

Doktori (Ph.D.) értekezés

Gyula Péter

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2009

Egy szokatlan szerkezetű kis GTPáz növényi cirkadián órában betöltött szerepének vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: Gyula Péter

Témavezető: Dr. Nagy Ferenc

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

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2009

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
BEVEZETÉS	3
Az időzítés élettani jelentősége	3
A cirkadián óra.....	4
SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
Rendszeresen ismétlődő élettani folyamatok	6
Cirkadián ritmusok.....	7
A cirkadián óra.....	12
Növényi életfolyamatok cirkadián szabályozása	16
A lúdfű cirkadián órájának modellje	22
A kis GTP-kötő fehérjék jellemzői	35
CÉLKITŰZÉSEK	40
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	41
Kísérleti anyagok és élőlények	41
Genetikai térképezés	45
Molekuláris biológiai és biokémiai módszerek	49
Élesztőn alkalmazott eljárások.....	58
Növényeken alkalmazott eljárások	60
EREDMÉNYEK	65
Egy új cirkadián óraelem azonosítása.....	65
A <i>lip1-1</i> mutáns cirkadián órájának jellemzése.....	65
A <i>lip1-1</i> mutáns egyéb jellemzői.....	77
A <i>LIP1</i> gén leírása	81

A LIP1 fehérje jellemzése	85
AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE	99
A LIP1 fehérje működésének modellje	99
A LIP1 cirkadián órán kívüli hatásai	104
ÖSSZEFOGLALÁS.....	106
SUMMARY	108
IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK	117
SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	128
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	129

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3×HA	A hemagglutinin-elem háromszor ismételve	GEF	(Guanine Exchange Factor) a GTPázok nukleotidcserélője
3×Myc	(Myelocytomatosis viral oncogene homolog) fehérjemintázat háromszor ismételve	GTP/GDP	Guanozin-trifoszfát/difoszfát
AD	(Activating Domain) a GAL4 átírási fehérje átírást serkentő eleme	H ⁻ L ⁻ W ⁻	Hisztidin-, leucin- és triptofán hiányos tápoldat
A ⁻ L ⁻ W ⁻	Adenin-, leucin- és triptofán hiányos tápoldat	IPTG	Izopropil-β-D-galakto-piranozid
AM	(<i>Arabidopsis</i> Medium) növényi táptalaj	LB	(Luria-Bertani) baktérium táptalaj
BD	(Binding Domain) a GAL4 átírási fehérje DNS-kötő eleme	LOV	(light/oxigen/voltage) fehérjeelem
bHLH	bázikus Helix-Loop-Helix fehérjeelem	LRR	(Leucin-Rich Repeat) fehérjeelem
BLAST	(Basic Local Alignment Tool)	L ⁻ W ⁻	Leucin- és triptofán hiányos tápoldat
BRASS	(Biological Rhythms Analysis Software System)	MS	(Murashige-Skoog) növényi táptalaj
CCD	(charge coupled device)	NCBI	(National Center for Biotechnology Information)
ClustalW	(Clustered alignment Weights)	oNPG	<i>orto</i> -nitrofenil galaktopiranozid
cps	(count per seconds) 1 másodperc alatt beérkező fotonok száma	PAS	(Per/Arnt/Sim) fehérjeelem
CTAB	Cetil-trimetil-ammónium bromid	PEST	Prolin-, glutaminsav-, szerin-, és treoningazdag fehérjemintázat
CSM	(Complete Synthetic Medium) élesztő táptalaj	Pfr	A fitokróm távoli vörös fényt elnyelő alakja
DTT	Ditiotreitol	PHI-BLAST	(Pattern Hit Initiated BLAST)
DUF	(Domain of Unknown Function) fehérjeelem	pPCV	(Plant Cloning Vector) növényi kétépítés plazmid
EDTA	Etilén-diamin-tetraacetát	Pr	A fitokróm vörös fényt elnyelő alakja
EMS	Etil-metán szulfonát	PRC	(phase response curve) az óra beállítási hatóságát az idő függvényében leíró görbe
ER	Endoplazmatikus Retikulum	PRONE	(Plant RHO Nucleotide Exchanger) fehérjeelem
FFT-NLLS	(Fast Fourier Transformation Non Linear Least Squares)	SCF	SKP-Cullin-F-box
FMN	Flavin-mononukleotid	SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
FRC	(fluence rate curve) egy jelleg függése a fényerősségtől	SEM	(standard error of the means) a középértékek standard hibája
GAP	(GTPase Activating Protein) a GTPázok GTP-hasítását gyorsító fehérje	SH3	(SRC Homology 3) fehérjeelem
GDI	(Guanine Dissociation Inhibitor) a GTPázok nukleotidcseréjét megakadályozó szabályozófehérje	TBLASTN	(Translated BLAST on Nucleotide database)
YEB	(Yeast Beef) <i>Agrobacterium</i> táptalaj	Tris·HCl	Trisz (hidroximetil) amino-metán klorid sója
YNB	(Yeast Nitrogen Base) élesztő táptalaj alkotóeleme	UV-A/B	Ibolyántúli-A/B sugárzás
YPAD	(Yeast Pepton Adenin Dextrose) élesztő táptalaj	WW	Két, jellegzetes elhelyezkedésű triptofánt tartalmazó fehérjeelem

Gének nevei

ARF	ADP-RIBOSYLATION FACTOR	RAS	RAS SARCOMA ONCOPROTEIN
ARR	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR	RHO	RAS HOMOLOGUE PROTEIN
ASK	ARABIDOPSIS SKP	ROP	RHO OF PLANTS
β -TUB	β -TUBULIN	SAR	SECRETION-ASSOCIATED AND RAS-RELATED
CAB2	CHLOROPHYLL A/B-BINDING 2	SRR1	SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1	TEJ	Szanszkritül: fényes
CCR2	COLD CIRCADIAN CLOCK REGULATED 2	TIC	TIME FOR COFFEE
CDC42	CELL DIVISION CYCLE 42	TOC1	TIMING OF CAB 1
CDF1	CYCLING DOF-FACTOR 1	WC	WHITE COLLAR
CIR1	CIRCADIAN 1	WNK	WITHOUT ASPARAGIN AND LYSIN
CK2	CASEIN KINASE 2	XCT	XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER
CKB	CASEIN KINASE β -SUBUNIT	YFP	YELLOW FLUORESCENT PROTEIN
CO	CONSTANS	ZTL	ZEITLUPE
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1		
CRY	CRYPTOCHROME = kriptokróm		
CUL1	CULLIN 1		
DET1	DE-ETIOLATED 1		
DEXRAS1	DEXAMETHASONE INDUCED RAS 1		
ELF	EARLY FLOWERING		
EPR1	EARLY PHYTOCHROME-RESPONSIVE 1		
FHY	FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL		
FIO1	FIONA 1		
FKF1	FLAVIN-BINDING, KELCH-REPEAT, F-BOX 1		
FT	FLORAL TRANSITION		
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN		
GI	GIGANTEA		
GRP7	GLYCINE-RICH PROTEIN 7		
HPT	HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE		
KPP1	KINASE PARTNER PROTEIN1		
LePRK	Licopersicon esculentum PROTEIN RECEPTOR KINASE		
LHY	LATE ELONGATED HYPOCOTYL		
LIP1	LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1		
LKP2	LOV KELCH PROTEIN 2		
LUC	Photinus pyralis (szentjánosbogár) luciferáz		
LUX	LUX ARRHYTHMO		
MAPK	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE		
MBP	MALTOSE-BINDING PROTEIN		
MYB	MYELOBLASTOSIS VIRAL ONCOGENE HOMOLOG		
PHOT	PHOTOTROPIN = fototropin		
PHY	PHYTOCHROME = fitokróm		
PIF	PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR		
PRR	PSEUDO RESPONSE REGULATOR		
RAB	RAS-LIKE PROTEINS IN BRAIN		
RABL3	RAB-LIKE 3		
RAN	RAS-LIKE NUCLEAR PROTEIN		

BEVEZETÉS

Az időzítés élettani jelentősége

A Földön nem minden környezeti tényező változása véletlenszerű. Bolygónk tengely körüli forgása következtében a felszínen a fény erőssége, spektruma és a hőmérséklet 24 óránként ismétlődő mintázat szerint változik. Ehhez a kiszámítható jelenséghez szinte minden földi élőlény alkalmazkodott. Különböző életfolyamataikat, amelyek fényhez vagy sötéthez köthetők, a napfelkeltéhez vagy a naplementéhez igazítják. A fotoszintetizáló élőlények számára a fény az elsőrendű energiaforrás, ezért számukra különösen fontos, hogy ezt az erőforrást minél hatékonyabban tudják hasznosítani. Ennek feltétele, hogy már napfelkelte előtt felkészítsék fényelnyelő és hasznosító, valamint a fénykárosodástól védő rendszereiket [1]. A helyhez kötött növények nem képesek a kedvezőtlen körülményeket helyváltoztatással elkerülni. Ezért kénytelenek a stresszválaszaikat és minden olyan életfolyamatukat is, amely komoly erőforrást igényel, takarékosági szempontból a legmegfelelőbb időszakra korlátozni, valamint egymással időben összehangolni [2,3].

A különböző folyamatok összehangolására sejtszinten is nagy szükség van. A sejten belüli forgalomirányítás a torlódások elkerülése, a csomagok gyors és pontos kézbesítése miatt kulcsszerepet játszik a sejtek változó környezethez való alkalmazkodásában [4]. A sejtosztódás időbeli szervezése az egyedfejlődés szempontjából rendkívül fontos. Számos élőlény a sejtosztódást csak egy bizonyos napszakra korlátozza [5]. A különböző körülményeket igénylő biokémiai folyamatokat nem csak térben, de időben is célszerű szétválasztani. Például az oxigéntermelő fotoszintézist és az oxigénmentes körülményeket igénylő nitrogénkötést a cianobaktériumok nemcsak különböző sejtekben, hanem eltérő napszakban is végzik [6]. A hatékony szénmegtartás érdekében a

pozgás növények pedig a fotoszintézis fény- és sötétfolyamatát választják szét térben és időben [7].

A cirkadián óra

Az az időmérő, amely ezt az időzítést, a külső és a belső ritmusok összehangolását lehetővé teszi az ún. biológiai óra. Ez egy önműködő ritmusképző rendszer, amely a hozzá kapcsolt folyamatoknak hullámnzó mintázatot biztosít. Ezen ritmusok hozzávetőleg egy napos gyakorisággal ismétlődnek, ezért a latin *circa diem* kifejezés nyomán cirkadián órának, az általa létrehozott ritmust pedig cirkadián ritmusnak nevezzük. A cirkadián ritmusok legfontosabb jellemzője, hogy állandó körülmények között is fennmaradnak. A cirkadián óra ugyan a környezettől függetlenül is képes ritmus előállítására, de a működésével járó előny érvényesüléséhez szükség van a külső környezethez való igazodás képességére. Az óra ezért a külső környezeti tényezők – elsősorban a fény és a hőmérséklet – által nap mint nap beállítódik. A cirkadián óra teszi lehetővé a nappalhosszúság változásának nyomonkövetésével a növény fejlődési folyamatainak megfelelő évszakra való időzítését is.

A rendszerben betöltött szerepük alapján a cirkadián órát felépítő elemeket három csoportba sorolhatjuk: a ritmusképző főrezgőkör elemei, a külvilággal való kapcsolatot biztosító bemeneti elemek, és a létrehozott ritmust az élettani folyamatokra kapcsoló kimeneti elemek. A kutatók figyelemét az elméleti szempontból legizgalmasabb rész, a központi főrezgőkör megismerése köti le elsősorban. A különböző modellszervezetekben (egér, gyümölcsleány, fonalas gomba, cianobaktérium, lúdfű) végzett kutatások kiderítették, hogy ugyan a főrezgőkört felépítő elemek egyáltalán nem hasonlítanak a vizsgált élőlénycsoportokban, az órát felépítő rendszer szerveződése mégis nagyon hasonló. Így például megállapítható, hogy a ritmus előállításához jellegzetes óragének és órafehérjék által létrehozott, késleltetett negatív visszacsatoláson alapuló szabályozóhurokra van szükség. A növényi cirkadián óra kutatása az utóbbi évek jelentős eredményei ellenére lemaradásban van a többi modellszervezetéhez képest. Noha a növényi modellszervezetként használt lúdfűben (*Arabidopsis thaliana*) számos olyan gént leírtak, amely befolyásolja a cirkadián óra működését, ezek többségét eddig nem sikerült megnyugtatóan elhelyezni egy jól működő növényi cirkadián óramodellben. A jelenlegi, elég vázlatos modell szerint a ritmus létrehozásához növényekben két, nega-

tív visszacsatoláson alapuló szabályozóhurok együttműködésére van szükség. A gyorsan rezgő ún. „reggeli” hurok és a lassan rezgő „esti” hurok összekapcsolásának eredményeképp alakul ki a közel 24 órás ritmus. A rezgőköri elemek egy részének működése fényszabályozott, ez biztosítja a környezettel való kapcsolatot. A bemeneti elemek közül igazából csak a fényelnyelő fehérjék szerepe ismert kielégítően, a köztük és a főrezgőkör közötti kapcsolatot biztosító jelátviteli elemek többnyire ismeretlenek. Egyelőre ugyancsak homályosak a főrezgőkör jeleit a vezérelt életfolyamatok felé továbbító kimeneti jelátviteli utak, noha maguk a vezérelt ritmusok jól jellemeztek.

SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

Rendszeresen ismétlődő élettani folyamatok

Az élő anyag minden megnyilvánulási szintjén megfigyelhetők olyan folyamatok, amelyek időben ismétlődő mintázatot mutatnak. Ezeket az ismétlődés gyakorisága szerint csoportosíthatjuk. Vannak olyanok, amelyek másodperces, perces gyakorisággal ismétlődnek. Közismertek pl. az agyhullámok (tizedmásodperc), a szívverés (~1 másodperc), a légzés, a madárdal, vagy a tücsökciripelés (néhány másodperc), de vannak kevésbé ismert folyamatok is, mint pl. a sejten belüli kalciumhullámok (fél perc), a pollencső növekedése (1 perc), a szomiták kialakulása a gerincesek embriófejlődése során (~20 perc zebrahalban), az élesztősejtek O_2 -fogyasztása (40 perc), vagy az ember különböző alvászakaszainak ismétlődése (90 perc). Ezeket a folyamatokat, mivel egy napon belül többször ismétlődnek, ultradián ritmusoknak nevezzük a latin *ultra diem* (egy napon túli) kifejezés alapján. Az időlépték másik végén olyan folyamatokat találunk, amelyek több nap alatt ismétlődnek. Ilyenek pl. a gerincesek menstruációs ciklusa (rágcsálók: 3–5 nap, ember: 25–33 nap), vagy a vándormadarak költözése, a téli álm (évente egyszer). Ezeket infradián ritmusoknak nevezzük (latin *infra diem*, egy nap alatti). Vizsgálataink tárgyát azok a folyamatok képezik, amelyek egy napos gyakorisággal ismétlődnek, és amelyeket ezért cirkadián ritmusoknak hívunk. Cirkadián ritmusokkal gyakran találkozunk a hétköznapi életben. Legismertebb megnyilvánulása az utazóbetegség (jet lag), amely akkor jelentkezik, ha viszonylag gyorsan a lakóhelyüinktől nagyon különböző időzónába kerülünk. Cirkadián szabályozás alatt áll az ember alvás/ébredés állapota, de a testhőmérséklet és a vérnyomás is. Cirkadián ritmusok szinte minden, a fény érzékelésére képes élőlényben megfigyelhetők a sejtmag nélküliektől a gombákon és növényeken keresztül a gerincesekig [8].

Cirkadián ritmusok

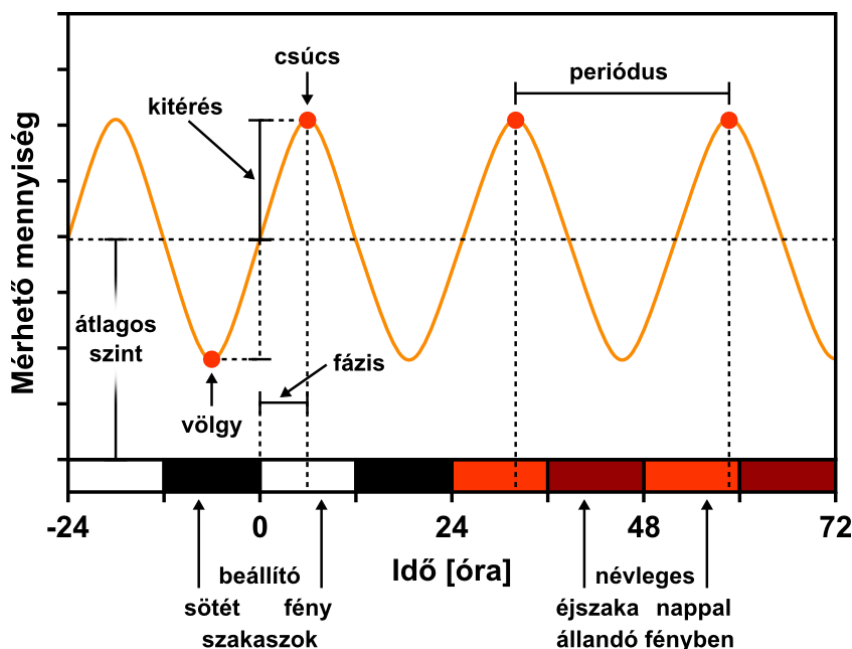
Alapismeretek, alapfogalmak

Összefoglalóan napszakos ritmusról beszélünk, ha egy jelleg természetes viszonyok között 24 órás gyakorisággal ismétlődik. A cirkadián ritmusok abban különböznek az egyszerű, környezeti jelek által vezérelt napszakos ritmusoktól, hogy állandó külső körülmények között is fennmaradnak. Ez egy környezettől függetlenül működő, szabályosan ismétlődő mintázat kialakítására képes belső óra (továbbiakban cirkadián óra) létezésének a bizonyítéka. Ilyenkor az adott ritmusra jellemző periódus alakul ki, amely rendszerint hosszabb vagy rövidebb, mint 24 óra, és amely egy idő után lecseng. A természetben ugyan soha nincsenek állandó fény- vagy hőmérsékleti viszonyok, mégis a kutatásban sokszor alkalmazzuk ezt a kísérleti elrendezést. Ilyen körülmények között ugyanis a környezet hatása elhanyagolható, a ritmus jellegét kizárólag a cirkadián rendszer belső törvényszerűségei alakítják: az óra „szabadon fut”.

A cirkadián ritmusok ugyan külső környezeti jelek nélkül is fennmaradnak, de azokkal beállíthatók. A beállítás során a belső idő a külsőhöz igazodik. Mivel az óra lényege a környezethez való alkalmazkodás, ezért a külső időhöz való igazíthatóság alapfeltétele a környezeti változások megbízható előrejelzésének. A belső óra sokféle külső (stressz)hatásra be képes állítódni, ezek közül a legfontosabb a fény és a hőmérséklet. A különböző környezeti jelekre való érzékenység azonban nem egyforma a nap során, hanem hullámzó mintázatot mutat. A belső óra ugyanis érzékelőinek cirkadián szabályozásával a saját beállíthatóságát, illetve a külső jelekre adott válaszokat bizonyos napszakokra korlátozza. Ezt a jelenséget zsilipelésnek hívjuk.

A cirkadián ritmusok képesek ellensúlyozni a hőmérséklet kémiai reakciókat befolyásoló hatását. Ennek köszönhetően a cirkadián ritmusok szabadon futó periódusa tág hőmérséklethatárok között is közel 24 óra marad. A kémiai folyamatok sebességének hőmérsékletfüggését az ún. Q_{10} érték mutatja. Ez azt fejezi ki, hogy egy adott folyamat sebessége hányszorosára nő, ha a hőmérsékletet 10 °C-kal emeljük. A cirkadián ritmusok periódusa alig változik a hőmérséklet változtatásával ($Q_{10}=0.8-1.2$), ellentétben a kémiai folyamatok sebességével ($Q_{10}=2-4$).

A cirkadián ritmusokat az alábbi fogalmakkal tudjuk leírni, amelyeket legegyszerűbben egy vázlatos ábrán lehet szemléltetni (1. ábra).



1. ábra. Egy cirkadián ritmus vázlatos jelleggörbéje

Az ábrán egy cirkadián óra által szabályozott folyamat mérhető tulajdonságait tüntettem fel. A beállító fényviszonyokat fekete, illetve fehér sávokkal jelöltem. Állandó fényviszonyok között a névleges éjszaka vagy nappal fogalmával azt fejezzük ki, hogy ekkor következne a beállító fény/sötét váltásoknak megfelelő napszak. Kísérleteink során az utolsó beállító nappal kezdetétől számítjuk az eltelt időt. Periódusnak nevezzük két egymást követő csúcs időbeli távolságát. A cirkadián ritmus csúcsa és völgye közötti különbség fele a kitérés (amplitúdó). A ritmus átlagos szintje a kitérések alapvonalának távolsága a függőleges tengely 0 pontjától. A ritmus fázisát rendszerint a hullám csúcsidejének és egy viszonyítási időpontnak a különbségeként adjuk meg.

A periódus egy jelleg ismétlődési gyakoriságát jelenti. Ha a jelleg kifejeződését az idő függvényében ábrázoljuk, akkor a periódust a hullámmintázat két azonos pontjának (pl. az egymást követő csúcsoknak) időbeli távolsága adja meg. A szabadon futó cirkadián ritmusok periódusa általában 20–28 óra (cirkadián tartomány). A periódus egy-egy körben különbözhet, a gyakorlatban ezért több csúcs távolságából számolunk egy átlagot. A ritmus fázisa azt mutatja meg, hogy a cirkadián körön belül hol tartózkodik a rendszer. Ezt rendszerint a hullám csúcsidejének és egy viszonyítási időpontnak (az utolsó beállító fény kezdetének) a különbségeként adjuk meg. Megegyezés

szerint a hullám kitérése (amplitúdója) a csúcs és a völgy közötti különbség fele. A kitérés egy-egy kör során eltérő is lehet. A ritmust erőteljesnek mondjuk, ha a kitérések nem változnak nagyon az egymást követő körök során. A ritmus átlagos szintje a kitérések alapvonalának távolsága a függőleges tengely 0 pontjától. A hullám alakja függ a ritmust kialakító folyamatok (felfutás, lefutás) sebességétől, a csúcsok és völgyek időtartamától. A különböző ritmusok hullámalakja nagyon eltérhet: vannak kihegyesedő csúcsokkal rendelkező ritmusok és elnyúltan tetőzők, szabályos szinuszhullám-szerűek és vállasak, nagy- és kis kitérésűek. Névleges éjszakaként vagy nappalként tüntetjük fel folyamatos körülmények alatt a beállító fény/sötét váltásoknak megfelelő időszakokat. Ezzel azt fejezzük ki, hogy ekkor következne a megfelelő napszak. Kísérleteink során az utolsó beállító nappal kezdetétől számítjuk az eltelt időt.

Mérési módszerek

Egy cirkadián jelleget sok szempontból vizsgálhatunk, ennek megfelelően sokféle kísérleti elrendezés közül választhatunk. A két leggyakoribb a valós viszonyokat utánzó váltakozó, illetve a belső törvényszerűségek feltérképezésére alkalmasabb állandó fényviszonyok között történő mérési mód. Utóbbi esetben a vizsgálati alanyokat pár napon keresztül a valós napokat utánzó egyszerű fény/sötét váltással való beállítás után helyezük állandó sötétbe vagy fénybe (fehérbe vagy egyszínűbe).

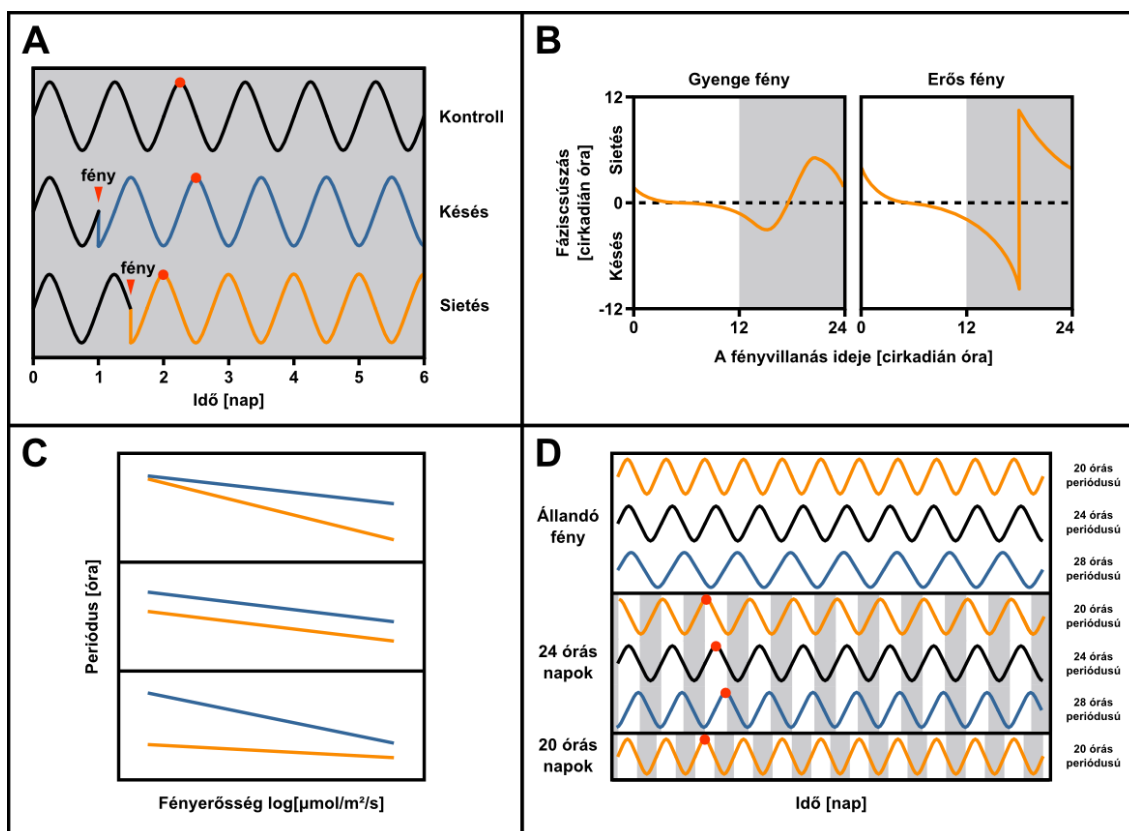
A szabadon futó körülmények között mérhető periódus a legtöbb élőlényben függ az alkalmazott fény erősségétől [9]. Növényekben ez a viszony általában fordított: minél erősebb a fény, annál rövidebb a periódus. A periódus fényfüggésének megváltozása a cirkadián óra fényszabályozásának zavarát jelezheti. A periódus fényerősségtől való függését úgy vizsgáljuk, hogy az azonos módon beállított növényeket eltérő erősségű állandó fénybe (fehérbe vagy egyszínűbe) helyezük néhány napra, majd a kialakuló periódust az alkalmazott fényerősség tízes alapú logaritmusának függvényében ábrázoljuk. Az így kialakuló fényerősség-függés görbe (FRC, Fluence Rate Curve) segítségével szerezhethetünk ismereteket a különböző színű és erősségű fényben működő fényérzékelő rendszerek érintettségéről.

A cirkadián órát be lehet állítani egyetlen fényvillanással is. Ez lényegében azt jelenti, hogy a rezgőkör valamely kulcselemének működését a fény közvetlenül vagy köz-

vetve befolyásolja, például ideiglenesen csökkenti annak szintjét. Az óra fázisától függően ez késést vagy sietést okozhat. Ez a kettős válasz az alapja a beállíthatóságnak (2. ábra, A mező), amelynek során a túl gyorsan vagy túl lassan futó belső óra a külső ritmushoz igazodik.

Korábban már említettem, hogy az óra saját beállíthatóságát cirkadián szabályozás alatt tartja. Ennek köszönhetően az óra a nap nagy részében szinte teljesen érzéketlen a beállító fényjelekre, míg a legnagyobb fáziscúszásokat a névleges éjfél környékén lehet kiváltani. A természetben ilyenkor nincs fény, ezért valójában az óra a napfelkelte és/vagy a naplemente idején a legérzékenyebb a beállításra. A természetben e két időpontban változik legnagyobb mértékben a fény erőssége (és színösszetétele), ezért ez a két legbiztosabb pont a nap folyamán, amelyekhez igazodni lehet. Az egyéb időpontokban fellépő ideiglenes, nem kiszámíthatóan bekövetkező környezeti változások (pl. egy felhő eltakarja a napot) cirkadián szempontból nem hasznosak, így érthető, hogy az óra a nappal során érzéketlen a beállító jelekre.

Ha a szabadon futó óra fázisát különböző időpontokban adott azonos erősségű és időtartamú fényvillanással állítjuk be, és a tapasztalt fáziscúszást az adott fényvillanás idejének függvényében ábrázoljuk, megkapjuk az ún. fázisválasz görbét (PRC, Phase Response Curve, [10]). A különböző színű és erősségű fényvillanásokkal előállított fázisválasz görbék alakja eltérő. Általában erősebb fényvillanásokkal nagyobb fáziscúszásokat lehet kiváltani, mint gyengébbekkel. A fényvillanás erejének vagy az óra fényérzékenységének más módon (pl. genetikai úton) történő megváltoztatása az egyik fajtájú görbéből a másikba való átmenetet idézheti elő (2. ábra, B mező).



2. ábra. A fény hatása a cirkadián órára

(A) Az óra beállításának alapja, hogy egy fő rezgőkör elem működését, pl. szintjét egy fényvillanás ideiglenesen meg tudja változtatni (itt csökkenteni). Attól függően, hogy a villanás melyik fázisban éri az órát, sietést vagy késést vált ki. (B) A sietéseknek és késéseknek a fényvillanás idejének függvényében való ábrázolásával kapjuk a fázisválasz görbét (PRC, Phase Response Curve). Erős villanásokkal nagyobb fáziscúszásokat lehet kiváltani, mint gyengébbekkel. (C) A PRC alakja befolyásolja az állandó fényben kialakuló periódust és annak fényerősségtől való függését. A magyarázatot lásd a szövegben. (D) Az állandó fényben különböző periódusú ritmusok csúcsa természetes 24 órás nap esetén különböző fázisra esik (a rövid periódusúaké korábban, a hosszúaké későbbre tolódik). A fázist helyrehozhatjuk, ha a különböző periódusú növényeket a periódusuknak megfelelő hosszú- vagy rövidnapos körülmények között neveljük.

Úgy tartják, hogy a rövid fényvillanásokkal kiváltott fáziscúszás az alapja a különböző erősségű állandó fényben kialakuló eltérő periódusoknak is [11]. Eszerint állandó fényben az óra folyamatosan beállítódik: a cirkadián kör egyik felében késések, a másik felében sietések történnek, és ezeknek eredőjeként alakul ki a szabadon futó periódus. A PRC alakja (a késések és sietések aránya) meghatározza a szabadon futó óra periódusát és annak fényfüggését [12]. Ha például a PRC-n azt látjuk, hogy a sieté-

sek mértéke jóval meghaladja a késéseket, akkor az FRC-n a periódus rövidülni fog a fény erősségének növelésével (így van a vad hátterű lúdfűben), míg ha a villanásokkal inkább késéseket lehet kiváltani, a periódus növekedni fog az alkalmazott fény erősségének növelésével (pl. elrontott órajú változatokban). Vegyünk két különböző óraváltozatot. Az első esetben a két óra periódusa sötétben megegyezik, de a fény eltérő módon képes gyorsítani őket. Amelyikben inkább sietéseket lehet kiváltani fényvillanásokkal, abban a periódus gyorsabban csökken az állandó fény erősségének növelésével (2. ábra, C mező, felső sáv). Ha a két óra periódusa sötétben eltér, de fényérzékenységek (PRC-jük) azonos, akkor párhuzamos FRC-t kapunk (2. ábra, C mező, középső sáv). Ha a két változatban mind a sötétben kialakuló periódus, mind pedig a PRC eltérő, akkor olyan eltérő meredekségű FRC-eket figyelhetünk meg, amelyek kiindulási pontja is eltérő (2. ábra, C mező, alsó sáv).

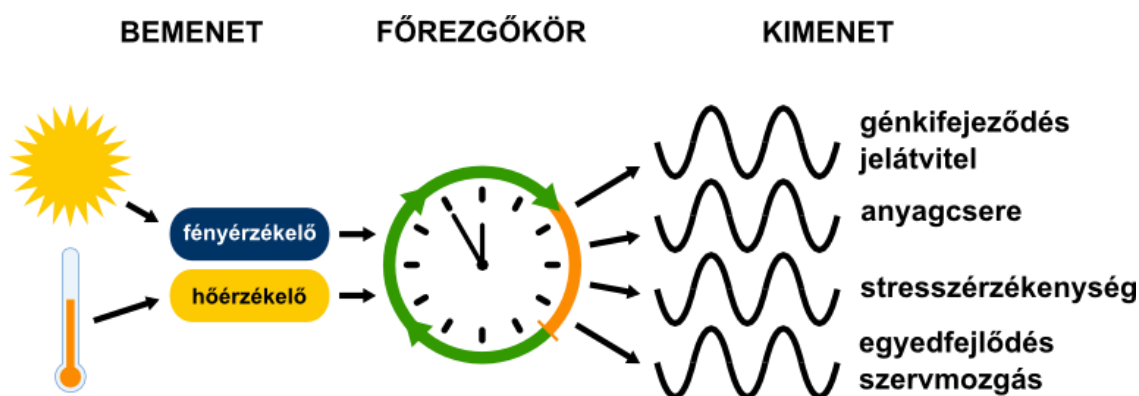
Az állandó fényben különböző periódusú ritmusok csúcsa természetes 24 órás nap esetén különböző fázisra esik: a rövid periódusúaké korábbra, a hosszúaké későbbre. Ezért az ilyen hibás változatokban az óra által időzített élettani folyamatok is más, nem megszokott időszakra esnek. Ennek egyik látványos következménye a virágzási idő megváltozása, amelyet a virágzást szabályozó gének kifejeződési csúcsának és a fényszakasznak a szétcsúszása okoz (lásd: 20. oldal). A fázist helyrehozhatjuk, ha a különböző periódusú vonalakat a periódusuknak megfelelő hosszú- (pl. 28 óra) vagy rövidnapos (20 óra) körülmények között neveljük (2. ábra, D mező). Ilyen módszerrel mutatták meg cianobaktériumokban és lúdfűben, hogy a rövid periódusú változatok rövid, a hosszú periódusúak hosszú napos körülmények között növekednek jobban [13,14]. Ez a belső és külső ritmusok összehangolásának jelentőségét bizonyítja.

Az óra működését sok más módon is lehet vizsgálni (pl. a periódus hőmérsékletfüggését, vagy a zsilipelést), mivel azonban dolgozatomban ezzel kapcsolatos kísérleteket nem mutatok be, eltekintek részletes leírásuktól.

A cirkadián óra

A cirkadián ritmusok létrejöttéért egy a külső környezettől függetlenül is működni képes belső óra tehető felelőssé. A cirkadián óra működését sokféleképpen lehet szemléltetni, modellezni (lengőinga, rugómozgás, elektronikus rezgőkör, körmozgást leíró egyenletek, stb). Akármelyik megközelítést választjuk is, három alapvető kérdést meg

kell tudnunk válaszolni: 1. hogyan jön létre a rezgés, 2. hogyan lehet a belső ritmust a külső környezet ritmusára hangolni (hogyan állítható be az óra környezeti jelekkel), illetve 3. hogyan lehet a létrehozott ismétlődő mintázatot a vezérelni kívánt élettani folyamatokhoz eljuttatni. Ezt az egyszerű, a köztudatba régóta [15] bevonult hármas felosztást (1. főrezgőkör, 2. bemenet, 3. kimenet) követem én is a cirkadián óra működésének bemutatása során (3. ábra).



3. ábra. A cirkadián óra vázlatos felépítése

Működés szempontjából a cirkadián órát három egységre bonthatjuk. A főrezgőkör, amely a környezettől függetlenül képes ismétlődő mintázat létrehozására, legalább egy serkentő és egy gátló folyamatból álló negatív visszacsatoláson alapul. A hullámmintázat létrejöttének feltétele a visszacsatolás késleltetése. A főrezgőkör ugyan képes a környezettől függetlenül is működni, de az alkalmazkodás szempontjából az is fontos, hogy a belső ritmus a külső, természetes ritmusra hangolódjék. A naponkénti órabéállítást a környezeti jeleket érzékelő molekulák és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli elemek főrezgőkörhöz való csatolása teszi lehetővé (bemenet). Az órát sokféle környezeti jellel be lehet állítani, de a két legjelentősebb a fény és a hőmérséklet. A létrehozott ismétlődő mintázat a kimeneti jelátviteli utakon keresztül nyilvánul meg a különféle élettani folyamatokban, amelyek a génkifejeződéstől kezdve a szervmozgásokig minden szinten megfigyelhetők.

A „tartós hullám” létrejöttének feltételei, a főrezgőkör felépítése

Hogyan lehet létrehozni egy önműködő hullámgerjesztő rendszert? A hullám gerjesztése és fenntartása az elemek (óragének és termékeik) közötti kapcsolati háló megfelelő elrendezésétől és az elemi kapcsolatok (átírás, lefordítás, fehérjemódosítások, lebomlás, stb.) erősségeinek egymáshoz igazításától függ [16]. Rezgés létrehozásához legalább egy serkentő és gátló folyamatból álló negatív visszacsatolásra és a visszaha-

tás késleltetésére van szükség. A negatív visszacsatolás lényege, hogy egy elem több lépcsőn keresztül végül a saját működésének gátlását idézi elő. Ez a rendszer azonban legalább három különböző állapotot vehet fel: gyorsan lecsengő (nem rezgő), szabályosan, illetve szabálytalanul rezgő. A három állapot közti átmenet ugrásszerű, és az elemek közötti kapcsolatok erősségének (segédváltozóknak) átállításával váltható ki.

Az ilyen egyszerű rezgőkör általában nem tud kellően erőteljes és állandó periódusú rezgést biztosítani, ahhoz egyéb szabályozókörök beépítésére van szükség. Ilyen megoldás pl. egy pozitív visszacsatolás hozzáadása, amelyről már több kísérletben is bemutatták, hogy szükséges a megfelelő szintű rezgés fenntartásához [17,18]. Másik megoldás, hogy több, kissé eltérően hangolt hurkot kapcsolunk össze, amelyek kiegyenlítik az egyensúlyt megzavaró külső és belső tényezők hatását. Ezen biztosítékok lényege, hogy megpróbálják a rezgőkört a szabályosan rezgő állapotban tartani. Egy cirkadián óragén vagy egy fénybemeneti elem elrontása örökletesen megváltoztathatja egy segédváltozó értékét. Ez a szabályosan rezgő állapotról valamelyik másik állapotra való átállást eredményezhet (eltérő periódus vagy kitérés, gyorsan lecsengő ritmus, szabálytalan rezgés).

Hagyományosan azokat az elemeket tekintjük a főrezgőkör részeinek, amelyek törlése vagy folyamatos működése minden megfigyelhető ritmus megszűnéséhez vezet, szintjük vagy működésük cirkadián módon hullámzik, továbbá amelyek szintje vagy működése a fény és egyéb beállítójelek által pillanatszerűen megváltoztatható, és ez egyben minden megfigyelhető ritmus fázisának átállítódásához is vezet.

Az óra kapcsolata a külvilággal a bemeneti elemeken keresztül

A cirkadián óra létezésére a környezeti változások előrejelzése miatt van szükség. A belső ritmus külsőhöz való igazítását a környezeti jeleket érzékelő jelátviteli rendszerek főrezgőkörhöz való csatolása teszi lehetővé. A kapcsolatot biztosító jelátviteli rendszert hívjuk a cirkadián óra bemenetének. A legfontosabb beállító jel a fény és a hőmérséklet, amelyek meghatározott pontoknál befolyásolják az óraelemek működését.

Számos esetben kimutatták, hogy saját bemeneti elemeinek működését a cirkadián óra szabályozza. Modellek tanúsága szerint ez a fajta szabályozás erőteljesebbé teszi a

rezgést [19], ezen kívül pedig biztosítja az óra beállíthatóságának bizonyos napszakra való korlátozását (a bemenet zsilipelése).

Azokat a géneket tekintjük a cirkadián óra bemeneti elemeinek, amelyek elrontása csak az óra működésének környezettől (pl. fénytől) való függését változtatja meg, de nem szünteti meg a ritmust. Így például megváltozhat a periódus, a hullám tartóssága (lecsengés), de a ritmus nem szűnik meg. A bemenetnek a ritmus erőteljességére gyakorolt hatása miatt könnyen előfordulhat, hogy egy bemeneti elem elrontása következtében legyengült ritmust megszűntnek hiszünk. Más körülmények között azonban a ritmus újra nyilvánvalóvá válhat, bizonyítván a főrezgőkör érintetlenségét.

Az óra kimeneti elemei által szabályozott folyamatok

Azokat a jelátviteli utakat, amelyeken keresztül az óra a különféle életfolyamatokat vezérli az óra kimeneteinek nevezzük. Cirkadián szabályozás a génkifejeződéstől a viselkedésig minden szinten megfigyelhető. Cianobaktériumokban az összes promóter működése cirkadián szabályozás alatt áll [20], és növényekben is a gének 89%-ának kifejeződése változik valamilyen napszakos mintázat szerint [21]. A különböző gének kifejeződési csúcsai (fázisai) ugyan lefedik az egész napot, mégis a hasonló szerepet betöltő gének időzítése ugyanazon napszakra, legtöbbször vagy a napfelkelte vagy a naplemente környékére esik [21,22]. A génkifejeződéshez hasonlóan az összes többi cirkadián-szabályozott folyamat is a számára legmegfelelőbb napszakra időzítődik. A főrezgőkör értelemszerűen csak egyféle fázissal rezeg, az ettől eltérő fázisokat módosító kimeneti elemek közbeiktatásával lehet létrehozni (fázisátalakítók). Megfigyelték azt is, hogy egyes kimeneti elemek önálló szabályozóhurkokat alkotnak. Ezen alrezgőkörök elrontása nem befolyásolja a főrezgőkör működését, csak az adott kimenetet érinti.

Azokat az elemeket tekintjük az óra kimenetének, amelyek elrontása nem szünteti meg a ritmusképzést és nem változtatja meg a periódust sem, hanem csak egyes ritmusok kifejeződésére (kitérés, fázis, hullámalak) van hatással.

