the long period phenotype was maintained in all cases, so the mutation was

independent of the amount and quality of light. The mutation has some effect on the central oscillator. Genetic mapping was also performed to find the gene, where At5g64430 was the one of 6 potential genes that showed complementation when transformed into plants. The gene is located on the lower arm of chromosome V, a 55kbp long region with an amino acid substitution from alanine to threonine at position 469. Little information was yet available about the gene and the protein it forms, and we named it *UHD1*, as *UNHURRIED1* because of its longer circadian period.

Therefore we started at the basics, our first question was that although we know that a variation in this gene causes the phenotype, it is still unknown which element of the clock it is related to. Thus, by measuring the expression levels of several central clock genes, our results suggested that the TOC1 protein is linked to the clock via a post-transcriptional/post-translational modification. To explore this link, a yeast two-hybrid system was constructed. Previous experiments have described interacting partners with this gene, and these have been tested and successfully validated. One of these was FLL2, through which it can be linked to TOC1. However, we have also shown that UHD1 is linked to TOC1 and ZTL, but due to its own transactivating effect, these two links are still unclear. Mutations affecting UHD1 did not cause changes in protein interaction formation, suggesting that phenotype formation is independent of protein binding ability. UHD1 has an N-terminal PB1 domain responsible for the forming of protein-protein interactions, however, we also tested this in the yeast two-hybrid system and our results showed that the C-terminal part of UHD1 was involved in the formation of interactions. The *uhd1-1* mutant carries the point mutation in this C-terminal region, but since it has been shown to have no effect on protein interactions, we believe that UHD1 may also have a previously unknown function in the clock, which has not been elucidated in our experiments.

In addition to this, we have also characterized the *uhd1-1* mutant in terms of hypocotyl and flowering. Inhibition of hypocotyl elongation was strong under red light, with hypersensitivity at all light intensities. In contrast, for far red and blue light, hypersensitivity response was only seen at low light intensities. This response may indicate that phytochrome A mediated signal transduction is moderately enhanced in the mutant. With a view to flowering, the results were as expected, i.e. the *uhd1-1* mutant exhibits a late flowering phenotype under long daylight conditions.

Overall, in my PhD dissertation, we have identified two novel circadian clock gene alleles and their roles, which contribute to a better understanding of the circadian clock function and other

pleiotropic functions of the *ubp12-3* allele, which may provide a new interpretation of the importance of amino acid substitutions by mutations.

Idézett közlemények

1. Corlett, R. T. Achieving zero extinction for land plants. *Trends Plant Sci* **28**, 913–923 (2023).
2. Harmer, S. L., Panda, S. & Kay, S. A. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 215–253 (2001).
3. Harmer, S. L. The circadian system in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 357–377 (2009).
4. Franklin, K. A. & Quail, P. H. Phytochrome functions in Arabidopsis development. *J Exp Bot* **61**, 11–24 (2010).
5. Dunlap, J. C. & Loros, J. J. The neurospora circadian system. *J Biol Rhythms* **19**, 414–424 (2004).
6. Halberg, F. *et al.* Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s. *J Circadian Rhythms* **1**, 2 (2003).
7. Más, P., Kim, W.-Y., Somers, D. E. & Kay, S. A. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana. *Nature* **426**, 567–570 (2003).
8. Cui, X. *et al.* Ubiquitin-specific proteases UBP12 and UBP13 act in circadian clock and photoperiodic flowering regulation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162**, 897–906 (2013).
9. Komander, D., Clague, M. J. & Urbé, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 550–563 (2009).
10. March, E. & Farrona, S. Plant Deubiquitinases and Their Role in the Control of Gene Expression Through Modification of Histones. *Front Plant Sci* **8**, 2274 (2017).
11. Clague, M. J., Heride, C. & Urbé, S. The demographics of the ubiquitin system. *Trends Cell Biol* **25**, 417–426 (2015).
12. McClung, C. R. Plant circadian rhythms. *Plant Cell* **18**, 792–803 (2006).
13. Greenham, K. & McClung, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nat Rev Genet* **16**, 598–610 (2015).
14. Sanchez, S. E. & Kay, S. A. The Plant Circadian Clock: From a Simple Timekeeper to a Complex Developmental Manager. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a027748 (2016).
15. Goodspeed, D., Chehab, E. W., Min-Venditti, A., Braam, J. & Covington, M. F. Arabidopsis synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4674–4677 (2012).
16. Jenkins, G. I. Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 407–431 (2009).
17. Frohnmeier, H. & Staiger, D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol* **133**, 1420–1428 (2003).
18. Harmer SL, K. S., Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA. Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* (2000).
19. Kreps, J. A. *et al.* Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**, 2129–2141 (2002).
20. Zhu, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247–273 (2002).
21. Tannenbaum GS, M. J. Tannenbaum GS, Martin JB. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* (1976).
22. Kyriacou, C. P. & Hall, J. C. Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 6729–6733 (1980).