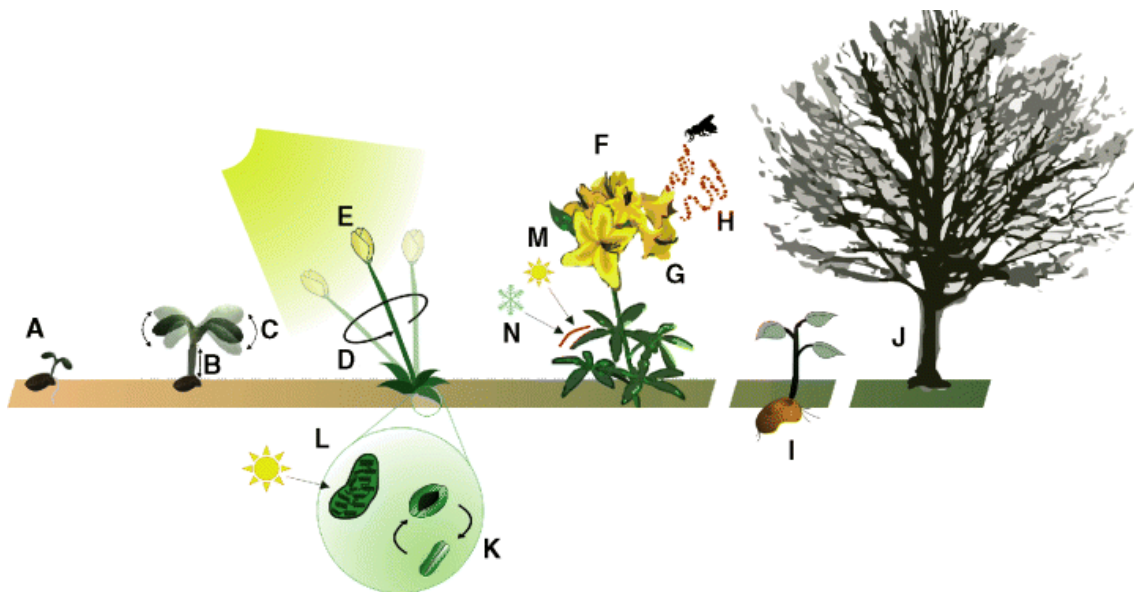
Központi és környéki órák

Állatokban cirkadián óra ugyan szinte minden sejtben működik, mégis egy központi óra (a hipotalamusz látóidegkereszteződés feletti sejtcsoportjában) irányítása alatt

áll az összes környéki óra [23]. Eddigi ismereteink szerint a növényeknek az állatokkal szemben nincs szervi szinten elkülönült központi és környéki órája (bár a legújabb, még nem közölt eredmények azt sugallják, hogy más óra működik a föld alatti és feletti szervekben). A növényi cirkadián óra minden sejtben önállóan, teljes értékűen működik, eddig még nem sikerült sejtek közötti összehangolódást, vagy függőséget megfigyelni. Ugyanazon levél két felét ellentétes fázisban beállítva a génkifejeződésben megfigyelhető fáziskülönbség állandó körülmények között napokig megmarad, nem egyenlítődik ki [24].

Növényi életfolyamatok cirkadián szabályozása

A cirkadián óra számos életfolyamatot szabályoz a növény fejlődése során (4. ábra). Egyesek naponta játszódnak le, ezeket az óra közvetlenül vezérli. Mások évente ismétlődnek, ezek időzítését a cirkadián óra közvetve, a nappalhosszúság változásának nyomkövetésével végzi.



4. ábra. Cirkadián szabályozás a növényi fejlődés minden szintjén megfigyelhető

(A) Csírázás, (B) a szikalatti szár megnyúlása, (C) levélmozgás, (D) a szár köröző mozgása, (E) árnyékelkerülés, (F) virágzási idő, (G) virágok kinyílása, (H) illatanyagok termelődése és kibocsátása, (I) gumóképzés és tápanyagraktározás, (J) téli nyugalmi állapot, (K) gázcserenyílások nyitódása és záródása, (L) fotoszintézis, (M) fénykárosodás elleni védelem, (N) hő- és fagykárosodás elleni védelem. Az ábra a Yakir és munkatársai által 2006-ban közölt összefoglaló cikkből származik [25].

Életfolyamatok közvetlen cirkadián szabályozása

Bizonyított tény, hogy a cirkadián óra már a növényi élet legkorábbi szakaszában is működik. Száraz, nyugalomban levő vöröshagyma magvak gázcseréje folyamatos sötétben is hullámzó módon változik. Lúdfűben a cirkadián órát a magvak beáztatásával be lehet állítani. Csíranövényeket sötétben növesztve már a beáztatást követő második naptól megfigyelhető az óragének kifejeződésében a cirkadián mintázat [26]. Számos növényfaj csírázási idejét a cirkadián óra határozza meg a nappalhosszúság mérésén keresztül, így időzítve azt a legmegfelelőbb évszakra.

A cirkadián szabályozás a csírázás utáni fejlődési szakaszokban sem szűnik meg. A csírázó lúdfű növénykéek szikalatti szárának megnyúlását a cirkadián óra is szabályozza: a megnyúlás üteme nem egyforma a nap során, váltakozó fényviszonyok között késő este [27], állandó fényben a névleges nappal végén [28] a leggyorsabb. Kiderítettek azt is, hogy a fény és a cirkadián óra együttesen alakítják ki a hullámzó mintázatot. A jelenlegi modell szerint [27] ez a következő képpen történik: a PIF4 és PIF5 átírási fehérjék génkifejeződését a cirkadián óra szabályozza. A csúcs ugyan a nappal közepére esik, a fény azonban a fehérjék lebontását serkentvén megakadályozza a nappali megnyúlást. Az este elején viszont a cirkadián völgy miatt nincs elég fehérje. A külső (fény) és belső (cirkadián ritmus) tényezők ilyen időbeli elrendezésének eredménye, hogy csak az este végén van elég növekedésserkentő fehérje a megnyúlás beindulásához. A fény gátló hatása nem teljes, mivel a megnyúlás üteme hullámzó marad állandó fényben is. Ezzel hozható kapcsolatba az a megfigyelés is, hogy a cirkadián óra zavara rendszerint együttjár a szikalatti szár hosszának megváltozásával [28]. A modellt némiképp bonyolítja, hogy a szikalatti szár megnyúlását sok egyéb tényező is befolyásolja, például egyes növényi hormonok. Nemrég mutatták ki, hogy az összes, auxin anyagcserével és jelátvitellel kapcsolatos gén kifejeződése, valamint az auxinérzékenység is cirkadián szabályozás alatt áll [29]. Később az is kiderült, hogy nem csak az auxin, hanem a növekedést befolyásoló egyéb növényi hormonok jelátviteli elemei és az általuk szabályozott célgének kifejeződése is napszakos ritmusú [30]. Nem kizárt, hogy a PIF4 és PIF5 átírási fehérjék éppen ezen gének átíródását irányítják. Érdekes módon az auxinnak nincs számottevő hatása a cirkadián óra működésére. A mesterségesen, kívülről adagolt hormon csak a ritmus kitérését csökkenti átmenetileg, a periódust nem befolyásolja. Ez arra utal, hogy az auxin-rendszert az óra egyirányúan vezérli, nincs

negatív visszacsatolás. Más hormonok ugyanakkor képesek befolyásolni a cirkadián ritmus sebességét is [31].

A növekedés során a cirkadián óra az árnyékelkerülést is szabályozza. Ennek lényege a szomszédos növények jelenlétének érzékelése, amelynek a fényforrásért folytatott küzdelemben van jelentősége. Az árnyéket vető szomszédok jelenlétét a növény azáltal érzékeli, hogy az árnyékoló leveleken keresztül érkező fény vörös/távolivörös aránya a közvetlen napfényhez képest kisebb. A megváltozott arány érzékelésében a fitokrómoknak van elsődleges szerepe. A beárnyékolt növények száruk és levélgyeik megnyúlásával próbálják túlnőni vetélytársaikat. Az alacsony vörös/távolivörös arányú fényre adott válasz nem egyforma a nap során, a cirkadián óra zsilipelése miatt a naplemente környékén a legnagyobb [32].

A növények sziklelevelének és valódi levelének szárral bezárt szöge szintén folyamatosan változik a nap során, amely állandó körülmények között is megfigyelhető [33]. Ennek célja nappal a lehető legtöbb fény elnyelésének biztosítása, éjszaka pedig a hőveszteség csökkentése. A tényleges levélállást sok egyéb tényező módosíthatja. A levélmozgás megvalósításának sejtszintű módja a különböző növényfajokban eltérő. Míg babban a levélgyél tövének alsó és felső oldalán elhelyezkedő sejtek ellentétes ozmotikus térfogatváltozása, addig a lúdfűben ezen sejtek váltakozó megnyúlása hozza létre a függőleges irányú mozgást.

A közvetlen cirkadián szabályozás már sejtszinten is megfigyelhető. Ilyen látványos sejtszintű folyamat a gázcsere nyitódása és záródása, amelyet a cirkadián órán kívül számos egyéb tényező (fény, hőmérséklet, páratartalom, CO₂, hormonok, stb.) is szabályoz. Az éghajlati körülmények nagy mértékben befolyásolják, hogy a nyílások melyik napszakban nyitottak a legnagyobb mértékben. Lúdfűben és a legtöbb mérsékelt égövi növényben a gázcsere nyitódások napközben nyitottak, éjjel pedig bezáródnak [34]. A száraz éghajlaton élő pozsgás növényekben azonban éppen fordított a helyzet [35]. Nappal a vízvesztést megakadályozandó a nyílások bezáródnak, ez azonban a gázcsere is megakadályozza. Annak érdekében, hogy a fotoszintézis emiatt ne álljon le, ezek a növények a fotoszintézis fény- és sötétszakaszát időben (és térben is) szétválasztották. A nyitódás közvetlen szabályozásán túl a cirkadián óra a külső szabályozójelek (pl. a fény) hatását zsilipel is [36].

A legközismertebb napszakosan ismétlődő sejtszintű folyamat a fotoszintézis és a szénmegkötés. A lúdfűben számos, a fotoszintézis fény- és sötétszakaszában szerepet játszó gén kifejeződése áll cirkadián szabályozás alatt. Így például az I-es és II-es fényelnyelő rendszer klorofill A/B-kötő fehérjéit kódoló *LHCA* és *LHCB* családba tartozó egyes géneké (pl. *CAB2*), a klorofill szintéziséért felelős géneké (protoporfirin IX magnézium kelatáz), valamint a CO₂-megkötésben szerepet játszó rubisco enzim kis alegységét (*RBCS*) és a rubisco aktivázt (*RCA*) kódoló géné [22]. Ezen gének által kódolt fehérjék szintje, sőt azok módosítása (foszforilálása) is cirkadián szabályozású [37]. Mérsékelt égövi növényekben a fotoszintézis fény és sötétszakasza is nappal történik, míg pozsgás növényekben a cirkadián órának köszönhetően e két folyamat és a hozzájuk kapcsolódó egyéb folyamatok is (pl. gázcsere) ellentétes fázisban zajlanak. A szén és a napenergia megkötését végző rendszereken kívül a forrásfelhasználó anyagfelépítő folyamatokat, valamint a cukor- és aminosavszállítást, keményítőanyagcserét bonyolító fehérjék kifejeződését is szabályozza a cirkadián óra [22].

A cirkadián órának rendkívül fontos szerepe van a stresszválaszok időbeli szervezésében is. A fény ugyan elsődlegesen energiaforrás a növények számára, de a túl sok (elsősorban az ultraibolya) fény káros nem csak a fényelnyelő rendszerekre, hanem a DNS-re is. A fénykárosodás csökkentése érdekében a növények már a napfelkelte előtt beindítják a fényvédő molekulák (pl. antocianidok) gyártásáért felelős enzimek génjeinek kifejeződését [22]. Nappal nem csak a sok fény, hanem a magas hőmérséklet és ehhez kapcsolódóan a szárazság, valamint a talajvízben oldott anyagok besűrűsödése miatt a só és ozmotikus stressz is megviseli a növényeket. Az említett környezeti tényezők elviselésére is megteszik a szükséges óvintézkedéseket a növények: a gázcsere nyílások szabályozásán túl egyes akvaporinok, ioncsatornák és pumpák génjeinek kifejeződését is megfelelően időzíti az óra. Éjszaka ugyanakkor elsősorban a hideg jelenti a legnagyobb gondot. Erre felkészülendő a növények a sejthártyák folyékonyságát növelő deszaturázok szintjét kezdi emelni már a naplemente előtt. A növények a cirkadián óra zsilipelése miatt eltérő mértékben érzékenyek a hidegre és a melegre a nap során: a gyapot például a hidegre a nap elején érzékenyebb, a melegre a nap végén.

Az előbbieken felsorolt enzimek és egyéb fehérjék génjeinek kifejeződését természetesen átírási fehérjék vezérlik, ezért ezek szintje is cirkadián módon változik. A fej-

lődési folyamatok és a stresszválaszok szabályozásában hormonok is szerepet játszanak. Az etilén, brasszinoszteroidok, gibberellinek és auxinok mennyisége cirkadián módon változik [38-41]. A különböző hormonok szintéziséért, szállításáért, lebontásáért, raktározásáért, érzékeléséért felelős enzimek, fehérjék génjei [30], valamint az ezen hormonok által szabályozott célgének egyaránt cirkadián szabályozottak [42].

A nappalhosszúság által szabályozott folyamatok

A mérsékelt égövön az időjárás egy év során kiszámíthatóan változik és ezek a változások évente nagyjából ugyanúgy ismétlődnek. A jól elkülöníthető időjárási jellegzetességeket mutató időszakokat nevezzük évszakoknak. Az évszakok kialakulásának oka, hogy Nap körüli keringése során a Föld forgástengelye nem merőleges a keringési pálya síkjára, hanem ahhoz képest $23,5^\circ$ -os szöget zár be. Az évszakok közötti legszembetűnőbb és legkiszámíthatóbb különbség a nappalok hosszában figyelhető meg. A nappalok hossza ugyanakkor nem egyenletesen változik, hanem tavasszal és ősszel a leggyorsabb. Lényeges különbség e két jellegzetes évszak között, hogy tavasszal nő, ősszel viszont csökken a nappalok hossza. A legkézenfekvőbb mód ezért az időbeli tájékozódásra a nappalhosszúság változási sebességének és irányának együttes mérése, amely a cirkadián óra és a fényérzékelő rendszerek együttműködésén alapul.

A legismertebb évszakhoz kötött fejlődési folyamat az önfenntartó állapotról a fajfenntartó állapotra való átkapcsolás, amely visszafordíthatatlan, ezért különösen fontos annak pontos időzítése. A virágzás időzítése szempontjából megkülönböztetünk hosszúnappalos és rövidnappalos, illetve nappalhosszúságra érzéketlen növényeket. A hosszú- és rövidnappalos azt jelenti, hogy a növények csak akkor virágoznak (vagy akkor virágoznak inkább), ha a nappalok kellően hosszúak, illetve kellően rövidek.

A nappalhosszúság mérésének molekulaszintű modellje szerint akkor indul be a virágzás folyamata, amikor egy cirkadián módon kifejeződő fényérzékeny szabályozó fehérje kellően magas szintje elegendően hosszú ideig egybeesik a fényszakasszal [43]. A lúdfűvel folytatott kutatások megállapították, hogy ez a fényérzékeny fehérje a CONSTANS (CO) [44]. A CO egy cink-ujj mintázatot hordozó fehérje, amely feltételezhetően nem közvetlenül, hanem az ún. CCAAT-kötő segédfehérjékkel összekapcsolódván más gének átírását irányítja [45]. A cirkadián óra oly módon szabályozza a CO mRNS szintjét, hogy az hosszú nappalon már jóval a naplemente előtt emelkedni kezd

és magas szinten marad egészen a következő reggelig. Rövid nappalon viszont csak éjszaka ér el magas szintet, és bár a *CO* mRNS lefordítása gyors, a *CO* fehérje sötétben lebomlik. A nappal elején a fény a *PHYB*-n keresztül szintén a *CO* fehérje lebomlását serkenti, a nap végén azonban a *PHYA* és a *CRY2* által elnyelt távoli vörös és a kék megóvjá a *CO* fehérjét a lebomlástól [46,47]. Így végülis elég *CO* fehérje csak hosszú nappalon, a fényszakasz végén tud felhalmozódni. A nappalok hosszabbodása a nap végi *CO* fehérjecsúcs kiszélesedéséhez vezet. A *CO* fehérje a sejtmagba vándorolván serkenti az egyik fő virágzásszabályozó gén, a *FLORAL TRANSITION (FT)* átírását. Az *FT* mRNS és fehérje a levelekből a csúcsi osztódószövetbe szállítódik, ahol beindítja a virágzás folyamatát [48]. Meglepő módon a virágzás szabályozása a rövidnappalos rizsben is hasonlóképpen zajlik azzal a különbséggel, hogy a *CO*-nak megfelelő gén az *FT*-nek megfelelő gént hosszú nappalon nem serkenti, hanem gátolja.

A cirkadián óra az önfenntartó állapotról a fajfenntartó állapotra való átkapcsoláson kívül egyéb fejlődési folyamatot is a nappalhosszúság mérésén keresztül szabályoz. Ilyen pl. a tápanyagraktározó szervek évszakfüggő kialakulása (gumóképzés), és egyes mérsékelt égövi fák téli nyugalmi állapota. Úgy tűnik, hogy ezen folyamatok szabályozása is a *CO* és az *FT* gének működéséhez kapcsolódik.

A külső és belső idő összehangolásának jelentősége

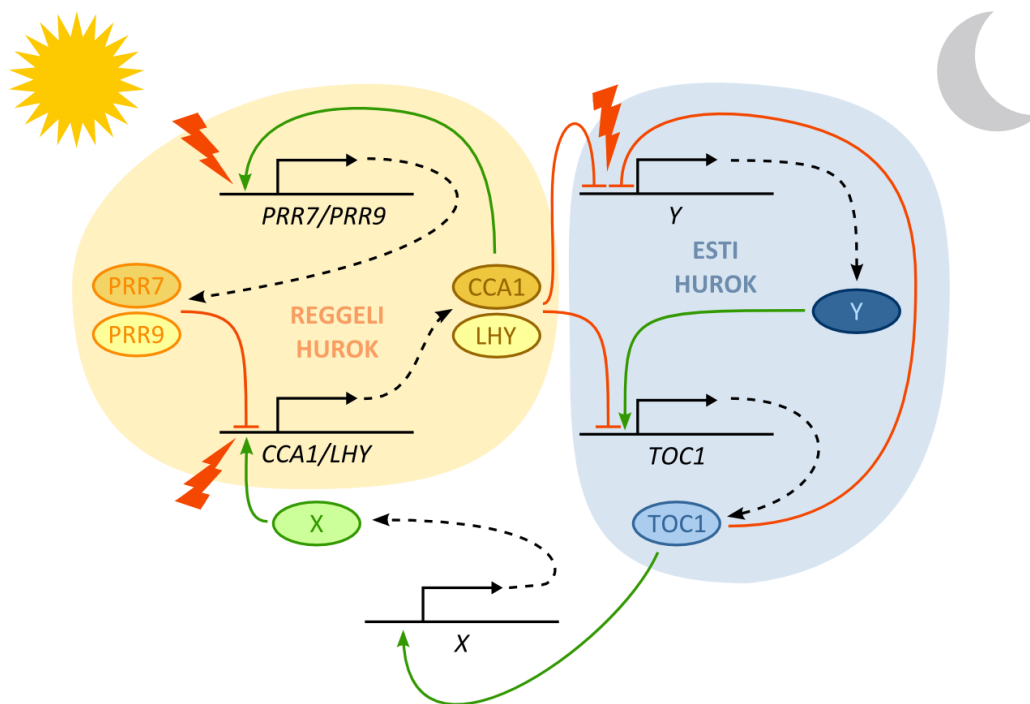
Mivel az óra az előbbieken részletezett módon jelentős szerepet játszik a különféle fejlődési- és stresszfolyamatok szabályozásában, régóta feltételezik, hogy alkalmazása növeli az előlányek életképességét. Milyen hatással van például a növények fejlődésére, ha állandó körülmények között nevelik őket? Paradicsommal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a növények állandó fényen és hőmérsékleten rosszul fejlődnek, kicsik maradnak és kevés termést hoznak [49,50]. Ha azonban a növényeket állandó fényben hőmérsékletváltásoknak vetik alá, akkor azok állandó fényben is megfelelően fejlődnek. Egy másik kísérletben azt vizsgálták, milyen hatással van a fejlődésre, ha a napok nem 24 órák. Cianobaktériumokkal végzett kísérletben hosszú (28 óra) és rövid periódusú (20 óra) törzseket keverték össze és neveltek hosszú (14 óra fény/14 óra sötét) illetve rövid (10 óra fény/10 óra sötét) napos viszonyok között. Néhány nemzedék után a hosszú napokon nevelt tenyészetben a hosszú periódusú, míg a rövid napokon neveltben a rövid periódusú törzs vált uralkodóvá [13]. Hasonló versengéses kísérle-

teket lúdfűvel is végeztek. Az egyik kísérletben azt mutatták meg, hogy a működőképes órával rendelkező növények életképesebbek váltakozó fényviszonyok mellett, mint a ritmus nélküliek [51], egy másik kísérletben pedig egy rövid és egy hosszú periódusú változat növekedését és fejlődését hasonlították össze különböző hosszúságú napok alkalmazásával. Kiderült, hogy a rövid periódusú változat rövid napos, míg a hosszú periódusú változat hosszú napos körülmények között nőtt jobban, bizonyítva a külső és belső ritmus összehangolásának versenyképességet növelő hatását [14].

A lúdfű cirkadián órájának modellje

A központi óramű felépítése

A közelmúltban végzett kísérletek és a matematikai modellek szerint a lúdfű központi rezgőköre három – óragének és termékeik által alkotott – összekapcsolt negatív visszacsatoláson alapuló szabályozóhurokból épül fel (5. ábra). Az elsőként azonosított hurok három összetevőből áll. A *TIMING OF CAB 1 (TOC1)*, vagy más néven *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 1 (PRR1)* egy esti kifejeződésű, cirkadián-szabályozott gén [34]. A sejtmagban elhelyezkedő TOC1 fehérje közvetett módon serkenti a két reggeli MYB-szerű átírási fehérje, a *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* és a *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* génjének kifejeződését [52]. A CCA1 és LHY olyan szokatlan felépítésű, MYB-elem tartalmú DNS-kötő fehérjék, amelyek a DNS-en aszimmetrikus nukleotidsorrendet, az ún. esti elemet (AAATATCT) [22] ismerik fel. Az mRNS-ek és fehérjék cirkadián módon hullámzanak, reggeli csúcsokkal. Kifejeződésük fényvel serkenhető. Szerepük részben átfed: a két gén bármelyikének túltermelése minden vizsgált ritmus megszűnését [53,54], hiánya a ritmusok periódusrövidülését okozza [55,56]; együttes hiányuk csaknem teljes ritmustalansággal jár [57]. Közvetlenül kötődnek a *TOC1* promóteréhez és gátolják annak működését [52]. Ennek a kölcsönös szabályozásnak köszönhetően a *TOC1* és a *CCA1/LHY* gének cirkadián kifejeződése ellentétes fázisú. A matematikai modell egy ismeretlen X elem jelenlétét is feltételezi, amely a TOC1 fehérje és a *CCA1/LHY* gének között helyezkedik el, feladata az utóbbi gének serkentése. Elképzelhető, hogy ezt a szerepkört az *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* és/vagy az *ELF4* molekulák töltik be [58], mivel hiányukban a *CCA1/LHY* kifejeződése drámaian lecsökken [59,60]. Egyesek az *ELF4*-et egy külön szabályozóhurok részeként képzelik el [60].



5. ábra. A növényi cirkadián óra modellje.

A jelenlegi elképzelés szerint a központi rezgőkör két egymáshoz kapcsolt, negatív visszacsatoláson alapuló szabályozóhurokból épül fel. A reggeli (gyorsan rezgő) hurkot a CIRCADIAN CLOCK REGULATED 1 (CCA1) és a LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), két MYB-szerű átírási fehérje és génjei, valamint a baktériumok kételemű rendszerének jelfogó tagjára hasonlító PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7 és 9 (PRR7,9) fehérjék és génjeik alkotják. A CCA1/LHY fehérjék közvetlenül serkentik a *PRR7/9* gének átíródását, míg a PRR-ek közvetett módon gátolják a *CCA1/LHY* géneket. Az esti (lassan rezgő) hurok tagjai a PRR-családba tartozó TIMING OF CAB 1 (*TOC1*) és egy *Y* elem, amely valószínűleg a GIGANTEA (*GI*). Az *Y* ismeretlen módon serkenti a *TOC1* gén kifejeződését, míg a *TOC1* fehérje szintén ismeretlen módon gátolja az *Y* gént. A két hurok több ponton is egymáshoz kapcsolódik: a *TOC1* egy feltételezett *X* elemen keresztül serkenti a *CCA1/LHY* géneket, míg a *CCA1/LHY* fehérjék közvetlenül a *TOC1* promóteréhez kapcsolódva gátolják annak működését. A *CCA1/LHY* nem csak a *TOC1*, hanem az *Y*, valamint saját génjeik kifejeződésére is gátlólag hat. A modellben négy gén kifejeződése fényrel serkenthető (piros villámok): *PRR9*, *CCA1*, *LHY*, *Y*. A modell szerint ezen gének fényérzékenysége az óra fényvel való beállíthatóságának alapja.

Az *ELF3* és *ELF4* gének kifejeződése cirkadián mintázatú, az *ELF4*-é ráadásul fényérzékeny is. A fehérjék sejtmagiak, és nem tartalmaznak egyetlen ismert fehérjeelemet sem.

Ez az eredeti egyhurkos modell azonban fontos kísérleti eredményekre nem tudott magyarázatot adni. A továbbfejlesztett modellben már egy esti időzítésű hurok is szerepel. Ennek lényeges összetevője egy ismeretlen Y elem, amelynek szerepe a *TOC1* gén kifejeződésének serkentése. Az Y génről megjósolták, hogy mind a *TOC1*, mind pedig a *CCA1/LHY* gátolja [58]. Egyes adatok szerint az Y tényező egy részéért a *GIGANTEA* (GI) lehet a felelős [58,61], mások azonban csak áttételes szerepet tulajdonítanak a GI-nak ebben a tekintetben [62-64]. A GI [65,66] egy nagy méretű sejtmagi fehérje [67], amely nem tartalmaz ismert fehérjeelemet. A GI mRNS és fehérje mennyisége cirkadián módon hullámzik, kora esti csúcsokkal [68]. A *gi* növényben az *LHY* és *CCA1* gének kifejeződése erősen csökkent, ami arra utal, hogy a GI a megfelelő *LHY* és *CCA1* szint kialakításában játszik szerepet. A különböző *gi* változatok vizsgálata kimutatta, hogy a GI fehérje a cirkadián ritmusok kitérését és periódusát is befolyásolja: a *gi-2* mutánsban a periódus fényerősség-függése kisebb mértékű, mint a vad háttérűben, a kitérés pedig kicsi [66].

A lúdfű génállománya négy *TOC1*-hez hasonló gént tartalmaz, cirkadián mintázatú kifejeződésük csúcsa különböző napszakokra esik [69]. Legkorábbi a *PRR9*, majd sorban következik a *PRR7*, *PRR5*, *PRR3*, végül az esti *TOC1/PRR1*. A *TOC1* és *PRR5* hiánya rövid, a *PRR7* és 9-é hosszú periódust okoz [34,70,71]. A *PRR3*, 5, 7, 9 fehérjék, valamint a *TOC1* az amino-végükön a baktériumok kételemű jeltovábbító rendszerének jelfogó tagjára jellemző fehérjeelemet tartalmaznak, viszont hiányzik belőlük az az aszparaginsav oldallánc (helyette glutaminsav található), amely a hagyományos kételemű rendszerekben hisztidin kinázok által foszforilálódik, és elengedhetetlen a megfelelő működéshez [72,73]. Ennek ellenére a *PRR*-ek is foszforilálódnak, de nem hisztidin kinázok, hanem egy rendellenes szerkezetű szerin/treonin kinázcsoport, a *WNK*-k által [74,75]. A *PRR*-ek a karboxi-végükön egy ún. CCT (CONSTANS, CONSTANS-LIKE, *TOC1*)-elemet is hordoznak, amelyben még egy sejtmagba irányító mintázat is található [73,76]. Az ilyen molekulák nem közvetlenül szabályozzák az átírást, hanem feltételezhetően egyéb segédfehérjéken keresztül [77]. A *TOC1*-re hasonló gének mindegyikéről kimutatták, hogy közülük van a cirkadián órához, noha az egy-

szeres hiánymutánsok cirkadián rendellenesége nem túl feltűnő [70,78-80]. A többszörös hiánymutánsok azonban már súlyosabban sérültek [78,80]. A legszélsőségebb a *prp5/prp7/prp9* mutáns, amelyben megszűnik mindenféle ritmus [81]. A kísérleti adatok és a modellszámítások szerint a CCA1/LHY fehérje serkenti a két reggeli kifejeződésű gén, a *PRR7* és *9* kifejeződését, a *PRR7* és *9* fehérje viszont (a TOC1-hez hasonlóan közvetetten) gátolja a *CCA1/LHY* géneket. Ez a negatív visszacsatolás ezért egy reggeli szabályozóhurkot alkot [61,82].

Az előbb vázolt modellt könnyebb megérteni, ha úgy értelmezzük, hogy valójában egy reggeli (gyors) és egy esti (lassú) rezgőkör kapcsolódik össze egy újabb hurok segítségével. Ha a gyors hurok elemeit rontjuk el, attól még a másik hurok működik, de rá jellemzően lassabban (hosszú periódus). Ha viszont a lassú hurkot tesszük tönkre, akkor a gyors hurok működését figyelhetjük meg (rövid periódus). A két eltérően hangolt rezgőkör együtműködése szükséges a cirkadián óra megfelelő működéséhez. Az egymásba hurkolódó óráknak ezt a rendszerét más élőlényekben is leírták és feltehetőleg egy általános szervezési elvet tükröz, melynek célja az erőteljes ritmus és a külső behatásokkal szembeni ellenállóképesség biztosítása [18].

Több olyan óraelem is ismert, amelynek hatása az órára drámai, még sincs benne a modellben. Ilyenek például a LUX ARRHYTHMO (LUX), amelynek hiányában teljes ritmustalanság tapasztalható [83,84]. Valójában ez az egyik legsúlyosabb cirkadián tünet, amelyet valaha is megfigyeltek. A LUX egy MYB-szerű DNS-kötő elemmel rendelkező átírási fehérje, amely szükséges a CCA1/LHY megfelelő szintjének kialakításához és a TOC1 ritmusának kialakulásához. A LUX a TOC1-hoz hasonlóan szabályozódik, mivel a CCA1/LHY a promóterében levő esti elemhez kötődve gátolja a kifejeződését. A CIR1 egy a CCA1/LHY fehérjékkel rokon MYB-szerű fehérje, amelynek túltermelése következtében számos óragén veszít ritmusának erőteljességéből [85]. Az óra működését egyéb átírási fehérjék túltermelése is komolyan befolyásolja [86]. Erre magyarázat lehet a később kifejtett heterodimerizálódás, vagy a kiszorítás jelensége.

Az óragének átíródásának szabályozásán alapuló jelenlegi modell nem vesz figyelembe számos átíródás utáni szabályozási folyamatot, pedig ezek bizonyítottan lényeges szerepet játszanak az óra működésében. Számos esetben (pl. az *ELF3*, *ELF4*, *TOC1* túltermelése esetén) bebizonyosodott, hogy az adott gén mRNS szintje nincs jelentős hatással az óra működésére [87-89]. Ennek az a magyarázata, hogy a fehérje működé-

séhez másodlagos fehérjemódosításra van szükség, ezért a meghatározó folyamat a módosítás sebessége, nem pedig az mRNS szintje. Így például a CCA1 fehérje működéséhez bizonyos szerin és treonin oldalláncok foszforilálása szükséges [90], a CASEIN KINASE II (CKII) szabályozó alegységeinek túltermelése pedig a periódus rövidülését okozza [91,92]. Sok órafehérje lebomlását is másodlagos fehérjemódosítások befolyásolják. Megfigyelték például, hogy a PRR-család tagjai időben lépcsőzetesen foszforilálódnak: a TOC1 és a PRR5 fehérjék foszforiláltságának mértéke egyenesen arányos a ZTL-hoz való tapadásukkal és így a lebomlásuk sebességével; a PRR3 és a TOC1 viszont csak foszforilált állapotukban hatnak kölcsön, amelynek következtében a TOC1 leesorul a ZTL-ről, és így nem bomlik le [93]. Érdekes módon a PRR3, 7 és 9 fehérjék szintje cirkadián mintázatú, de ez független a ZTL-től [93,94]. Egyéb elemek, amelyeknek egyensúlyi fehérjeszintjét az óra és/vagy a fény szabályozza: LHY [95], CASEIN KINASE II B4 (CKB4) [96], XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER (XCT) [97]. Ezen fehérjék egy részének lebomlásában a foszforilálás szintén fontos szerepet játszik. A foszforilálás a cianobaktériumok, gombák és állatok cirkadián rendszerében is rendkívüli fontosságú. Cianobaktériumban például kimutatták, hogy pusztán a tisztított órafehérjék kémcsőben képesek hőmérsékletfüggetlen 24 órás ritmust előállítani: a KaiC fehérje foszforiláltsági állapota ugyanis – kináz és foszfatáz reakciók közötti negatív visszacsatolásnak köszönhetően – 24 órás periódussal hullámzik [98].

Egyéb érdekes fehérjemódosítások lehetősége is felmerült a cirkadián órafehérjékkel kapcsolatban. A SPINDLY (SPY) egy O-kötött β -N-acetilglükózamin transzferáz enzim, amely a fehérjék glikozilálásában vesz részt és kölcsönhat a GI-val. Hiánya hosszú periódust okoz [99]. Az óra sebességét befolyásolja két másik érdekes molekula is: a TEJ, amely egy poli(ADP-ribóz) glikohidroláz [100], és a FIONA (FIO1), amely szerkezete alapján feltehetően egy S-adenozil-L-metionin-függő metiltranszferáz [101]. Egyik molekulának sem ismert a működési elve és a célfehérjéje sem.

Nincs kellően kihangsúlyozva a heterodimerképzés szabályozószerelve sem, pedig erre is van néhány adat a szakirodalomban. Említettem már a ZTL-szerű molekulák, valamint a II-es csoportba tartozó fitokrómok egymással való párosodását. Ennek a szabályozásnak a lényege, hogy ha például a lehetséges párok közül a működőképes alak a heterodimer, akkor az egyik alak túltermelése, vagy hiánya egyformán csökkenti a heterodimer töménységét és lényegében hasonló tünetet okoz. Ilyen szabályozásra

példa a KIDARI fehérje, amely egy DNS-kötésre képtelen bHLH átírási fehérje. A KIDARI a LONG HYPOCOTYL IN FAR RED 1 (HFR1)-gyel képes működésképtelen heterodimert képezni, ezzel gátolva annak DNS-kötését. A KIDARI cirkadián módon fejeződik ki, így a HFR1 működése is cirkadián mintázatot ölt annak ellenére, hogy kifejeződése nem az [102].

Egyáltalán nem ismert az órafehérjék sejten belüli elhelyezkedésének szabályozása, noha egyéb élőlényekben már bebizonyították ennek jelentőségét a cirkadián ritmusképzésben [103]. A növényi óra matematikai modelljében is szerepel a sejtmag és a sejtplazma közötti anyagforgalom, de ennek molekuláris háttere nincs tisztázva [58].

Nemrég mutatták ki lúdfűben a kromatinszerkezet cirkadián szabályozását: a *TOC1* gén promóteréhez tapadó hiszton H3 acetiláltsági állapota, amely a nyitott kromatinszerkezetre jellemző, napszakos hullámzást mutat, amely időben megelőzi a CCA1 átírási fehérje kötődését. A promóterhez tapadt CCA1 kiváltja a kromatin záródását, feltehetőleg hiszton-deacetilázok odavonzásával [104]. Ez összhangban van azal a ténnyel, hogy a CCA1 gátolja a *TOC1* gén kifejeződését. A kromatinszerkezet cirkadián szabályozása régóta ismert egyéb szervezetekből [105].

Világosan látszik, hogy az átírás utáni folyamatokat nem lehet kihagyni a növényi cirkadián óramodellből. Az elkövetkezendő évek fő kutatási vonala ezért véleményem szerint ezeknek a folyamatoknak még részletesebb feltérképezése és szerepük tisztázása lesz. Nincs kellően felderítve a már ismert óraelemek közötti kapcsolatrendszer sem. Jelenleg a sok, független kutatócsoportok által leírt elem önmagában áll, nem nagyon lehet őket elhelyezni egy nagyobb rendszerben. Erre megoldás az lehetne, ha a kutatók összehangoltabban végeznék munkájukat, és egységes, előre meghatározott kísérletsorozatokat végeznének el minden egyes azonosított óraelem esetében.

A bemeneti oldal elemei

Ahogy azt már korábban kifejtettem, a cirkadián óra nyújtotta előnyök érvényesüléséhez a belső időnek azonos fázisban kell lennie a valós idővel. Mivel a szabadon futó cirkadián ritmusok periódusa nem pontosan 24 óra, ezért a belső és külső ritmusok szétcsúszásának elkerülése érdekében az órát naponta hozzá kell igazítani a külső időhöz. A beállítást különböző környezeti tényezők (leginkább a fény és a hőmérséklet) hirtelen változása váltja ki, amelyet az erre fogékony érzékelőmolekulák fordíta-

nak le biokémiai jelekre. Az érzékelők a jelet ezután a hozzájuk kapcsolt jelátviteli hálózaton keresztül jutattják el a főrezgőkörhöz. A jel az órafehérjék szintjét vagy működését oly módon változtatja meg, hogy az a cirkadián kör egy másik fázisára lesz jellemző. Az óra ezután ettől a ponttól folytatja tovább működését. Ez a beállítás molekulaszintű magyarázata.

A főrezgőkör egyes elemei fényérzékenyek. Ezek azok a belépési pontok, amelyeken keresztül a beállító fényjelek elérik az órát. Így például a fény serkenti a *CCA1/LHY* [53,106] és a *PRR9* [107], valamint az *ELF4* [60] és a *GI* [58] gén kifejeződését, ugyanakkor a *CCA1* mRNS lebomlását [108] és az *LHY* mRNS lefordítását is [106]. A fény az átírás utáni szinteken is befolyásolja az óra működését. A *GI* és a *ZTL* fehérje például csak sötétben bomlik, mivel a kék fény gátolja a bomlásukat [62,109,110].

A növényi cirkadián óra és a fény kapcsolata egyedi. Míg az ecetmuslica, egér és a fonalgomba órájának működése folyamatos fényben, a kékalgáké pedig sötétben leáll, addig a növényeké sötétben és fényben is működik. Folyamatos fényben a kialakuló periódus nagyban függ az alkalmazott fény színösszetételétől és erősségétől, így a fázis beállítása mellett a fény a rezgés sebességének hangolásában is fontos szerepet játszik.

Fényérzékelők

A cirkadián órát a fény nem a fotoszintézis fényelnyelő és energiaátalakító rendszerén, hanem növényjellegzetes érzékelőfehérjéken keresztül szabályozza. Ezek a fehérjék a fényt a hozzájuk kötött jellegzetes festékmolekulák segítségével nyelik el. A festékmolekulák fényelnyelés által kiváltott szerkezetváltozása torzulásra kényszeríti az őket megkötő fehérjéket is, ami elindítja a jelátvitelt. A fényérzékelőket az általuk elnyelt fény hullámhossza alapján három nagy csoportba oszthatjuk [111].

1. A vörös/távoli vörös fényt érzékelő fitokrómok [112,113]
2. Az UV-A és kék tartományban elnyelő kriptokrómok, fototropinok és a *ZTL*-család tagjai [62,114-116]
3. UV-B fényérzékelő molekulák

A cirkadián óra szabályozásában a fitokrómok, a kriptokrómok és a *ZTL*-család szerepe bizonyított [62,117-120], jelenlegi tudásunk szerint a fototropinok ebben nem vesznek részt, az UV-B érzékelők kiléte pedig egyelőre ismeretlen.

A fitokrómok olyan, ~125 kDa molekulásúlyú hisztidin kináz-szerű fehérjék, amelyek amino-végi fehérjeeleméhez kovalensen kötődik egy nyílt láncú tetrapirrol természetű fitokromobilin festékmolekula. A festék fényelnyelési tulajdonságainak köszönhetően a fitokrómoknak két alakjuk van: a vörös fényt elnyelő élettanilag hatástalan Pr ($\lambda_{\max}=660$ nm), valamint a távoli vöröst elnyelő hatásos Pfr ($\lambda_{\max}=730$ nm). A fitokrómok a sejtben Pr alakban képződnek, majd vörös fény elnyelésekor átalakulnak Pfr alakba. Ez az alak távoli vörös fény hatására képes visszakerülni az eredeti Pr állapotba, amelybe egyébként idővel sötétben magától is visszaalakul. A fitokrómok dimer alakban működnek, a párbaállásért felelős elem a molekula közepén helyezkedik el. A jellegzetes fitokrómválaszokat az amino-végi elem fitokrómhiányos növényekben történő túltermelésével vissza lehet állítani, ami arra utal, hogy ez a szakasz felelős a jelátvitelért [121]. A karboxi-végi kinázelem szerepe a fitokrómok működésében még nem kellően tisztázott, feltehetőleg az amino-végi jelátvivő elemhez való hozzáférést gátolja. A fitokrómok sötétben a sejt plazmában helyezkednek el, fény hatására pedig a sejt magba vándorolnak, ahol közvetlenül átírási fehérjékhez kapcsolódva fényfüggő gének kifejeződését szabályozzák [113]. A fitokrómokat lúdfűben öt gén kódolja, a PHYA, -B, -C, -D és -E. Az egyes gének által kódolt fehérjék ugyan hasonlítanak egymásra, a köztük lévő kis különbségek azonban eltérő működéssel ruházzák fel őket. A fitokrómok működésük alapján két csoportba sorolhatók: az I-es csoport tagjai (lúdfűben csak egy van, a PHYA) fényben gyorsan lebomlanak, így legnagyobb mennyiségben a sötétben csírázó (föld alatti) és sötétben nőtt növényekben találhatók meg [122]. E tulajdonságok egyértelműen meghatározzák a PHYA szerepét: elsősorban a csírázás megindításában és nagyon gyenge fényben a zöldülés szabályozásában vesz részt. A II-es csoportot a többi (*PHYB-E*) gén terméke alkotja. Ezek a fehérjék fényben nehezebben bomlanak, ezért a zöld növények uralkodó fitokrómjai. Többek között a zöldülés folyamatát, a szár megnyúlását, az árnyékelkerülést és a virágzást szabályozzák. A II-csoport tagjai képesek egymással heterodimereket képezni, ami eléggé megnehezíti az egyes tagok élettani szerepének vizsgálatát [123].

A kriptokrómokat elsőként növényekben azonosították, majd állatokban is leírták szerepüket a cirkadián óra működésében [124]. Növényekben elsősorban a kék/UV-A-függő élettani folyamatok (pl. zöldülés, virágzás, fényfüggő génkifejeződés) szabályozásában játszanak szerepet. Amino-végükön egy FAD és MTHF festékmolekulát kötő fotoliáz-szerű, karboxi-végükön pedig egy szerin/treonin kináz fehérjeelemet tartal-

maznak [114]. Sötétben a molekula csukott állapotban van, a karboxi-végi elem elfedi az amino-végen található jelátvivő elemet. Kék fény hatására a festékkötő elem szerkezetváltozása következtében a molekula saját magát foszforilálja. Ennek hatására az amino-végi elem szabaddá válik, lehetővé téve a jelátviteli molekulákkal való kölcsönhatást. A kriptokrómok sejtmagi elhelyezkedésűek. Lúdfűben két eltérően viselkedő kriptokrómot azonosítottak, amelyeket a *CRY1* és a *CRY2* gének kódolnak. A két fehérje fényérzékenysége különbözik: kék fény hatására a *CRY2* (foszforilálódás után) ubikvitinálódik és lebomlik, míg a *CRY1* fehérje szintje nem változik [125]. Ennek megfelelően a *CRY2* szerepe gyenge, míg a *CRY1*-é inkább erősebb fényben fontosabb.

Az egyedi fitokróm- és kriptokrómhiányos (*phyA*, *phyB*, *cry1*, *cry2*) illetve ezek kettős, hármas és négyes hiányváltozatainak vizsgálata során sikerült meghatározni, hogy az egyes fényérzékelők milyen mértékben vesznek részt az óra fénybemenetének szabályozásában [118]. A kísérletek során a beállított növényeket folyamatos gyenge fénybe helyezésük után különböző színű fényvillanásokkal kezelték és a levélmozgás ritmusában bekövetkező fáziscúszást mérték. A kísérletek kimutatták, hogy a *PHYA* a távoli vörös- és kék, a *CRY1* és *CRY2* a kék, a *PHYB* pedig a vörös fény érzékelésében vesz részt. A *phyA/phyB* kettős hiányváltozatban csökkent, de nem szűnt meg a vörös fényre adott fázisválasz, ami további fényérzékelők (*PHYC-E*) szerepére utal.

Növényekben a szabadon futó cirkadián ritmus periódusa a fény erősségének növekedésével csökken (2. ábra, C mező) [9]. A fényérzékelők hiánya a fényerősség csökkenéséhez hasonlóan a folyamatos fényben megfigyelhető periódus megnyúlásával jár. Az egyes érzékelők hiánya csak az általuk elnyelt hullámhossztartományban és jellegzetes fényerősségnél mutatkozik meg. Az egyes fényérzékelők periódusra gyakorolt hatását Somers és munkatársai a különböző hiányváltozatokban olyan jelzőgén segítségével vizsgálták, amelyben a cirkadián óra által vezérelt *CAB2* gén promótere a szentjánosbogár luciferáz génjének termelődését szabályozta [117]. A luciferáz reakció eredményeként fény szabadul fel. Ezzel a módszerrel a génkifejeződés cirkadián ritmusa hosszú ideig mérhető élő növényben is. A kutatók kimutatták, hogy a *phyA* növényekben a *CAB2:LUC* jelzőgén kifejeződésének periódusa gyenge vörös és kék fényben a vad háttérüéhez képest hosszabb. A *phyB* növényekben viszont erős vörös fényben figyelhető meg ugyanez a jelenség. A *PHYB* mellett minden bizonnyal további fitokrómok is részt vesznek a vörös fény érzékelésében, mivel a *phyB* növényekben továbbra is észlelhető

a fény periódusrövidítő hatása. Hasonló kísérletben igazolták a CRY1 és CRY2 fehérjék szerepét a kék fény periódushangolásában. Érdekes, hogy a *phyA/phyB/cry1/cry2* négyszeres hiányváltozat továbbra is képes a fényjelek továbbítására a cirkadián óra felé, miközben fényfejlődési képessége gyakorlatilag nincs [126]. Eszerint az említett fényérzékelőkön kívül mások (PHYC-E, ZTL-család) is szabályozzák az óra fénybemenetét.

A ZEITLUPE (ZTL), a LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) és FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) egy újabb fényérzékelő fehérjecsalád tagjai. E fehérjék három jellegzetes fehérjeelemet tartalmaznak: LOV (Light, Oxygen, Voltage), F-box és Kelch. Ezek együttes előfordulása egy molekulán belül sejteti a fehérjék működésének mikéntjét. A LOV elemet eredetileg olyan baktériumfehérjékben azonosították, amelyek különféle környezeti tényezők, pl. fény, redox állapot ill. feszültség érzékelésében vesznek részt. Ilyen elemet tartalmaznak a fototropinok, valamint a fonalagomba cirkadián órafehérjéi, a WC1 és 2 is. A LOV-elem FMN redoxfestéket köt, amelynek külső hatásra bekövetkező elektronszerkezeti változása teszi lehetővé a fent említett környezeti jelek érzékelését [127]. A fototropinok, a WC fehérjék és az FKF1 LOV-elemeinek vizsgálatával sikerült kimutatni, hogy ez a fehérjeelem általános (kék) fényérzékelőként működik [119,128,129]. Az F-box elem olyan fehérjékre jellemző, amelyek az ún. SCF (Skp1-Cul1-F-box) ubikvitin-ligáz együttes részeként más fehérjék irányított lebomlásában működnek közre [130-132]. Az F-box fehérjék a lebontandó célfehérjék felismerését és az ubikvitin-ligázhoz történő kapcsolását végzik biztosítván az ubikvitinnel történő jelölés célzottságát. Lúdfűben megdöbbszentően sok, mintegy 700 F-box tartalmú fehérje található, amelyhez változatos fehérjefelismerő elemek társulnak [133]. A Kelch viszont egy általánosan elterjedt, β -propeller szerkezetű fehérjefelismerő elem, amelynek változékonysága lehetővé teszi a célfehérjék egyedi felismerését [134]. Ez az elemelrendezés azt sugallja, hogy a ZTL család tagjai célfehérjék fényszabályozott lebomlásában vesznek részt.

A ZTL gén elrontása a cirkadián ritmusok periódushosszabbodását okozza [135]. A periódus a fényerősség függvényében erőteljesebben változik, mint a vad háttérű növényben. Ez arra utal, hogy a ZTL a fénybemenet gátlóeleme. A hosszú periódus sötétben is megfigyelhető. Az FKF1 a virágzás nappalhosszúságtól függő szabályozásában kulcs szerepet játszó fehérje. A GIGANTEA (GI) fehérjével együtt a *CONSTANS (CO)* gén

kifejeződését gátló átírási fehérje, a CDF1 lebomlását irányítja [64]. Az *fkf1* változatban emellett a cirkadián ritmusok hullámalakja is megváltozik, tehát ez a fehérje is hozzájárul a megfelelő óraműködéshez [136]. Az LKP2 túltermelése a ritmusok megszűnését okozza, hiányváltozatának hatása egyelőre nem ismert [120]. Az LKP2 fehérjéről kimutatták, hogy élesztőben (a ZTL-hoz hasonlóan) összekapcsolódik a TOC1 és PRR5 fehérjével is, bár ezen kölcsönhatások élettani jelentőségéről még nem sokat tudunk [137]. A ZTL-család egyes fehérjéi önmagukkal illetve egymással dimert képezve működnek [137]. Mivel a ZTL sem önmagával, sem az FKF1-gyel nem tud párbaállni, csak az LKP2-vel, ezért a ZTL működésének (a TOC1 és PRR5 lebontása) elvileg erősen LKP2-függőnek kell lennie.

A fénybemenet és a főrezgőkör közti kölcsönhatást szemlélteti az a tény, hogy a fitokróm és kriptokróm gének (*PHYA*, *-B*, *-D*, *-E*; *CRY1*, *-2*) kifejeződése cirkadián mintázatú [138]. Ez lehet az alapja annak a korábban már említett jelenségnek, hogy az óra a saját fényérzékenységét csak bizonyos időszakokra zsilipeli (lásd: fázisválasz görbe, 2. ábra, B mező).

Az eddig leírt kísérleti eredményeket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a növényi cirkadián óra fénybemenetében az egyes fényérzékelők a következő módon jutnak szerephez: a *PHYA*, *CRY1*, *CRY2*, *ZTL*, *LKP2* egyaránt részt vesznek a kék fénybemenetben, míg a távoli vörös fény érzékelésére egyedül a *PHYA* képes. A *PHYA*, *PHYB*, *PHYD* és *PHYE* egymást kiegészítve juttatja el a vörös fény hatásait az órához [139]. A fényérzékelők egymás működését is befolyásolják. Leírták például, hogy a *PHYA* megfelelő működéséhez vörös és kék fényben a *CRY1* [139], a *CRY2* fehér fényben való működéséhez pedig a *PHYB* jelenléte szükséges [140]. Egyelőre csak mesterséges rendszerekben (élesztő kéthibrid és kémcső) mutatták ki a kölcsönhatást a *ZTL*, valamint a *CRY1* és a *PHYB* karboxi-végi fehérjeeleme között [141]. Ha ilyen kölcsönhatás valóban létezik az alapvetően kékfény-érzékelő *ZTL* és a vörösfény-érzékelő *PHYB* között, akkor az magyarázat lehet a *ZTL*-hiányos növények órájának vörös fényben megfigyelt viselkedésére.

Jelátviteli utak

Génkölcsönhatásokat feltérképező kísérletekből sikerült néhány olyan elemet azonosítani, amelyek a fényérzékelők és a központi óraelemek közé helyezhetők. A fényfejlődésben sérült *constitutive photomorphogenesis 1 (cop1)* és *de-etiolated 1 (det1)* válto-

zatokban a vizsgált ritmusok periódusa állandó sötétben rövidebb [142]. Hatásuk a fényfejlődésre és a génkifejeződés genomszintű mintázatára nagyon hasonló, ezért feltételezhetően ugyanabban a szabályozási egységben (E3 ubikvitin-ligáz együttes) működnek. Nemrég mutatták ki, hogy a COP1 az ELF3 fehérjével együtt felelős a GI fehérje ubikvitinálásáért és lebomlásáért, és ezt a folyamatot a kék fény a CRY2-n keresztül gátolja [109]. A DET1 pontos szerepét az órában nem ismerjük, csak annyit figyeltek meg, hogy hiányában az LHY fehérje lebomlása felgyorsul [95]. Ez a hatás fényfüggetlen, így a DET1 nem is a fénybemenet, sokkal inkább a központi óramű része lehet. A FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL 1 és 3 (FHY1 és FHY3) hiányában távoli vörös fényvel nem állítható át megfelelően a fázis [118,143], így ezen fehérjék is nélkülözhetetlenek az óra megfelelő működéséhez. Az FHY3 ezentúl részt vesz a beállító fényjelek zsilipelésében is [144].

A kriptokrómok eredendően a sejtmagban találhatók [145], a fitokrómok pedig fényfüggő módon vándorolnak a sejtmagba [113]. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a fénybemeneti folyamatok korai lépései a sejtmagban játszódnak le, ahol a fényérzékelők közvetlenül, vagy jelátvivő molekulákon keresztül szabályozzák a génkifejeződést. A fitokrómok esetében a közvetlen kapcsolat különféle átírási fehérjékkel régóta ismert. Az elsőként azonosított PHYB-vel kölcsönható fehérje a PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) volt. Később számos rokon fehérjét azonosítottak, amelyek mindegyike kölcsönhat a fitokrómokkal, élettani szerepük azonban sokféle [146-148]. A PIF3 egy bHLH átírási fehérje, amely a bekapcsolt fitokrómhoz tapadva kötődik számos fény-szabályozott gén promóterében található ún. G-box mintázathoz [149]. Ilyen G-box mintázat található a *CCA1* és *LHY* óragének promóterében is, amelyekhez a PIF3 szintén képes kapcsolódni. PIF3-hiányos növényekben az *LHY* és *CCA1* gének fényválasza erősen csökken, ami arra utal, hogy a PIF3 fehérje szerepet játszik a két óragén kifejeződésének fény szabályozásában. Ez a megfigyelés azt sugallta, hogy az óra fázisának beállítása ezen az úton, a PIF3 közreműködésével történik. Kiderült azonban, hogy a PIF3 egyáltalán nem vesz részt a cirkadián óra beállításában, szerepe a fényfejlődési folyamatok szabályozására korlátozódik [150]. Ez azt is jelenti, hogy a *CCA1/LHY* mRNS szintjének nem sok köze van a beállításhoz, az feltehetően átírás utáni folyamatokhoz köthető. Az *LHY* mRNS lefordítását a fény serkenti ugyan, de ennek sincs köze a beállításhoz, mivel az *LHY*-hiányos növényeket fényvel gond nélkül be lehet állítani [106].

A kriptokrómok és az átírás közötti jelátviteli út is rövidnek tűnik. Egy új megfigyelés magyarázatot adhat a kriptokrómok órára gyakorolt hatására. Eszerint a COP1 az ELF3 közreműködésével irányítja a GI lebomlását, ezt a folyamatot azonban kék fényben a CRY2 gátolja [109].

A kimeneti oldal elemei

Megdöbbenő módon nem csak egyes átírási fehérjék génjei, hanem az alap átírási fehérjeegyüttes összes elemét – beleértve az RNS polimeráz II-t és a TATA-kötő fehérjét is – kódoló gének is cirkadián szabályozás alatt állnak [151]. Nem meglepő ezért, hogy a lúdfű génállományának 89%-a mutat valamilyen napszakos ritmust [21], és legalább 30%-uk állandó körülmények között is hullámzik. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy alapvetően minden gén számára adott a cirkadián kifejeződés lehetősége, de egyes esetekben, ahol a cirkadián szabályozás nem kívánatos, utólagosan felülíródik (pl. kromatinmódosítás következtében, vagy úgy, hogy több, ellentétes fázisban kifejeződő átírási fehérje is hatással van a célgén kifejeződésére, hatásuk összegződik).

Hogyan tudja ugyanaz az óra a sok száz, eltérő fázisban rezgő gén kifejeződését egyszerre szabályozni? Számos olyan promóterelemet azonosítottak, amelyek egy bizonyos fázisú kifejeződésért felelősek. Az ún. esti elem (EE) az esti gének többségében megtalálható és esti kifejeződést képes biztosítani egy mesterséges jelzőgénnek [22,152]. Az esti elem jelen van az olyan esti óragének promóterében, mint a *TOC1*, *GI*, és a *LUX*. Ehhez az elemhez kötődik a reggeli kifejeződésű *CCA1* és *LHY* átírási fehérje, és gátolja az átírást. Az esti elemen kívül azonosítottak egy reggeli elemet (ME), amely a reggeli kifejeződési csúccsal rendelkező gének promóterében található, valamint egy ún. protein box elemet is (PBX), amely az éjszakai csúccsal hullámzó génekre jellemző [21]. Ezek az elemek is képesek egy jelzőgénnek megfelelő cirkadián kifejeződést biztosítani. Ezen elemekhez kötődő átírási fehérjék egyelőre nem ismertek.

A növényi cirkadián órával kapcsolatban is azonosítottak a főrezgőkörhöz csatlakozó, de arra vissza nem ható alrezgőköröket. Ilyen például a *CCR2* gén és fehérje [153], valamint az *EARLY PHYTOCHROME RESPONSE 1 (EPR1)* gén és fehérje közötti önszabályozó negatív visszacsatolás [154]. Ezek elrontása vagy megzavarása csak a saját kifejeződésükre van hatással, a főrezgőkörre nincs. Ezzel ellentétben két érdekes példát lehet hozni a kimeneti elemek órára való visszahatásának bemutatására. A

CHLOROPLAST RNA BINDING (CRB) fehérje egy zöld színtestben működő RNS-kötő fehérje, amelynek elrontása érdekes módon megváltoztatja a központi óragének kifejeződési mintázatát [155]. Lehetséges, hogy a színtest állapota egy fontos szabályozótényező az óra számára. A másik példa a sejt plazma Ca^{2+} -szintjének időbeli változása, amely cirkadián szabályozás alatt áll. Ugyanakkor azt is bebizonyították, hogy a Ca^{2+} -szint megzavarása visszahat az óra működésére [156]. Egyelőre nem ismert, hogy a Ca^{2+} milyen órafehérjék működését befolyásolja. Legvalószínűbb, hogy Ca^{2+} -függő fehérjekinázokról van szó.

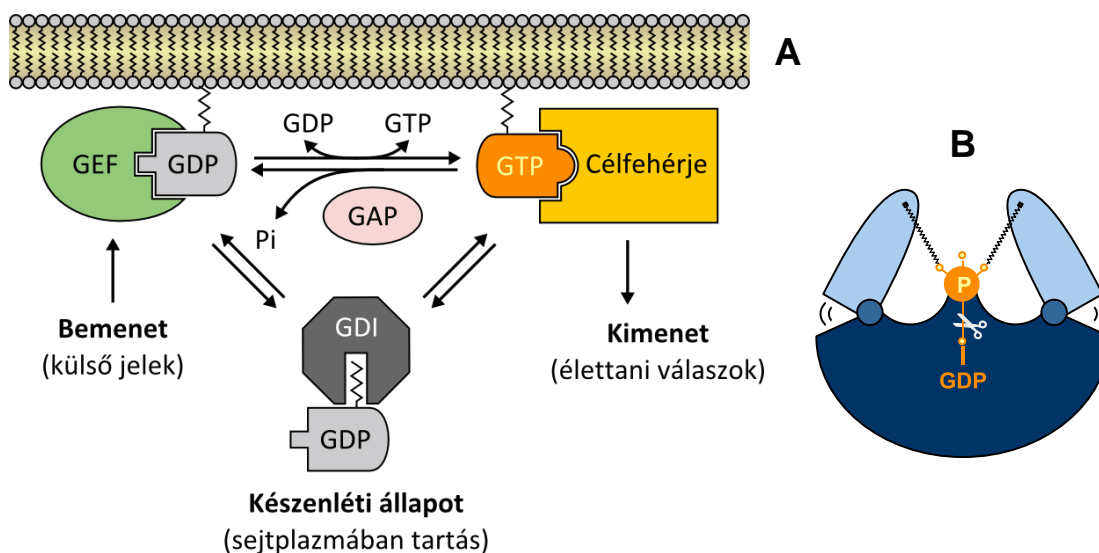
A kis GTP-kötő fehérjék jellemzői

A GTP-ázok kétállású molekuláris kapcsolók

A kis GTPázok olyan egyalegységes 20–40 kDa molekulású fehérjék, amelyek guanozin-trifoszfát (GTP) kötésére képesek. Ezeket a fehérjéket az elsőként leírt családtagról RAS-szerű fehérjéknek is nevezik és a háromalegységes G-fehérjékkel, valamint a lefordítás folyamatát szabályozó GTP-kötő fehérjékkel együtt alkotják a G-fehérjék ún. TRAFAC családját [157,158]. Mindnyájan GTPázok, azonban a kis GTPázoknak kissé eltérő a szerkezetük és a működési módjuk. Növényekben az állatoktól eltérően a háromalegységes GTPáz rendszer nagyon csökevényes, mindössze egy α -, egy β -, és két γ -alegység, valamint három G-fehérjéhez kapcsolt érzékelő génje található meg a lúdfű génállományában [159].

A G-fehérjék bekapcsolt állapotukban GTP-t kötnek, kikapcsoltban pedig GDP-t. Külső jel hatására egy nukleotidcserélő segédfehérje (GEF) a GDP leválasztásával és egy új GTP molekula feltöltésével kapcsolja be a GTPázot. A nukleotidcsere következtében a GTPáz szerkezeti átrendeződésen megy keresztül, aminek eredményeképp egy vagy több célfehérjével képes kölcsönhatni. Olyan segédfehérjék is vannak, amelyek a nukleotidcserét nem serkentik, hanem gátolják. Ezek a nukleotidrogzítók (GDI, Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitors). A GTP-kötött alak rendszerint gyenge GTP-bontó képességgel rendelkezik, ami lehetővé teszi a kikapcsolt, GDP-kötött állapotba való visszaalakulást. A sejten belül a GTP-bontást segédfehérjék (GAP-ok) gyorsítják [160-163]. A két különböző alak nem csak eltérő fehérjékkel hat kölcsön, hanem sokszor a sejten belül eltérő helyeken is található (6. ábra). Génhibák eredményeként a

fehérjék elveszíthetik átkapcsolhatóságukat, és így GDP- vagy GTP-kötő alakban rögzülve különféle élettani rendellenességeket okozhatnak (pl. rákos sejtburjánzást).



6. ábra. A kis GTPázok működésének vázlata

(A) A kis GTPázok két állapot között ingáznak. Kikapcsolt állapotukban GDP-t kötnek, és rendszerint a sejtplazmában helyezkednek el, mivel a nukleotidrógzító segédfehérjék (GDI-k) letakarván a hozzájuk kovalensen kötött lipidhorgonyokat megakadályozzák azok sejthátyához kötődését. A GDP-kötött fehérjét nukleotidcserélő segédfehérjék (GEF-ek) is képesek felismerni. A GEF-ek külső jel hatására a fehérjéhez kötött GDP-t GTP-re cserélik, ezáltal bekapcsolják a GTPázokat. A lipidhorgony a bekapcsolás során felszabadulván lehetővé teszi a sejthártyához kapcsolódást. A GTP-kötött molekulák megváltozott felületükkel képesek a jelátviteli láncban őket követő különféle célfehérjékhez tapadni és azokat bekapcsolni. A GTP-kötött fehérje gyenge GTP-bontó képessége folytán egy idő után képes magától is visszaalakulni GDP-kötött állapotba, a sejten belül azonban ezt a folyamatot GTP-bontást serkentő segédfehérjék gyorsítják (GAP-ok).

(B) A G-fehérjék működését egy rókacsapdáéhoz lehet hasonlítani. A felajzott állapotot a GTP rögzíti. A γ -foszfát lehasításakor a feszített karok visszaugranak az alapállapotba.

A kis GTPázok jelátviteli hálózatát tovább bonyolítja, hogy egy G-fehérjének több különböző GEF-je, GAP-ja és célfehérjéje is lehet. A különféle segéd- és célfehérjékkel szóba jöhető kölcsönhatások közötti válogatást olyan fehérjék könnyítik meg, amelyek összeszerelő állványként szolgálnak a kölcsönhatók számára [164].

A kis GTPázok változatos sejt folyamatokat szabályoznak, így például a növekedést, osztódást, sejt váz átrendeződését, sejtmozgást és a sejten belüli anyagmozgatást. A kis

GTPázokat öt nagyobb, és több kisebb családba sorolhatjuk aminosavsorrendjük alapján. Az öt nagyobb család a RAS, RHO, RAB, ARF és a RAN [157,165]. Ezeken kívül egyéb kisebb csoportok is vannak, mint pl. a RGK (RAD/GEM/KIR), MIRO vagy az ún. cirkulárisan permutált GTPázok. Egyre több olyan GTPázról írnak le, amelyek sem szerkezetükben, sem működésükben nem hasonlítanak a „hagyományos” kis GTPázokra (a RAS-nagycsalád régóta ismert tagjaira) [158,166]. A RAB, ARF és a RAN családok minden sejtmagvas élőlényben megtalálhatók. Az ARF-ok a sejten belüli hártýarendszer működésében a hólyagocskák lefűződését, míg az egyes RAB-ok a különféle hólyagocskák célzott mozgását, főleg azok megfelelő helyre történő beolvadását szabályozzák [167]. A RAN-ok az RNS-ek és fehérjék sejtmag és sejtplazma közötti forgalmát irányítják. A RAS és RHO családba tartozó GTPázok az előbbiekkal ellentétben kifejezetten jelátviteli hálózatok elemeiként működnek. A RAS GTPázok külső serkentő jelek hatására a MAPK kinázlánc bekapcsolásán keresztül a sejtosztódást, az utódsejtek működésbeli elkülönülését, sejtalakot, apoptózist, különféle stresszválaszokat szabályozó gének kifejeződését indítja be. A RAS-ok működéséhez elengedhetetlen a sejt hártýához való kötődésük [168]. A RHO (RHO, RAC, CDC42) GTPázokat először a sejt váz átrendezésével és ehhez kapcsolódóan a sejtirányultság meghatározásával, sejtmozgással, sejtalakokkal kapcsolatban írták le. Később kimutatták szerepüket a génkifejeződés, sejt falépítés, H₂O₂-termelés, sejten belüli anyagmozgatás, sejtosztódás szabályozásában is [169].

A kis GTP-kötő fehérjék általános szerkezeti sajátosságai

A G-fehérjék legfontosabb, a GTP-kötés és -bontás alapvető műveleteit végző ~20 kD molekulásúlyú fehérjeelemének (G-elem) szerkezeti felépítése és működési elve eléggé egyöntetű. A G-elem jellegzetes fehérjemintázatokat tartalmaz, amelyek megléte a nukleotidkötés és bontás szempontjából elengedhetetlen. Ezeket G1–G5 mintázatoknak hívjuk. A GTP-kötés szempontjából legmeghatározóbbak azok a kölcsönhatások, amelyek a fehérje aminosavdalláncai és a guanin bázis, valamint a GTP β- és γ-foszfát csoportjai között jönnek létre [160,162]. A GTPázok kizárólagos guanin nukleotidkötése annak köszönhető, hogy a G4 mintázat (átlagos aminosavsorrendje [N/T]KXD) aszparaginsavjának, valamint a G5 mintázat ([C/S]A[K/L/T]) kulcsfontosságú alaninjának nukleotid-bázisokkal kialakítható kapcsolata térbelileg nem teszi lehetővé az adenin-bázis kötődését, csak a guaninét. A foszfátcsoportok felismerésében a G1

mintázat – elterjedtebb nevén P-hurok (GXXXXGK[T/S]) – játszik központi szerepet. Ez a glicingazdag mintázat szinte minden NTP-kötő fehérjében megtalálható. A G2 mintázat treonin oldallánca a Mg^{2+} -ion és a foszfátcsoportok kötéséhez szükséges. A G3 mintázat (DXXG) szerepe kettős: szintén részt vesz a nukleotid rögzítésében, másrészt közvetlen közelében található a γ -foszfát lehasításában nélkülözhetetlen katalitikus glutamin (Q) oldallánc. A G mintázatok környezete az adott GTPáz családra jellemző.

A nukleotidkötés és bontás nyomán a G-fehérjék alakja megváltozik, de ez a változás nem egyformán érinti az egész molekulát. A kis GTPázokban két olyan fehérjerészlet van, amely jelentős mértékben torzul, ezeket I-es és II-es csuklónak („switch”) hívjuk. Mivel a kikapcsolt és bekapcsolt alak között ezeknél a szakaszoknál van a legnagyobb különbség, a kizárólagosan az egyik alakot felismerő fehérjék (pl. a cél- és segédfehérjék) ide kötődnek.

Maga a G-elem is, de leginkább az azon kívüli fehérjerészek különféle toldalékokat tartalmazhatnak, amelyek az egyes GTPázok működésbeli sokféleségéhez járulnak hozzá. A G-elemben található RHO-hurok (10–12 aminosav) például csak a RHO GTPázokra jellemző, szerepe a célfehérjék felismerésében kulcsfontosságú. A RAN-ok karboxi végükön erősen bázikus toldalékot tartalmaznak, amelynek a sejtmagi elhelyezkedésben van jelentősége. Általánosságban elmondható, hogy míg a kapcsolgathatóságot biztosító G-elem aminosavsorrendje és szerkezete megőrződött, az ezen elemhez csatlakozó toldalékoké nagy mértékben különbözik.

A kis GTPázok működését erőteljesen befolyásolják a másodlagos fehérjemódosítók. Így például a sejthártyához ill. a segédfehérjékhez való kapcsolódáshoz sokszor kovalens lipidmódosítás szükséges. Ehhez a fehérjén megfelelő helyzetben levő, módosítható aminosavoldallánca (pl. cisztein) ill. a módosítóenzim kapcsolódását lehetővé tevő fehérjemintázatra van szükség. A RAB, RAS, és RHO GTPázok a karboxi végük közelében, egy CaaX mintázatban található cisztein oldalláncon prenilálódnak. Az ARF-ok amino végi glicinjének α -amino-csoportjára mirisztoil-csoport kerül, a RAN-ok viszont nem esnek át lipidmódosításon [157]. Egyéb módosítások (fehérjedarabolás, foszforilálás, ADP-ribozilálás, nitrozilálás) is ismeretesek, de ezek működés-módosító szerepe még nem kellőképpen tisztázott.

Növényjellegzetes vonások

Növényekben a fent említett kis GTPáz-féleségek közül a RAS és a RHO család teljesen hiányzik, szerepüket más növényjellegzetes molekulák töltik be. A RHO-khoz kapcsolódó feladatokat például az ún. ROP (RHO of Plants) molekulák végzik. Növényekben ez a kis GTPáz család szabályozza a legváltozatosabb élettani folyamatokat. Ezek közül részletesebben a sejtváztrendeződésben játszott szerepüket ismerik. Kiváló növényi modellrendszer a sejtváztrendeződés vizsgálatára a levél bórszöveti sejtjeinek jellegzetes karéjos alakjának kialakulása [170], a gyökérszőrök fejlődése, valamint a pollentömlő beporzást követő irányított megnyúlása. Mivel a ROP-ok szerkezetileg különböznek állati RHO-któl, nem meglepő, hogy egyes RHO segédfehérjék megfelelői sem találhatóak meg növényekben. Így például hiányoznak a DH-PH-elemet tartalmazó RHOGEF molekulák, helyettük PRONE-elemet tartalmazó növényjellegzetes ROPGEF-ek végzik a nukleotidcserét [171]. A ROPGAP-ok is egyediek, szerkezeti és működésbeli szempontból egyaránt [172]. A RHO molekulákat állatokban a sejthártyán átnyúló, sejten kívüli jeleket érzékelő tirozin-kinázok kapcsolják be. Növényekben eddig még egyetlen tirozin-kinázt sem írtak le, pedig a tirozin-foszforilálás megléte bizonyított [173]. A ROP-ok egy része feltehetőleg a tirozin-kináz érzékelőkhöz hasonló elemelrendezésű, de eltérő szerkezetű szerin/treonin kinázok által szabályozódik: paradicsomban az egyik ilyen kináz kölcsönhat a ROPGEF család egyik tagjával [174].

A sejtosztódást állatokban a RAS és a RHO családba tartozó GTPázok szabályozzák. Ezeket a fentebb említett sejthártyán átnyúló érzékelő kinázok hozzák működésbe. Tőlük a jel a MAP-kinázláncolatán keresztül terjed tovább egészen a célmolekuláig. A MAP-kinázláncolat bekapcsolódásának lehet rövid távú és tartós következménye is. Előbbire példa a Ca^{2+} -áramok megváltozása és a H_2O_2 -termelődés, utóbbira pedig a génkifejeződés módosulása. Növényekben a MAP-kináz rendszer, amelyet a különféle stressztényezők illetve hormonális jelek hoznak működésbe, igen fejlett [175,176]. Mivel azonban a RAS-jellegű molekulák hiányoznak, és nem sikerült eddig biokémiai kapcsolatot találni a ROP-ok és a MAP-kinázok között sem, lehetséges, hogy az érzékelők és a MAP-kinázok közötti közvetítő szerepet is eddig ismeretlen, növényjellegzetes molekulák töltik be.

CÉLKITŰZÉSEK

A lúdfű teljes génállományának közzététele után nyilvánvalóvá vált, hogy az egyéb élőlényekben azonosított óragéneknek nincsenek növényi megfelelőik. Ez annyira nem meglepő, hisz a cianobaktériumok és a fonalas gombák órája is egyedi felépítésű, különbözik az összes többi élőlényétől. A növényi cirkadián óra megismerése érdekében végzett kutatások jelentős eredményei ellenére ma még messze vagyunk attól, hogy elmondhassuk: ismerjük a növényi cirkadián óra felépítését. Célunk ezért az volt, hogy új cirkadián óraelemeket azonosítsunk a növényi modellszervezetként szolgáló lúdfűben, majd ezeket szerepük és más elemekhez fűződő kapcsolatuk tisztázása után megkíséreljük elhelyezni a cirkadián óra működését leíró modellben.

Ehhez a *CAB2:LUC* jelzőgént hordozó növény génállományában véletlenszerű nukleotidcseréket hoztunk létre. Az így előállított változatok között olyanokat kerestünk, amelyekben megváltozott a jelzőgén kifejeződésének cirkadián mintázata. Sikertült is azonosítanunk egy eddig ismeretlen óragént, amelyet a növény cirkadián viselkedése után *LIP1*-nek (*LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1*) neveztünk el. A *LIP1* működésének megismerése érdekében a következő főbb célokat tűztük ki:

1. A *lip1-1* növény cirkadián órájának jellemzése
2. A *lip1-1* génváltozat által érintett élettani folyamatok körülhatárolása
3. A *LIP1* gén azonosítása
4. A *LIP1* gén kifejeződésének jellemzése
5. A *LIP1* fehérje működésének vizsgálata
6. A *LIP1*-függő jelátviteli utak feltérképezése

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti anyagok és élőlények

Tápoldatok, táptalajok, antibiotikumok

Bakteriális táptalajok

LB (Luria-Bertani Medium) (pH=7.0): 1% tripton (Reanal), 0.5% élesztő kivonat (Reanal), 1% NaCl (Reanal); táptalajhoz: 1.5% agar (Reanal)

RM (Rich Medium) (pH=7.0): 1% tripton, 0.5% élesztő kivonat, 0.5% NaCl, 0.2% glükóz (Reanal)

YEB (pH=7.0): 0.5% marhahús-kivonat (Difco), 0.1% élesztő kivonat, 0.5% Bacto[®]-pepton (Difco), 0.5% szaharóz (Reanal), 2 mM MgSO₄ (csíramentesre szűrve, autoklávozás után hozzáadva; Sigma); táptalajhoz: 1.5% Bacto[®]-agar (Difco)

Élesztő táptalajok

YPAD (pH=7.0) 1% élesztő kivonat, 2% Bacto[®]-pepton, 2% glükóz, 0.01% adenin hemiszulfát (Sigma); táptalajhoz: 1.5% Bacto[®]-agar

CSM (Complete Supplement Mixture) (pH=7.0): 2% glükóz, 0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco), 0.64 g/l Leu⁻/Trp⁻ CSM (Qbiogene) vagy 0.63 g/l Ade⁻/Leu⁻/Trp⁻ CSM (Qbiogene); táptalajhoz: 1.5% Bacto[®]-agar

Növényi táptalajok

MS3 (Murashige-Skoog Medium) [177] (pH=5.6): 4.3 g/l MS sókeverék (Sigma), 3% szaharóz, 1% agar (Difco)

AM (Arabidopsis Medium) (pH=5.6): 2.16 g/l MS por, 1% szaharóz, 0.2% phytigel (Sigma)

Munkánk során az alábbi antibiotikumokat használtuk, melyeket csíramentesre szűrve a tápoldatba ill. táptalajba autoklávozás (121 °C, 25 perc) és 60 °C-ra hűtés után kevertünk.

Amire hat	Antibiotikum	Végkoncentráció
<i>Escherichia coli</i>	Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
	Kanamicin (Km)	50 µg/ml
	Tetraciklin (Tet)	100 µg/ml
	Kloramfenikol (Cm)	170 µg/ml
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Karbenicillin (Cb)	100 µg/ml
	Kanamicin (Km)	50 µg/ml
	Rifampicin (Rif)	25 µg/ml
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Higromicin (Hyg)	15 µg/ml
	Klaforán (Cf)*	200 µg/ml
	BASTA®**	20 000×

1. táblázat. Az alkalmazott antibiotikumok listája

* A klaforánt nem válogatásra használtuk AM és MS táptalajokban, hanem azért, hogy csökkentjük a baktériumok általi fertőződés esélyét.

** A BASTA® nem antibiotikum, hanem gyomirtó. Az AgrEvo (Bad Soden, Németország) cég által forgalmazott oldatot csíramentesre szűrve a fenti hígításban használtuk AM táptalajban.

Plazmidok leírása

Baktérium plazmidok

A génépítéshez általában pBluescript® II KS/SK plazmidot (Stratagene) használtunk, vagy egyből a célplazmidban raktuk össze a géndarabokat.

Idegen gének baktériumban történő kifejezésére a pMAL c2x plazmid (New England Biolabs) házilag módosított változatát használtuk. A módosított változatban a kifejezni kívánt fehérje karboxi-végére 6 db hisztidin aminosav is kerül, így az amilóz-oszlopon történő tisztítás után egy Ni-agaróz oszlopos tisztítással a teljes hosszúságú fehérjét kapjuk meg (az amino-végi MBP előtte akár le is vágható Xa faktorral történő

emésztéssel). Az idegen gént az izopropil- β -D-galakto-piranozidra (IPTG) bekapcsolódó *tac* promóter hajtja meg.

Élesztő kétgazdás plazmidok

Az élesztő kéthibrid kísérletekben a vizsgálandó fehérjék kódoló részeit pGADT7 és pGBKT7 (Clontech) kétgazdás plazmidokba klónoztuk. A pGADT7 segítségével a baktériumból származó GAL4 átírási fehérje átírást serkentő eleméhez forrasztott fehérjéket tudunk magas szinten kifejeztetni élesztőben. A pGBKT7 alkalmazásával viszont a GAL4 DNS-kötő eleméhez toldhatjuk a fehérjéket. Az élesztősejten belül a GAL4 két eleme működőképes átírási fehérjévé képes összeállni, ha a két darabhoz forrasztott fehérjék kölcsönhatnak [178]. A pGADT7 a plazmidon kódolt *LEU2* gén segítségével a leucin tápanyagfüggőséget, míg a pGBKT7 *TRP1* génje révén a triptofán-függőséget hidalja át. A két plazmid együttes jelenlétét a sejtekben ezért leucin- és triptofánhiányos (L^-W^-) táptalajon tudjuk biztosítani. Az élesztő kéthibrid szűréshez használt cDNS könyvtárat pACT2-ben (szintén *LEU2* gént hordoz) hozták létre. Ez a plazmid baktériumban ampicillin-ellenállóságot okoz, ezért a kéthibrid szűrés után a vele párban levő pGBKT7 plazmidtól (amely kanamicin-ellenállóságot képes biztosítani) könnyen megtisztítható.

Növénybe juttatandó plazmidok

A lúdfű genetikai átalakítására használt pPCV (Plant Cloning Vector) plazmidot Dr. Koncz Csaba csoportja fejlesztette ki [179]. Ennek BASTA[®]-ellenállóságot biztosító változatát (pPCVB) Dr. Szekeres Miklós készítette el. Ezek a plazmidok az *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plazmidján alapulnak. A jobb és bal oldali határelemek közötti DNS szakaszt (T-DNS) az *Agrobacterium* képes átjuttatni növényi sejtekbe, ahol azok véletlenszerűen beépülnek a növény génállományába. A pPCV plazmidok T-DNS-ének egyik része olyan elemeket tartalmaz, amelyek lehetővé teszik a plazmid szaporodását *Escherichia coli* sejtekben (ORI_{ColE1} másolási kezdőpont és az ampicillin/karbenicillin ellenállóságot okozó β -laktamáz gén), míg a másik részen a plazmidot hordozó növények válogatását lehetővé tevő, a higromicin ellenállóságért felelős neomicin-foszfotranszferáz gént (pPCVH), vagy a BASTA[®] ellenállóságért felelős foszfinotricin-acetiltranszferáz gént (pPCVB) helyezték el. A plazmid T-DNS részébe beépítettek egy, a génépítést megkönnyítő, egyedi restriktációs endonukleáz hasítóhelyeket hordozó szakaszt is.

A növényekben átmeneti fehérjetermelésre használt pRT104 [180] alapú plazmidokat Dr. Bakó Lászlótól kaptuk (pRT104 3×HA és 3×Myc). Ezekkel olyan fehérjéket lehet átmenetileg magas szinten kifejeztetni növényi sejtekben, amelyek amino-végén 3×HA vagy 3×Myc horgony van. Az ezekre kifejlesztett ellenanyagok segítségével fehérjeegyütteseket lehet tisztítani, illetve ki lehet őket mutatni az együttesben.

Felhasznált baktérium- és élesztőtörzsek

Génebeszeti műveletekhez az *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsét használtuk (Stratagene). A növénybe juttatandó plazmidokat először *Escherichia coli* S17-1 törzsébe vittük be. Ez a törzs képes a plazmidot átadni az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzsének [181], amely azután a növénybe viszi be a határelemek közötti idegen DNS-t (T-DNS).

Idegen fehérjék kifejezésére az *Escherichia coli* BL21 alapú Rosetta™ (Novagen) törzsét használtuk, mivel ez a törzs hordozza a pRARE plazmidot, amely ritka antikodonokat kódoló tRNS géneket tartalmaz. Ennek segítségével a növényre jellemző kodonyakorúságú mRNS-ek sokkal nagyobb hatékonysággal fordítódnak le fehérjévé a baktériumban. A törzs előnye továbbá, hogy a Lon és az OmpT fehérjebontó enzimek el vannak rontva benne, ezáltal az idegen fehérjék nem bomlanak le a sejtben belül, valamint hogy a *LacY* gén elrontásának köszönhetően a *tac* promóter működése finoman szabályozható IPTG-vel.

Az élesztő kéthibrid vizsgálatokhoz a *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A törzsét [182] használtuk. Ebben a törzsben három különböző eredetű, de egyaránt GAL4 fehérje által szabályozott promóterrel meghajtott jelzőgén található. Ebből kettő (*HIS3*, *ADE2*) a PJ69-4A tápanyagfüggését (hisztidin ill. adenin) képes áthidalni, ha a vizsgált fehérjék kölcsönhatása következtében a kifejeződésük beindul. A harmadik jelzőgén a *LacZ*. Ennek terméke, a β -galaktozidáz a színtelen oNPG kiindulási anyagból sárga színű oldható végterméket (vagy a színtelen 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktopiranozidból [X-gal] oldhatatlan kék színű csapadékot) képes létrehozni, így nincs szükség hiányos táptalajra a kölcsönhatások vizsgálatához.

Faj	Törzs	Genetikai jellemzők
<i>Escherichia coli</i>	XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rk ⁻ ,mk ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]
	S17-1	F ⁻ <i>recA pro hsdR</i> RP4-2 Tc ^r ::Mu Tn ^r ::Tn7 (Tmp ^R , Spc ^R , Str ^R)
	Rosetta™	<i>lon ompT lacY</i> pRARE (Cm ^R)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101	<i>rpoH⁺ hrcA⁺</i> pMP90RK (Gm ^R , Km ^R , Rif ^R)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>

2. táblázat. A munka során felhasznált baktérium- és élesztőtörzsek jellemzői.

Növények

A *CAB2:LUC* jelzőgént egy példányban homozigóta formában hordozó C24 ökotípusú lúdfű vonal Dr. Andrew J. Millar laboratóriumában készült [183]. A kísérletekben alkalmazott további jelzőgéneket *Agrobacterium* segítségével juttattuk be a megfelelő növényekbe (lásd: 60. oldal). A jelzőgének kifejeződését mindegyik háttér esetében legalább 5 független vonalban vizsgáltuk meg. A vizsgált jelzőgén kifejeződése minden azonos háttérű növényi vonalban hasonló mintázatot mutatott.

Genetikai térképezés

Megváltozott jellegek lúdfűben történő keresésének tervezését, a hibás gének molekuláris genetikai térképezésének menetét, elvét és az alkalmazható módszereknek közérthető összefoglalását néhány nagyszerű közleményben találhatjuk meg [184-186].

Genetikai elváltozások létrehozása

Nukleotidcserék létrehozásához a *CAB2:LUC* jelzőgént hordozó C24 ökotípusú növények magjait Dr. Andrew J. Millar laboratóriumában etil-metil-szulfonáttal (EMS) kezelték [183]. Az EMS a DNS-ben G→A (ill. C→T) cserét eredményez [187]. A kezelést

követően a magokból kinövő növényeket (M_1 nemzedék) csoportosították, és hagyták önbeporzódni.