23. Albers, H. E., Lydic, R. & Moore-Ede, M. C. Entrainment and masking of circadian drinking rhythms in primates: influence of light intensity. *Physiol Behav* **28**, 205–211 (1982).
24. Refinetti, R. Variability of diurnality in laboratory rodents. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **192**, 701–714 (2006).
25. Halberg, F., Carandente, F., Cornelissen, G. & Katinas, G. S. [Glossary of chronobiology (author's transl)]. *Chronobiologia* **4 Suppl 1**, 1–189 (1977).
26. Bünning, E. [Regularity of chronobiology]. *Verh Dtsch Ges Inn Med* **73**, 887–895 (1967).
27. Bünning, E. & Moser, I. [Further experiments concerning the influence of light on the circadian rhythm of *Phaseolus multiflorus*]. *Planta* **77**, 99–107 (1967).
28. Millar AJ, K. S., Carré IA, Strayer CA, Chua NH. Millar AJ, Carré IA, Strayer CA, Chua NH, Kay SA. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* (1995).
29. Zielinski, T., Moore, A. M., Troup, E., Halliday, K. J. & Millar, A. J. Strengths and limitations of period estimation methods for circadian data. *PLoS One* **9**, e96462 (2014).
30. Johnson, C. H., Elliott, J. A. & Foster, R. Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int* **20**, 741–774 (2003).
31. McWatters, H. G., Bastow, R. M., Hall, A. & Millar, A. J. The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* **408**, 716–720 (2000).
32. Covington, M. F. *et al.* ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1305–1315 (2001).
33. Roenneberg, T. & Mrosovsky, M. Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *J Biol Rhythms* **13**, 167–179 (1998).
34. Giehl, J. Chronobiology: biological timekeeping. *Integr Comp Biol* **44**, 266 (2004).
35. Koornneef, M., Alonso-Blanco, C. & Vreugdenhil, D. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 141–172 (2004).
36. Alonso-Blanco, C. *et al.* What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? *Plant Cell* **21**, 1877–1896 (2009).
37. McKhann, H. I. *et al.* Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **38**, 193–202 (2004).
38. Millar AJ, K. S., Straume M, Chory J, Chua NH. Millar AJ, Straume M, Chory J, Chua NH, Kay SA. The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* (1995).
39. Dodd AN, W. A., Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ. Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* (2005).
40. Hotta, C. T. *et al.* Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant Cell Environ* **30**, 333–349 (2007).
41. Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S. & Johnson, C. H. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8660–8664 (1998).
42. Higashi, Y., Okazaki, Y., Myouga, F., Shinozaki, K. & Saito, K. Landscape of the lipidome and transcriptome under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* **5**, 10533 (2015).
43. Niwa, Y., Yamashino, T. & Mizuno, T. The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **50**, 838–854 (2009).