Elrontott cirkadián órájú növények keresése

Az így létrejövő M_2 nemzedék csíranövényeiben a luciferáz enzim működését folyamatos sötétben 36 órán át mértük (ennek módját lásd: 61. oldal), miután a növényeket 12 óra fény/12 óra sötét váltásokkal beállítottuk. Ez idő alatt a *CAB2:LUC* jelzőgén kifejeződésében megnyilvánuló cirkadián mintázat első csúcsa figyelhető csak meg, mivel fény hiányában a *CAB2* gén kifejeződése gyorsan lecseng [188,189]. Noha ilyen körülmények között nincs lehetőség a periódus, csak a fázis mérésére, mégis ezt a módszert választottuk a növények első körben történő válogatására. Így ugyanis egyszerre sokkal több lemezt tudunk lemérni a luminométerben, hiszen nincs szükség az oldalról érkező fényt a lemezek felszínére tükröző segédlemezek alkalmazására.

Az ebből a szűrésből kiválogatott eltérő lumineszcencia-mintázatot mutató változatok utódait (M_3 nemzedék) folyamatos sötétben újrazvizsgáltuk, hogy a tulajdonság öröklődik-e. A megmaradt jelölteket ezután az előbbieken leírtakhoz hasonlóan, de folyamatos vörös fényben is lemértük, így módon meg tudtuk különböztetni a periódusban illetve a fázisban eltéréseket mutató változatokat.

A térképezőpopuláció létrehozása

A fenti szűrések után a C24 háttérű *lip1-1*-et a térképezéshez Col-0 háttérű növényvel kereszteztük, hogy a kapcsoltsági vizsgálathoz a molekuláris tájékozódási pontokat és a mérhető cirkadián jellegeket összekeverjük. A keresztezéssel létrejövő F_1 nemzedék örökítőanyaga minden helyen heterozigóta mintázatú. Ekkor történnek a szülői kromatidák közötti átkereszteződések is, amelynek során a hibát tartalmazó DNS darab a másik háttérre jellemző DNS-környezetbe kerül. Az egyedekben megfigyelhető cirkadián jelleg (periódus vagy fázis) azonban nem egyöntetűen köztes, mivel a cirkadián periódust és fázist több gén együttesen, bonyolult génkölcsonhatásokon keresztül határozza meg. Ezek a keresztezés során szabadon rekombinálódva a jellegek többé-kevésbé folyamatos eloszlását eredményezik. A helyzetet bonyolítja, hogy a két vad háttérnek (C24 és Col-0) nem csupán a cirkadián szempontból semleges molekuláris tájékozódási pontjai különböznek, hanem cirkadián jellege is már eleve eltér a

természetes kiválasztódásnak köszönhetően. Az F_1 nemzedék egyébként a *CAB2:LUC* jelzőgénre is heterozigóta, mivel a Col-0 nem tartalmazott ilyen jelzőgént. Az F_1 nemzedék önbeporzással létrejövő utódainak cirkadián jellegei hasadnak. Természetesen ekkor sem tisztán az eredeti szülői jellegeket kapjuk vissza, hanem a háttérkeveredés miatt nehezebben elkülöníthető csoportokat.

Kapcsoltsági vizsgálat

A kapcsoltsági vizsgálatához a *lip1-1* F_2 nemzedékének egyedeit a megfigyelhető cirkadián jellegeik alapján szétválogattuk. A szóba jöhető növényeknek azonban csak a negyedét tudtuk kiválasztani, mert a többi nem tartalmazta a *CAB2:LUC* jelzőgént, így a luminométerben ezeket nem lehetett megmérni. Az egyes csoportok egymáshoz viszonyított arányaiból megállapítottuk a *lip1-1* köztes öröklődésű. A térképezés biztonságát növelendő csak a legszélsőségesebb jellegű hibás egyedeket tartottuk meg. Összesen 50 ilyen egyed lett a kapcsoltsági vizsgálat alanya. A kapcsoltsági vizsgálatnak egy egyszerű és hatékony módját, a hasadó utódok göngyöltett vizsgálatát választottuk [190]. Három hetes homozigóta hibás növények hasonló méretű leveleiből DNS-t tisztítottunk (lásd: 53. oldal), majd a DNS-ekből 10-10 μ l-t kivéve egy keveréket készítettünk. Ezen a keveréken végeztük a kis felbontású genetikai térképezést, amellyel a hibás gén helyét nagyjából egy kromoszómakarra tudtuk behatárolni. Ehhez olyan molekuláris tájékozódási pontokra volt szükség, amelyek valamilyen módon különböznek a két vad háttérű növényben, ezért segítségükkel eldönthető, hogy egy vizsgált egyed örökítőanyaga az adott helyen homozigóta vagy heterozigóta-e. A térképezéskor még nem állt rendelkezésünkre a lúdfű változatai közötti molekuláris különbségeket tartalmazó adatbázis, ezért magunknak kellett ilyeneket találnunk. Végül sikerült egy olyan gyűjteményt összeállítani, amely a lúdfű mind az öt kromoszómáján egyenletesen elosztott molekuláris tájékozódási pontokból áll. Ezeket a tájékozódási pontokat PCR-rel lehet ellenőrizni [191] (a részletes leírást lásd: 53. oldal). A kapcsoltsági vizsgálat nem más, mint ezen pontok mintázatának összevetése a megfigyelhető cirkadián jelleg mintázatával. Ha a homozigóta hibás növényekből kevert DNS-en végzett PCR termékek közül egy vagy több következetesen homozigóta C24 mintázatot mutat, akkor az azt jelenti, hogy a hibás gén ezen tájékozódási pontok közelében van. A többi kromoszómán a véletlenszerű kromatidapárbaállás miatt a hibás cirkadián jelleg kialakításában szerepet nem játszó DNS darabok heterozigóta-szerű mintázatot mutat-

nak. A hibát hordozó kromoszómán bekövetkező átkereszteződések teszik lehetővé, hogy a kapcsoltságot a kromoszómán belül is meg tudjuk állapítani, mivel csak azok a részek érdekesek számunkra, amelyek homozigóta C24 mintázatúak maradnak.

Finomtérképezés

Ezt követően olyan átkereszteződési pontokat kerestünk, amelyek a hibás gén két oldalán kb. 500 kb-nyi távolságra találhatóak (ahol a mintázat homozigóta C24-ről heterozigótára vált, vagy fordítva). Miután ez sikerült, a továbblépéshez egy másik módszert alkalmaztunk. Minél több olyan növényt kellett találnunk, amelyek a két határolópont helyén DNS mintázatot váltanak. Ehhez nem gyűjtöttük össze a hibás egyedeket, hanem válogatás nélkül neveltünk fel kb. 2 000 növényt (luciferázt tartalmazókból). Ezek mindegyikének DNS mintázatát a két határoló pont helyén meghatároztuk. Csak azokat tartottuk meg, amelyek DNS mintázatot váltottak (kb. 5%). Következő lépésként ezen növények cirkadián jellegét luminométerrel meghatároztuk, és a kapott eredményeket összevetettük a DNS mintázatukkal. Eközben a két határpont közötti szakaszra egyenletesen elosztva új tájékozódási pontokat terveztünk. A megmaradt, és már ismert cirkadián tulajdonságú egyedeinknek ezeken a pontokon meghatároztuk a DNS mintázatát. A cél olyan növények találása volt, amelyek kb. 50 kb-ra szűkítik a gént tartalmazó szakaszt.

Az elrontott gén azonosítása

A szakaszt végül 29.4 kb-nyira sikerült leszűkíteni. Ezt három darabban sokszorosítottuk PCR-rel, a TaKaRa cég ExTaq hibajavító enzimével, amely nagy DNS darabok sokszorosítására is alkalmas. Az oligonukleotidok 5' végére *KpnI* illetve *NotI* restriktív enzimek felismerőhelyeit illesztettük. A vad háttérű és a *lip1-1* növényből is 3-3 párhuzamos sokszorozást végeztünk, hogy a polimeráz által elkövetett hibákat a bázissorrendek összehasonlításánál ki tudjuk szűrni. A darabokat pBluescript® II SK(-) plazmidba, *KpnI* és *NotI* helyekre varrtuk be, majd bázissorrendjüket meghatároztuk. Az eltéréseket azonosítandó a kapott bázissorrendeket összeillesztés után ClustalW2 eljárással egymás alá rendeztük.

Molekuláris biológiai és biokémiai módszerek

Génebézészet

A teljes hosszúságú *LIP1* cDNS-t (pda02083) a RIKEN cégtől vásároltuk [192]. Az egyéb megszakításmentes kódoló génszakaszokat az Athanasios Theologis laboratóriumában készített, 3 napos, sötétben nőtt lúdfű Col-0 változatából származó cDNS-eket hordozó λ -fág könyvtárból, a gének promótereit pedig lúdfű Ws ill. Col-0 változatának genomi DNS-éből (a növényi genomi DNS tisztítását lásd: 52. oldal) sokszorosítottuk PCR-rel. Minden szükséges DNS darabot – a kívánt restriktációs enzim hasítóhelyekkel a végükön – PCR-rel állítottunk elő hibajavító enzimkeverékkel (TaKaRa ExTaq, Abgene Extensor Hi-Fidelity enzyme mix, ill. Stratagene PfuUltra™ II Fusion HS) a gyártó útmutatása szerint.

A restriktációs endonukleáz emésztéseket és egyéb DNS módosító kezeléseket a gyártó (Fermentas) által szállított pufferekben és körülmények között végeztük, majd a termékeket agaróz gélen (SeaKem® LE, Cambrex), elektroforézissel választottuk el, a megfelelő DNS darabokat a gélből kivágván fenolozással tisztítottuk. A darabok összevarrását a T4 DNS ligáz gyártójának (Fermentas) útmutatásai alapján végeztük. Az összevarrt DNS-eket Inoue módszere [193] szerint előkészített XL-1 Blue sejtekbe egy gyors és hatékony módszerrel [194] juttattuk be. A plazmidot hordozó baktériumsejtek kiválogatását a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezekon 37 °C-on 16 órán át végeztük. A plazmidokat *Escherichia coli* sejtekből a hagyományos lúgos feltárás módosított változatával tisztítottuk [195], amelyeket azután restriktációs enzimekkel ellenőriztünk.

Növényekbe kerülő génépítmények létrehozása

A *CCA1:LUC+*, *LHY:LUC+* és *CCR2:LUC+* jelzőgénekben használt szentjánosbogár luciferáz+ (*LUC+*; módosított *LUC*; ez a luciferáz erősebben világít, mint a *LUC*) cDNS-t a Promega cégtől vásároltuk.

A *CCR2:LUC+*, a *CCA1:LUC+* és az *LHY:LUC+* jelzőgének létrehozásához a *CCR2* kódoló része előtti 2 233 bp-nyi DNS darabot, a *CCA1* kódoló része előtti 3 530 bp-nyi DNS darabot, illetve az *LHY* kódoló része előtti 1 812 bp-nyi szakaszt sokszorosítottuk lúdfű Ws változatából ExTaq polimerázkeverék és a következő primerek felhasználásával:

CCR2 pro F: 5'-CGCAAGCTTAAATCTTCTCCTTCATCACCGCATA-3'
 CCR2 pro R: 5'-CGCGGATCCTGAAATTTGAAAAGAAGATCTAAGGGA-3'
 CCA1 pro F: 5'-CGCAAGCTTCTTCTCGGCATGGAAGTTGACTTTGG-3'
 CCA1 pro R: 5'-CGCGGATCCCACTAAGCTCCTCTACACAAGTTC-3'
 LHY pro F: 5'-TGCGGTCTGACTGTTTCAAATAACTGTTATGTCCTA-3'
 LHY pro R: 5'-GGAAGGATCCAACAGGACCGGTGCAGCTAT-3'

A termékeket közvetlenül a növényi kétgzadás pPCVH LUC+ plazmidba klónoztuk *HindIII*–*BamHI* (*CCA1* és *CCR2*), *Sall*–*BamHI* (*LHY*) helyekre. A kísérleteinkben használt *CAB2* promóter a *CAB2* gén kódoló része előtt elhelyezkedő 320 bp-nyi DNS darabot tartalmazza (ezt a génépitményt Andrew Millar laboratóriumában készítették).

A *lip1* tünetegyüttes helyreállításához a *LIP1:LIP1* és a *35S:YFP-LIP1* génépitményeket készítettük el. Ehhez a *LIP1* kódoló részét Pfu polimerázzal újraszorosítottuk az alábbi primerek felhasználásával:

LIP1 CDS F: 5'-TCGCGGATCCGTATGAAGTTTTGGAGGGAACGTGAAAG-3'
 LIP1 CDS R: 5'-TCGGGAGCTCTCAGACGTTAATATCCATTCGCTTTGAC-3'

A terméket gélből való tisztítás után *BamHI* és *SacI* enzimekkel kezeltük, és pBluescript® II SK(–) plazmidba klónoztuk. A *LIP1* promótert a *LIP1* kódoló rész előtti 1 137 bp-nyi szakasz lúdfű Col-0 változatából ExTaq polimerázzal történő sokszorosításával állítottuk elő az alábbi primerekkel:

LIP1 pro F: 5'-CCCAGAATTCATCCTCGTTGAGATTGTAAGATACC-3'
 LIP1 pro R: 5'-CGCCGTCGACTTTTGCTTAACAAGAGCAGATTAGGT-3'

A PCR termékét *EcoRI*–*Sall* darabként pBluescript® II SK(–) plazmidba klónoztuk. A *LIP1:LIP1* génépitményt pPCVH plazmidban raktuk össze: először a *LIP1* promótert illesztettük be *EcoRI* és *Sall* helyek közé, majd e mögé szúrtuk be a *LIP1* kódoló részét *BamHI* és *SacI* helyekre. A mikroszkópos vizsgálatokhoz is használható *LIP1* túltermelő vonalak előállításához a *LIP1* kódoló részét pPCVB 35S plazmidba varrtuk be a *35S* promóter mögé *BamHI*–*SacI* helyekre. Az *YFP* stop kodon nélküli változatát a megfelelő leolvasási keretben *Sall*–*BamHI* darabként illesztettük a *35S* promóter és a *LIP1* közé. Ugyanebben a plazmidban raktuk össze a *LIP1* mRNS lefordításának vizsgálatához a *LIP1*-LUC+ mesterséges fehérjét kódoló gént is. Először a *LUC+* gént *SmaI* és *SacI* enzimekkel vágtuk ki pPCVH LUC+ plazmidból, és pPCVB 35S plazmid *SmaI* és *SacI*

helyei közé illesztettük be. A fehérjék összeforrasztásához a *LIP1* stop kodon nélküli változatát készítettük el a *LIP1* CDS F és a következő primer felhasználásával:

LIP1 STOP(-) R: 5'-TCGGGGAGCTCACAGACGTTAATATCCATTCGCTTTGAC-3'

A terméket *Bam*HI-*Ecl*136II darabként illesztettük be a *LUC+* elé *Bam*HI-*Sma*I helyekre.

Az élesztő kéthibrid eredmények megerősítésére a növényi sejtekbe juttatandó, átmeneti kifejeződést biztosító génépítményekhez a beépítendő géneket (*LIP1*, *ROPGEF7*, *GI*, *TOC1*, *ZTL*) az élesztő kéthibrid rendszerben használatos pGADT7 plazmidból vágtuk ki *Eco*RI és *Xho*I enzimekkel, majd a pRT104 3×Myc és 3×HA plazmidok *Eco*RI és *Xho*I helyei közé varrtuk be őket (kivéve a *GI*-t, mivel ezt közvetlenül *Eco*RI-feltöltött *Not*I darabként vittük át *Eco*RI-feltöltött *Xba*I helyekre).

Élesztőbe kerülő génépítmények létrehozása

Az élesztő kéthibrid alapú kölcsönhatás-vizsgálatokhoz a Clontech által kifejlesztett pGADT7 és pGBKT7 élesztő kétgazdás plazmidokba, a megfelelő leolvasási keretbe illesztve klónoztuk a *LIP1*, *ROPGEF7*, *GI*, *TOC1*, *ZTL* gének megszakításmentes kódoló részét. Ehhez a kérdéses géneket Pfu polimerázzal sokszorosítottuk a következő primerek segítségével:

GEF7 CDS F: 5'-TCGGGATCCTTATGGATGGTTCGTCGG-3'

GEF7 CDS R: 5'-TATGAGCTCTCAAATCCCAGGATCAAGG-3'

GI CDS F: 5'-CTTTTGCGAATTCATGGCTAGTTCATCTTCATCTGAGAGA-3'

GI CDS R: 5'-TTTGCCTCGAGTTAGCGGCCGCATTGGGACAAGGATATAGT-ACAGCC-3'

TOC1 CDS F: 5'-TTGGCTCGAGGAATTCATGGATTTGAACGGTGAGTGTAAGG-3'

TOC1 CDS R: 5'-TTCTGAGCTCCTACTCGAGAGTTCCCAAAGCATCATCCTG-3'

ZTL CDS F: 5'-TGGACTCGAGGGATCCGTATGGAGTGGGACAGTGGTTC-3'

ZTL CDS R: 5'-TTTCCCGGGTTACTCGAGATTCGTGAGATAGCTCGCTAGTGAT-3'

A PCR termékeit a megfelelő enzimekkel való kezelés után (*GEF7*: *Bam*HI-*Sac*I, *GI*: *Eco*RI-feltöltött *Not*I, *TOC1*: *Eco*RI-*Sac*I, *ZTL*: *Bam*HI-*Sma*I) először pGADT7 plazmidba varrtuk be (*GEF7*: *Bam*HI-*Sac*I, *GI*: *Eco*RI-*Ecl*136II, *TOC1*: *Eco*RI-*Sac*I, *ZTL*: *Bam*HI-*Ecl*136II), majd innen vittük át pGBKT7-be *Eco*RI és *Xho*I darabokként *Eco*RI

és *Sall* helyek közé (kivéve a *Gl*-t, amelyet nem pGADT7-ből vittünk át, hanem egyből pGBKT7-be varrtunk be *EcoRI*-feltöltött *PstI* helyekre).

Baktériumba kerülő génépítmények létrehozása

A pMALc2X LIP1-cHis génépítményhez a *LIP1* stop kodon nélküli, megszakításmentes kódoló részét használtuk, amelyet Pfu polimerázzal állítottunk elő a következő primerket használva:

LIP1 MAL F: 5'-CTTTTGCGAATTCATGAAGTTTGGAGGGAACGT-3'

LIP1 MAL R: 5'-TTTGCCTCGAGTCAGTCGACGACGTTAATATCCATTCGCTT-3'

A termék végeit *EcoRI* és *XhoI* enzimekkel alakítottuk ki, majd a pMAL c2X (New England Biolabs) plazmidba *EcoRI* és *Sall* helyek közé illesztettük be. Az *MBP-MsROP6* génépítményt a következő módon hoztuk létre: a leolvasási keret megváltoztatása érdekében a rekombinációs klónozáshoz használt pENTR 2B plazmidban (Invitrogen) a felvágott *Sall* helyet T4 DNS polimeráz segítségével feltöltöttük, majd visszazártuk. Ezután az *MsROP6* kódoló részét ebbe a pENTR 2Bmod plazmidba helyeztük *EcoRI* és *XhoI* helyek közé, innen pedig LR rekombinációval vittük tovább egy Gateway rendszerű pMAL c2X Destiny plazmidba.

Jó minőségű növényi DNS előállítása klónozáshoz

Körülbelül 1 cm² felületű levelet folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, majd 1.5 ml-es centrifugacsőben elporítottunk. A mintára 500 µl 60 °C-ra előmelegített 2×CTAB puffert (2% CTAB, 100 mM Tris·HCl pH=8.0, 20 mM EDTA pH=8.0, 1.4 M NaCl, 1% PVP-40, 0.5% β-merkaptotanol) mértünk rá, majd többször összerázva a csövet, 30 percig 65 °C-on tartottuk. 5 percnyi ülepítés után a törmelékmentes felülúszót új csőbe szívtuk át és azonos térfogatú kloroformmal ráztuk össze. A vizes és a szerves fázist 5 perc centrifugálással választottuk szét. A felső vizes fázisból a nukleinsavakat 0.75 térfogatnyi 2-propanollal szobahőmérsékleten 10 perc alatt csaptuk ki, majd 10 perces centrifugálással ülepítettük. A csapadékot 70%-os etanollal mostuk, légszivattyúval megszáritottuk és 100 µl csíramentes TE pufferben (10 mM Tris·HCl pH=7.5, 1 mM EDTA) feloldottuk. A mintát 10 µg RNáz-A enzimmel kezeltük 37 °C-on 1 órán át, majd fenol-kloroform (1:1) elegyével ráztuk össze. Centrifugálás után a vizes fázist kloroformmal is tisztítottuk, majd a vizes fázisból a DNS-t 0.2 térfogatnyi 3 M nátrium-acetát pH=5.2 és 0.75 térfogatnyi 2-propanol hozzáadásával szobahőmérsékleten 10

perc alatt csaptuk ki. Centrifugálásos ülepités és 70%-os etanollal történő mosás után a csapadékot megszárítottuk és 100 µl csíramentes TE-ben oldottuk fel. A mintából 1–2 µl-t használtunk egy PCR-hez.

Sokmintás növényi DNS tisztítása gyorseszthez

Az ún. ROSE (Rapid One Step Extraction) módszert [196] alakítottuk át úgy, hogy sok mintát lehessen kényelmesen feldolgozni. Körülbelül 1–3 cm² levelet szedtünk 2 ml-es gyűjtőcsövekbe (Qiagen), amelyek egy 96 csövet befogadó állványban, folyékony nitrogénben álltak. A csövekbe előzőleg 1-1 db, 3 mm átmérőjű csapágygolyót is helyeztünk. A leszedett és fagyott mintákat gyorsan egy mintafeltáró rázógépre (Mixer Mill, Retsch) helyeztük, és 2 percig teljes fokozaton rázattuk. Az így módon porrá zúzott mintákat visszafagyasztottuk, majd röviden lecentrifugáltuk egy szabványos 96-os lemez befogadására alkalmas hűthető centrifugában (Eppendorf). Ezután a mintákhoz nyolccsatornás pipettával 200-200 µl feltáráspuffert (10 mM Tris·HCl pH=8.0, 312.5 mM EDTA, 1% Na-lauril szarkozinát, 1% PVPP) adagoltunk. A csöveket ezután egy házilag készített szerkezettel szorosan lezárva 90 °C-os sütőbe helyeztük 20 percre, majd jégen hűtöttük 5 percig. 5 perc centrifugálás után a felülúszókból 6-6 µl-t nyolccsatornás pipettával átmértünk 1-1 ml csíramentes Milli-Q vízbe, amelyet előzőleg egy 96-csöves, csövenként 2 ml űrtartalmú lemezbe (ABgene) mértünk szét. Az így kihígított mintákból 2 µl-t használtunk fel egy 10 µl-es PCR-hez.

Sokmintás PCR és PCR alapú genetikai markerek

A PCR-eket 10 µl-es térfogatban végeztük, 96 csöves PCR lemezekben (ABgene). A lemezeket újrahaználható gumifedővel zártuk le (Applied Biosystems). A reakciótérfogatot az összerakáshoz két részre választottuk. Az egyik részbe a csoportonként változó (primer, MgCl₂, valamint puffer és festék), a másikba a minden csoportra egyaránt jellemző összetevőket (dNTP keverék, Taq polimeráz, valamint szintén puffer és festék) mértük. A reakcióelegy összetétele az összerakás után a következő volt: 75 mM Tris·HCl pH=8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween® 20, 2.5 mM MgCl₂, 3% szacharóz-krezolvörös keverék, 0.2 mM dNTP keverék (Fermentas), 0.3 µM primerkeverék, 0.25 U Taq polimeráz (házi készítésű). A végig jéghideg állványban tartott lemezekbe először az első oldatot mértük szét (3-3 µl) nyolccsatornás pipettával, majd

egyenként beléjük mértük a ROSE módszerrel tisztított vizsgálandó minta DNS-eket is (2-2 μ l). Ezután a második, enzimet tartalmazó oldat szétmérése következett (5-5 μ l). A lemezeket lezártuk, összekevertük, majd hűthető centrifugában (Eppendorf) röviden lecentrifugáltuk. Ezután előre 95 °C-ra felfűtött PCR gépbe helyeztük őket és elindítottuk a hőmérsékleti programot, amely általában a következő volt: 95 °C 2 perc, 50×(95 °C 30 mp, 55 °C 30 mp, 72 °C 1 perc), 72 °C 3 perc, 4 °C ∞ . Miután elkészültek, SSLP markerek esetében azonnal 0.5×TBE puffert és 3–4% agarózt (SeaKem™ LE, Cambrex) tartalmazó gélen választottuk el a PCR termékeket, vagy a dCAPS markerek [191] esetében előbb restriktációs emésztést hajtottunk végre rajtuk: a mintákat 20 μ l-re egészítettük ki a restriktációs enzim számára legmegfelelőbb pufferrel, szacharóz-krezolvörös keverékkel, valamint magával az adott restriktációs enzimmel (3 U/minta). Az emésztést az enzimnek megfelelő körülmények között végeztük egy éjszakán keresztül, majd a termékeket a fentiekben leírt módon agarózgélen választottuk szét.

Növényi RNS tisztítása

Össz-RNS-t ~100 mg, folyékony nitrogénben porított növényi anyagból a Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit-jével tisztítottuk (oszlopon történő RNáz-mentes DNáz kezeléssel kiegészítve) a gyártó leírása alapján. A kapott RNS mennyiségét és minőségét a minta 260 és 280 nm-en mért fényelnyeléséből határoztuk meg.

mRNS szint meghatározása Northern módszerrel

Mintánként 20 μ g össz-RNS-t egyesszálúvá alakítottunk a felvivő pufferben (1×MOPS, 50% formamid, 7% formaldehid, 0.1 μ g/ μ l etídium-bromid), majd az RNS mintákat formaldehides, 1%-os agaróz gélen választottuk el. A gélből az RNS-t a Zeta-Probe® GT (Bio-Rad) pozitívan töltött nylon lapra vittük át a gyártó útmutatása alapján. A hibridizációhoz próbaként használt *CCA1* és *TOC1* teljes hosszúságú cDNS-t az Amersham cég Megaprime™ DNA Labelling System jelölőcsomagját használva jelöltük [α -³²P]-dCTP jelenlétében. A lapon a felesleges kötőhelyeket kioltópufferben (50 mM foszfát puffer pH=6.5 [197], 50% formamid, 5×SSC, 0.2% SDS, 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml PVP-40, 1 mg/ml fikoll-400, 100 μ g/ml egyesszálú heringsperma DNS) egy éjszakán át 42 °C-on való áztatással fedtük le. A radioaktív próbát egyesszálúvá alakítva adtuk a kioltópufferhez és a hibridizálást 42 °C-on, 24 órán keresztül végeztük. Ezt követően a

lapot csökkenő töménységű só és emelkedő hőmérséklet mellett mostuk: 2×SSC, 0.2% SDS (2×15 perc, 42 °C); 2×SSC, 0.2% SDS (2×15 perc, 65 °C); 1×SSC, 0.2% SDS (2×15 perc, 65 °C); 0.5×SSC, 0.2% SDS (1×15 perc, 65 °C). Az 1×SSC összetétele: 0.15 M NaCl, 15 mM Na₃-citrát, pH=7.2. A lapot PhosphorImager® (Molecular Dynamics) készülék segítségével hívtuk elő. A jeleket az ImageQuant™ (Molecular Dynamics) alkalmazással mértük meg.

mRNS szint meghatározása folyamatosan mért PCR-rel

Időpontonként ~100 db növényből tisztítottunk össz-RNS-t (lásd: 54. oldal). 0.5–1 µg RNS-ből cDNS-t a Fermentas által gyártott RevertAid™ First-Strand cDNA Synthesis Kit felhasználásával készítettünk a gyártó útmutatásainak megfelelően. A termékeket RNáz-mentes vízzel ötszörösére hígítottuk. A *CCA1*, *LHY* és a *TOC1* mRNS szintjét folyamatosan mért PCR-rel ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) gépen, ABI SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) alkalmazásával 15 µl térfogatban határoztuk meg.

Minden kísérletnél készítettünk egy cDNS hígítási sort: a vad háttérű növények egy napot lefedő mintáiból (cDNS) keveréket csináltunk, amelyet 1-, 10-, 100-, 1000-szeresre hígítottunk. Ezekben megmértük a kérdéses mRNS-ek szintjét. Az egyes primerpárokkal kapott értékekre egyenest illesztettünk, amelynek meghatároztuk a segédváltozóit. Az ismeretlen mintákban az mRNS szinteket ennek a hitelesítő egyenesnek a segítségével számítottuk ki. A kapott értékeket a minták *TUB2/3* mRNS-szintjére vonatkoztattuk. Minden mintát háromszor mértünk meg. A sokszorozáshoz használt primerek az alábbiak voltak, amelyeket 0.3 µM töménységben alkalmaztunk:

CCA1 RT-PCR F: 5'-CTGTGTCTGACGAGGGTTCGAA-3'

CCA1 RT-PCR R: 5'-ATATGTAAAACCTTTGCGGCAATACCT-3'

LHY RT-PCR F: 5'-CAACAGCAACAACAATGCAACTAC-3'

LHY RT-PCR R: 5'-AGAGAGCCTGAAACGCTATACGA-3'

TOC1 RT-PCR F: 5'-ATCTTCGCAGAATCCCTGTGATA-3'

TOC1 RT-PCR R: 5'-GCACCTAGCTTCAAGCACTTTACA-3'

A PCR körülményei az alábbiak voltak: 94 °C 2.5 perc, 40×(95 °C 15 mp, 60 °C 1 perc), 95 °C 15 mp, 60 °C 1 perc, 95 °C 15 mp, 60 °C 15 mp.

Növényi összfehérje tisztítása

50–100 mg növényi anyagot folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és 1.5 ml-es csőben porrá őröltük. Az elporított mintára 300 µl/100 mg 60 °C-ra előmelegített feltárápuffert mértünk (4 M urea, 5% SDS, 5% β-merkaptoetanol, 16.66% glicerin). A mintákat tovább őröltük addig, amíg nagyobb darabokat már nem láttunk az oldatban, majd 60 °C-os vízfürdőbe helyeztük őket 10 percre. Időnként erőteljesen összeráztuk a csöveket. A törmeléket ezután centrifugálással ülepítettük 30 percig. A tiszta felülúszót új csövekbe mértük át. Az így elkészített minták azonnal felvihetők poliakrilamid géltre.

Fehérjeszint meghatározása Western blot módszerrel

Mintánként 10 µl fehérjekivonatot futtattunk 10%-os SDS-poliakrilamid gélen Tris/glicin/SDS futatópufferben. A kifuttatott gélből 2×15 percen keresztül átvivőpufferrel (12 mM Tris bázis, 96 mM glicin, pH=8.3, 20% metanol) mostuk ki az SDS és urea maradványokat. A gélből az elválasztott fehérjéket elektroblot készülékkel (Bio-Rad; 25 V, 1 h) átvittük Immobilon®-P PVDF (polivinilidén-difluorid) műanyag szűrőlapra (Millipore). Az átvitel után a lapot TBST pufferrel (20 mM Tris-HCl pH=7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween® 20) öblítettük át. A szabadon maradt kötőhelyeket kioltópufferrel (5% sovány tejpor, 1% BSA TBST pufferben) semlegesítettük 4 °C-on egy éjszakán át. Ezután a lapot műanyag zacskóba helyeztük, amelyet a GFP elleni elsődleges ellenanyag (Clontech, Living Colors A.v. Monoclonal Antibody JL-8, 500-szoros hígításban) hozzáadása után lehegesztettünk. Az ellenanyagot kioltópufferben 1 órán keresztül hagytuk a lapon, majd a lapot kivéve 3×5 perc TBST pufferben történő mosással távolítottuk el róla a felesleges ellenanyag maradványokat. Ezután kioltópufferben 10 000-szeresre hígított, alkalikus-foszfátázhoz kapcsolt egér-IgG elleni másodlagos ellenanyagot (Sigma, A-3562) adtunk hozzá, és így tartottuk szobahőmérsékleten 1 óráig. Ezt követően 3×10 percig TBST pufferben mostuk. A felesleges folyadék leitatása után előhívó oldatban (100 mM Tris-HCl pH=9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.02% BCIP, 0.03% NBT) tartottuk szobahőmérsékleten, míg a fehérjesávok láthatóvá nem váltak. A reakciót vizes öblítéssel leállítottuk, majd a lapot megszáritottuk és képet készítettünk róla.

Fehérjeegyüttes tisztítása növényi sejtenyészetből

A plazmidokat tartalmazó protoplasztokat (lásd: 64. oldal) sötétben rázattuk 22 °C-on 18 órán át, majd 7 percig 100 g gyorsulással óvatosan üleptettük őket. Az üledéket 50 µl feltárápufferbe (25 mM Tris·HCl pH=7.8, 10 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 10% glicerin, 75 mM NaCl, 60 mM β-glicerofoszfát, 0.2% Igepal® CA-630, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidin, 1×proteázgátló keverék [Roche]) vettük fel és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Jégen hagytuk felengedni, majd a törmeléket 10 percig üleptettük 4 °C-on, 15 000 g gyorsulással. A tiszta felülúszóból egy kísérlethez 100 µg összfehérjét használtunk fel 100 µl térfogatban. Az ellenanyag hozzáadása előtt a NaCl töménységét az oldatban 5 M-os NaCl-dal 150 mM-ra emeltük. A fehérjeegyüttes megjelöléséhez 1 µg Myc vagy HA ellenanyagot (Sigma) használtunk. Az ellenanyagot 4 °C-on 2 óráig hagytuk kötődni. Az ellenanyaggal jelölt fehérjeegyütteseket 10 µl Protein G Sepharose gyöngyökhöz kötöttük 1 óráig 4 °C-on, folyamatosan forgatva. A gyöngyöket oszlopba töltöttük és 3×500 µl jéghideg mosópufferrel (1×PBS pH=7.5, 5% glicerin, 0.2% Igepal® CA-630) mostuk. A gyöngyökről a fehérjéket 35 µl 1×SDS felvivőpufferrel távolítottuk el 4 perces 95 °C-os kezeléssel. Az így nyert mintákat SDS-poliakrilamid gélen futtatuk meg, a fehérjeegyüttes jelölt tagjait a jelölésre kifejlesztett ellenanyaggal mutattuk ki az előző alfejezetben leírtak szerint. A lehúzáshoz használt fehérje jelenlétének ellenőrzésekor nem tisztítottunk fehérjét, hanem csak feltártuk a sejteket a fent leírt módon, majd a tiszta felülúszóhoz egyből felvivőpuffert adtunk. A mintákat 5 percig 95 °C-on tartottuk, majd lehűlés után géltre vittük.

Mesterséges fehérje tisztítása baktériumból

Az amino-végén MBP, valamint a karboxi-végén 6×His fehérjedarabokkal összeforrasztott LIP1 fehérjét *Escherichia coli* Rosetta™ törzséből (Novagen) tisztítottuk. A plazmidot hordozó baktériumtelepeket 15 ml ampicillines, kloramfenikolos RM tápoldatba oltottunk le és egy éjszakán át növesztettük 37 °C-on. Másnap az egészét átöntöttük 250 ml friss RM tápoldatba és tovább növesztettük, amíg a tenyészet sűrűsége OD₆₀₀≈0.5 nem lett. Ekkor a sejteket lecentrifugáltuk (5 000 rpm, 5 perc), majd 250 ml friss, glükóz- és antibiotikum-mentes LB tápoldatba vettük fel, amelybe 1 mM töménységben IPTG-t adtunk. A sejteket ezután további 3 órán keresztül rázattuk 37 °C-on, majd kiüleptettük őket. Az üledéket 10 ml kötőpufferbe (20 mM Tris·HCl pH=7.4, 200

mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) vettük fel. A sejteket jégen, ultrahanggal tártuk fel (7×5 mp, 5 mp-es szünetekkel). A feltárt mintákat hűthető centrifugában üleptítettük (14 000 rpm, 30 perc, 4 °C). Innentől az összes műveletet hidegszobában végeztük. A felülúszót óvatosan 500 µl (kötőpufferral átmosott) amilóz gyönggyel (New England Biolabs) megtöltött oszlopokra (Bio-Rad) vittük fel. Az oszlopra kötött fehérjét 3×10 ml kötőpufferral mostuk át, majd 1 ml leszorítópufferral (kötőpuffer+10 mM maltóz) nyertük ki. A tisztított fehérjét Centricon® cső (Millipore) segítségével töményítettük, majd annyi 87%-os glicerint adtunk hozzá, hogy töménysége glicerinra 50%-os legyen. Az így elkészített fehérjét -20 °C-on tároltuk. A fehérjekészítmény mennyiségét és minőségét SDS poliakrilamid gélen való elválasztás után Coomassie festéssel és a His-farok ellenanyagot (Novagen, His-Tag® Monoclonal Antibody, 70796) felhasználva Western blot-tal ellenőriztük.

GTP-hasítás vizsgálata

A baktériumból tisztított fehérje önálló (segédfehérjék nélküli) GTP-hasító képességét 20 µl oldatban (20 mM Tris·HCl pH=8.0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µM GTP, 0.7 µCi [α-³²P] GTP, 4 µM fehérje) vizsgáltuk szobahőmérsékleten 10 óráig. Az elegyből 1 µl-t szilikagél vékonyrétegre (Merck, Silica gel 60 F₂₅₄, üveg hordozón) vittünk fel, majd a termékeket 1-propanol:cc.NH₄OH:H₂O (11:7:2) arányú keverékében futtatva választottuk szét. A megszáritott lemezeken a jeleket PhosphorImager® készülékkel tettük láthatóvá.

Élesztőn alkalmazott eljárások

Kölcsönható fehérjék keresése élesztő kéthibrid szűréssel

Az élesztő kéthibrid vizsgálatokhoz a *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A törzsét használtuk [182]. Az idegen DNS felvételére képes sejtek előállítását, a DNS bejuttatását, a kéthibrid szűrést, és egyéb élesztővel kapcsolatos műveleteket a *Methods in Molecular Biology* sorozat kéthibrid rendszerekről szóló kötetében leírtak szerint végeztük [198]. A LIP1-gyel kölcsönható fehérjék kereséséhez az Athanasios Theologis laboratóriumában készített, 3 napos, sötétben nőtt lúdfű Col-0 változatából származó, pACT2 plazmidba klónozott cDNS gyűjteményt használtuk. A könyvtár pGBKT7 LIP1-et tar-

talmazó sejtekbe történő bejuttatása után a sejteket A⁻L⁻W⁻ lemezekre szélesztettük. Ezzel csak a legerősebben kölcsönható párok növekedését engedjük meg. A kinőtt telepeket csíramentes vízben kihígítottuk, majd új A⁻L⁻W⁻, L⁻W⁻, valamint 10 mM 3-aminotriazollal kiegészített H⁻L⁻W⁻ lemezre csöppentettük ki őket, hogy kiválogassuk a legerősebben kölcsönhatókat. A kiválasztott klónokból a kölcsönható fehérje génjét hordozó plazmidot (pACT2) tisztítottuk, majd szaporítás céljából *Escherichia coli* XL-1 Blue sejtekbe vittük át. A baktériumból tisztított plazmidok újra élesztőbe kerültek, bizonyítandó hogy a növekedést a kérdéses plazmid jelenléte tette lehetővé. Ezután meghatároztuk az ígéretes klónok plazmidjai által hordozott ismeretlen cDNS darabok bázissorrendjét.

A kölcsönható párok vizsgálatakor a plazmidok bejuttatása után a sejtek egyik felét L⁻W⁻, a másikat pedig A⁻L⁻W⁻ lemezre kentük ki. Utóbbi lemezen csak a valóban kölcsönható fehérjét kifejező élesztők képesek nőni, míg az előbbin minden olyan élesztő kinő, amely tartalmazza a bevitt plazmidpár mindkét tagját. Ezzel az együttes bejuttatás hatékonysága ellenőrizhető.

β-galaktozidáz enzimműködés mérése

A kölcsönhatás erősségének számszerű becslésére legalkalmasabb módszer a kölcsönhatás következtében kifejeződő β-galaktozidáz működésének mérése oldatban. Ehhez minden L⁻W⁻ lemezről 3 telepet oltottunk le 3 ml L⁻W⁻ tápoldatba, és erősen rázatva OD₆₀₀≈0.8-ig növesztettük őket 30 °C-on. Minden egyes minta sejtsűrűségét megmértük és feljegyeztük. A mintákból 2 ml-t centrifugálással ülepítettünk, majd a felülúszót óvatosan eltávolítva az üledéket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Felolvasztás után a sejteket 665 μl H-pufferbe (100 mM HEPES·KOH pH=7.0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% BSA) vettük fel, majd 55 μl kloroformot és 55 μl 0.1%-os SDS oldatot adagoltunk hozzájuk. A keveréket 1 percig erősen összeráztuk, majd 125 μl oNPG-oldat (4 mg/ml, H-pufferben) hozzáadása után a mintákat 30 °C-ra helyeztük legfeljebb 1 óráig. Az egyes mintákban az enzimműködést, amikor az oldat színe közepesen sárgára változott, 400 μl 1 M-os Na₂CO₃-oldat hozzáadásával állítottuk le. A leállítási idejét feljegyeztük. 5 perces centrifugálás után megmértük a tiszta felülúszó 420 nm-en való fényelnyelését. A β-galaktozidáz enzim működését egy viszonylagos értékkel (Miller-egység) jellemeztük, amelyet a következő módon számoltunk ki:

$(1\ 000 \times OD_{420}) / (V \times T \times OD_{600})$, ahol V a sejtenyészet térfogata ml-ben, T pedig a leállítás ideje percben mérve.

Növényeken alkalmazott eljárások

Növények előkészítése és nevelése

Felületkezeléshez a lúdfű magjait legalább 3 napig desztillált vízben 4 °C-on, sötétben duzzasztottuk, majd 10 percig 30%-os *Domestos* oldatban áztattuk. Ezután csíramentes desztillált vízzel ötször átmostuk. Az így felületkezelt magokat AM ill. MS3 lemezekre szélesztettük és általában 22 °C-on, 12 óra fény/12 óra sötét körülmények között neveltük őket programozható fűtésű és világítású növénynevelő kamrákban.

Idegen DNS-t öröklődően hordozó növények előállítása

A növénybe bejuttatni kívánt pPCV plazmidot először *Escherichia coli* S17-1 törzsébe vittük be, majd az ampicillines lemezen kinőtt sejteket 2 ml ampicillines LB tápoldatban 16 órán át növesztettük. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzséből YEB tápoldatban, 24 óra alatt szintén fiatal folyadékkultúrát neveltünk. A két baktériumtenyészetből 1-1 ml-t összekevertünk, a sejteket ülepítettük, majd a tömény baktériumkeveréket YEB táplemezen növesztettük. 24 óra után a növekedésnek indult baktériumtenyészetből kis mennyiséget rifampicin és karbenicillin tartalmú YEB lemezre szélesztettünk. A felnövekvő *Agrobacterium* telepeket legalább 3 alkalommal kentük át, mielőtt a növények kezeléséhez felhasználtuk volna őket.

Az *Agrobacterium* által hordozott idegen DNS növényekbe juttatására a virágmárgatogató módszer alkalmaztuk [199]. A felnevelt növényekről magot gyűjtöttünk, amelyekből a megfelelő gyomirtóval, valamint klaforánnal kiegészített AM táptalajon csíramentes körülmények között kiválogattuk a gyomirtónak ellenálló egyedeket (T1 nemzedék). Ezeket a megfelelő erősségű gyökérszet kialakulása után (10–12 nap) földbe ültettük és az üvegházban felneveltük. Általában 20–30 független T1 vonalat állítottunk elő. Vizsgálatainkat a T3 nemzedék idegen génre nézve homozigóta egyedein végeztük.