44. Hozer, C., Perret, M., Pavard, S. & Pifferi, F. Survival is reduced when endogenous period deviates from 24 h in a non-human primate, supporting the circadian resonance theory. *Sci Rep* **10**, 18002 (2020).
45. Clack, T., Mathews, S. & Sharrock, R. A. The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* **25**, 413–427 (1994).
46. Rockwell, N. C., Su, Y.-S. & Lagarias, J. C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837–858 (2006).
47. Hall, A., Kozma-Bognár, L., Tóth, R., Nagy, F. & Millar, A. J. Conditional circadian regulation of PHYTOCHROME A gene expression. *Plant Physiol* **127**, 1808–1818 (2001).
48. Quail, P. H. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 85–93 (2002).
49. Smith, H. Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585–591 (2000).
50. Dunlap JC. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* (1999).
51. Mehra A, D. J., Shi M, Baker CL, Colot HV, Loros JJ. Mehra A, Shi M, Baker CL, Colot HV, Loros JJ, Dunlap JC. A role for casein kinase 2 in the mechanism underlying circadian temperature compensation. *Cell* (2009) doi:10.1016/j.cell.2009.03.019.
52. Bell-Pedersen, D. *et al.* Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* **6**, 544–556 (2005).
53. Novák, B. & Tyson, J. J. Design principles of biochemical oscillators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 981–991 (2008).
54. Huang, W. *et al.* Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science* **336**, 75–79 (2012).
55. Locke, J. C. W. *et al.* Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of Arabidopsis thaliana. *Mol Syst Biol* **2**, 59 (2006).
56. Nakamichi, N. Molecular mechanisms underlying the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell Physiol* **52**, 1709–1718 (2011).
57. Harmer, S. L. *et al.* Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* **290**, 2110–2113 (2000).
58. Somers DE, K. S., Devlin PF. Somers DE, Devlin PF, Kay SA. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science* (1998).
59. Bruce, V. G., Weight, F. & Pittendrigh, C. S. Resetting the sporulation rhythm in *Pilobolus* with short light flashes of high intensity. *Science* **131**, 728–730 (1960).
60. Aschoff, J. Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol* **49**, 225–249 (1979).
61. Hobson, J. A. & Pace-Schott, E. F. The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nat Rev Neurosci* **3**, 679–693 (2002).
62. Liu, Y. *et al.* Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev* **9**, 1469–1478 (1995).
63. Salomé, P. A., To, J. P. C., Kieber, J. J. & McClung, C. R. Arabidopsis response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *Plant Cell* **18**, 55–69 (2006).
64. Nozue, K. *et al.* Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448**, 358–361 (2007).

65. Franklin, K. A. Shade avoidance. *New Phytol* **179**, 930–944 (2008).
66. Brasier, A. R. & Fortin, J. J. Nonisotopic assays for reporter gene activity. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 9**, Unit9.7B (2001).
67. Millar, A. J., Short, S. R., Chua, N. H. & Kay, S. A. A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* **4**, 1075–1087 (1992).
68. Alam, J. & Cook, J. L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* **188**, 245–254 (1990).
69. Wang ZY, T. E. Wang ZY, Tobin EM. Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* (1998).
70. Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T. & Mizuno, T. 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 (2005).
71. Millar, A. J. The Intracellular Dynamics of Circadian Clocks Reach for the Light of Ecology and Evolution. *Annu Rev Plant Biol* **67**, 595–618 (2016).
72. Kim, W.-Y. *et al.* ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**, 356–360 (2007).
73. Ezer, D. *et al.* The evening complex coordinates environmental and endogenous signals in *Arabidopsis*. *Nat Plants* **3**, 17087 (2017).
74. Nusinow DA, K. S., Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farré EM. Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farré EM, Kay SA. The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* (2011).
75. Rawat, R. *et al.* REVEILLE8 and PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 form a negative feedback loop within the *Arabidopsis* circadian clock. *PLoS Genet* **7**, e1001350 (2011).
76. Hsu, P. Y. & Harmer, S. L. Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends Plant Sci* **19**, 240–249 (2014).
77. Hsu, P. Y., Devisetty, U. K. & Harmer, S. L. Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in *Arabidopsis*. *Elife* **2**, e00473 (2013).
78. Varshavsky, A. The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **22**, 383–387 (1997).
79. Glickman, M. H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373–428 (2002).
80. Schnell, J. D. & Hicke, L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **278**, 35857–35860 (2003).
81. Mukhopadhyay, D. & Riezman, H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**, 201–205 (2007).
82. Komander, D. & Rape, M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203–229 (2012).
83. Mevissen, T. E. T. & Komander, D. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annu Rev Biochem* **86**, 159–192 (2017).
84. Zhou, X.-J., Li, R., Liu, X. & Qu, Y.-Q. Advances in deubiquitinating enzymes in lung adenocarcinoma. *J Cancer* **12**, 5573–5582 (2021).
85. Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M.-M. & Pawson, T. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 473–483 (2006).
86. Pickart, C. M. & Fushman, D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610–616 (2004).