Fénykezelések

A fénykezelésekhez a Quantum Devices Inc (USA) Snaplite™ LED-eket tartalmazó egy-színű fényforrásait használtuk. Az alkalmazott vörös fény hullámhossza 665 ± 15 nm, erőssége $36 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; a távoli-vörös fény hullámhossza 730 ± 15 nm, erőssége $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; a kék fény hullámhossza 470 ± 15 nm, erőssége $38 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ volt, ha máshogy nem jelöltük.

Lumineszcencia-mérés élő növényben

A luciferázos jelzőgéneket kifejező csíranövényeket 12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)/12 óra sötét váltakozó fényviszonyok mellett állandó 22°C -on 6 napig neveltük MS3 lemezekben. A mérés kezdete előtt 6 órával a csíranövényeket csíramentes körülmények között 96 zsebes lemezbe emeltük át, melynek minden zsebe 0.25 ml MS3 táptalajt tartalmazott. Minden növényre $20 \mu\text{l}$ 2.5 mM-os luciferin oldatot csep-pentettünk. A mérés a csírázást követő hetedik napon indult. A méréseket TopCount®NXT™ önműködő luminométerrel (Packard) végeztük, amely a lemez zse-beiben elhelyezett csíranövény által kibocsátott fényt 1–2 óránként a mérési idő végé-ig rögzítette (a módszer részletes leírását lásd: [189,200]). A luminométerben a min-tákat sötétben vagy vörös fényben ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) tartottuk. A folyamatos fényben levő minták csupán a mérések alkalmával (1–2 óránként 9 percre) kerültek a mérőtér sötétjébe, mely a cirkadián óra működését nem befolyásolja [183]. A mérési eredmények feldolgozása a TopTemp nevű Microsoft Excel makróval (Dr. Andrew Millar ajándéka) történt. A mért értékeket az összes mért érték átlagával osztottuk el. Ezt az adatot az idő függvényében ábráztuk. Az időtengely 0 pontja az utolsó sötét/fehér fény átme-net időpontja.

Levélmozgás mérése

A levélmozgás digitális kamerával való rögzítését az Edwards és Millar által leírtak szerint végeztük [201]. A növényeket 10 napig neveltük 12 óra fény/12 óra sötét váltásokkal, MS3 táptalajon, majd 7 napon keresztül, folyamatos fehér fényben ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), állandó hőmérsékleten (22°C) 2 óránként felvételt készítettünk róluk. A MetaMorph™ alkalmazás (Universal Imaging) segítségével a levelek függőleges vagy vízszintes tengely menti elmozdulását mértük az idő függvényében.

Periódusbecslés

A periódusok becslését a Biological Rhythms Analysis Software System [58,189] segítségével végeztük el. A Microsoft Excel alapú makró képes a TopCount®NXT™ luminométer és a levélmozgás kamerarendszer használata során nyert adatok kiértékelésére. A BRASS program a „Fast Fourier Transform-Non-Linear Least Squares (FFT-NLLS)” módszerrel [202] minden egyes növény adatsorára illesztett görbe alapján ad becslést az egyedek periódusára. Minden kísérletben legalább 80, legfeljebb 120 órás mérési időtartamból származó adatokat használtunk fel. A csoportonként legalább 20 növény periódusának statisztikai elemzését a BRASS programmal végeztük el. A periódus középértékének becslése során csak az értékeket vettük figyelembe, amelyek 15 és 38 óra közé estek (cirkadián tartomány).

A fázis igazíthatóságának mérése (PRC)

A *CCR2:LUC+* jelzőgént hordozó növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos sötétbe helyeztük őket. Ezután 3 óránként 1 órás, ugyanolyan erősségű fényvillanásokat kaptak. A villanások által kiváltott fáziscsúszást a villanás időpontjának függvényében ábrázoltuk. A különböző periódusú növények fázisainak összehasonlíthatósága érdekében a fáziscsúszásokat a következő módon számítottuk ki: a kezelt növények új fázisát (a folyamatos sötétbe helyezés után jelentkező harmadik cirkadián csúcs idejét) a kezeletlen, folyamatosan sötétben mérődő növények fázisából kivontuk. A negatív értékek jelzik ezért az óra késését, mert a csúcs később jön, mint a kezeletlenben. A pozitív értékek a hamarabb érkező, siető csúcst jelölik. Megmértük továbbá az adott növényvonal folyamatos sötétben mérhető periódusát is. Ezt az értéket elosztottuk 24-gyel, majd a kapott arányszámmal szoroztuk be az összes fáziskülönbséget, valamint a villanások időpontjait is. Így minden értéket egy névleges 24 órás napon belül tudtunk feltüntetni (cirkadián idő). A fáziscsúszás hibáját a kezelt és a kezeletlen növényekben mért fázisok középértékhibáiból (*SEM*) számoltuk ki az alábbi képlet szerint:

$$SEM_{\text{csúszás}} = \sqrt{(SEM_{\text{kezeletlen}})^2 + (SEM_{\text{kezelt}})^2}.$$

A szikalatti szár hosszának mérése

A magokat Petri-csészébe helyezett 4 réteg, desztillált vízzel megnedvesített szűrőpapírra szórtuk, majd 2 napra 4 °C-ra, sötétbe helyeztük. Ezután a magok 22 °C-ra kerültek: a csírázást megindító 6 óra fehér fény adása ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) után 12 óra sötét, majd a megfelelő erősségű és színű fény (vagy sötét) szakasz következett. A kezelés 4. napján a csíranövényeket 1%-os agar lemezre fektettük, majd lefényképeztük őket. A képet MetaMorph™ alkalmazással (Universal Imaging) dolgoztuk fel, mely az adatokat az Excel alkalmazás (Microsoft) által olvashatóvá alakította, így a statisztikai kiértékelést már ezzel végezhetjük. Az értékeket az adott vonal sötétben mért szárhosszára vonatkoztatva tüntettük fel, hogy csak a fényfüggő különbségeket lássuk. Minden növényvonalból legalább 30 egyed szikalatti szárát mértük meg.

Virágzási idő meghatározása

A magokat nedves talajra vetettük, majd 2 napig sötétben, 4 °C-on tartottuk. Ezután állandó hőmérsékletet (22 °C) biztosító nevelőkamrákba helyeztük őket rövid- (8 óra fehér fény [$60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$], 16 óra sötét) illetve hosszú- (16 óra fehér fény, 8 óra sötét) nappalos körülményeket előállítva. A virágzási időt kétféleképpen határoztuk meg: vagy a növények tőlevélrózsáinak leveleit számoltuk meg akkor, amikor a virágzati tengely hossza elérte az 1 cm-t, vagy azt mértük, hogy hány nap telt el eddig a pontig. Minden mérésben legalább 30 növény szerepelt.

Mikroszkópos vizsgálatok

Epifluoreszcens és fénymikroszkópiához a csíranövényeket zöld biztonsági fényben helyeztük a mikroszkópos tárgylemezre, majd Axioskop mikroszkóppal (Zeiss) vizsgáltuk őket. Az YFP fluoreszkáló fehérje gerjesztéséhez és kimutatásához YFP-szűrőkészletet használtunk (AHF Analysentechnik). Az eseményeket digitális Axiocam kamerarendszerrel (Zeiss) követtük nyomon a mikroszkópos vizsgálat kezdeti 30 másodpercében. A konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos vizsgálatokhoz (LSM-510 neví készülék, Zeiss) a fent leírtak szerint készítettük elő a vizsgálandó mintákat. A gerjesztőfényt argon lézer biztosította: 514 nm (YFP). A digitális képek tulajdonságait az XnView és a GIMP alkalmazással módosítottuk.

Növényi protoplasztok készítése

50 ml 2–5 napos lúdfű Col-0 változatából készített sejtenyészetet centrifugálással üleptítettünk (5 perc, 1 200 rpm). A leüleptített sejtekre 25 ml sejtfalbontó enzimoldatot (MS tápoldat, 0.34 M glükóz, 0.34 M mannitol, 1% celluláz [Serva], 0.2% macerozim [Yakult]) öntöttünk, majd 50 ml-re töltöttük fel GM-oldattal (MS tápoldat, 0.34 M glükóz, 0.34 M mannitol). A sejteket felkeverés után két Petri-csészébe öntöttük ki, és újabb 25-25 ml GM-oldattal egészítettük ki őket. 3–4 óra 28 °C-on történő rázatás után a sejteket kiüleptítettük (5 perc, 1 200 rpm). Az üledéket 25 ml GM-oldatba vettük fel, majd újra üleptítés következett (5 perc, 1 000 rpm). A sejteket ezután 5 ml S-oldatba (MS tápoldat, 0.28 M szacharóz) vettük fel, üleptítettük (5 perc, 800 rpm). A lebegő sejteket leszívtuk, és egy új csőbe vittük át. Mikroszkóp alatt ellenőriztük a minőségüket. A sejtfalmentesített sejtek gömb alakúak.

Idegen DNS bejuttatása növényi protoplasztokba

2.5–3 µg plazmidhoz 50 µl-ben $\sim 2 \times 10^5$ protoplasztot és 150 µl PEG-oldatot (25% PEG 6000, 0.45 M mannitol, 0.1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ pH=9.0) adtunk, és összekevertük őket. A sejteket szobahőmérsékleten 15 percig sötétben tartottuk, majd 2×500 µl 0.275 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ hozzáadásával állítottuk le a DNS bevitelt. A sejteket üleptítés (7 perc, 800 rpm) után 500 µl GM-oldatba vettük fel.

EREDMÉNYEK

Egy új cirkadián óraelem azonosítása

Laboratóriumunkban számos elromlott cirkadián órájú növényt azonosítottunk. Ezek egy részéről kiderült, hogy már ismert óra gének (*ZTL*, *GI*, *ELF3*, *TOC1*) új változatait hordozzák. Több éves munkánk eredményét 2006-ban közzétettük [203]. A keresés során a fent említett ismert géneken kívül egy eddig ismeretlennek ígérkező jelöltünk is akadt. A cirkadián jelleg alapján szóba jöhető ismert óragének bázissorrendjét a jelöltben meghatároztuk. Mivel nem találtunk eltérést, hozzáfogtunk a jelölt jellemzéséhez és térképezéséhez.

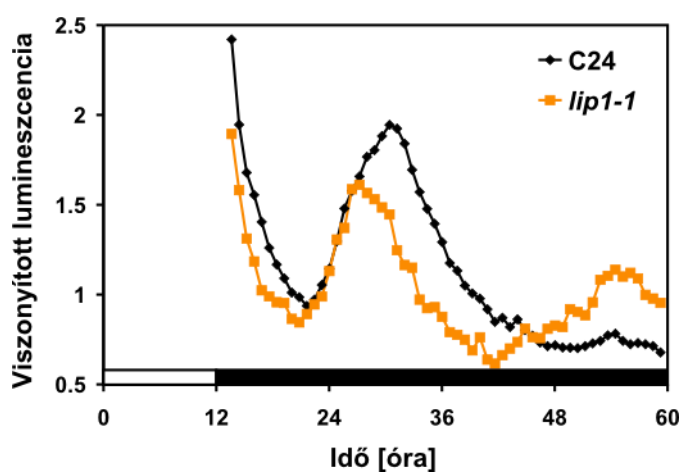
A *lip1-1* mutáns cirkadián órájának jellemzése

A LIP1 gén elrontása a cirkadián óra több független kimeneti elemére is hatással van

A cirkadián óra tanulmányozásának legkézenfekvőbb módja, ha valamely kimeneti elemének időbeli mintázatát figyeljük. Legegyszerűbb, ha ez a kimenet valamilyen szemmel látható tulajdonság, pl. a levélmozgás [33], vagy a szikalatti szár növekedése [28]. Ehhez ugyanis nincs szükség a növények genetikai módosítására, vagy megsemmisítésére. Sajnos azonban ezeket a jellegeket nem tudjuk egyszerre elég nagy számú növényen vizsgálni. Valamivel bonyolultabb az óraszabályozott gének kifejeződésének követése, de létezik ma már olyan módszer, amellyel ezt élő növényben folyamatosan lehet végezni. Ezt a módszert alkalmassá tették igen nagyszámú egyed egyszerre történő ellenőrzésére [189,200], ezért mi is ezt alkalmaztuk az elromlott órájú növények keresése során. A cirkadián óra állapotának megváltozását a *CAB2* promóter működésének nyomonkövetésével ellenőriztük. A *CAB2* gén a zöld színtestek fénybegyűjtő

fehérjeegyüttesében működő klorofill A/B-kötő fehérjét kódolja, és már régóta ismert, hogy kettős szabályozás alatt áll: kifejeződését egyrészt a fény, másrészt a cirkadián óra befolyásolja [204]. Emiatt ezt a gént sokáig modellként alkalmazták a génkifejeződés fény- és cirkadián szabályozásának vizsgálatára. Növényekben (lúdfűben) a *CAB2* promóter volt az első, amelynek kifejeződését a szentjánosbogár luciferáz enzimműködésének nyomonkövetésével vizsgálták [188]. Az elrontott cirkadián órájú növények keresésére ezt a *CAB2:LUC* jelzőgént hordozó C24 ökotípusú lúdfű vonalat használtuk fel. A növény magjait EMS-sel kezeltük, hogy véletlenszerű nukleotidcseréket hozzunk létre a génállományban (lásd: 45. oldal). A kezelt magokat földbe vetettük, majd a kinövő növények magjait betakarítottuk. A magokat MS3 táptalajon csíráztattuk, majd 7 napig 12 óra fehér fény/12 óra sötét fényviszonyok között neveltük. A 8. naptól állandó sötétben luminométerben követtük nyomon a jelzőgén kifejeződését.

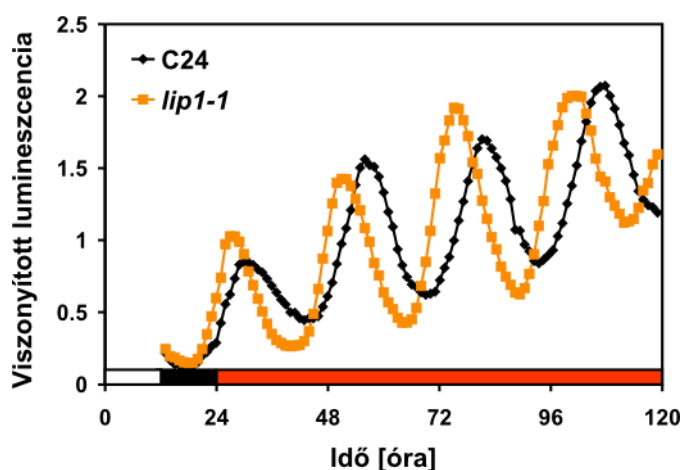
A *lip1-1*-et eredetileg korai fázisú változatként azonosítottuk a reggel kifejeződő jelzőgén folyamatos sötétben megfigyelt viselkedése alapján (7. ábra).



7. ábra. A *CAB2:LUC* jelzőgén kifejeződésének mintázata folyamatos sötétben

A növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos sötétbe helyeztük őket (fekete sáv). A jelzőgén működését sötétben csak két napig tudtuk nyomon követni, mivel a *CAB2* promóter működése fényfüggő.

A *CAB2* promóter erős fény szabályozása miatt a *CAB2:LUC* jelzőgén kifejeződése sötétben gyorsan, másfél nap alatt lecseng. Ilyen körülmények között nincs lehetőség a periódus becslésére, mivel ehhez legalább két jól mérhető csúcsra van szükség. A szabadon futó óra első csúcsának helyzetéből csak a fázist tudjuk megbecsülni. Kíváncsiak voltunk, hogy a *lip1-1*-nek fényben megváltozik-e a periódusa, ezért a C24 és *lip1-1* növényeket folyamatos vörös fényben is megmértük. A kísérletből kiderült, hogy *lip1-1* periódusa a vad háttérűhöz képest 1.5–2 órával rövidebb (8. ábra).

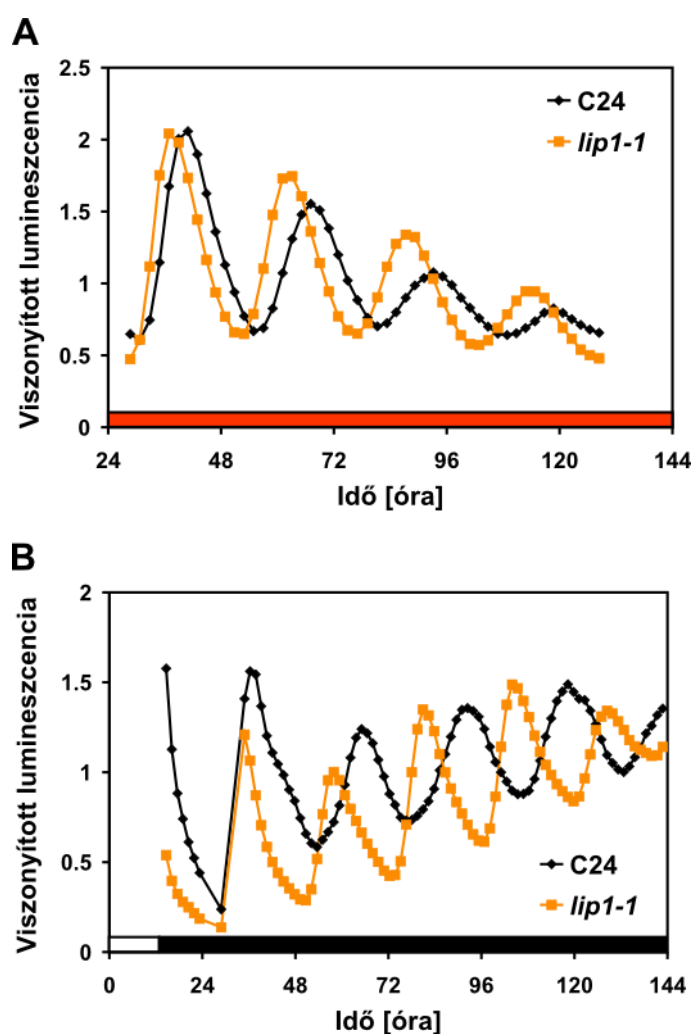


8. ábra. A *CAB2:LUC* jelzőgén kifejeződésének mintázata folyamatos vörös fényben

A növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos gyenge vörös fénybe ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) helyeztük őket. Luminométerrel a jelzőgén működését 4 napig követtük nyomon. A *lip1-1* rövid periódusa ilyen körülmények között már szembetűnő.

Ezek az eredmények azt valószínűsítették, hogy a *lip1-1*-ben sötétben megfigyelt eltérés sem korai fázis, hanem inkább rövid periódus. A folyamatos sötétben kialakuló periódus megállapításához egy olyan jelzőgénre volt szükség, amelynek kifejeződése nem fényfüggő. A *CCR2* (*COLD- AND CIRCADIAN REGULATED 2*) gén kifejeződését csak gyengén befolyásolja a fény, a *CCR2:LUC+* jelzőgén működése napokon keresztül mérhető folyamatos sötétben is [73]. További kísérletekhez ezt a mesterséges gént vittük be a *lip1-1* háttérül szolgáló C24 növényekbe. Ezekben a növényekben ugyan van már egy *CAB2:LUC* gén, mivel azonban a *LUC+* génváltozatról kb. ezerszer hatékonyabban termelődik a luciferáz enzim, így a *CCR2* promóter kifejeződési mintázata érvényesül. Innen keresztezéssel vittük át az új jelzőgént a *lip1-1* növénybe, hogy a kifejeződési szintek összehasonlíthatók legyenek.

Egy másik jelzőgén megvizsgálására nem csak a fázis-periódus kérdés eldöntése miatt volt szükség. Felmerült ugyanis annak a lehetősége is, hogy az érintett gén csak egy cirkadián mellékszabályozó kör eleme [154,205], vagy az órának egy szövetjellegzetes összetevője [206-208]. A helyzet tisztázása érdekében más cirkadián kimeneteket is megvizsgáltunk. Az este kifejeződő, újonnan bevitt *CCR2:LUC+* jelzőgén is ugyanazt a rövid periódus tünetet mutatta folyamatos vörös fényben és sötétben is, mint a *CAB2:LUC* sötétben (9. ábra).



9. ábra. A *CCR2:LUC+* jelzőgén kifejeződésének mintázata folyamatos sötétben és vörös fényben

A növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos gyenge vörös fénybe (A; $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) illetve sötétbe (B) helyeztük őket. Luminométerrel a jelzőgén működését 5 napig követtük nyomon. A javított LUC+ luciferáz sokkal erősebb fényt bocsát ki, ezért működése pontosabban és tovább mérhető. A *CCR2* gén promóterének működése nem fényfüggő, ezért sötétben is több napig nyomon követhető. Így derült ki, hogy a *lip1* jelleg valójában sötétben is rövid periódus, nem pedig korai fázis.

Egy másik, a génkifejeződéstől eltérő szinten megnyilvánuló, ugyancsak cirkadián óraszabályozott folyamat a levélmozgás [33]. A levéllemezek síkjának függőleges (a felülről érkező fénynek kitett felületet szabályozó) mozgását digitális kamera segítségével lehet nyomon követni [201]. Ezzel a módszerrel mértük meg a levélmozgás cirkadián mintázatát a *lip1-1* és a vad háttérű növényekben. A kísérlet szerint a *lip1-1*-ben a levélmozgás periódusa is rövidült.

Összefoglalásként egy táblázatban tüntettük fel a különböző cirkadián kimenetek periódusbecslését, amelyekből kiderül, hogy minden általunk vizsgált kimenet periódusa rövidebb a *lip1-1* mutánsban (3. táblázat).

Háttér	Kimenet	Körülmény	Periódus [óra]	SEM (n)
C24	<i>CCR2:LUC+</i>	Sötét	27.92	±0.24 (56)
<i>lip1-1</i>			25.11	±0.28 (55)
C24	<i>CCR2:LUC+</i>	Vörös	27.09	±0.31 (27)
<i>lip1-1</i>			25.17	±0.22 (24)
C24	<i>CAB2:LUC</i>	Vörös	28.35	±0.88 (28)
<i>lip1-1</i>			25.37	±0.26 (56)
C24	<i>CCA1:LUC+</i>	Vörös	27.16	±0.27 (23)
<i>lip1-1</i>			24.88	±0.37 (22)
C24	<i>LHY:LUC+</i>	Vörös	26.52	±0.20 (23)
<i>lip1-1</i>			24.70	±0.57 (22)
C24	Levélmozgás	Fehér	26.95	± 0.14 (22)
<i>lip1-1</i>			24.35	± 0.24 (23)

3. táblázat. Kimenetek periódusbecslése *lip1-1* és vad háttérű növényekben

A jelzőgén vizsgálatok a csíranövények cirkadián óráját 12 óra fény/12 óra sötét váltásokkal állítottuk be 7 napon keresztül, majd folyamatos sötétbe illetve vörös fénybe ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) helyeztük őket. A luciferáz működését a szubsztrát hozzáadása után luminométerben mértük 5 napon keresztül. A levélmozgást vizsgáló kísérletekben 10 napos *lip1-1* és vad háttérű csíranövények levélmozgását követtük nyomon kamerával folyamatos gyenge fehér fényben ($1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). A periódusbecslést mindkét esetben a BRASS alkalmazással végeztük.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a *LIP1* nem egy mellékszabályozó kör része, és nem is csak egy jellegzetes szövetben működik, mivel hiánya több különböző kimenetet is hasonló módon érint.

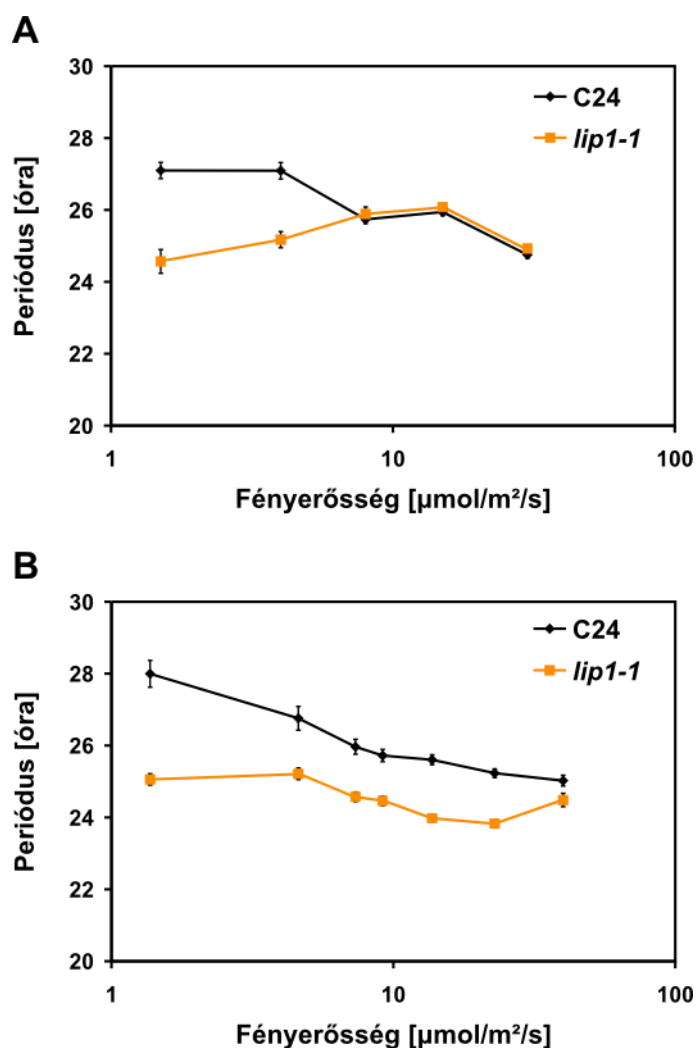
LIP1 hiányában a fény alig befolyásolja az óra periódusát

Ismert tulajdonsága a cirkadián óráknak, hogy a szabadon futó körülmények között kialakuló periódusuk függ az ezalatt alkalmazott fény erősségétől [9]. Növényekben ez a viszony általában fordított, tehát minél erősebb fényt alkalmazunk, annál rövidebb periódus alakul ki.

A LIP1 működésének fénytől való függését vizsgálándó a *CCR2:LUC+* kifejeződését mértük meg sötétben nőtt vad háttérű és *lip1-1* növényekben, amelyeket három napig 12 óra 24 °C/12 óra 18 °C hőmérsékletváltásokkal állítottunk be, majd folyamatos 22 °C-ra helyeztünk. Mind a vad háttérű növényben, mind a *lip1-1*-ben a *CCR2:LUC+* kifejeződése jól mérhetően hullámzott, de a *lip1-1*-ben statisztikailag szignifikánsan rövidebb periódussal (25.4 ± 0.1 óra [SEM]), mint a vad háttérben (27.92 ± 0.46 óra). Ez az eredmény azt mutatja, hogy a *LIP1* szükséges a megfelelő óraműködéshez olyan növényekben is, amelyek sohasem láttak fényt.

A folyamatos fényben mért periódus és az alkalmazott fény erőssége közötti fordított összefüggés miatt a fényválasz görbe (FRC, a periódus ábrázolása az alkalmazott fény erősségének függvényében) meredeksége növényekben negatív. Bizonyos esetekben azonban, például a fényérzékelésben szerepet játszó gének elromlása, vagy természetes kiválogatódás eredményeképpen az összefüggés a fény és a periódus között megváltozhat, akár meg is fordulhat (pozitív meredekségű FRC) [12].

A fényválasz görbe előállításához *CCR2:LUC+* jelzőgént kifejező vad háttérű és *lip1-1* csíranövényeket állítottunk be 12 óra fény/12 óra sötét váltásokkal egy héten keresztül, majd különböző erősségű folyamatos vörös illetve kék fénybe helyeztük őket. A kialakuló periódusokat a BRASS alkalmazással számszerűsítettük, majd a fényerősség függvényében ábrázoltuk (10. ábra). A kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a periódus a *lip1-1* növényekben kevésbé változik a teljes vizsgált fényerősség tartományban, míg a vad háttérű növényekben a periódus egyre csökken, ahogy a fényerősség növekszik. E viselkedés alapján neveztük el ezt a változatot *lip1*-nek (*LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1 = fényfüggetlen periódus 1*). Ha jobban szemügyre vesszük a vörös fényben végzett kísérlet eredményét, akkor azt is láthatjuk, hogy a görbe valójában két szakaszra osztható: az alacsonytól a közepes fényerősségig a görbe meredeksége a vad háttérűtől élesen eltérően pozitív, míg a középestől az erős tartományig a vad háttérűvel megegyezően negatív. További fontos megfigyelés, hogy közepes és erős vörös, valamint erős kék fényben a *lip1-1* periódusa megkülönböztethetetlen a vad háttérűtől. Ez a furcsa viselkedés magyarázható azzal, hogy vad háttérű növényben az erős fény a LIP1 működését valahogy gátolván LIP1-hiányos állapotot idéz elő.



10. ábra. A *CCR2:LUC+* jelzőgén periódusának fényerősségtől való függése vörös és kék fényben

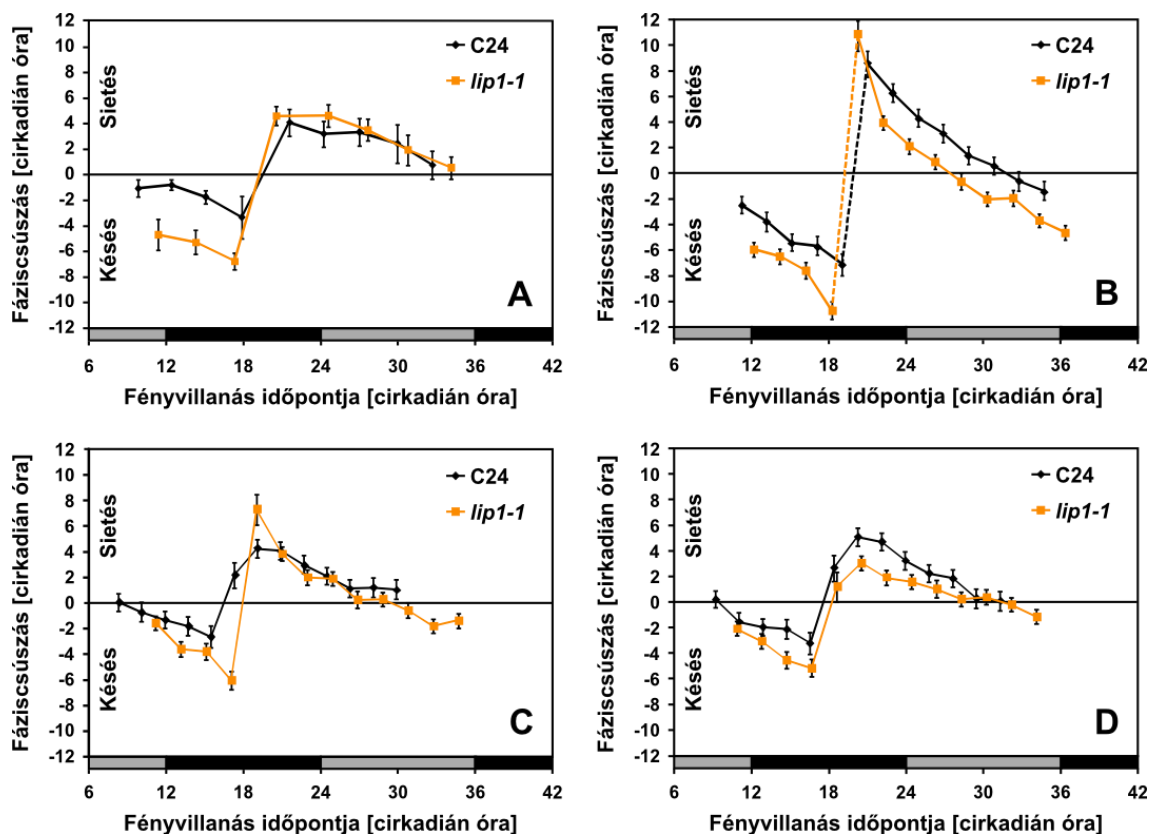
A növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd különböző erősségű folyamatos vörös (A) illetve kék (B) fénybe helyeztük őket. Luminométerrel a jelzőgén működését 5 napig követtük nyomon, az egyedi növények periódusait BRASS alkalmazással becsültük meg. A fényerősséget logaritmikus léptékben tüntettük fel.

A *lip1-1* folyamatos sötétben mért periódusa szinte megegyezik az erős fényben mértével (3. táblázat). Ez tovább erősíti azt a feltételezést, hogy a *lip1-1* mutánsban a fénynek nincs jelentős hatása az óra sebességére, az sötétben is úgy működik, mintha erős fényben lenne.

A LIP1 hatása az órabeállításra kora este a legkifejezettebb

A fény nem csak a periódus finomhangolásához szükséges, hanem a napenkénti órabeállításhoz is. A cirkadián óra a nap egy bizonyos szakára korlátozza a saját beállítathatóságát, legfőképpen a napfelkelte vagy a naplemente környékére. Ekkor legnagyobb ugyanis a fényerősség változása, ami egy jó tájékozódási pont a beállításhoz. Érzékenységének időzítését az óra saját bemeneti elemeinek cirkadián szabályozásával oldja meg [19,138,209]. Megvizsgálandó, hogy a *lip1-1* mutánsban ez a képesség meg-

változott-e, végigellenőriztük az óra beállíthatóságát egy teljes cirkadián körön át. Folyamatos sötétbe kiengedett csíranövényeket 3 óránként adott 1 órás vörös, kék, illetve távoli vörös fényvillanásokkal kezeltünk. Miután cirkadián időbe átszámoltuk (lásd: [62. oldal](#)), a fáziscsúszásokat a fényvillanások idejének függvényében ábrázoltuk. Így kaptuk meg az ún. fázisválasz görbéket (PRC) ([11. ábra](#)).



11. ábra. A cirkadián óra beállíthatóságának vizsgálata fényvillanásokkal

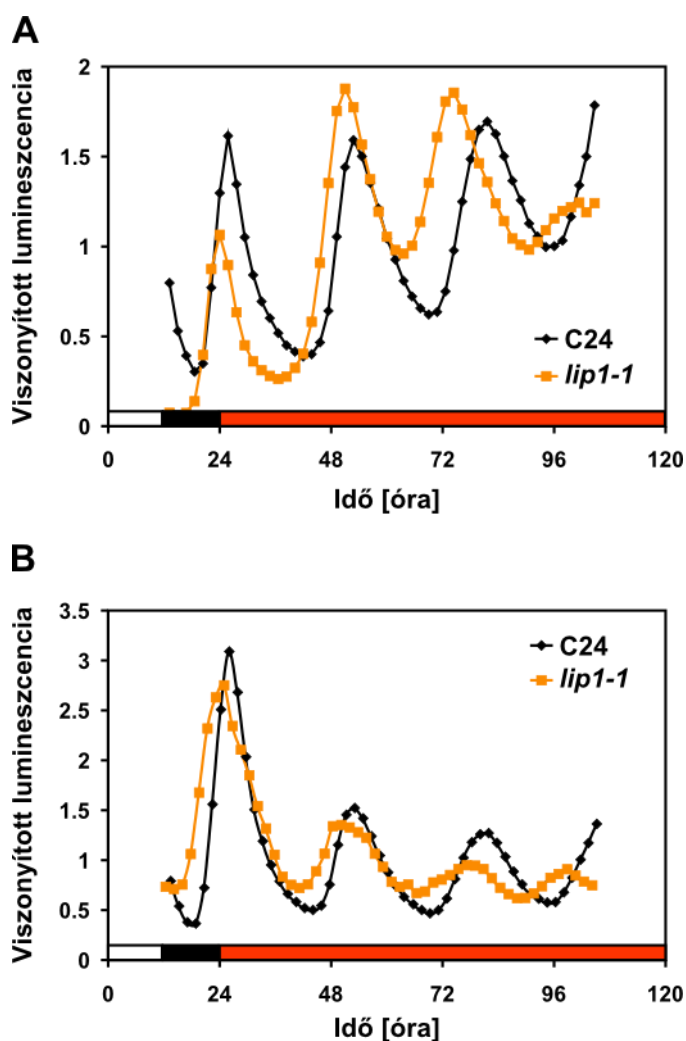
A *CCR2:LUC+* jelzőgént hordozó növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos sötétbe helyeztük őket. Ezután 3 óránként 1 órás, ugyanolyan erősségű fényvillanásokat kaptak. A villanások által kiváltott fáziscsúszást a villanás időpontjának függvényében ábrázoltuk. Az értékek számolásának és feltüntetésének módját lásd a [62. oldalon](#). A növényeket a következő színű és erősségű fényvillanásokkal kezeltük: (A) közepes vörös ($18 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$); (B) erős vörös ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$); (C) kék ($15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$); (D) távoli vörös ($15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). A fáziscsúszásokat és a fényvillanások idejét az összehasonlíthatóság miatt 24 órára viszonyítva adtuk meg (cirkadián idő). A szürke sávok az időtengelyen a névleges nappalt jelölik.

A PRC-k összehasonlításából kiderült, hogy a *lip1-1* sokkal érzékenyebb a késést, mint a sietést kiváltó villanásokra: a *lip1-1* PRC-je torzul. A vad háttérű növények PRC-je is általában aránytalan, de éppen fordított módon; ezekben ugyanakkora fényvillanásokkal sietést lehet inkább kiváltani. A *lip1-1* mutáns és a vad háttérű között a legnagyobb különbség tehát a névleges éjszaka első felében (a késéseket kiváltó szakaszban) figyelhető meg. A LIP1 ezért feltételezhetően csak ebben a napszakban működik, amely jelenség a LIP1 működésének cirkadián óra általi korlátozásával magyarázható.

A LIP1 fehérje elsődleges szerepe nem a központi óraelemek RNS-szintű szabályozása

A jelenlegi modell szerint a növényi cirkadián óra lelke az óragének mRNS-ének átírásán és lefordításán alapuló visszacsatolási kör. Az elmélet szerint az óragének mRNS szintjének változása szükséges a hullámmintázat létrehozásához és a fázisbeállításhoz egyaránt. Az mRNS szintek elrontásának eszerint hatással kellene lennie a periódusra és a beállíthatóságra is. Számos olyan kísérleti eredmény létezik azonban, amelyek szerint az mRNS szintű szabályozás nem lényeges a hullámmintázat létrehozása szempontjából, hanem csak kiegészítő szerepe lehet. Egyre több olyan óraelemet azonosítanak, amelyek nem mRNS szinten befolyásolják az óra működését. A jelenlegi háromhurkos modell szerint ha az egyik hurkot elrontjuk, az nem állítja meg az órát, mert a többi hurok valamilyen szinten továbbra is képes mozgásban tartani. Az mRNS szintekben megfigyelhető torzulások azonban jellemzőek lehetnek egy-egy hurokra, így egy elrontott génről jó eséllyel meg tudjuk mondani, hogy melyik hurok működésében vesz részt.

Annak kiderítésére, hogy milyen hatással van a LIP1 a központi óraelemek mRNS mintázatára, megvizsgáltuk a reggeli *CCA1/LHY* és az esti *TOC1* időbeli kifejeződését. A *CCA1:LUC+* és az *LHY:LUC+* jelzőgének (promóterműködés) periódusát vad háttérű és *lip1-1* csíranövényekben folyamatos gyenge vörös fényben ellenőriztük. Azt találtuk, hogy a harmadik napra a *lip1-1* növényekben a jellegzetes rövid periódus tünet mindkét gén mintázatában nyilvánvalóvá vált, de az átlagos szint nem változott (12. ábra).



12. ábra. A *CCA1:LUC+* és *LHY:LUC+* jelzőgének kifejeződési mintázata folyamatos vörös fényben

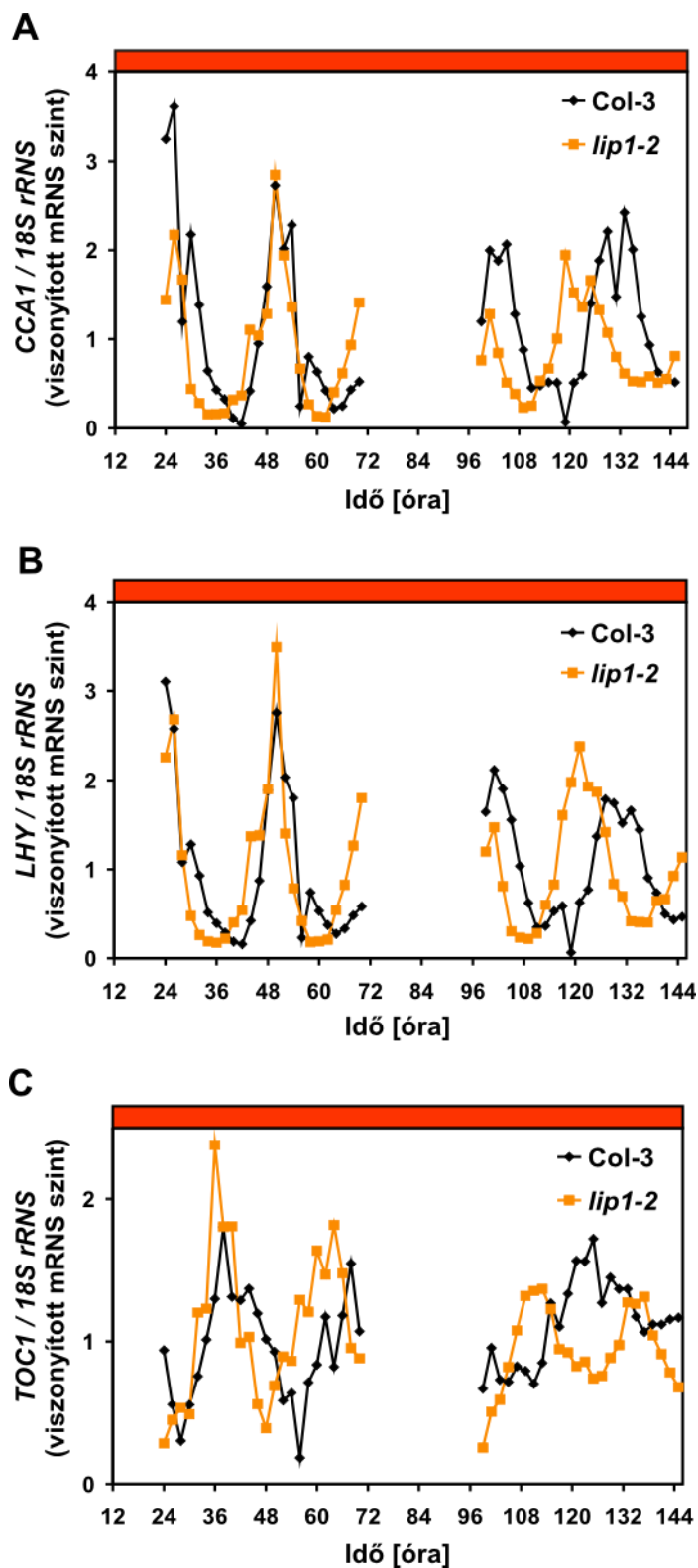
A növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos gyenge vörös fénybe ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) helyeztük őket. Luminométerrel a jelzőgén működését 4 napig követtük nyomon.