87. Weissman, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169–178 (2001).
88. Dupré, S., Volland, C. & Haguenauer-Tsapis, R. Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. *Curr Biol* **11**, R932–934 (2001).
89. Hicke, L. A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* **106**, 527–530 (2001).
90. Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 195–201 (2001).
91. Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H. & Wilkinson, K. D. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* **78**, 363–397 (2009).
92. Lam, Y. A., Xu, W., DeMartino, G. N. & Cohen, R. E. Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* **385**, 737–740 (1997).
93. Komander, D. Mechanism, specificity and structure of the deubiquitinases. *Subcell Biochem* **54**, 69–87 (2010).
94. Amerik, A. Y. & Hochstrasser, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 189–207 (2004).
95. Somers DE, K. S., Schultz TF, Milnamow M. Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay SA. ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from Arabidopsis. *Cell* (2000).
96. Cha, J.-Y. *et al.* GIGANTEA is a co-chaperone which facilitates maturation of ZEITLUPE in the Arabidopsis circadian clock. *Nat Commun* **8**, 3 (2017).
97. Lee, C.-M. *et al.* GIGANTEA recruits the UBP12 and UBP13 deubiquitylases to regulate accumulation of the ZTL photoreceptor complex. *Nat Commun* **10**, 3750 (2019).
98. Feng, H., Tan, J. & Deng, Z. Decoding plant adaptation: deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 in hormone signaling, light response, and developmental processes. *J Exp Bot* **75**, 721–732 (2024).
99. Yan, N., Doelling, J. H., Falbel, T. G., Durski, A. M. & Vierstra, R. D. The ubiquitin-specific protease family from Arabidopsis. AtUBP1 and 2 are required for the resistance to the amino acid analog canavanine. *Plant Physiol* **124**, 1828–1843 (2000).
100. Young, M. W. The tick-tock of the biological clock. *Sci Am* **282**, 64–71 (2000).
101. Young, M. W. & Kay, S. A. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* **2**, 702–715 (2001).
102. Forger, D. B. Signal processing in cellular clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4281–4285 (2011).
103. Creux, N. & Harmer, S. Circadian Rhythms in Plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11**, a034611 (2019).
104. Reppert SM, W. D. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* (2002).
105. Gekakis, N. *et al.* Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, 1564–1569 (1998).
106. Kume, K. *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193–205 (1999).
107. Lowrey, P. L. *et al.* Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* **288**, 483–492 (2000).
108. Takahashi, J. S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet* **18**, 164–179 (2017).

109. Preitner, N. *et al.* The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**, 251–260 (2002).
110. Panda, S. *et al.* Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307–320 (2002).
111. Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E. & Hogenesch, J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 16219–16224 (2014).
112. Srikanta, S. B. & Cermakian, N. To Ub or not to Ub: Regulation of circadian clocks by ubiquitination and deubiquitination. *J Neurochem* **157**, 11–30 (2021).
113. Czeisler, C. A. & Gooley, J. J. Sleep and circadian rhythms in humans. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**, 579–597 (2007).
114. Duffy, J. F. & Czeisler, C. A. Effect of Light on Human Circadian Physiology. *Sleep Med Clin* **4**, 165–177 (2009).
115. Khalsa, S. B. S., Jewett, M. E., Cajochen, C. & Czeisler, C. A. A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *J Physiol* **549**, 945–952 (2003).
116. Arendt, J. Managing jet lag: Some of the problems and possible new solutions. *Sleep Med Rev* **13**, 249–256 (2009).
117. Waterhouse, J., Reilly, T. & Edwards, B. The stress of travel. *J Sports Sci* **22**, 946–965; discussion 965–966 (2004).
118. Reiter, R. J., Tan, D. X. & Galano, A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)* **29**, 325–333 (2014).
119. Arendt, J., Deacon, S., English, J., Hampton, S. & Morgan, L. Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res* **4**, 74–79 (1995).
120. Roenneberg, T., Wirz-Justice, A. & Mrosovsky, M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms* **18**, 80–90 (2003).
121. Reid, E. Factors affecting how patients sleep in the hospital environment. *Br J Nurs* **10**, 912–915 (2001).
122. Arendt, J. Melatonin and human rhythms. *Chronobiol Int* **23**, 21–37 (2006).
123. Toh, K. L. *et al.* An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040–1043 (2001).
124. Kantermann, T., Juda, M., Mrosovsky, M. & Roenneberg, T. The human circadian clock's seasonal adjustment is disrupted by daylight saving time. *Curr Biol* **17**, 1996–2000 (2007).
125. Sandhu, A., Seth, M. & Gurm, H. S. Daylight savings time and myocardial infarction. *Open Heart* **1**, e000019 (2014).
126. Monk TH, F. S. Monk TH, Folkard S. Adjusting to the changes to and from Daylight Saving Time. *Nature* (1976).
127. Ballesta, A., Innominato, P. F., Dallmann, R., Rand, D. A. & Lévi, F. A. Systems Chronotherapeutics. *Pharmacol Rev* **69**, 161–199 (2017).
128. Lévi, F. & Okyar, A. Circadian clocks and drug delivery systems: impact and opportunities in chronotherapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* **8**, 1535–1541 (2011).
129. Kraft, M. & Martin, R. J. Chronobiology and chronotherapy in medicine. *Dis Mon* **41**, 506–575 (1995).
130. Arrowsmith, J. Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 328–329 (2011).