(A) *CCA1:LUC+* jelzőgén

(B) *LHY:LUC+* jelzőgén

A *CCA1*, *LHY* és a *TOC1* egyensúlyi mRNS szintjének hullámzó változását a *lip1-2* mutánsban (a *lip1* T-DNS beépüléssel működésképtelen változata Col-3 háttérben) mértük meg a jelzőgén kísérlettel megegyező körülmények között Northern blot módszerrel. Ebből a kísérletből kiderült, hogy noha a *lip1-2*-ben a periódus vártnak megfelelően rövidebb, sem a reggeli, sem az esti kifejeződésű központi óragének átlagos mRNS szintje nem változik ilyen körülmények között (13. ábra).

Ugyanezen gének egyensúlyi mRNS szintjét váltakozó fény/sötét körülmények között nőtt csíranövényekben is megmértük folyamatosan mért PCR segítségével. A 14. ábra tanúsága szerint a *CCA1* és az *LHY* génekről termelődő mRNS szintje összemérhető a vad háttérű és a *lip1-1* növényekben, a *TOC1* mRNS szintje azonban jelentősen csökkent a *lip1-1* mutánsban a vad háttérűhöz képest.



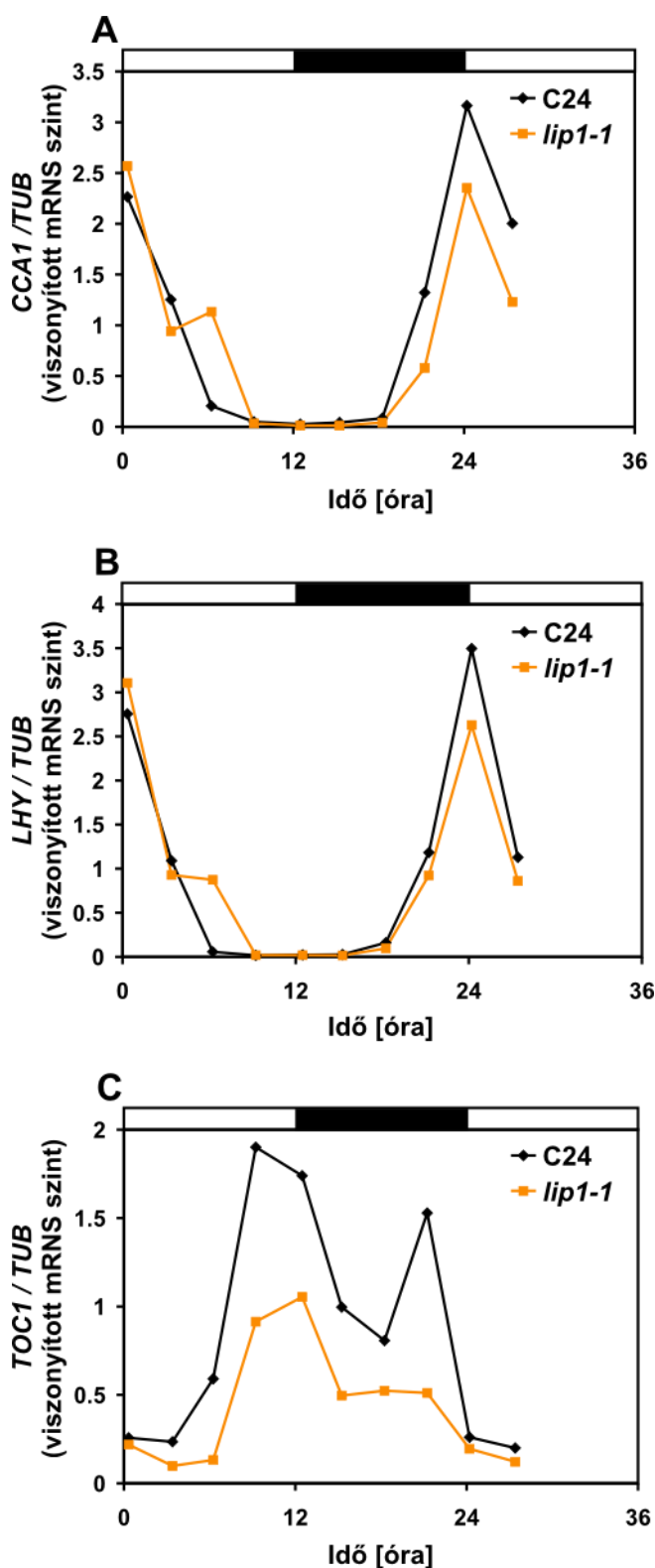
13. ábra. A cirkadián óragének mRNS-szintjének mintázata folyamatos vörös fényben

A Col-3 háttérű *lip1-2* és a megfelelő vad háttérű növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos gyenge vörös fénybe ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) helyeztük őket. 2 óránként mintát vettünk belőlük, amelyekből össz-RNS-t tisztítottunk. A központi óragének mRNS-szintjét Northern blot módszerrel határoztuk meg, az értékeket a *18S rRNS* szintjéhez viszonyítva ábráztuk. A következő központi óragének szintjét mértük meg:

(A) *CCA1* (reggeli gén)

(B) *LHY* (reggeli gén)

(C) *TOC1* (esti gén)



14. ábra. A központi óragének mRNS szintjének időbeli alakulása váltakozó fényviszonyok között

A növényeket 12 óra sötét/12 óra gyenge fehér fény ($4 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 9 napig, közben 3 óránként mintát vettünk belőlük, amelyekből össz-RNS-t tisztítottunk. A központi óragének mRNS-szintjét valós időben mért PCR segítségével határoztuk meg, az értékeket a *TUBULIN* mRNS szintjéhez viszonyítva ábrázoltuk.

(A) *CCA1* (reggeli gén)

(B) *LHY* (reggeli gén)

(C) *TOC1* (esti gén)

A *lip1-1* mutáns egyéb jellemzői

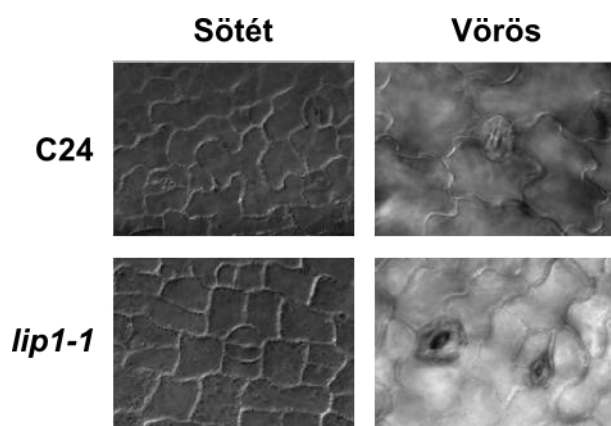
A lip1-1 vörös és kék fényben hibásan fejlődik

A cirkadián jelleg vizsgálata során a folyamatos vörös fénybe kiengedett növényeken vettük észre, hogy a *lip1-1*-nek rövidebb a szikalatti szára, ami a fényfejlődés hibájára utalt. Mivel a szikalatti szár megnyúlásának ütemét a cirkadián óra is szabályozza, ezért számos cirkadián óragén elrontása egyben a szikalatti szár hosszát is megváltoztatja [28]. Kiderítendő, hogy melyik fényérzékelő jelátviteli út zavarával állunk szemben a *lip1-1* esetében, megmértük a C24 és a *lip1-1* szikalatti szárának hosszát különböző színű és erősségű fényben (16. ábra).

A kísérletek szerint a *lip1-1* szikalatti szárának hossza vörös és kék fényben változik meg, a távoli vörös fénytől függő jelátviteli út érintetlen. Szembetűnő, hogy a periódussal ellentétben a szikalatti szárhossz erős fényben is nagyjából annyira különbözik a két változatban, mint gyenge fényben. További lényeges eltérésre utal a periódus és a szikalatti szár megnyúlásának szabályozásában az is, hogy sötétben a vad háttérű és a *lip1-1* növények szikalatti szárának hossza nem különbözik.

A fényben nőtt lip1-1 sejtjeinek alakja eltérő

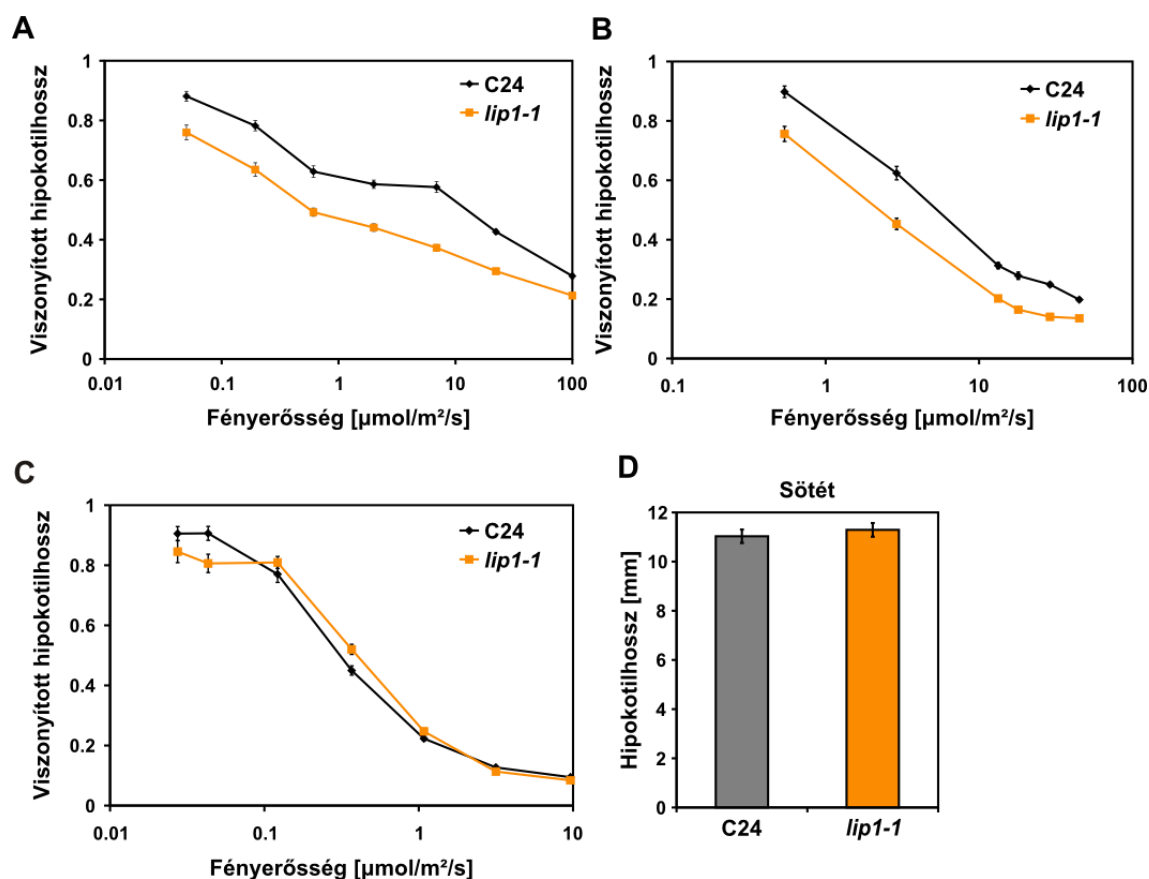
A fény és a cirkadián óra a szikalatti szárhossz megnyúlását a csúcsi osztódószövet működésén, illetve a képződő sejtek irányított növekedésén keresztül szabályozza. A sejtek állapotát megvizsgálandó, 4 napos, vörös fényben ($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), illetve sötétben nőtt C24 és a *lip1-1* csíranövények szikalatti szárának bőrszöveti sejtjeit mikroszkóp alatt ellenőriztük (15. ábra).



15. ábra. A fényben nőtt *lip1-1* szikalatti szárának bőrszöveti sejtjei eltérő alakúak és méretűek

4 napos, sötétben és vörös fényben ($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) nőtt vad háttérű C24 és *lip1-1* csíranövények sejtjeinek állapotát ellenőriztük fénymikroszkóppal

A vizsgálatok érdekes eredményre vezettek. A *lip1-1* csíranövények bőrszöveti sejtjeinek alakja jellegzetes módon eltér a C24-étől. Nem alakul ki a vad háttérre oly jellemző karéjos sejtalak. A fényben nőtt *lip1-1* sejtjeinek mérete is kisebb, és hasonló a sötétben megfigyeltéhez.



16. ábra. A szikalatti szárhossz fényerősség-függése vörös, kék, és távoli vörös fényben

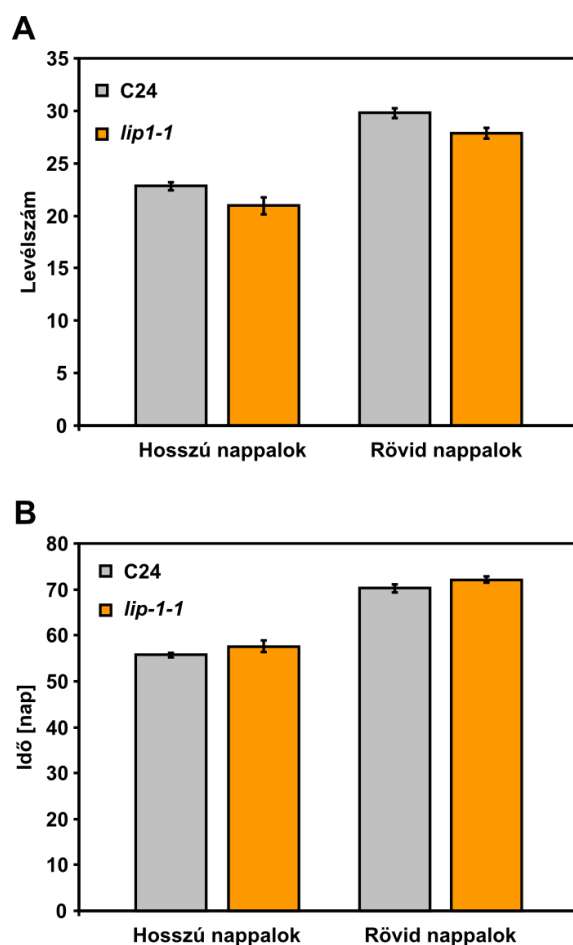
A növényeket nedves szűrőpapíron csíráztattuk és 4 napig neveltük különböző színű és erősségű fényben, állandó hőmérsékleten (22 °C). Ezután a növénykéket egyenként 1%-os agar lemezre fektettük, minden vonalból legalább 50 egyed. Miután lefényképeztük őket, számítógépes alkalmazással megmértük szikalatti száraik hosszát. Az értékeket a vonal saját, sötétben mért hosszára vonatkoztattuk, hogy csak a fényfüggő különbségeket lássuk. A kapott viszonyított értékeket az alkalmazott fényerősség függvényében, logaritmusos léptékben ábráztuk. A *lip1-1* és a vad háttérű növények szikalatti szárának megnyúlása fényfüggő módon különbözik vörös (A) és kék (B) fényben, azonban a távoli vörös (C) fénytől függő jelátviteli út érintetlennek látszik. Nincs különbség a két változat sötétben mért hosszában sem (D), ami éles ellentétben áll a cirkadián periódus sötétben megfigyelt eltéréseivel.

A lekerekített sejtalak a sejtfalmenti aktin- és tubulinhálózatot szervező ROP GTPázok működésének zavarára emlékeztet [210]. A sejtek kirakósjáték alakjának létrejöttéhez két egymást kölcsönösen gátló folyamatnak, a kidudorodás engedésének és gátlásának helyi, valamint sejtközi összehangolására van szükség, amelyben központi szerepet játszik a ROP2 GTPáz [170,211]. Ha ezt a finom egyensúlyt bármilyen módon megzavarjuk, pl. elrontott GTPázokat termeltetünk, vagy vegyszerrel megbontjuk az aktinhálózatot, a sejtek lekerekítettek lesznek. A *lip1-1* sejtjeinek lekerekített alakja arra utal, hogy az aktin- és/vagy a tubulinhálózat valamilyen módon sérült ebben a változatban. Mivel ez a jelleg sötétben is megfigyelhető, arra következtethetünk, hogy a LIP1 szerepe ebben a folyamatban nem fényfüggő.

A LIP1 gén elrontása nem befolyásolja a virágzási időt

A cirkadián óra egyik legismertebb szerepe az évszakok érzékelése, és az ehhez kapcsolódó élettani folyamatok szabályozása. A hosszúnappalos lúdfű virágzásának megfelelő időzítését a cirkadián óra és a külső környezeti jelek összehangolása biztosítja. A cirkadián óraelemek elrontása ezért általában együttjár a virágzási idő nappalhosszúságtól való függetlenedésével [212].

Megvizsgáltuk, hogy a *lip1-1*-ben zavart szenvedett-e a virágzási idő nappalhosszúság-függése. A növényeket nevelőkamrában rövid- (8 óra fehér fény, 16 óra sötét) illetve hosszúnappalos (16 óra fehér fény, 8 óra sötét) körülmények között neveltük. A virágzási időt kétféleképpen határoztuk meg (lásd: 63. oldal). Az eredmények azt mutatják, hogy ilyen kísérleti körülmények között nem mutatható ki semmilyen különbség a *lip1-1* és a vad háttérű C24 virágzási idejében (17. ábra).



17. ábra. A virágzási idő nem változott meg a *lip1-1*-ben

A C24 és a *lip1-1* növényeket nevelőkamrában neveltük rövid- (8 óra fehér fény [60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$]/16 óra sötét) illetve hosszúnappalos (16 óra fény/8 óra sötét) körülmények között, állandó 22 °C-on. A virágzás idejét kétféleképpen mértük:

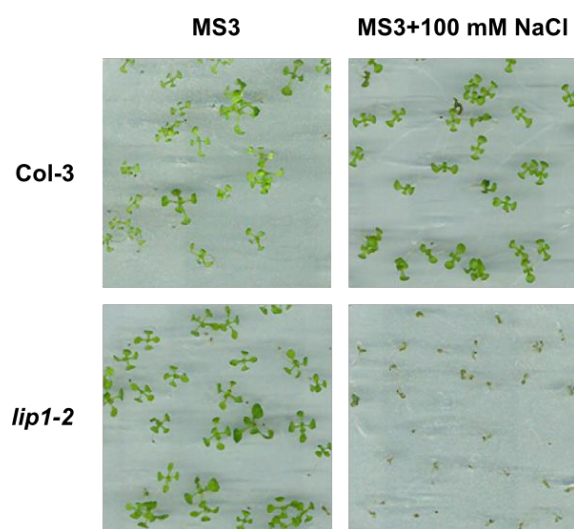
(A) A tőlevélrózsa leveleinek száma az 1 cm-es virágzati tengely megjelenéséig.

(B) Az eltelt idő az 1 cm-es virágzati tengely megjelenéséig napokban.

A *lip1-1* növény sóérzékeny

A cirkadián óra és a stresszválasz kapcsolatát is szeretnénk volna feltérképezni a *lip1* mutánsban, ezért elvégeztünk egy egyszerű kísérletet. Ezt a kísérletet a *lip1-1*-gyel és a *lip1-2*-vel is elvégeztük, hasonló eredménnyel. Itt az utóbbival kapott eredményeket mutatjuk be, mert ezek látványosabbak. Ennek oka lehet az, hogy feltételezésünk szerint a *lip1-2* egy olyan változat, amelyben nem csak a *LIP1*, hanem a *LIP2* (a *LIP1*-hez hasonló gén) sem működik (a magyarázatot lásd az [84. oldalon](#)). A *lip1-2*-nek a cirkadián jellege is erősebb.

A növényeket MS3 illetve 100 mM NaCl-dal kiegészített MS3 táptalajon csíráztattuk és neveltük 10 napon keresztül. Ez a sótöménység még nem gátolja észrevehetően a vad háttérű Col-3 növények csírázását és fejlődését, de a *lip1-2*-ét igen ([18. ábra](#)).



18. ábra. A *lip1-2* sóérzékeny

A kísérlethez a *lip1-2* mutánsot és a megfelelő vad háttérű növényt (Col-3) használtuk, mert a jelenség ebben a változatban látványosabb (a lehetséges okokat lásd a szövegben). A növényeket MS3 illetve 100 mM NaCl-dal kiegészített MS3 táptalajon csíráztattuk és neveltük 10 napon keresztül. Ez a sötöttség még nem gátolja a vad háttérű növények csírázását, ellentétben a *lip1-2*-jével, amelyek egyáltalán nem csíráznak.

A *LIP1* gén leírása

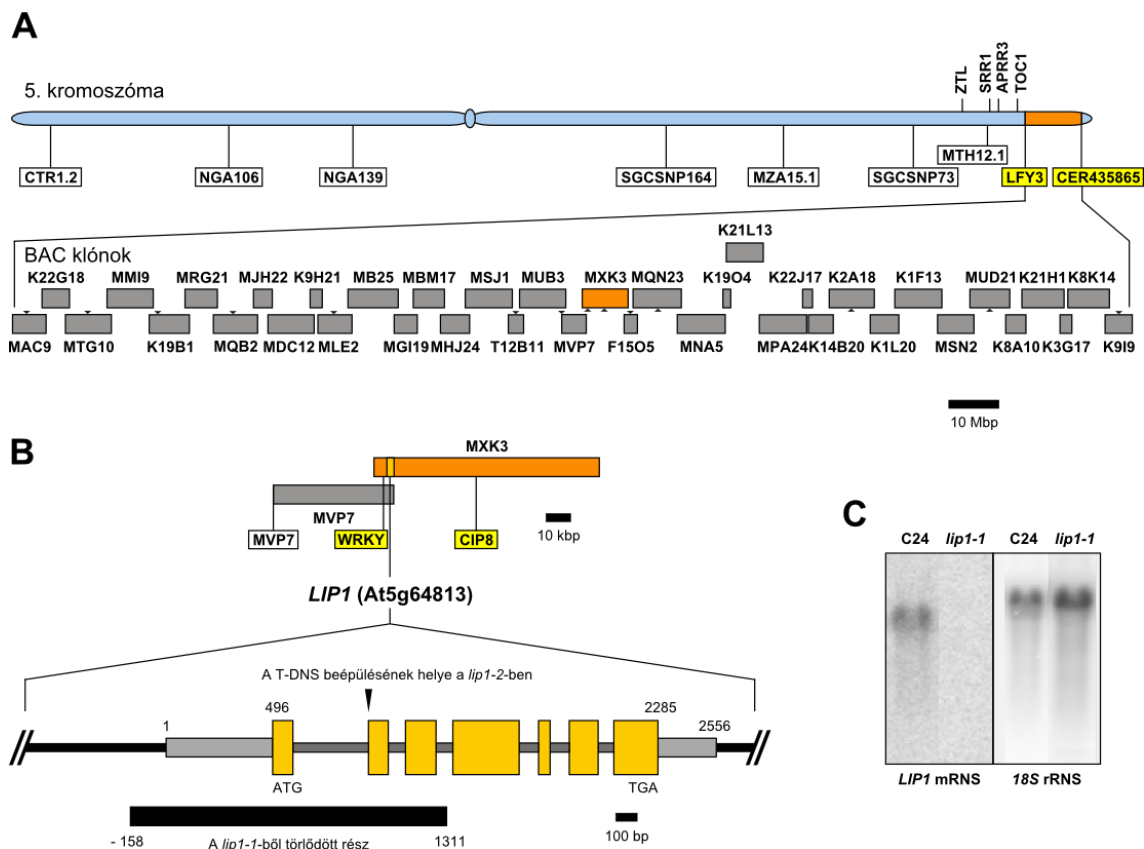
A lip1-1 mutáns genetikai térképezése és a megváltozott jelleg helyreállítása

A *lip1-1* mutáns genetikai térképezésének részleteit, módszertanát az *Anyagok és módszerek* fejezet [Genetikai térképezés](#) részében írtam le. A térképezés eredménye összefoglalva a következő: durvatérképezéssel a jelölt gén helyét sikerült az 5. kromoszóma alsó karjának végére behatárolni (SGCSNP73 és CER435865 közé). Mivel ebben a tartományban több ismert cirkadián óragén (*ZTL*, *SRR1*, *PRR3*, *TOC1*) található, ezért ezeknek a géneknek a bázissorrendjét mind a *lip1-1*, mind a C24 növényben meghatároztuk. Nem találtunk eltérést, ezért folytattuk a térképezést. Kb. 200 növény segítségével meghatároztuk a *LIP1* gént közrefogó, egymástól ~300 kb-ra elhelyezkedő két molekuláris tájékozódási pontot (LFY3 és CER435865). Ezután újabb ~2 000 db, cirkadián jellegük alapján nem előválogatott növényben határoztuk meg a tájékozódási pontok mintázatát. Azokat tartottuk meg, amelyekben a két pont mintázata eltért, tehát köztük valahol a kromoszómán átkereszteződés történt (az összes növény ~5%-a). A mintázatváltó növényeknek meghatároztuk a cirkadián jellegét. Ezzel párhuzamosan a LFY3 és CER435865 közötti szakaszra egyenletesen elosztva 12 újabb molekuláris tájékozódási pontot terveztünk, és megállapítottuk a mintázatukat. Minden egyes növény cirkadián jellegét összevetettük tájékozódási pontjaik mintázatával,

és így a *LIP1* gént tartalmazó szakaszt végül sikerült leszűkítenünk 29.4 kb-ra, a *WRKY* és a *CIP8* pontok közé. Ezt a szakaszt PCR-rel 3 darabban sokszorosítottuk, majd klónoztuk. A DNS-darabok bázissorrendjének meghatározásával kiderült, hogy a *LIP1* azonos az *At5g64813* jelű génnel, és hogy a *lip1-1* mutánsban a gén kódoló részének első fele a promóter egy részével együtt (összesen 1 469 bp) hiányzik (19. ábra).

Bizonyítandó, hogy a megtalált gén felelős a *lip1* tünetegyüttesért, megkíséreltük az elváltozott cirkadián jelleg helyreállítását mesterségesen létrehozott, majd a *lip1-1*-be visszavitt vad háttérű *LIP1* gént tartalmazó génépítményekkel. A *LIP1* gén kódoló részét a pPCV növényi kétgazdás vektorban *LIP1* illetve *35S* promóterek mögé varrtuk be, és a nopalin szintáz gén 3' le nem fordítódó végével zártuk le. Olyan génépítmény is készült, amelyben a *LIP1* gén elé a megfelelő leolvasási keretben egy YFP-t kódoló gént is toldottunk, hogy a későbbiekben így tudjuk nyomon követni a YFP-*LIP1* fehérje mozgását a sejten belül. Az említett génépítményeket *lip1-1* növényekbe vittük be, majd az idegen gént homozigóta formában hordozóknak meghatároztuk a cirkadián jellegét. A *lip1-1* tünetegyüttes sikeres gyógyítása a *35S* vagy a *LIP1* promóter által szabályozottan termelődő YFP-*LIP1* fehérjével megerősítette a térképezés eredményét (20. ábra).

Érdekes volt azonban, hogy nem sikerült ellenkező cirkadián jellegű (hosszú periódusú) egyedeket találnunk, még a *35S* promóterrel *LIP1*-et egyenletesen túltermelő vonalakban sem. Ez arra utalt, hogy a *LIP1* működésében nem játszik túl nagy szerepet saját mRNS szintjének változása, és hogy a működőképes *LIP1*-nek az RNS-szint feletti másodlagos módosításra van szüksége.

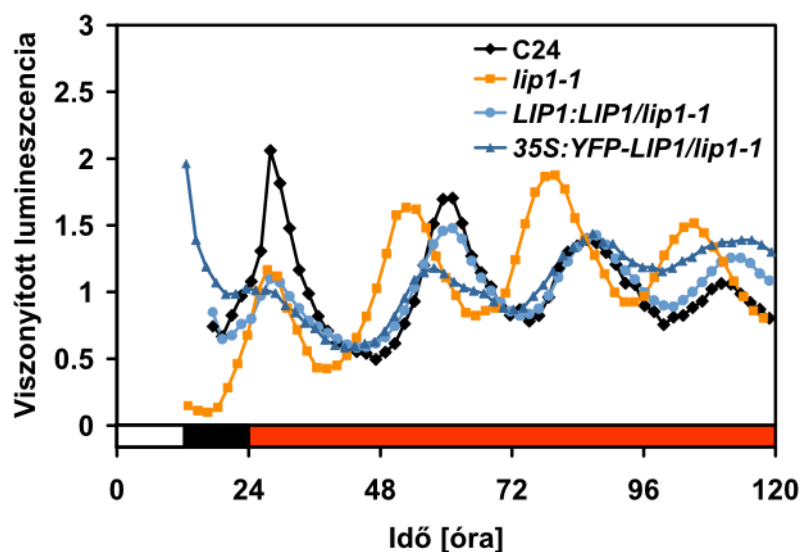


19. ábra. A LIP1 gén genetikai térképezése és azonosítása

(A) A *lip1-1* genetikai térképezésének eredményeként a *LIP1* gén helyét az 5-ös kromoszóma alsó karjára, az MVP7 és az MXK3 BAC-ok által lefedett szakaszra sikerült behatárolni. A keretes címkék a durvatérképezés során alkalmazott genetikai tájékozódási pontokat jelölik. Amint megállapítottuk, hogy génünk az SGCSNP73 és a CER435865 pontok között található, azonnal meghatároztuk az itt elhelyezkedő ismert cirkadián óragének (ZTL, SRR1, APRR3, TOC1) bázissorrendjét. Eltérést nem találván folytattuk a térképezést. A kis háromszögek a nagy felbontású térképezés tájékozódási pontjainak helyét jelölik.

(B) A nagy felbontású térképezés eredményeként a kérdéses szakaszt a WRKY és a CIP8 pontok közé sikerült leszűkítenünk. Meghatároztuk az MXK3 BAC e két pont közé eső szakaszának bázissorrendjét a *lip1-1* és a C24 növényekben. Ennek eredményeképpen kiderült, hogy a *lip1-1*-ben egy 1469 bp-nyi darab kiesett a At5g64813 jelű gén elejéből. Eredményeink igazolásához egy független, T-DNS beépüléses (Col-3 háttérű) változatot szereztünk a Syngenta cégtől (SAIL_1157_A08; *lip1-2*). A világosszürke téglalapok az mRNS le nem fordítódó szabályozórészeit, a sárgák az exonokat, a sötétszürkék az intronokat jelölik.

(C) Megvizsgáltuk, hogy a *lip1-1*-ben kifejeződik-e valamilyen *LIP1*-szerű mRNS. Northern blot módszerrel nem találtunk *LIP1* mRNS-t a *lip1-1* mutánsban.



20. ábra. A *lip1* tünetegyüttes gyógyítása mesterséges *LIP1* génépítményekkel

Bizonyítandó hogy a megtalált gén felelős a *lip1-1* rövid periódus tünetéért, mesterséges *LIP1* génépítményeket jutattunk vissza *lip1-1* növényekbe. Ehhez a *LIP1* gén megszakítatlan kódoló részét a *LIP1* illetve az egyenletesen magas kifejeződést biztosító víruseredetű *35S* promóter mögé varrtuk be. Az utóbbi változatban a *LIP1* kódoló rész elé még az YFP fehérjét kódoló gént is beillesztettük oly módon, hogy az így keletkező génről egy mesterséges, fluoreszcensen jelölt YFP-LIP1 fehérje képződjék. Ennek segítségével tudtuk később megállapítani a *LIP1* fehérje sejten belüli elhelyezkedését. A növényeket 12 óra fény/12 óra fehér fény váltásokkal beállítottuk, majd folyamatos gyenge vörös fénybe ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) helyeztük őket. A *CAB2:LUC* jelzőgén jelét 4 napon át követtük nyomon luminométerben

A LIP1 gén egy különleges, csak a magas növényekre jellemző kis GTP-kötő fehérjét kódol

A *LIP1* gén teljes bázissorrendjét összehasonlítva a RIKEN cégtől vásárolt teljes hosszúságú cDNS bázissorrendjével bebizonyosodott, hogy az adatbázisban szereplő At5g64813 gén feltételezett szerkezete megfelel a valóságnak. A *LIP1* gén által kódolt polipeptidhez hasonló aminosavsorrendű elemeket kerestünk a lúdfű elméletileg létező fehérjéinek adatbázisában. Kiderült, hogy a *LIP1* fehérje nagyon hasonlít a kis molekulatömegű GTPázokra, de azoktól nem csak méretében, hanem aminosavsorrendjében is eltér. Valószínűleg ezért sem szerepel a lúdfű kis GTPázait tartalmazó jegyzékben [213]. Lúdfűben a *LIP1* jellegzetes eltéréseit magán viselő kis GTPáz-szerű fehérjéből mindössze kettő van. A *LIP1* után a másik fehérjét, amelyet az

At5g09910 jelű feltételezett gén kódol LIP2-nek neveztük el. Míg a *LIP1* gén bizonyítottan kifejeződik növényben (számtalan kísérletből származó EST és génlapka adatbázis szerint), addig a *LIP2*-ről semmiféle adat nem állt rendelkezésre. Ebből arra következtettünk, hogy a *LIP2* – legalábbis a Columbia háttérben, amelyből az adatok többsége származik – feltehetőleg nem fejeződik ki, vagy kifejeződése alacsony szintű, esetleg erősen szövet- ill. fejlődésjellegzetes (pl. pollen, mag, osztódószövet, stb.). Ez lehet az oka annak, hogy nem található meg cDNS könyvtárakban és génlapkákban.

A *LIP1* és a *LIP2* gén bázissorrendjét a C24 háttérű növényeken kívül meghatároztuk még Wassilevskija (Ws), Landsberg erecta (Ler), Cape verde island (Cvi) és Nossen (No) ökotípusokban is. A *LIP1* aminosavsorrendje megegyezik a Col, C24, Ws, Cvi és a No ökotípusban, de a Ler két ponton is különbözik ezektől (T_{170I} és F_{270I}). A *LIP2* fehérjében is van különbség a természetes változatok között (C24, Ws, Ler, Cvi, No: F_{226I}; C24, Ws, No: V_{133I}). Megemlítenéd, hogy a legtöbb esetben az eltérés hasonló aminosavakat eredményez, vagy nem megőrződött helyeken található, addig a *LIP2* Col változatának F_{226I} cseréje egy fontosnak tűnő aminosavat változtat meg lényegesen. Elképzelhető ezért, hogy a Col változatban a *LIP2* fehérje nem működik.

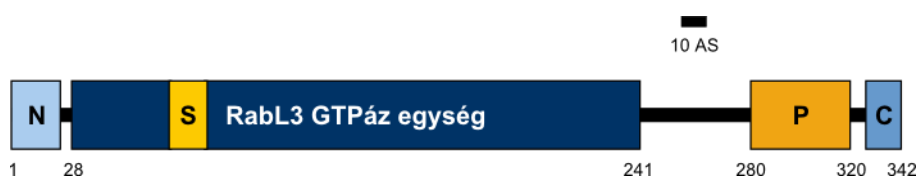
Miután a lúdfűben csak két *LIP1*-szerű fehérjét találtunk, kíváncsiak voltunk arra, hogy az élővilág egyéb csoportjaiban megvan-e ez a különleges GTPáz. A *LIP1* fehérje aminosavsorrendjével TBLASTN és PHI-BLAST eljárással keresgáltunk az NCBI nukleotid és fehérje adatbázisaiban. A találatokból megállapítottuk, hogy *LIP1*-szerű molekulák csak a magvas növényekben (Spermatophyta) fordulnak elő; nincsenek prokariótákban, állatokban, gombákban, moszatokban, de mohákban, harasztokban sem. Érdekes módon azonban mindegyik fajban csak egy vagy két különböző *LIP*-molekula van. A különböző élőlénycsoportok *LIP*-szerű fehérjéi nagyon hasonlóak, a törzsfelődés során alig változtak. Ez arra enged következtetni, hogy ezek a molekulák fontos szerepet játszanak a magvas növények életében.

A *LIP1* fehérje jellemzése

*A *LIP1* fehérje aminosavsorrendjének számítógépes elemzése*

Melyek azok a tulajdonságok, amelyek a *LIP1*-et különlegessé teszik a GTPázok körében? Mint azt a GTPázokról szóló fejezetben is bemutattam, a RAS nagycsaládba tarto-

zó kis GTPázok többsége alig nagyobb magánál a központi GTPáz egységnél, amely általában 200–250 aminosav hosszúságú és alcsaládokra jellemző szerkezetű. A LIP1 központi GTPáz egysége nem hasonlít a hagyományos (RAS, RAB, RHO, RAN, ARF, SAR) kis GTPázokéra. Egyes mintázatai a RAB-családra jellemzők, míg mások egyéb családokhoz teszik hasonlatossá. A hagyományos RAS-jellegű kis GTPázok mellett egyre több furcsa szerkezetű GTPázról írnak le. A LIP1 GTPáz egysége egy ilyen újonnan felfedezett, a RABL3 (RAB-like3) fehérjéről elnevezett család GTPáz egységére hasonlít (21. ábra).



21. ábra. A LIP1 fehérje vázlatos szerkezete

A RAB-like3 jellegű központi GTPáz egység a molekula kétharmadát teszi ki. Tartalmazza az összes GTP-kötéshez és hasításhoz szükséges mintázatot a LIP1-re jellemző kiegészítésekkel: például egy szeringazdag részlet szakítja meg a GTPáz egységet a célfehérjét kötő, a GTP-kötéskor és bontáskor térben leginkább átrendeződő szakaszok között. A katalitikus glutamin helyett egy jellegzetes GHERY-mintázatban elhelyezkedő hisztidin található. Az N és C az egyedi amino- és karboxi-végi mintázatokat, a P pedig egy prolingazdag egységet jelöl, amely feltételezhetően fehérje-fehérje kölcsönhatásért felelős. A kis fekete téglalap 10 aminosav hosszúságot jelöl.

Ezek a fehérjék leginkább a RAB család tagjaira emlékeztetnek, de számos fontos aminosav hiányzik belőlük és nem rendelkeznek karboxi-végi prenilálási mintázattal sem. Élettani szerepük nem ismert. Ezen a csoporton belül a növényi LIP1-szerű molekulák jól elkülöníthető alcsoportot képviselnek.

A LIP1 fehérjéket a BioEdit alkalmazásba épített ClustalW eljárással egymás alá rendeztük, hogy meg tudjuk állapítani a megőrződött aminosavakat, fehérjemintázatokat. Ezáltal meg tudjuk becsülni, melyek azok a részletek, amelyek a működés szempontjából fontosak lehetnek.

A LIP1-szerű molekulák legfeltűnőbb sajátossága, hogy a GTPáz egység mindkét végéhez todalékok kapcsolódnak. Az amino végi todalék a nyitvatermők és a kétszikűek LIP1-szerű molekuláiban egy jellegzetes, váltakozóan savas és bázikus aminosavakból

(RERERE) felépülő α -csavarból áll (molekulamodellálás alapján), míg ugyanez a szakasz az egyszikűekben glicingazdag, rendezetlen szerkezetű.

A LIP1 fehérje mintázatainak számítógépes elemzését az ELM (Eukaryotic Linear Motif) internetes alkalmazás segítségével végeztük (<http://elm.eu.org/>). A GTPáz egység karboxi végén egy nagy méretű, prolingazdag szerkezeti elem található, amely nem hasonlít semmilyen ismert fehérjeszerkezeti elemre sem. A prolingazdag elemek elsősorban fehérje-fehérje kölcsönhatásban vesznek részt [214]. A LIP1 ezen eleme olyan mintázatot tartalmaz, amely állati fehérjékben az ún. SH3-elemet (PQQP), illetve WW-elemet (PPLP, és foszforilálástól függő WSI Σ PVP, RNLT Σ PPP) tartalmazó fehérjékhez való kötődésért felelősek. SH3-elemet tartalmaznak pl. egyes GEF molekulák, vagy a sejten belüli anyagforgalomban szerepet játszó fehérjék. A foszforilálástól függő WW-kötő mintázatok egyben prolinfüggő kinázok (pl. MAPK) felismerőhelyei is. Ennek fényében válik érdekessé, hogy a LIP1 fehérje karboxi-végén egy, az összes LIP1-szerű molekulában megőrződött mintázat található (RSKRMDINV), amely valójában a MAPK kinázlánc fehérjéiben előforduló MAPK-kötő mintázattal azonos. A legtöbb kis GTPáztól eltérően a LIP1 amino- és karboxi-végéről hiányoznak a lipidmódosításhoz szükséges felismerőhelyek.

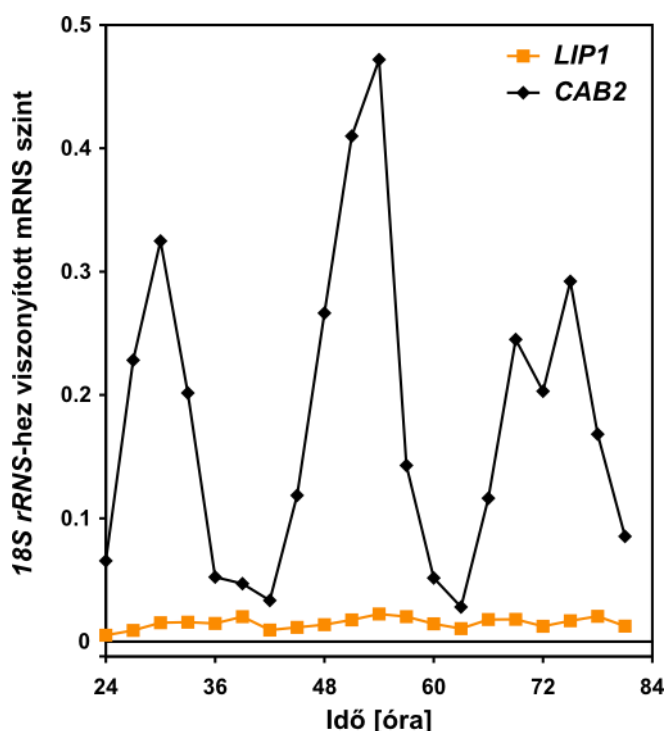
A LIP1 GTPáz két, a GTP-kötéskor és bomláskor legnagyobb szerkezeti átrendeződést elszenvedő részét egy szeringazdag részlet szakítja meg, amely minden LIP1-szerű molekulában megtalálható. Ez a részlet, azon kívül, hogy CKI és CKII kináz felismerőhelyeket tartalmaz, átfed egy ún. PEST-mintázattal is, amely a gyorsan bomló fehérjékre jellemző [215]. A PEST-mintázat erőssége fordítottan arányos a fehérje féléletidejével, és ezt igen gyakran foszforilálás szabályozza [215,216]. A szerin lecserélése glutaminsavra képes utánozni a foszforilálás hatását nemcsak biokémiai, hanem élettani szempontból is [217,218]. A LIP1 szeringazdag részének szerinjeit lépcsőzetesen, a NetPhosK eljárás által előrejelzett pontokon egymás után glutaminsavra cserélgetve azt kapjuk, hogy a PEST-mintázat egyre erősebbé válik, ami a fehérje életidejével fordított arányban áll. Ennek a gondolat kísérletnek az eredménye a LIP1 működés szabályozásának egy lehetséges módját körvonalazza: a LIP1 fehérje szintjét a cirkadián körön át a foszforilálás miatt folyamatosan változó erősségű PEST-mintázat szabályozza. Ezt a hipotézist valódi kísérletekkel kell ellenőrizni. Az ezekhez szükséges

módosított LIP1 fehérjék génjeit (amelyekben a szerinek kodonjait alaninéra vagy glutaminsavéra cseréltük) már előállítottuk, de kísérleteket még nem végeztünk velük.