131. Waring, M. J. *et al.* An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 475–486 (2015).
132. Virshup, D. M., Eide, E. J., Forger, D. B., Gallego, M. & Harnish, E. V. Reversible protein phosphorylation regulates circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**, 413–420 (2007).
133. Gallego, M. & Virshup, D. M. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 139–148 (2007).
134. Kojima, S., Shingle, D. L. & Green, C. B. Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J Cell Sci* **124**, 311–320 (2011).
135. Hirano, A. *et al.* FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**, 1106–1118 (2013).
136. Hirano, A. *et al.* A Cryptochrome 2 mutation yields advanced sleep phase in humans. *Elife* **5**, e16695 (2016).
137. Hu, M. *et al.* Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* **111**, 1041–1054 (2002).
138. Faesen, A. C., Luna-Vargas, M. P. A. & Sixma, T. K. The role of UBL domains in ubiquitin-specific proteases. *Biochem Soc Trans* **40**, 539–545 (2012).
139. Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A. & Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* **5**, 301–307 (2009).
140. Turek, F. W. Circadian rhythms. *Recent Prog Horm Res* **49**, 43–90 (1994).
141. Wasternack, C. & Hause, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* **111**, 1021–1058 (2013).
142. Wasternack, C. & Song, S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J Exp Bot* **68**, 1303–1321 (2017).
143. Fonseca, S. *et al.* (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**, 344–350 (2009).
144. Wasternack, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**, 681–697 (2007).
145. Hedrich, R. & Fukushima, K. On the Origin of Carnivory: Molecular Physiology and Evolution of Plants on an Animal Diet. *Annu Rev Plant Biol* **72**, 133–153 (2021).
146. Bigeard, J., Colcombet, J. & Hirt, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant* **8**, 521–539 (2015).
147. Howe, G. A. & Jander, G. Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 41–66 (2008).
148. Kazan, K. & Manners, J. M. MYC2: the master in action. *Mol Plant* **6**, 686–703 (2013).
149. Manners, J. M. *et al.* The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol Biol* **38**, 1071–1080 (1998).
150. Fernández-Calvo, P. *et al.* The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**, 701–715 (2011).
151. Chico, J.-M. *et al.* Repression of Jasmonate-Dependent Defenses by Shade Involves Differential Regulation of Protein Stability of MYC Transcription Factors and Their JAZ Repressors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 1967–1980 (2014).

152. Zhai, Q. *et al.* Phosphorylation-coupled proteolysis of the transcription factor MYC2 is important for jasmonate-signaled plant immunity. *PLoS Genet* **9**, e1003422 (2013).
153. Chini, A. *et al.* The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666–671 (2007).
154. Jeong, J. S., Jung, C., Seo, J. S., Kim, J.-K. & Chua, N.-H. The Deubiquitinating Enzymes UBP12 and UBP13 Positively Regulate MYC2 Levels in Jasmonate Responses. *Plant Cell* **29**, 1406–1424 (2017).
155. Chromatin accessibility: methods, mechanisms, and biological insights. Chromatin accessibility: methods, mechanisms, and biological insights. Mansisidor AR, Risca VI. *Nucleus* (2022).
156. Mattioli, F. & Penengo, L. Histone Ubiquitination: An Integrative Signaling Platform in Genome Stability. *Trends Genet* **37**, 566–581 (2021).
157. Derkacheva, M. *et al.* H2A deubiquitinases UBP12/13 are part of the Arabidopsis polycomb group protein system. *Nat Plants* **2**, 16126 (2016).
158. Kralemann, L. E. M. *et al.* Removal of H2Aub1 by ubiquitin-specific proteases 12 and 13 is required for stable Polycomb-mediated gene repression in Arabidopsis. *Genome Biol* **21**, 144 (2020).
159. Hanahan, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580 (1983).
160. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23–28 (1990).
161. Rhaese, H. J. & Boetker, N. K. The molecular basis of mutagenesis by methyl and ethyl methanesulfonates. *Eur J Biochem* **32**, 166–172 (1973).
162. Somerville, C. & Koornneef, M. A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nat Rev Genet* **3**, 883–889 (2002).
163. Koornneef, M., Bentsink, L. & Hilhorst, H. Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 33–36 (2002).
164. Nguyen, N. *et al.* Random mutagenesis of the mouse genome: a strategy for discovering gene function and the molecular basis of disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G1–11 (2011).
165. Trovão, M. *et al.* Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain Improvement towards Industrial Production. *Mar Drugs* **20**, 440 (2022).
166. Sega, G. A. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* **134**, 113–142 (1984).
167. Hunter, T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* **28**, 730–738 (2007).
168. Zheng, X.-Y. *et al.* Coronatine promotes Pseudomonas syringae virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* **11**, 587–596 (2012).
169. Jung, C. *et al.* PLANT U-BOX PROTEIN10 Regulates MYC2 Stability in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**, 2016–2031 (2015).
170. Yanovsky MJ, K. S. Yanovsky MJ, Kay SA. Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature* (2002).
171. Mutte, S. K. & Weijers, D. Deep Evolutionary History of the Phox and Bem1 (PB1) Domain Across Eukaryotes. *Sci Rep* **10**, 3797 (2020).

172. Hao, Y.-H. *et al.* USP7 Acts as a Molecular Rheostat to Promote WASH-Dependent Endosomal Protein Recycling and Is Mutated in a Human Neurodevelopmental Disorder. *Mol Cell* **59**, 956–969 (2015).
173. Takagi, H., Hempton, A. K. & Imaizumi, T. Photoperiodic flowering in Arabidopsis: Multilayered regulatory mechanisms of CONSTANS and the florigen FLOWERING LOCUS T. *Plant Commun* **4**, 100552 (2023).
174. Hajdu, A. *et al.* LIP1 Regulates the Plant Circadian Oscillator by Modulating the Function of the Clock Component GIGANTEA. *Cells* **13**, (2024).
175. Hajdu, A. *et al.* Author Correction: Forward genetic approach identifies a phylogenetically conserved serine residue critical for the catalytic activity of UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 12 in Arabidopsis. *Sci Rep* **14**, 28722 (2024).

Saját közlemények

A dolgozat alapját képező közlemény:

Hajdu A*, **Nyári DV***, Ádám É, Kim YJ, Somers DE, Silhavy D, Nagy F, Kozma-Bognár L.
Sci Rep. 2024 doi: 10.1038/s41598-024-77232-w

Forward genetic approach identifies a phylogenetically conserved serine residue critical for the catalytic activity of UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 12 in Arabidopsis

Egyéb közlemények:

Hajdu A, **Nyári D**, Terecskei K, Gyula P, Ádám É, Dobos O, Mérai Z, Kozma-Bognár L.
Cells. 2024 doi: 10.3390/cells13171503

LIP1 Regulates the Plant Circadian Oscillator by Modulating the Function of the Clock Component GIGANTEA.

*: megosztott első szerzők

MTMT azonosító: 10095033

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni elsősorban Dr. Kozma-Bognár Lászlónak, hogy csoportjuk tagja lehettem, illetve hogy szakdolgozataimat és doktori disszertációm is a témavezetésével végezhettem el. Köszönöm azt a sok szakmai hozzájárulást és segítséget, amit kaptam és hogy a biológia, ezen belül is cirkadián óra és a tudomány iránti lelkesedését át tudta adni mind oktatóként, mind témavezetőként.

Külön nagy hálával tartozom Dr. Hajdu Anitának, hogy témavezetőmként segített a laborban elhelyezkedni, szakmai tudását és precizitását átadni. Köszönöm türelmét és azokat a beszélgetéseket és „anyai” jótanácsait, melyekkel mindig tudott rajtam egyet előre lendíteni.

Köszönöm Dr. Szabó Áronnak, hogy elvállalta és elkészítette a házi védésemhez a bírálatot és köszönöm az építő jellegű kritikákat és a kiegészítő érdekes információkat.

Ezen kívül szeretném megköszönni a Növényi Foto- és Kronobiológiai csoport volt és jelenlegi tagjainak, hogy velük dolgozhattam és szakmai tudásukkal mindig kisegítettek, illetve hogy annyi tapasztalattal gazdagítottak.

Külön köszönettel tartozom Sándor Györgyinek, Hajó Róbertnének és Csávásné Ördög Mónikának a laborban és az üvegházban való összes segítségükért.

Emellett szeretném hálámat kifejezni a Lendület Gomba Genomika és Evolúció csoport tagjainak, amiért befogadtak és lelkiileg támogattak.

Végül köszönöm barátaimnak és családomnak, hogy mindig mellettem álltak, bátorítottak az utamban. Kiemelten köszönöm Papp Dórának és Péter Csabának a támogatásukat. Nélkületek nem sikerült volna.