A legérdekesebb különbség a LIP1 és a hagyományos GTPázok között a GTP-bontásban fontos szerepet játszó glutamin₉₄ cseréje hisztidinre. Ez a katalitikus glutamin megőrződött szinte mindegyik hagyományos kis GTPázban, bár olyan is ismert, amely más módon bontja a GTP-t [219]. Ennek a glutaminnak az elrontása a hagyományos GTPázokban a GTP-bontó képesség elvesztéséhez (miközben a fehérje képes kötni a GTP-t), folyamatosan bekapcsolt állapot létrejöttéhez vezet [162]. A LIP1 központi GTPáz egységében egyébként az összes egyéb, a GTP-kötésben és bontásban szerepet játszó mintázat megtalálható (G1: GXXXXGK[T/S], LIP1: GDSGVGKT; G2: T, LIP1: QTIG; G3: DXXG, LIP1: DVSG; G4: [N/T]KXD, LIP1: NKAD; G5: [C/S]A[K/L/T], LIP1: IAAAK), így feltételeztük, hogy ha nem is a hagyományos módon, de képes GTP-t kötni és bontani.

A LIP1 gén kifejeződésére elsősorban a fehérjeszintű szabályozás jellemző

Már a *lip1* jelleg helyreállításakor gyanítottuk, hogy a működőképességhez a *LIP1* mRNS szintjének cirkadián szabályozására nincs szükség. Ezt tisztázandó vad háttérű növényekben megvizsgáltuk a *LIP1* mRNS szintjének időbeli alakulását: C24 növények cirkadián óráját 12 óra fehér fény/12 óra sötét váltásokkal állítottuk be, majd állandó fehér fénybe helyezve a növényeket 3 óránként mintát vettünk belőlük. A mintákból teljes RNS-t tisztítottunk, majd Northern blot módszerrel meghatároztuk a *LIP1* és a *CAB2* génekről termelődő mRNS-ek egyensúlyi szintjét. A *CAB2* mRNS-t összehasonlítás céljából mértük meg, mivel kifejeződése a fenti körülmények között határozott, jól mérhetően cirkadián mintázatú. Az adatok számszerűsítésekor mindkét gén mRNS szintjét a minták *18S rRNS* szintjére vonatkoztattuk. Eredményeink szerint a *LIP1* mRNS állandó fehér fényben nagyon alacsony szinten, számottevő cirkadián mintázat nélkül fejeződik ki (Hiba! A hivatkozási forrás nem található.).



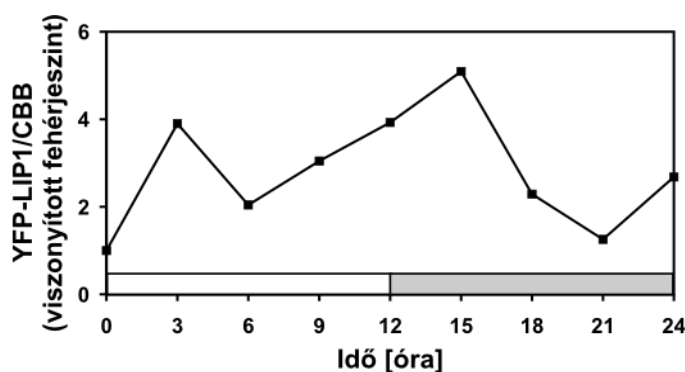
22. ábra. A *LIP1* és *CAB2* gén egyensúlyi szintjének mintázata folyamatos fehér fényben

A növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos fehér fénybe ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) helyeztük őket. 3 óránként mintát szedtünk, amelyekből össz-RNS-t tisztítottunk. A mintákban a *LIP1* és a *CAB2* mRNS szintjét Northern blot módszerrel határoztuk meg és a kapott értékeket a minták *18S rRNS* szintjére vonatkoztattuk.

Eredményünket alátámasztják azok a génlapkás kísérletek is, amelyek során 11 különböző kísérleti elrendezésben mérték meg a lúdfű, a rizs, és a nyárfa közel teljes génállományának kifejeződési mintázatát [21]. A kísérletek tanúsága szerint a *LIP1* mRNS szintje bizonyos körülmények között ugyan mutat napszakos ingadozást (a génállomány nagy részéhez hasonlóan), de csak nagyon alacsony (a *CCR2*-nél 100-szor alacsonyabb) szinten, kis kitérésekkel.

A fázisválasz görbék tanúsága szerint a *LIP1* működése cirkadián módon szabályozódik. Mivel a fenti adatok szerint ez nem az mRNS egyensúlyi szintjének változásánál nyilvánul meg, valamilyen későbbi folyamatnál kell jelentkeznie. Megmutatkozhat a cirkadián ingadozás a fehérje egyensúlyi szintjében, vagy működésében is (GTP/GDP-kötő állapot, foszforilálás, egyéb módosítások). A *LIP1* egyensúlyi fehérjeszintjét *LIP1* ellenanyag hiányában csak közvetett módon tudtuk meghatározni. Elkészítettük a *LIP1* amino végéhez illesztett YFP fehérjét egyenletesen magas szinten kifejező génépítményt (*35S:YFP-LIP1*), amelyet *lip1-1* növényekbe vittünk be. Csak a *lip1* tünetet helyreállító vonalakat használtuk fel a kísérlethez (20. ábra). Az YFP-*LIP1* fehérjét kifejező növényeket 12 óra fehér fény/12 óra sötét váltásokkal beállítottuk, majd folyamatos vörös fénybe helyeztük őket. Három óránként mintát vettünk belőlük, amelyekből fehérjét tisztítottunk. A mintákban az YFP-*LIP1* fehérje szintjét Western blot mód-

szerrel GFP ellenanyag felhasználásával határoztuk meg. Ugyanazokban a mintákban a az összfehérje mennyiségét is megmértük Coomassie Brilliant Blue festéssel. Az YFP-LIP1 fehérje szintjét a minta összfehérje tartalmára, és a 0 időpontra vonatkoztatva ábrázoltuk az idő függvényében (23. ábra).



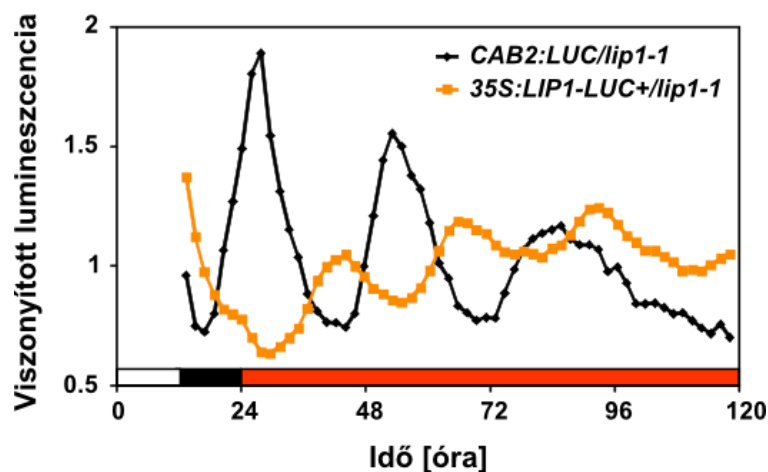
23. ábra. Az YFP-LIP1 fehérje egyensúlyi szintjének alakulása folyamatos vörös fényben.

A növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos fehér fénybe ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) helyeztük őket. 3 óránként mintát szedtünk, amelyekből fehérjét tisztítottunk. A mesterséges, egyenletesen magas szintű mRNS-ről lefordított YFP-LIP1 fehérje egyensúlyi fehérjeszintjét Western blot módszerrel mértük meg GFP ellenanyag felhasználásával. Az YFP jelét a minta Coomassie Brilliant Blue (CBB) festéssel mért összfehérje tartalmára, majd az így kapott értékeket a 0 időpont jelére vonatkoztattuk. A szürke csík a névleges éjszakát jelöli.

Az eredmény nem zárja ki, hogy az YFP-LIP1 és az YFP nélküli eredeti LIP1 fehérje egyensúlyi szintje cirkadián szabályozás alatt áll. Ez a módszer egyrészt nem alkalmas finom mennyiségi különbségek megbízható kimérésére, másrészt egy mesterséges fehérjét túltermelő vonalról van szó, ezért a fenti eredmények egy jól működő LIP1 ellenanyag elkészültéig óvatosan kezelendők. Mindazonáltal a LIP1-éhez megszólalásig hasonló mintázatot mértek az *XCT* gén kifejeződésének vizsgálatokor [97].

Egy fehérje egyensúlyi szintjét a képződés és a lebomlás aránya határozza meg. Számos példa van cirkadián óragének lefordítás szintjén történő szabályozásra [94,106,220]. A riboszóma külső vagy belső hatásra átkapcsolható olyan üzemmódba, amelyben csak bizonyos mRNS-ek lefordítása folyik (pl. hősokk, tápanyagmegvonás, sejtosztódás esetén), illetve amelyben egyes mRNS-ek lefordítására ideiglenesen na-

gyobb figyelem fordítódik (pl. hormon vagy fény hatására). Egy vizsgálandó fehérje lefordítási sebességének mérésére jó módszer, ha fehérjénket luciferáz enzimhez forrasztjuk és luminométerben folyamatos üzemmódban követjük a luciferáz működését. Ebben az esetben ~24 óra eltelte után már csak az újonnan termelődő fehérje-luciferáz molekulák jeleit látjuk, a korábban felhalmozódottak ugyanis működésképtelenek az oxiluciferin termék erős kötődése miatt [221]. Ha a gént egy folyamatosan működő promóter vezérli, akkor az új luciferáz enzim mennyisége a hozzáforsasztott fehérje lefordításának szabályozásától függ, ezért a felszabaduló fény a vizsgálandó fehérje lefordításáról tájékoztat [94,222]. A *LIP1* lefordításának vizsgálatához a *LIP1* gén stop kodon nélküli változatának végéhez a megfelelő leolvasási keretben hozzáillesztettük a luciferáz génjét. Az idegen gén egyenletes kifejeződését biztosítandó 35S promótert helyeztünk elé, és az így előállt génépítményt *lip1-1* növényekbe juttattuk. Azokat a növényeket tartottuk meg, amelyekben sikerült meggyógyítani a *lip1* tünetegyüttest. Ezeket a növényeket 12 óra fehér fény/12 óra sötét váltásokkal beállítottuk, majd folyamatos vörös fénybe helyezve őket luminométerrel több napon keresztül mértük bennük a *LIP1-LUC+* jelét. Ilyen körülmények között az új *LIP1* fehérjemolekulák cirkadián mintázat szerint termelődnek, esti csúcsokkal (24. ábra).



24. ábra. A *35S:LIP1-LUC+* jelzőgén kifejeződése folyamatos vörös fényben

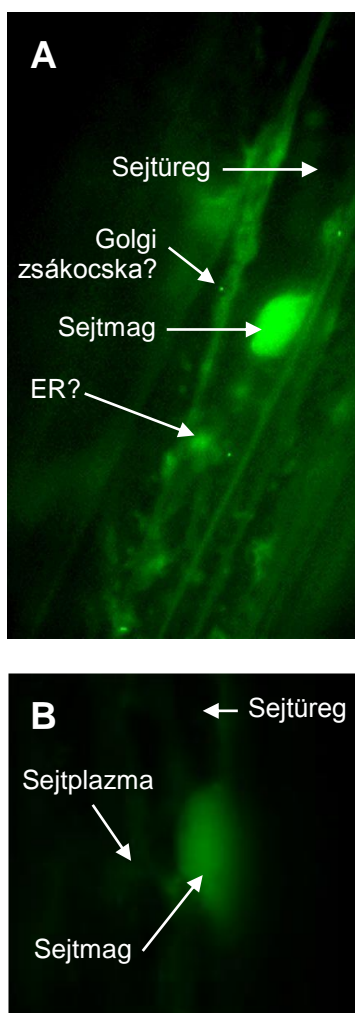
A *35S:LIP1-LUC+* növényeket, amelyek a *lip1-1* háttérben eleve meglévő *CAB2:LUC* jelzőgén is egyszerre hordozták, beállítás után folyamatos gyenge vörös fénybe ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) helyeztük. A jelzőgén működését luminométerrel mértük. A *LIP1-LUC+* jele sokkal erősebb, mint a *CAB2-LUC*-é, ezért egy növényen belül csak az előbbi jelét láttuk. Az értékeket az ábrán az adott jelzőgén jelének átlagára vonatkoztattuk, hogy a mintázatok összehasonlíthatók legyenek.

A LIP1 fehérje megtalálható a sejtmagban és a sejtplazmában is

A LIP1 működésének cirkadián befolyásolására az mRNS vagy fehérje szintjének változtatásán kívül egyéb lehetőség is adódik. A LIP1 fehérje sejten belüli eloszlása, különböző sejtstruktúrákba való irányítása, az eltérő állapotú LIP1 molekulák szétválogatása is állhat cirkadián szabályozás alatt. Az is elképzelhető, hogy valójában a LIP1 az a molekula, amely más óraférfék sejten belüli eloszlását szabályozza cirkadián módon.

A LIP1 nyomonkövetésére a fehérjeszint meghatározásakor már megismert YFP-LIP1 fehérjét kifejező növényvonalakat használtuk fel. Mivel a fényben nőtt növényekben a nagy mennyiségű klorofill fluoreszcenciája elnyomja az YFP jelét, ezért vagy sötétben nőtt növényeken végeztük a kísérleteket, vagy a fényben nőtt növényeknek olyan sejtjeit vizsgáltuk, amelyekben nincs zöld színtest (levélszór, szikalatti szár sejtjei). A növényeket a vizsgálat során 30 mp-ig az YFP gerjesztésére alkalmas 514 nm-es hullámhosszúságú zöld lézerténnel világítottuk meg, a kisugárzott 527–560 nm hullámhosszúságú sárgászöld fluoreszcens fényt pedig egy a gerjesztő fényt elnyelő szűrőn keresztül érzékeltük. Az eredmények szerint a LIP1 fehérje mind a sejtmagban, mind a sejtplazmában előfordul, utóbbiban egyértelműen valamilyen belső hártárhoz (valószínűleg endoplazmás hálózathoz) kötötten is (25. ábra). A sejtmagban a LIP1 egyenletesen oszlik el, sejtmagi csomókat nem képez. A sorozatban készített felvételekből összeállított filmen a sejt felszíne mentén gyorsan és szaggatottan mozgó apró fényes alakzatok figyelhetők meg a sejtplazmában. Ezek nagy valószínűséggel Golgi zsákocskák. A növényi Golgi zsákocskák több tulajdonságukban is különböznek az állati megfelelőjüktől: sok van belőlük és gyorsan mozognak, míg az állati sejtekben kevesen vannak, jól meghatározott elhelyezkedésűek [223]. A LIP1 eloszlásában nem észleltünk feltűnő napszakos ingadozást, és lényegében ugyanazt a mintázatot figyeltük meg fényben és sötétben nőtt növényekben is. Ha létezik is a LIP1 eloszlásának valamilyen cirkadián- vagy fény szabályozása, akkor azt ilyen körülmények közt, ezzel a módszerrel nem tudjuk kimérni. Elképzelhető, hogy a kis mértékű ingadozások elvesznek a nagy háttérben, amelyet az YFP-LIP1 fehérje magas szintű egyenletes túltermelése okoz. Valószínűbb azonban, hogy ez a változatlan csupán látszólagos, mivel mikroszkópban nem tudunk különbséget tenni a LIP1 különböző biokémiai (GTP/GDP-kötő) alakjai között. Ezek egymásba alakulása elképzelésünk szerint nap-

szakos ingadozást mutat, és nem lehetetlen az sem, hogy a két alak eltérő sejt szervecskékben halmozódik fel.



25. ábra. Az YFP-LIP1 mesterséges fehérje sejtben belüli eloszlása fényben és sötétben

A növényeket a vizsgálat során 30 mp-ig az YFP gerjesztésére alkalmas zöld lézertfényvel világítottuk meg, a kisugárzott sárgászöld fluoreszcens fényt pedig egy a gerjesztő fényt elnyelő szűrőn keresztül érzékeltük. A felvételek hamis színezésűek.

(A) Az YFP-LIP1 eloszlása fényben nőtt növényekben. A *lip1* tüneteket gyógyítani képes *35S:YFP-LIP1* jelzőgént kifejező növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény váltásokkal állítottuk be 7 napig.

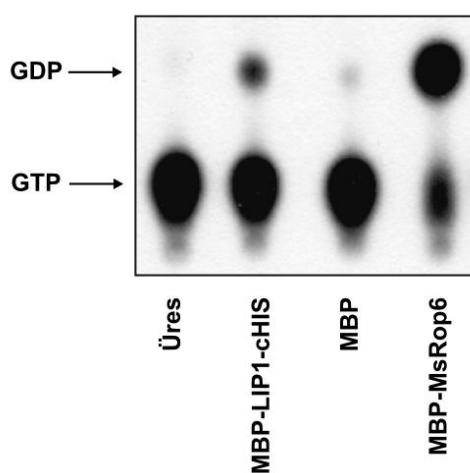
(B) Az YFP-LIP1 eloszlása sötétben nőtt növényekben. Ugyanazt a növényvonalat folyamatos sötétben neveltük 4 napig (csak a csíráztatás során kaptak néhány óra fénykezelést), majd a fenti módon mikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá. Az eredmények szerint a LIP1 fehérje fényben és sötétben is ugyanolyan elhelyezkedésű: mind a sejtmagban, mind a sejtplazmában előfordul, utóbbiban valamilyen belső hártvához (endoplazmatikus hálózathoz, Golgi zsákocskákhoz) kötöten is. A sejtmagban a LIP1 egyenletesen oszlik el, sejtmagi csomókat nem képez. Semmilyen időbeli változás nem figyelhető meg az egyenletesen magas szinten kifejeződő YFP-LIP1 eloszlásában.

Annak bizonyítására, hogy ez valóban így van, először is meg kellett mutatnunk, hogy a LIP1 képes GTP-t kötni. Amennyiben sikerül megtalálni a GTP-kötésben és -bontásban, valamint a sejtben belüli elhelyezkedésben szerepet játszó aminosavakat, akkor készíthetünk olyan folyamatosan bekapcsolt és bekapcsolhatatlan LIP1 változatokat, amelyek eltérő sejt szervecskékbe irányíthatók. Annak tanulmányozásával, hogy ezek az átalakított fehérjék a *lip1* tünetegyüttest milyen mértékben képesek gyógyítani, képet alkothatunk a sejtben belüli elhelyezkedés jelentőségéről.

A tisztított LIP1 fehérje képes GTP-t hasítani

A LIP1 fehérje aminosavsorrendjének szokatlansága, különösen a katalitikus glutamin hiánya miatt arra gondoltunk, hogy a LIP1 esetleg elveszíthette eredeti GTP-bontó képességét, és a molekula valamilyen más, a többi kis GTP-kötő fehérjétől eltérő módon működik. Ezt eldöntendő, tisztított LIP1 fehérje GTP-bontó képességét kémcsőben ellenőriztük. A kísérlethez LIP1 fehérjét egy jól bevált baktériumos fehérjetermeltető rendszerrel állítottunk elő. A tisztítás megkönnyítésére a LIP1 fehérje két végére egy-egy idegen fehérjedarabot illesztettünk. Az amino-véghez csatolt maltózkötő fehérje (MBP) nem csak az egyszerű tisztítás miatt fontos, hanem mert tekerceselő képessége következtében egyben biztosítja a hozzáragasztott fehérje megfelelő térbeli szerkezetét is. A karboxi-véghez forrasztott hat hisztidint tartalmazó peptid (cHIS) ugyanakkor egy más fajta tisztítást is lehetővé tesz. A két – teljesen eltérő elven működő – tisztítás egymást követő alkalmazásával teljes hosszúságú, minden egyéb szennyezéstől mentes fehérjét kaphatunk.

A tisztított MBP-LIP1-cHIS GTP-bontó képességét radioaktív [$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP felhasználásával végeztük. A GTP γ helyzetű foszfátcsoportjának hasítása sugárzó GDP-t eredményez. A reakció termékeit vékonyrétegen választottuk szét. Az eredmények szerint a baktériumból tisztított LIP1 fehérje képes önmagában is GTP-t hasítani (26. ábra). A katalitikus glutamin hiánya miatt a hasítás elve valószínűleg eltér a kis GTP-kötő fehérjéknél leírtaktól.



26. ábra. A baktériumból tisztított MBP-LIP1-cHIS mesterséges fehérje képes GTP-t hasítani

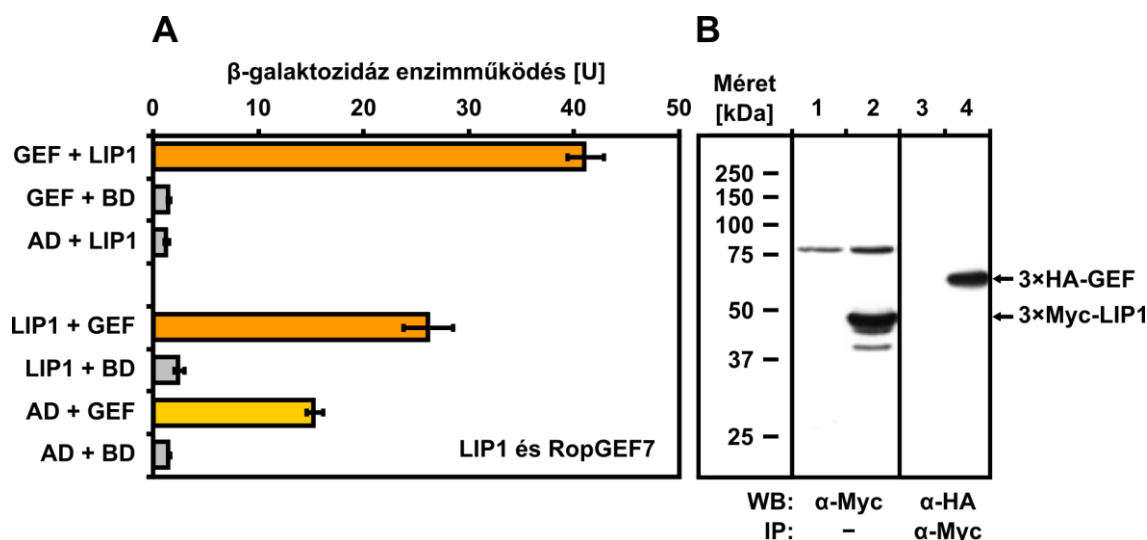
A tisztított MBP-LIP1-cHIS GTP-hasító képességét [$\alpha^{32}\text{P}$] GTP bomlásának kimutatásával vizsgáltuk. A mintákat 10 óráig tartottuk szobahőmérsékleten, majd a termékeket vékonyrétegen választottuk szét. A jeleket PhosphorImager[®] készülékkel tettük láthatóvá. Viszonyításként igazoltan GTP-hasító lucerna ROP6 fehérjét és a tisztításhoz használt MBP-t alkalmaztunk. Az üres mintába nem tettünk semmilyen fehérjét.

A LIP1 fehérje kölcsönhat a ROPGEF7 fehérjével élesztőben

A LIP1 élettani szerepének megismeréséhez nem elég magának a LIP1 fehérjének a vizsgálata, fel kell térképeznünk a jelátviteli hálózatát is. Milyen jelek kapcsolják be és ki, illetve milyen folyamatokat vezérel a LIP1? Ennek a kérdésnek a megválaszolásához LIP1-gyel kölcsönható fehérjéket kerestünk élesztő kéthibrid módszerrel.

Első lépésként a kezünkben levő, élesztő kéthibrid plazmidokba klónozott, a cirkadián órában és a fényérzékelésben szerepet játszó géneket vizsgáltuk át a vad háttérű LIP1-gyel való kölcsönhatás után kutatva. Sajnos nem találtunk kölcsönható fehérjéket. Ekkor egy élesztő kéthibrid szűrést hajtottunk végre ismeretlen kölcsönhatók azonosítása végett (lásd: [58. oldal](#)). A jelöltek ~75%-a jól ismert módon háttérrel adó hamis kölcsönhatónak bizonyult. A maradék 12 jelölt teljes hosszúságú változatából is azonban csak egy hatott kölcsön a LIP1-gyel ([27. ábra](#)).

Ez a fehérje egy akkor még ismeretlen, ún. DUF315 elemet hordozó fehérjecsalád tagjának bizonyult. Később megjelent egy cikk, amelyben ennek a 14 tagú családnak egy másik képviselőjét jellemezték. Kiderült, hogy ezek a fehérjék voltaképpen a növényi ROP GTPázok nukleotidcserélőjeként működnek, ezért ROPGEF-eknek nevezték el őket, a DUF315 elemet pedig PRONE-elemnek [\[171\]](#). A mi kölcsönhatónk ROPGEF7 néven szerepel ebben a nyilvántartásban. Egy korábbi közleményben ennek a családnak egy paradicsomban lévő rokonáról (KPP1) azt írták le, hogy kölcsönhat a sejthártyába ágyazódó LePRK1 és LePRK2 LRR receptor kinázok sejten belüli kináz egységével, és hogy a pollennövekedés szabályozásában van szerepe [\[174\]](#). Ezek a kutatók a paradicsom KPP1 lúdfű megfelelőinek szöveti kifejeződését is megvizsgálták. E szerint a család 14 tagjából csak egy fejeződik ki a ROPGEF7-hez hasonló mintázat szerint minden szövetben, a többi szövetjellegzetes kifejeződésű (virágpor). Ez némileg megerősíti a kapott eredményünket, mivel feltételezzük, hogy a cirkadián óra fontos elemei általánosan fejeződnek ki. Ugyanakkor nem zárhatjuk ki, hogy a LIP1 a ROPGEF család más, szövetjellegzetes módon kifejeződő tagjaival is képes kölcsönhatni.



27. ábra. A LIP1 kölcsönhat a ROPGEF7 fehérjével élesztőben

(A) LIP1-gyel kölcsönható fehérjék után kutattunk élesztő kéthibrid szűréssel, fényben nőtt lúdfű sejtenyészetből készült cDNS könyvtárat használva. A jelöltek teljes hosszúságú változatai közül csak a ROPGEF7 fehérje hatott kölcsön a LIP1-gyel, mindkét párosításban. AD, üres pGADT7 plazmid; BD, üres pGBKT7 plazmid. A színes oszlopok azt jelentik, hogy ezek a sejtek $A^{-}L^{-}W^{-}$ lemezen is nőttek. A ROPGEF7 a GAL4 DNS-kötő eleméhez illesztve ugyan önmaga is képes beindítani a β -galaktozidáz kifejeződését (világossárga oszlop), de ezt hatékonyabban teszi, ha a GAL4 átírásserkentő eleméhez illesztett LIP1 is jelen van. A β -galaktozidáz enzimműködést egységnyi sejtmennyiségre és időre vonatkoztatva tüntettük fel (Miller egység).

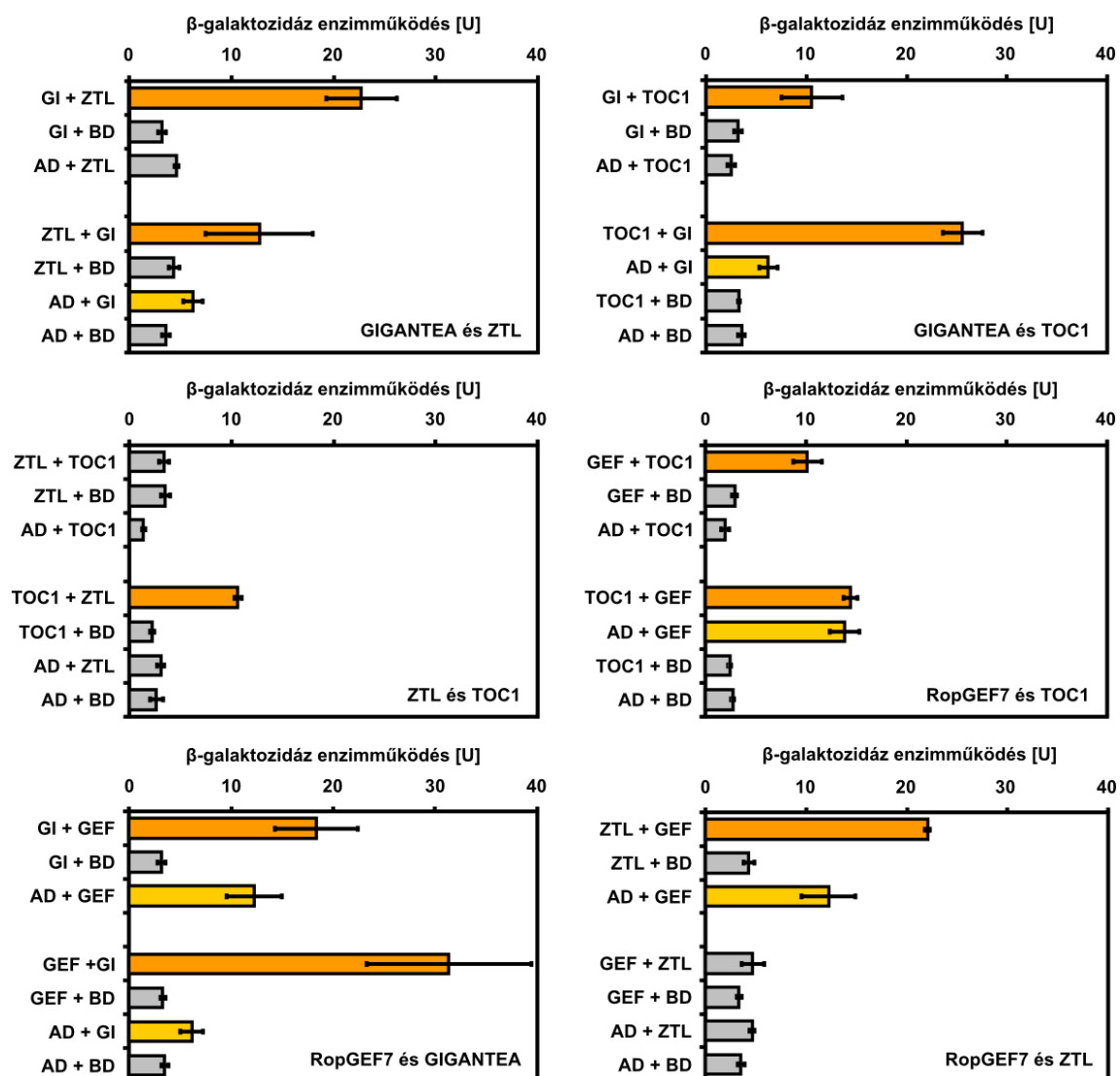
(B) Az élesztő kéthibrid eredményeket lúdfű sejtenyészetben megtermelt, majd onnan ágyhoz kötött ellenanyagok segítségével tisztított fehérjék kölcsönhatásának kimutatásával igazoltuk. A LIP1 fehérje elejéhez 3×Myc, a ROPGEF7-éhez pedig 3×HA farkat forrasztottunk. A plazmidokat közvetlenül lúdfű sejtekbe juttattuk, ahol azokról fehérjéink átmenetileg egyenletesen magas szinten termelődtek. A sejteket sötétben növesztettük 18 óráig, majd feltártuk őket. Az összeállt LIP1 tartalmú fehérjeegyütteseket ágyhoz kötött Myc ellenanyag segítségével különítettük el, majd az alkotóelemeket SDS-poliakrilamid gélen választottuk szét. A ROPGEF7 jelenlétét HA ellenanyaggal mutattuk ki. Sikertelenül igazolnunk, hogy a ROPGEF7 és a LIP1 ugyanabban a fehérjeegyüttesben található. (1,2) A sejtenyészet LIP1 tartalma: 1. nem vittük be a LIP1-et, 2. Bevittük a LIP1-et; (3,4) A ROPGEF7 jelenléte a tisztított mintákban: 3. LIP1 hiányában nem tisztítható ROPGEF7, 4. LIP1 jelenlétében megjelenik a ROPGEF7 is a fehérjeegyüttesben. WB (Western blot), IP (Immunoprecipitation).

Az élesztő kéthibrid kísérletek eredményét lúdfű sejtenyészetben megtermelt, majd onnan ágyhoz kötött ellenanyagok segítségével tisztított fehérjék kölcsönhatásának kimutatásával igazoltuk (27. ábra, B mező). Növényi protoplasztokba pRT104 3×Myc-LIP1 és pRT104 3×HA-ROPGEF7 plazmidokat juttatunk be, ahol azokról a 35S promóternek köszönhetően átmenetileg magas szinten fejeződik ki az amino végén 3×Myc horgonyt viselő LIP1, illetve a 3×HA horgonnyal ellátott ROPGEF7 fehérje. A sejteket sötétben növesztettük 18 óráig, majd feltártuk őket. Az összeállt LIP1 tartalmú fehérjeegyütteseket ágyhoz kötött Myc ellenanyag segítségével halásztuk ki az oldatból, majd az alkotóelemeket SDS-poliakrilamid gélen választottuk szét. Az együttesben a ROPGEF7 jelenlétét HA ellenanyaggal mutattuk ki. Ezzel a módszerrel sikerült igazolnunk, hogy növényi sejteken belül is összeáll olyan fehérjeegyüttes, amelyben a LIP1 és a ROPGEF7 is megtalálható.

A ROPGEF7 fehérje más esti óraféhrjéjékkel is kölcsönhat

Ezek után az izgalmas eredmények után kíváncsiak voltunk, hogy milyen egyéb fehérjék lehetnek még ebben a fehérjeegyüttesben. Említettem, hogy leellenőriztük az összes kezünkben levő fehérje és a LIP1 kölcsönhatását, de nem találtunk kölcsönhatót. Ezt az ellenőrzést végrehajtottuk a ROPGEF7-tel is, és meglepő eredményeket kaptunk. Élesztő kéthibrid kísérletekben a ROPGEF7 az összes vizsgált fehérje közül csak a GIGANTEA, a TOC1 és a ZTL cirkadián óraféhrjéjékkel hatott kölcsön. Az irodalomból ekkor már ismert volt, hogy a ZTL és a TOC1, valamint a ZTL és a GIGANTEA fehérje is kölcsönhat egymással. Jelenlegi elképzelések szerint a ZTL felelős a TOC1 fehérje lebomlásáért sötétben [224], míg a GIGANTEA a ZTL fehérje bomlását gátolja meg kék fényben [62]. Amellett, hogy ezeket a kölcsönhatásokat mi is igazoltuk élesztő kéthibrid kísérleteinkben, egy új, a GIGANTEA és a TOC1 fehérje közötti kölcsönhatást is sikerült kimutatnunk (28. ábra). Ezzel egy érdekes kép kezdett kialakulni a szemünk előtt, ugyanis az összes fenti fehérje kifejeződése vagy működése az esti időszakban a legmagasabb. A ROPGEF7-ről ugyan egyelőre nincs adatunk, de az eddigi eredményeink szerint a ROPGEF7-tel kölcsönható LIP1 szintén este működik. Feltételezzük, hogy a LIP1 is jelen van ebben az esti fehérjeegyüttesben, de csak bekapcsolt (vagy kikapcsolt) állapotában, és/vagy a ROPGEF7-en keresztül; talán ezért nem figyelhetünk meg kölcsönhatást az élesztőben. Az összes élesztő kéthibrid kölcsönhatást egyébként a

LIP1/ROPGEF7 együtteshez hasonlóan növényi sejtenyészetben is sikerült igazolnunk.



28. ábra. A ROPGEF7 és egyéb esti óraféhrjék kölcsönhatása élesztőben

Megvizsgáltuk a kezünkben levő összes fehérje és a ROPGEF7 kölcsönhatását élesztő kéthibrid rendszerben. Az összes alany közül a ROPGEF7 csak a GIGANTEA, a TOC1, és a ZTL cirkadián óraféhrjékkel hatott kölcsön (a LIP1-en kívül, természetesen). A ZTL és a TOC1, valamint a ZTL és a GIGANTEA közötti kölcsönhatásokat már korábban leírták. Nekünk ezeken kívül egy újabbat is sikerült leírni, a GIGANTEA és a TOC1 közöttit. Az említett óraféhrjék mindegyike este fejeződik ki a legmagasabb szinten. AD, üres pGADT7 plazmid; BD, üres pGBKT7 plazmid. Színes oszlopok: növekedés A⁻L⁻W⁻ lemezen. Világossárga oszlopok: ebben az elrendezésben a kérdéses fehérje önmaga is képes beindítani a β -galaktozidáz kifejeződését. A β -galaktozidáz enzimaktivitást egysejtmenyiségre és időre vonatkoztatva tüntettük fel (Miller egység).

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A LIP1 fehérje működésének modellje

A LIP1 fehérje hatását a fény és a cirkadián óra gátolja

Időtartamától és mennyiségétől függően a fény az óra különböző tulajdonságait befolyásolja. Folyamatos megvilágítás esetén a fény a periódust állítja be. Növényekben a leghosszabb periódust folyamatos sötétben mérhetjük, míg folyamatos fényben a fényerősség növelésével egyre rövidebb periódust figyelhetünk meg. Ugyanakkor egy-egy fényvillanásokkal jellegzetes fáziscúszásokat lehet kiváltani beállított, majd folyamatos körülmények közé helyezett növényekben. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a vad háttérű növényekben a LIP1 a cirkadián periódust hosszabbítja, és hogy a fény – erősségétől függő módon – gátolja ezt a hatást. Erős fényben a *lip1-1* vadra jellemző periódusú. Ebből következik, hogy ilyen körülmények között vad háttérű növényekben a LIP1 fehérje nem működik. Ez a gátlás feltehetően a LIP1 fényszabályozott lebomlásán vagy kikapcsolásán keresztül valósul meg.

A *lip1-1* sötétben megfigyelhető rövid periódusát ugyanakkor megmagyarázhatjuk, ha feltételezzük, hogy a LIP1 az esti, lassan rezgő hurok része, így törlésével a reggeli (gyorsan rezgő) hurok „elszabadul”. Ehhez a hatáshoz nincs szükség fényre, az a rendszer felépítéséből, a két eltérő sebességgel rezgő hurok negatív visszacsatolással történő összekapcsolódásából következik.

A periódus ugyan érzéketlen a fényre a *lip1-1* mutánsban, a PRC-ből azonban kiderül, hogy a *lip1-1* a beállító fényvillanásokra érzékenyebb (jellemzően a névleges éjszaka első felében), hiszen jelentősen nagyobb késleltető fáziscúszásokat lehetett kiváltani benne, mint a vad háttérűben. Ezért inkább arról lehet szó, hogy LIP1 hiányában az óra túlérzékennyé válik a fényre, tehát már gyenge fényben is ugyanarra az

értékre áll be a periódus, mint erősben. A bevezetésben említett összefüggés a PRC és a periódus fényfüggése (FRC) között a *lip1*-re is igaznak bizonyult: a *lip1-1*-ben fényvilágításokkal inkább késéseket lehet kiváltani, ennek megfelelően a periódus fényerősségtől való függése kisebb mértékű (2. ábra, C mező).

A LIP1 elsősorban fehérjeszinten szabályozódik

A PRC azt is megmutatta, hogy a LIP1 működését nem csak a fény, hanem a cirkadián óra is szabályozza (zsilipeli). Elképzelhető, hogy a LIP1 fehérje szintjét a cirkadián körön át a foszforilálás miatt folyamatosan változó erősségű PEST-mintázat szabályozza. Az a kináz, amely ezt a foszforilálást cirkadián mintázat szerint végrehajthatja, valószínűleg a cirkadián órában bizonyítottan szerepet játszó CKII. Cirkadián óraféhrjék ilyen szabályozására van példa az irodalomban [93,216,225]. A LIP1-LUC+ és az YFP-LIP1 féhrjék szintjében megfigyelhető cirkadián mintázat ennek a szabályozásnak a meglétét bizonyítja. Mivel ezeket a géneket egyenletesen működő promóterek vezérelték, az ingadozás nem az mRNS-szint ingadozásának következménye.

A szeringazdag részlet foszforilálása nem csak a fehérje lebomlását, hanem a működését is szabályozhatja, mivel ez a részlet pont a célfehrjéket kötő csuklók között található. A foszforilálás erős torzulást eredményezhet, megváltoztatva a LIP1 célfehrjekötő képességét. A két folyamat össze is függhet. Érzékelő rendszerekre ugyanis általában igaz az, hogy a bekapcsolt alakot gyorsan el kell tüntetni a változások nyomon követhetősége érdekében. Kísérleti adataink alapján úgy tűnik, hogy a LIP1 szabályozása (az ELF3-hoz és ZTL-hoz hasonlóan) szintén fehérjeszinten zajlik elsősorban, mivel a LIP1 egyensúlyi mRNS-szintjében nem figyelhető meg semmiféle cirkadián mintázat, továbbá a LIP1 fehérje túltermelése nem vált ki semmilyen lényeges hatást (pl. hosszú periódust). Ez utóbbi megfigyelés arra utal, hogy a LIP1 féhrjének másodlagos féhrjemódosításon kell átesnie ahhoz, hogy működőképes állapotba kerüljön. Valójában a módosítás sebessége határozza meg a LIP1 fehérje hatékonyságát, a nagy mennyiségben jelen levő módosítatlan LIP1 nem hatásos. Ez a módosítás valószínűleg nem lipidmódosítás, mert az ehhez szüksége féhrjemintázatok nincsenek meg a LIP1-ben. Legvalószínűbb, hogy a LIP1 GDP-kötött állapotából a GTP-kötött állapotba való átkapcsolás ez a módosítás, a sebességmeghatározó tényező pedig a LIP1 GEF-jének működése. A második legvalószínűbb módosítás a foszforilálás.

A LIP1 fehérje az óra működését fehérjeszinten szabályozza

A *lip1* mutánsokban a központi óragének egyensúlyi mRNS szintje nem változik, ha állandó körülmények között vizsgáljuk őket. Ebből arra következtettünk, hogy a LIP1 elsősorban nem RNS-, hanem inkább fehérjeszinten befolyásolja az óra működését. A *TOC1* mRNS szintjének csökkenése váltakozó fény/sötét viszonyok közt nőtt *lip1-1* növényekben ugyanakkor összhangban van e változat rövid periódusával: *TOC1*-hiányos növényekben a periódus még a *lip1-1*-énél is rövidebb. A növényi óra jelenlegi modellje szerint a *TOC1*-et a reggeli hurok összetevői (*CCA1* és *LHY*) gátolják, míg az esti hurok összetevői (*GI*) serkentik.

Vajon mennyire egyedi a LIP1 előbb leírt működése a növényi cirkadián rendszerben? Az *ELF3* és a *ZTL*, valamint az *XCT* órafehérjék működését lehet párhuzamba állítani a LIP1-ével néhány tekintetben. Vad háttérű növényekben az *ELF3* a LIP1-hez hasonlóan tompítja a beállítójeleket és hosszabbítja a periódust, de ezt kizárólag fényben teszi, mivel sötétben a vadra jellemző periódust (ugyanakkor nagyon kis kitéréseket) figyeltek meg az *ELF3*-mat hibásan kifejező növényekben. Az *ELF3* működésének molekulaszintű magyarázatára sokáig kellett várni. Az erre vonatkozó első közvetlen bizonyítékokat 2008 végén közölték [109]. Ezek szerint az *ELF3* a *GI* fehérje *COP1* általi ubikvitinálásában illesztőfehérjeként vesz részt, hiányában a *GI* lebomlása gátolt. A *GI* viszont a *ZTL* fehérjéhez kötődve gátolja annak működését, a *TOC1* fehérje ubikvitinálását. A *TOC1* fehérje a *CCA1/LHY* gének kifejeződését serkenti, ezért az *ELF3* hiánya végső soron felgyorsult *TOC1* bomlást és alacsony szintű *CCA1/LHY* kifejeződést eredményez. A *ZTL* és az *XCT* hatása a periódus fényerősség-függésére pont az ellenkezője a LIP1-ének. A *ztl* periódusa nagyon hosszú, az *xct*-jé viszont a *lip1-1*-hez hasonlóan rövid folyamatos sötétben, amely fényben mindkét esetben erősebben csökken, mint a vad növényeké. A *ztl* és az *xct* PRC-je azt mutatja, hogy ezek a *lip1-1*-gyel ellentétben a sietést kiváltó beállító jelekre érzékenyebbek [97]. A *ZTL* az órát átírás utáni szinteken befolyásolja, a *TOC1* órafehérje lebomlásának serkentésével. Az *XCT* is feltehetőleg fehérjeszinten működik, de hogy milyen módon, még nem ismert.

Adataink alapján úgy véljük, hogy a LIP1 az óra sebességét szintén átírás utáni szinteken befolyásolja, vélhetőleg egy eddig ismeretlen célfehérje – talán a *ROPGEF7*-tel kölcsönható esti fehérjék valamelyikének – sejten belüli eloszlását, vagy a fehérjeegyüttes összetételét szabályozva. A jelenlegi óramodellben a *GI* fehérje a *TOC1*

gén kifejeződését serkenti, míg a TOC1 fehérje negatív visszacsatolással hat vissza a *GI* gén kifejeződésére. Vajon lehetséges, hogy az általunk kimutatott *GI*-TOC1 fehérjeszintű kölcsönhatás egy újabb szabályozó kör (pl. pozitív visszacsatolás) jelenlétére utal? Elképzelhető, hogy a *GI* nagy méreténél (és egyedi felépítésénél) fogva valójában egy összeszerelő állvány, amelynek felületén áll össze egy esti cirkadián fehérjeegyüttes. Ennek része lehet a LIP1 is, a ROPGEF7-en keresztül. Korábban már említettem, hogy a különféle GEF-ek és GTPázok célzott összeállását állványfehérjék segítik, így válogatva a lehetséges kölcsönhatások között [164].

A LIP1 helye a növényi cirkadián óramodellben

Ha a LIP1-et megpróbáljuk elhelyezni a jelenlegi óramodellben, akkor azt minden bizonnyal az esti hurkon belül, valamely fehérje működését befolyásoló ponton kell beillesztenünk. Legesélyesebbnek a TOC1 fehérje szintjét alakító fehérjelebonzó E3 ubikvitin-ligáz együttes mutatkozik, amelyben a LIP1 a *GI*-val együtt a ZTL működését fogná vissza, a TOC1 lebomlását gátolva ezzel valamilyen szinten. A LIP1 törlése a TOC1-hiányos, illetve a ZTL-túlműködéses állapotot közelítő körülményeket idéz elő (rövid periódus). Ellentmondásnak tűnik, hogy a TOC1 lebomlása és a ZTL, de a LIP1 és a *GI* működése is a kora esti órákban a legnagyobb. Valószínűleg a LIP1 és a *GI* gátló hatására eleve akkor van szükség, amikor a ZTL működik, szerepük a megfelelő TOC1 fehérjeszint beállítása. A fény szerepe ebben a folyamatban az lehet, hogy megóvjá a TOC1-et a lebomlástól. A LIP1 ezt a hatást közvetítheti, hiányában a fényjel nem jut el a ZTL-hoz, következésképp a TOC1 gyorsabban bomlik, pont annyira, mint sötétben (mindenhol egyformán rövid periódus). Feltételeztük, hogy a LIP1 fehérjeszintjét vagy működését a fény gátolja. Ez egy újabb ellentmondáshoz vezet: erős fényben a TOC1-nek fel kellene halmozódnia és hosszú periódust okoznia. Ezzel szemben az FRC szerint a fényerősség növekedésével a periódus csökken. A magyarázat az lehet, hogy a periódus kialakításakor legalább két, egymással ellentétes hatású fény szabályozott folyamat verseng. Például az egyik a TOC1 felhalmozódását vagy működését, a másik pedig a lebomlását befolyásolhatja, de fényerősség-függésük eltérő mértékű. Adott fényerősségnél a két folyamat eredőjeként alakul ki a periódus: gyenge fényben a felhalmozódás (LIP1 működik), erősben pedig a lebomlás érvényesül (nincs LIP1). Ebből következik, hogy a LIP1 az óra fénybemenetének egyik eleme. A fenti feltételezéseket a *ztl*, *toc1* és *lip1* mutánsok genetikai kölcsönhatásának vizsgálatával fogjuk igazolni.

A LIP1 egy új biokémiai szerepkört képvisel a cirkadián órában

A LIP1 a kis GTPázok egy új családjához tartozik. Kémcsőben végzett kísérletben megmutattuk, hogy a katalitikus glutamin hiányának ellenére a LIP1 fehérjének számottevő GTP-bontó képessége van, ezzel a LIP1 lett az első kis GTPáz, amelynek a növényi cirkadián órában van szerepe. Legalább két másik kis GTPázról ismert eddig, hogy részt vesznek a cirkadián óra működésében valamilyen élőlényben. A *RAB3a* gén elrontása az egerek viselkedési ritmusának periódusát változtatja meg [226]. Ugyanakkor a központi óra nem sérült, ami azt jelenti, hogy a *RAB3a* nem a fénybemenet vagy a központi óra része, hanem valószínűleg a ritmust előállító idegsejtek közötti kapcsolatot, azok összehangolását befolyásolja. A *DEXRAS1* viszont az emlős cirkadián óra fénybeállító jelekre való napszakfüggő érzékenységét alakítja [227].

A LIP1 – a kis GTPázok körében szokatlan – sejtmagi elhelyezkedése jól összeegyeztethető a cirkadián szerepével, ugyanis az összes eddig ismert órafehérje sejtmagi elhelyezkedésű. Mivel a LIP1 a sejtplazmában is előfordul, elképzelhető, hogy a LIP1-nek a sejtmagtól eltérő működésű állapota is van. Ezt kiderítendő már folyamatban vannak azok a kísérletek, amelyekben a LIP1-et a sejtmagba illetve a sejtplazmába kényszerítjük. A kísérlettől azt várjuk, hogy a *lip1-1* cirkadián tüneteit csak a sejtmagba kényszerített változattal sikerül helyreállítani, míg a sejtplazmás változat az órán kívüli tüneteket javítja ki. Ezt a feltételezést erősítheti az a megfigyelésünk, hogy a mustársejtekbe belőtt ROPGEF7 a sejtplazmában helyezkedik el. Ha a ROPGEF7 valóban a LIP1 célfehérjéje, amely a sejtvezérlést befolyásolja, akkor a LIP1 sejtplazmás alakjának a sejtvezérlés lehet az egyik – cirkadián órától független – szerepe. Nehéz megmagyarázni ugyanakkor azt, hogy ha a ROPGEF7 a sejtplazmában található, akkor hogyan képes kölcsönhatni növényben a sejtmagi órafehérjével (az élesztős kölcsönhatásokat ugyanis növényi sejtenyészetben is sikerült igazolni). Lehetséges, hogy a ROPGEF7 elhelyezkedése időben, vagy külső jel (fény?) hatására megváltozik, bemegy a sejtmagba. A kérdést a ROPGEF7-et hibásan kifejező vagy nélkülvő növények cirkadián órájának ellenőrzése fogja eldönteni.

A lúdfű fehérjék aminosavsorrendjének elemzése a LIP1-nek mindössze egy közeli rokonát mutatta ki (LIP2), amely rendelkezett az összes LIP1-re jellemző eltéréssel. Ugyanakkor számos, a LIP1-re nagyon hasonlító fehérjét találtunk több

magasabbrendű növényben is, ami a LIP1-szerű molekuláknak a magas növények (*Spermatophyta*) élettanában betöltött általánosabb szerepét valószínűsítik.

A LIP1 cirkadián órán kívüli hatásai

A LIP1 cirkadián órán kívüli hatásainak feltérképezésekor figyeltük meg, hogy a *lip1-1* fényfejlődése is megváltozott. A cirkadián jelleggel ellentétben ez azonban fényfüggő: a szikalatti szármegnyúlás fény általi gátlását vizsgáló kísérletekből kiderült, hogy sötétben a *lip1-1* és a vad növény szikalatti szára ugyanolyan hosszú. A LIP1-nek a cirkadián órában és a fényfejlődésben betöltött szerepének különállósága nem egyedülálló. Hasonló jelenséget figyeltek meg a ZTL, a GI, az ELF3 és az XCT esetében is. Véleményem szerint a LIP1 hiánya a fényérzékelők felhalmozódásán keresztül vezethet a megfigyelt fényfejlődési tünetekhez, tehát ez valójában egy mellékhatás.

Fénytől függetlennek tűnik a *lip1-1* növények bőrszöveti sejtjeinek lekerekített alakjának kialakulása. Ez a hatás az sejtvezérendellenességére utal, amelyet növényekben leginkább a ROP GTPázok szabályoznak. A *lip1-1* ilyen ROP-szerű tünete összefüggésbe hozható a LIP1-gyel kölcsönható ROPGEF7 molekulával. Ahogy azt már felvetettem, lehetséges, hogy a ROPGEF7 a LIP1 egyik célfehérjéje, amelyen keresztül a LIP1 a ROP-ok jelátviteli hálózatához kapcsolódik. Ebben az esetben a LIP1 ezen hatása a sejtvezérendezésre áttételes, és függetlennek tekinthető a cirkadián órától, amelyet valószínűleg más célfehérjéken keresztül ér el. Mindazonáltal a sejtvezérszerkezet megzavarása hatással van a cirkadián órára, mivel az aktinhálózatot megbontó latrunculin-B rövid periódust okoz, meglepő módon azonban csak sötétben és kék fényben, vörösben nem. Ez a hatás ugyanakkor a *lip1-1*-től független, mert a *lip1-1* periódusa tovább rövidíthető a kezeléssel (nem közölt adatok). Elképzelhető, hogy a LIP1 és a latrunculin ugyanarra (t.i. az aktinhálózatra) hat, de különböző irányból, ezért hatásuk összeadódik. A jelenség tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Másik érdekes megfigyelésünk az volt, hogy a *lip1-1*-nek nincs virágzási tünete, pedig ez „elvárható” lett volna a rövid periódus következményeként, amelynek hatással kellett volna lennie a fő virágzásszabályozó CO és az FT kifejeződésére. Ennek magyarázata lehet az, hogy a LIP1-nek úgy tűnik csak gyenge fényben van szerepe, a virágzási kísérleteket viszont erős fényben végeztük. Másik lehetséges magyarázat, hogy míg a cirkadián kísérleteket szacharózos táptalajon végezzük, a virágzási időt földben nőtt

növényeknél mérjük. Nemrég írtak le egy olyan gént (*SFR6*), amelynek cirkadián tünete szacharózfüggő [228], így felmerül a lehetősége, hogy a *lip1-1*-é is ilyen. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy ez lehet a helyzet.

A *lip1* mutánsok sóstresszre érzékenyek. A sóstressz-tűrés erősen köthető a sejt-hártyában jelenlevő ion- és vízcsatornákhöz, pumpákhoz, valamint a sejtfa állapotához. Mindezeket a sejten belüli anyagmozgatás, a sejtvíz állapota nagy mértékben befolyásolja, így a megfigyelt sóérzékenység nem meglepő. Mivel a sejtvízátrendeződés a fentiekben leírtak miatt valószínűleg nem a cirkadián tünehez kapcsolódik, ezért feltételezhetően a *lip1-1* sóérzékenysége sem a cirkadián óra zavarának következménye. Megfigyeléseink szerint nem csak a cirkadián jelleg, hanem a sóérzékenység is szacharózfüggő, mivel cukormentes táptalajon nem jelentkezik. A szacharóz és a cirkadián óra kapcsolatának vizsgálata egyelőre nem szerepel jövőbeli terveink között.

ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatomban ismertetett eredményeket és magyarázatukat a következőképpen foglalhatjuk össze:

1. A *lip1-1* minden vizsgált cirkadián kimenet periódusát rövidíti, ezért a *LIP1* nem kimeneti szabályozóelem, hanem a főrezgőkör működését befolyásoló tényező.
2. A periódus a *lip1-1*-ben szinte változatlan marad a teljes vizsgált fényerősség tartományban. Eszerint a *LIP1* fontos szerepet játszik a periódus fényhangolásában.
3. Erős fényben a *lip1-1* periódusa megkülönböztethetetlen a vad háttérűétől. Feltételezzük, hogy a vad háttérű növényben az erős fény *LIP1*-hiányos állapotot idéz elő.
4. A *lip1-1* folyamatos sötétben mért periódusa szinte megegyezik a fényben mértével: a *lip1-1*-ben a fénynek nincs jelentős hatása az óra sebességére. Elképzelhető, hogy a *lip1-1*-ben a periódus fényszabályozását biztosító jelátviteli út folyamatosan bekapcsolt állapotban van, nem képes fogadni a fényérzékelők felől érkező gátló jelet (amelyet a *LIP1* közvetíthet).
5. A *lip1-1* kora este érzékenyebb a beállító fényjelekre. Ez arra utal, hogy a *LIP1* csak ebben a napszakban fejt ki gátló hatását, tehát a *LIP1* működését az óra zsilipel.
6. Központi óragének mRNS szintjét állandó fényben nem érinti jelentősen a *LIP1* elrontása. A természetes viszonyokat utánzó fény/sötét körülmények között azonban az esti kifejeződésű *TOC1* mRNS szintje jelentősen csökken, miközben a reggeli kifejeződésű *CCA1* és *LHY* szintje nem változik. Erre a furcsa viselkedésre egyelőre nem tudunk magyarázatot adni, de már mások is megfigyelték.
7. A *lip1-1* mutáns szikalatti szára vörös és kék fényben rövidebb, sötétben és távolivörösben viszont a vad háttérűével megegyező. Ez utóbbi azért figyelemreméltó, mert a rövid periódus sötétben is megfigyelhető. További érdekesség, hogy erős fényben, ahol nincs különbség a periódusban, a szikalatti szár szintén rövid. Eszerint a cirkadián és a fényfejlődési tünetek más módon alakulnak ki.

8. A *lip1-1* mutáns bőrszöveti sejtjei lekerekítettek, ami az aktinhálózat zavarára utal.
9. A *lip1-1* növények sóérzékenyek.
10. A térképezés eredményeként kiderült, hogy a *lip1-1* mutánsban a LIP1 gén első fele a promóter egy részével együtt hiányzik, ezért a *lip1-1* hiányváltozatnak tekinthető.
11. A *lip1-1* tünetegyüttes sikeres gyógyítása a *35S* vagy a *LIP1* promóter által szabályozottan termelődő YFP-LIP1 fehérjével megerősítette a térképezés eredményét.
12. A *LIP1* egy különleges, a magvas növényekre jellemző kis GTPáz kódol.
13. A LIP1 fehérje aminosavsorrendjének számítógépes elemzésével a molekula szabályozásának egy lehetséges módját sikerült felvázolni: a fehérje lebomlási sebességét más ismert órafehérjékhez hasonlóan lépcsőzetes foszforilálás szabályozhatja.
14. Mesterséges MBP-LIP1 fehérje segítségével sikerült kimutatnunk jelentősebb GTP-bontó hatást a LIP1-ben, ami bizonyítja, hogy a szerkezeti különbségek ellenére a LIP1 valóban egy működőképes GTPáz.
15. A LIP1 kifejeződését több szinten is megvizsgáltuk. Eredményeink szerint a cirkadián óra nincs jelentős hatással a *LIP1* mRNS egyensúlyi szintjére. Ugyanakkor a LIP1 fehérje termelődésében és egyensúlyi szintjében a névleges naplemente környékén csúcsosodó cirkadián szabályozás jelenlétét sikerült kimutatni. Az YFP-LIP1 fluoreszcens jelét a sejtek magjában és plazmájában is látni lehetett.
16. Élesztő kéthibrid szűréssel azonosítottunk egy a LIP1-gyel kölcsönható fehérjét, a ROPGEF7-et. Ez a fehérje egyéb esti kifejeződésű cirkadián órafehérjékkel (ZTL, GI, TOC1) is összeragad. Ezek a fehérjék egymással is kölcsönhatnak, ami felveti egy esti fehérjeegyüttes létezésének lehetőségét.

A LIP1 az első azonosított kis GTPáz a növényi cirkadián rendszerben. Kísérleteink alapján a cirkadián óra fénybemenetének szabályozásában vesz részt. Megmutattuk, hogy a LIP1 szükséges a periódus fényfüggő hangolásához és az óra fényvillanásokkal történő beállításához, kifejezetten a névleges éjszaka első felében. Adataink szerint a LIP1 az esti hurok részeként – valószínűleg más fényérzékeny fehérjék, pl. a ZTL vagy a GI működésének szabályozásán keresztül – korlátozza a fényjelekkel való beállítás fokát a cirkadián körnek ebben az időszakában, amikor a természetben fény nincs jelen. Lehetséges, hogy a LIP1 védi az órát a túl sok, vagy rosszul időzített fénytől, ezzel járulva hozzá a növényi óra pontos és erőteljes működéséhez.

SUMMARY

Introduction

The circadian clock is a biological timing mechanism which provides rhythmicity to gene expression, metabolism and physiology in many organisms. This internal clock helps the organisms to anticipate the most predictable periodic environmental change on Earth: the succession of days and nights, allowing different processes to be scheduled to the most appropriate time of the day. Precise synchronisation of these internal processes to rhythmically changing environmental cues has been shown to enhance fitness of organisms [14].

The genetic circuit underlying the *Arabidopsis* circadian oscillator was initially proposed to function through the reciprocal regulation between the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*), *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*) and *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*) genes [53,54,73]. The morning-expressed *CCA1/LHY* Myb transcription factors repress the *TOC1* gene; conversely, the evening-expressed *TOC1* positively regulates the transcription of *CCA1/LHY* [52]. *TOC1* belongs to the PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR) protein family, which consists of five members: *TOC1/PRR1*, 3, 5, 7 and 9 [69]. Recent results of mathematical modelling and experimental approaches have revealed two additional regulatory loops coupled to the *CCA1/LHY-TOC1* circuit. The “evening loop” is formed by *TOC1* and a hypothetical factor *Y*, both expressed in the evening. *Y* positively regulates *TOC1*, whereas *TOC1* represses *Y* transcription, which is also inhibited by *CCA1/LHY*. *TOC1* promotes *CCA1/LHY* transcription via another hypothetical component, *X* [58]. It has been demonstrated that *GIGANTEA* (*GI*), a nuclear protein with unknown biochemical function is an essential contributor to *Y* function [61]. The “morning loop” is formed by *CCA/LHY* and *PRR7/9*. *CCA1/LHY* activates *PRR7/9* expression in the morning;

conversely, PRR7/9 inhibit CCA1/LHY during the rest of the day [61,78]. The coordinated function of the three loops is required to generate the ~24 h basic oscillations in *Arabidopsis*.

This oscillation is synchronised to the environment via periodic light and temperature signals normally associated with the natural day/night cycles. Light signals are perceived by the red/far-red light absorbing phytochrome photoreceptors and the blue light absorbing cryptochromes [117,139] and are transduced to the oscillator through the input pathways. The resetting process, also called as entrainment is essential for setting the phase of the oscillator to the environmental light/dark cycles. The light input also modulates the pace/period of the clock under constant light conditions. Each loop of the plant oscillator contains at least one light-inducible/sensitive component (PRR9, CCA1/LHY, GI) providing a possible molecular mechanism for resetting. The F-box protein ZEITLUPE (ZTL) [135] and protein kinase CK2 [229] represent a different level of regulation, since they are not directly involved in the transcriptional control of clock genes, but they primarily affect the abundance or activity of certain clock proteins. ZTL directs TOC1 for degradation in a light-dependent manner [224], whereas CK2 modulates the activity of CCA1 via phosphorylation [90].

In my thesis I report about our team effort resulted in the identification and characterisation of a novel clock-associated factor, LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1 (LIP1). We demonstrated that LIP1 is a negative factor controlling the light-dependent period shortening of circadian rhythms and light-induced phase resetting during the subjective night in plants and that LIP1 represents the first small GTPase affecting the circadian clock function in plants. Small monomeric GTPases form a large family of eukaryotic proteins with a highly conserved basic biochemical function, which relies on binding and subsequent hydrolysis of guanine nucleotides in a cyclic manner [165]. Small GTPases are molecular switches shuttling between the GDP-bound inactive and the GTP-bound active states. Based on their structural and functional similarities, small GTPases are divided into five subfamilies, RAS, RHO, RAB, RAN, ARF, respectively [213]. LIP1 owns some characteristics of the above mentioned classes, but exhibits remarkable differences which makes this molecule a member of a new, seed plant (Spermatophyta) specific subfamily of small GTPases.

Research objectives

Despite the progression made toward understanding the *Arabidopsis* circadian clock, our knowledge is still incomplete. The present model of the plant circadian clock is quite oversimplified. In order to facilitate building a more complete model we decided to conduct a mutant screen searching for new clock components. We created transgenic plants carrying the *CAB2:LUC* reporter gene. The firefly luciferase gene fused to a circadian controlled promoter allowed us to measure the changes of gene expression pattern in real time in living plants for several days by detecting bioluminescence. These plants were EMS treated so as to introduce random point mutations into the genome. Mutants showing altered circadian gene expression pattern were then selected and genetically mapped to identify the mutated gene responsible for the observed phenotype.

Methods

- Molecular cloning techniques
- Creation and maintenance of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants
- EMS mutagenesis
- Genetic mapping, high-throughput genotyping PCR
- *In vivo* luciferase enzyme activity measurements in intact seedlings
- Determination of period length of circadian rhythms by using BRASS software
- Measuring quantitative traits of plants (hypocotyl length, flowering time) under different light and day-length conditions
- Plant total RNA extraction, Northern blotting, Real-time PCR
- Total plant protein isolation, Western blotting
- Various microscope techniques
- Bacterial expression and purification of fusion proteins
- *In vitro* GTPase assay
- Yeast two-hybrid screen and test for protein interactions
- Transient protein expression in plant cells and co-immunoprecipitation of protein complexes

Results

lip1-1 affects multiple circadian outputs and period of the clock

lip1-1 was initially isolated as an early-phase phase mutant based on the expression pattern of the morning-expressed *CAB2:LUC* circadian output marker during the first 36 h in constant dark (DD). However, prolonged free-running experiments in constant red light (LL) demonstrated that the period of *lip1-1* is 1.5-2 h shorter than that of wild-type (WT) plants. A different molecular marker, the evening-expressed *CCR2:LUC+* also displayed a similar short period phenotype in LL and DD and leaf movement rhythms were also shortened in *lip1-1*. These results indicate that LIP1 is not a component of the output pathway, because the mutation affects several different overt rhythms.

In plants, there is an inverse relationship between the free-running period in LL and the fluence rate of the light: the higher the fluence rate, the shorter the period. As a result, fluence rate curves (FRCs, plots of period values as the function of fluence rates) in plants show a negative slope [34]. To construct FRCs, WT and *lip1-1* seedlings expressing *CCR2:LUC+* were entrained by 12:12 LD cycles for one week and transferred to different fluences of constant red or blue light. Periods in the mutant seedlings remain almost constant over the tested range of fluence rates, in contrast to WT plants, where periods are shortened by increasing light intensity. As a result, periods of WT and mutant plants were indistinguishable at medium and high fluences of red light and high fluences of blue light. Moreover, periods in *lip1-1* plants in DD fall in the range of period values plotted on FRCs, further corroborating the fact that light has very little effect on the pace of the clock in *lip1-1*.

lip1-1 is more sensitive to resetting light stimuli around dusk

Light input is important not only for tuning the period but also for daily entrainment. It is a well-known phenomenon that the clock restricts its own sensitivity to resetting stimuli to particular times of the day, especially to around dawn and dusk by rhythmic regulation of the input components. To test if the mutation affects this function, we scanned the entrainability of the clock during a circadian cycle. Seedlings free-running in DD were irradiated for 1 h by red light pulses in every 3 hours. The phase of the

circadian rhythm shifts upon these resetting light pulses. After correction by the free running period of the untreated plants the phase shifts were plotted as a function of the time of the given resetting stimuli, yielding the Phase Response Curves (PRCs) of *lip1-1* and WT plants. The most significant difference between *lip1-1* and WT plants in sensitivity for resetting stimuli can be observed during the first half of the subjective night. This suggests an important function for LIP1 at this time of the cycle.

Analysis of mRNA abundance of clock components in lip1

To see how period and mRNA level of some of the core oscillator components is affected by LIP1 we analysed the temporal expression of the morning-expressed core oscillator genes *CCA1*, *LHY* and the evening-expressed *TOC1*. The period of the *CCA1:LUC+* and *LHY:LUC+* reporters was tested in WT and *lip1-1* seedlings under low fluences of red light. We found that the 1.5–2 h short period phenotype is apparent in all cases in the mutant plants by the fourth day of the free run. The rhythmic accumulation of *CCA1*, *LHY* and *TOC1* mRNA was measured in *lip1-2* (*lip1-2* is a T-DNA insertion null allele of *lip1* in the Col-0 accession) under the same conditions by Northern blot. Although the mutation alters the period of rhythmic expression, the mean levels of either the morning- or the evening-expressed core oscillator genes are not affected significantly under free-running conditions. We also defined mRNA abundance of the same clock genes by quantitative PCR in seedlings grown in LD cycles. Expression patterns of *CCA1* and *LHY1* were comparable in *lip1-1* and WT seedlings. In contrast, the abundance of *TOC1* mRNA was drastically reduced in *lip1-1* as compared to WT.

LIP1 encodes an atypical small GTPase

Genetic mapping of the *lip1-1* mutant identified At5g64813 as *LIP1* and showed that the mutation is caused by a deletion eliminating the first half of the gene. Successful complementation of *lip1-1* by expressing the YFP-LIP1 fusion protein under the control of the *35S* or the native *LIP1* promoter verified the mapping data. Based on the predicted amino acid sequence LIP1 shows significant similarity to small GTPases [165,213], but with some remarkable differences. LIP1 contains peptide inserts at several positions which are missing from the classical small GTPases. The most interesting feature is the replacement of glutamine₉₄ (Q₉₄) for histidine (H). This

catalytical glutamine is highly conserved in all of the classical small GTPases [162]. Its mutation results in the loss of GTPase activity (while the protein still binds GTP), leading to a constitutively active state of the protein. Finally, LIP1 lacks specific motifs at the N or C terminus for lipid modifications.

We characterised expression pattern of LIP1 at multiple levels. First, we showed that abundance of *LIP1* mRNA in WT seedlings in LL is not significantly affected by the circadian clock and shows only a very weak oscillatory pattern if any. Second, we determined abundance of the YFP-LIP1 fusion protein in *lip1-1* seedlings complemented by expressing the *35S:YFP-LIP1* transgene under the same conditions. Results obtained by Western blot analysis does not exclude a possible, low amplitude circadian oscillation in the YFP-LIP1 protein level with a peak around the subjective dusk. This expression pattern conditionally supports the PRC data indicating that LIP1 may function at the first half of the subjective night.

Finally we characterised the subcellular localisation of the LIP1 protein in darkness, where it most clearly exerts its function. 4-day-old etiolated *lip1-1* mutant plants expressing the YFP-LIP1 fusion protein were analysed by confocal microscopy. YFP fluorescence can be observed both in the nucleus and the cytosol of hypocotyl epidermal cells. The nucleus was evenly filled with YFP signal; nuclear speckles were not detected. The subcellular localisation of LIP1 is not significantly affected by light, since essentially the same distribution pattern was observed in light-grown plants.

In order to test if LIP1 is a functional GTPase, we purified recombinant maltose-binding protein-LIP1 (MBP-LIP1) fusion proteins from *Escherichia coli* and tested for GTP-hydrolysing activity using [α - 32 P]-GTP as substrate. Reaction products were analysed by thin layer chromatography. We were able to detect significant GTP hydrolysing activity of LIP1, which clearly shows that, despite its atypical nature, LIP1 is a functional GTPase.

To map the signaling network of LIP1 we conducted a yeast-two-hybrid screen searching for LIP1 interacting proteins. We identified a strong interactor that turned out to be one of the 14 member containing ROPGEF family of small GTPase nucleotide exchangers. The interaction was verified *in planta* by co-immunoprecipitation. When we tested interaction between ROPGEF7 and circadian clock proteins we discovered that it binds several night specific clock proteins. Furthermore, these proteins

mutually interact with each other. It raises the possibility of a night specific regulatory protein complex that possibly contains LIP1 as well.

Discussion

LIP1 regulates light input to the plant circadian clock

We propose that LIP1 plays a negative role in controlling circadian period and light suppresses this effect in a fluence rate dependent manner. Elimination of LIP1 function (e.g. *lip1-1*) mimics the effect of light and results in a short-period phenotype even in darkness. It follows that in WT plants LIP1 function is fully suppressed at those fluence rates, where *lip1-1* plants display WT periods. We emphasize, however that although the period is less sensitive to light in *lip1-1*, PRCs revealed hypersensitivity to resetting light pulses in the mutant specifically during the first half of the subjective night, producing significantly larger phase delays than in WT. The molecular mechanism by which LIP1 negatively regulates resetting however, remains to be elucidated.

ELF3, ZTL are known clock-associated factors whose function could be paralleled to that of LIP1 in some aspects. ELF3 attenuates resetting light signals similarly to LIP1, but at a slightly later phase. ELF3 negatively regulates period similarly to LIP1, but this is light dependent: WT periods were observed in DD in plants misexpressing ELF3. Moreover, ELF3 probably affects the clock via the transcription of CCA1/LHY [87]. ZTL and XCT has a function in regulating period opposite to that of LIP1. *ztl* mutants show extreme long periods in DD that are dramatically shortened by light. However, ZTL affects the clock at the posttranscriptional level [224]. Based on our data, we propose that LIP1 controls the pace of the clock acting primarily at posttranscriptional level and could be involved in the regulation of the abundance or nucleo-cytoplasmic distribution of its yet unknown target.

Independent of this hypothesis we note that the reduced level of *TOC1* mRNA in LD grown seedlings is consistent with a shortening of the period in the *lip1* mutant, as strong loss-of-function *toc1* mutants have even shorter periods than *lip1*. Current models of the plant clock mechanism [61,82] indicate that *TOC1* is both repressed by the morning functions of *LHY* and *CCA1*, and activated by the evening functions

including *Gl*. It remains to be determined which regulatory mechanism links LIP1 function to the clock circuit.

Light inhibition of hypocotyl elongation is rhythmically gated by the circadian clock, and virtually all clock mutants show aberrations in this photomorphogenic response [28]. Our data indicate a negative role for *LIP1*, throughout the entire fluence rate range tested, in red and blue but not in far-red light-dependent inhibition of hypocotyl growth. Hypocotyl length in dark-grown plants was the same in all genotypes, indicating that the differences observed were indeed light-dependent. The hypersensitivity to red and blue light is also apparent at high fluence rates, where the clock function is not affected by *lip1-1*. Thus our data suggest a separate role for LIP1 in photomorphogenesis. There is only one small GTPase that has been implicated in the regulation of hypocotyl elongation so far. PRA2 from pea is a typical RAB-like small GTPase [230] and was shown to modulate the synthesis of brassinosteroids in the dark. Misexpression of PRA2 in transgenic tobacco results in a dark-specific hypocotyl phenotype indicating substantially different functions for PRA2 and LIP1 in the regulation of hypocotyl elongation. It is worth mentioning that *lip1* mutant plant has other developmental deficiencies as well. The epidermal cells of *lip1* did not show the well known jigsaw puzzle-like shape but are rounded. This indicates the misregulation of the cytoskeleton, typical of the mutation of ROP GTPases. Mutant plants are also salt sensitive.

LIP1 represents a novel biochemical function in the clock

LIP1 belongs to a novel subfamily of small GTPases. *In vitro* assays demonstrated significant GTP binding and hydrolysing activity of LIP1, making this protein the first small GTPase with a role in the circadian network of plants. In fact, there are at least two other small GTPase that has been implicated in the function of circadian clocks in any organisms studied so far. Mutations in RAB3a have been suggested to affect the period of behavioural rhythms in mice [226]. However, the core molecular oscillator was not affected, indicating that RAB3a is not functioning in the light input pathway or the oscillator itself, but probably affects the coordination/coupling of rhythm-generating nerve cells. On the other hand, DEXRAS1 has been implicated in shaping the phase-dependent responsiveness of the mammalian circadian clock to photic entrainment cues [227].

The interaction of LIP1 with a *bona fide* ROPGEF was surprising because it was described earlier that ROPGEFs are specific regulators of the ROP family of GTPases and LIP1 is clearly not a ROP type GTPase, considering its amino acid sequence. It is possible that ROPGEF is not a regulator but actually a downstream effector of LIP1. Alternative explanation is that despite different primary structure, LIP1 conformation mimics ROP. Either way, it may explain the observed typical ROP phenotype, the distorted shape of epidermal cells and maybe salt sensitivity as well.

Analysis of *Arabidopsis* protein sequences identified only one close homolog (named LIP2) of LIP1 sharing the characteristic motifs. Tblastn search of available EST and genomic databases revealed the presence of highly conserved LIP-like sequences in several higher plant taxa, but not in non-plant organisms, suggesting a function for LIP-like molecules that is associated with the physiology of seed plants (Spermatophyte).

Conclusion

We identified the small GTPase LIP1 as a novel component of the light input pathway of the plant circadian network. We demonstrate that LIP1 function is required for the light-dependent modulation of period and for proper resetting of the clock by light pulses, especially during the early subjective night. Our data show that LIP1 – presumably through regulation of other light sensitive components, i.e. ZTL or GI – limits the degree of phase resetting by light pulses at this time of the circadian cycle, when light is normally not present. It is possible that LIP1 protects the clock from excessive or mis-timed light and, therefore, contributes to the robustness and accuracy of the plant circadian clockwork.

IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK

1. Johnson CH: Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms. *Annual Review of Physiology* 2001, **63**: 695-728.
2. Hotta CT, Gardner MJ, Hubbard KE, Baek SJ, Dalchau N, Suhita D, Dodd AN, Webb AA: Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant Cell and Environment* 2007, **30**(3): 333-349.
3. Mizuno T, Yamashino T: Comparative transcriptome of diurnally oscillating genes and hormone-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*: insight into circadian clock-controlled daily responses to common ambient stresses in plants. *Plant and Cell Physiology* 2008, **49**(3): 481-487.
4. Surpin M, Raikhel N: Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004, **5**(2): 100-109.
5. Meroow M, Roenneberg T: Cellular clocks: coupled circadian and cell division cycles. *Current Biology* 2004, **14**(1): R25-26.
6. Berman-Frank I, Lundgren P, Chen YB, Kupper H, Kolber Z, Bergman B, Falkowski P: Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science* 2001, **294**(5546): 1534-1537.
7. Hartwell J: The co-ordination of central plant metabolism by the circadian clock. *Biochemical Society Transactions* 2005, **33**(Pt 5): 945-948.
8. Dunlap JC: Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999, **96**(2): 271-290.
9. Aschoff J: Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 1979, **49**(3): 225-249.
10. Johnson CH: Phase Response Curves: what can they tell us about circadian clocks? *Circadian clocks from cell to human* 1. kiadás, szerk: Hiroshige T, Honma K, Hokkaido University Press, Sapporo, 1992: 209-249.
11. Johnson CH, Elliott JA, Foster R: Entrainment of circadian programs. *Chronobiology International* 2003, **20**(5): 741-774.
12. Roenneberg T, Meroow M: Circadian clocks: Omnes viae Romam ducunt. *Current Biology* 2000, **10**(20): R742-745.
13. Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH: Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(15): 8660-8664.
14. Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kevei É, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA: Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 2005, **309**(5734): 630-633.
15. Eskin A: Identification and physiology of circadian pacemakers. Introduction. *Federation Proceedings* 1979, **38**(12): 2570-2572.
16. Rand DA, Shulgin BV, Salazar JD, Millar AJ: Uncovering the design principles of circadian clocks: mathematical analysis of flexibility and evolutionary goals. *Journal of Theoretical Biology* 2006, **238**(3): 616-635.
17. Cheng P, Yang Y, Liu Y: Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(13): 7408-7413.

18. Tsai TY, Choi YS, Ma W, Pomerening JR, Tang C, Ferrell JE, Jr.: Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops. *Science* 2008, **321**(5885): 126-129.
19. Roenneberg T, Merrow M: Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *Journal of Biological Rhythms* 1998, **13**(2): 167-179.
20. Liu Y, Tsinoremas NF, Johnson CH, Lebedeva NV, Golden SS, Ishiura M, Kondo T: Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes & Development* 1995, **9**(12): 1469-1478.
21. Michael TP, Mockler TC, Breton G, McEntee C, Byer A, Trout JD, Hazen SP, Shen R, Priest HD, Sullivan CM, Givan SA, Yanovsky M, Hong F, Kay SA, Chory J: Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genetics* 2008, **4**(2): e14.
22. 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, **290**(5499): 2110-2113.
23. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ: Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Genetics* 2005, **6**(7): 544-556.
24. Thain SC, Hall A, Millar AJ: Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Current Biology* 2000, **10**(16): 951-956.
25. Yakir E, Hilman D, Harir Y, Green RM: Regulation of output from the plant circadian clock. *FEBS Journal* 2007, **274**(2): 335-345.
26. Salomé PA, Xie Q, McClung CR: Circadian timekeeping during early *Arabidopsis* development. *Plant Physiology* 2008, **147**(3): 1110-1125.
27. Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN: Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 2007, **448**(7151): 358-361.
28. Dowson-Day MJ, Millar AJ: Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 1999, **17**(1): 63-71.
29. Covington MF, Harmer SL: The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* 2007, **5**(8): e222.
30. Michael TP, Breton G, Hazen SP, Priest H, Mockler TC, Kay SA, Chory J: A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biology* 2008, **6**(9): e225.
31. Hanano S, Domagalska MA, Nagy F, Davis SJ: Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes to Cells* 2006, **11**(12): 1381-1392.
32. Salter MG, Franklin KA, Whitelam GC: Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature* 2003, **426**(6967): 680-683.
33. Engelmann W, Johnsson A: Rhythms in organ movement. *Biological rhythms and photoperiodism in plants* 1. kiadás, szerk: Lumsden PJ, Millar AJ, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 1998: 35-50.
34. Somers DE, Webb AA, Pearson M, Kay SA: The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 1998, **125**(3): 485-494.
35. Thimann KV, Tan Z-Y, Park J: Cycling of stomatal aperture in leaves of plants with crassulacean acid metabolism under constant conditions. *American Journal of Botany* 1992, **79**(1): 23-27.
36. Gorton HL, Williams WE, Assmann SM: Circadian rhythms in stomatal responsiveness to red and blue light. *Plant Physiology* 1993, **103**(2): 399-406.
37. Booi-James IS, Swegle WM, Edelman M, Mattoo AK: Phosphorylation of the D1 photosystem II reaction center protein is controlled by an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiology* 2002, **130**(4): 2069-2075.
38. Bancos S, Szatmári AM, Castle J, Kozma-Bognár L, Shibata K, Yokota T, Bishop GJ, Nagy F, Szekeres M: Diurnal regulation of the brassinosteroid-biosynthetic *CPD* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2006, **141**(1): 299-309.

39. Blazquez MA, Trenor M, Weigel D: Independent control of gibberellin biosynthesis and flowering time by the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2002, **130**(4): 1770-1775.
40. Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven LJ, Dowson-Day MJ, Wang ZY, Tobin EM, Harren FJ, Millar AJ, Van Der Straeten D: Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2004, **136**(3): 3751-3761.
41. Jouve L, Gaspar T, Kevers C, Greppin H, Degli Agosti R: Involvement of indole-3-acetic acid in the circadian growth of the first internode of *Arabidopsis*. *Planta* 1999, **209**(1): 136-142.
42. Covington MF, Maloof JN, Straume M, Kay SA, Harmer SL: Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol* 2008, **9**(8): R130.
43. Searle I, Coupland G: Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J* 2004, **23**(6): 1217-1222.
44. Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G: *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 2001, **410**(6832): 1116-1120.
45. Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierc J, Samach A, Coupland G: *CONSTANS* and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006, **18**(11): 2971-2984.
46. Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G: Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. *Science* 2004, **303**(5660): 1003-1006.
47. Liu LJ, Zhang YC, Li QH, Sang Y, Mao J, Lian HL, Wang L, Yang HQ: COP1-mediated ubiquitination of *CONSTANS* is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008, **20**(2): 292-306.
48. Huang T, Böhlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O: The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 2005, **309**(5741): 1694-1696.
49. Highkin HR, Hanson JB: Possible interaction between light-dark cycles and endogenous daily rhythms on the growth of tomato plants. *Plant Physiology* 1954, **29**(3): 301-302.
50. Went FW: Photo- and thermoperiodic effects in plant growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1960, **25**: 221-230.
51. Green RM, Tingay S, Wang ZY, Tobin EM: Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 2002, **129**(2): 576-584.
52. Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA: Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 2001, **293**(5531): 880-883.
53. Wang ZY, Tobin EM: Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 1998, **93**(7): 1207-1217.
54. Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carré IA, Coupland G: The *late elongated hypocotyl* mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 1998, **93**(7): 1219-1229.
55. Green RM, Tobin EM: Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(7): 4176-4179.
56. Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, Wright L, Mizoguchi M, Song HR, Carré IA, Coupland G: *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 2002, **2**(5): 629-641.
57. Ding Z, Doyle MR, Amasino RM, Davis SJ: A complex genetic interaction between *Arabidopsis thaliana* *TOC1* and *CCA1/LHY* in driving the circadian clock and in output regulation. *Genetics* 2007, **176**(3): 1501-1510.
58. Locke JC, Southern MM, Kozma-Bognár L, Hibberd V, Brown PE, Turner MS, Millar AJ: Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Molecular Systems Biology* 2005, **1**: 0013.
59. Doyle MR, Davis SJ, Bastow RM, McWatters HG, Kozma-Bognár L, Nagy F, Millar AJ, Amasino RM: The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2002, **419**(6902): 74-77.

60. Kikis EA, Khanna R, Quail PH: ELF4 is a phytochrome-regulated component of a negative-feedback loop involving the central oscillator components CCA1 and LHY. *Plant Journal* 2005, **44**(2): 300-313.
61. Locke JC, Kozma-Bognár L, Gould PD, Fehér B, Kevei É, Nagy F, Turner MS, Hall A, Millar AJ: Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 2006, **2**: 59.
62. Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG, Somers DE: ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 2007, **449**(7160): 356-360.
63. Martin-Tryon EL, Kreps JA, Harmer SL: GIGANTEA acts in blue light signaling and has biochemically separable roles in circadian clock and flowering time regulation. *Plant Physiology* 2007, **143**(1): 473-486.
64. Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T: FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 2007, **318**(5848): 261-265.
65. Fowler S, Lee K, Onouchi H, Samach A, Richardson K, Morris B, Coupland G, Putterill J: GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J* 1999, **18**(17): 4679-4688.
66. Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, Kim HJ, Kay SA, Nam HG: Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* GIGANTEA gene. *Science* 1999, **285**(5433): 1579-1582.
67. Huq E, Tepperman JM, Quail PH: GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(17): 9789-9794.
68. David KM, Armbruster U, Tama N, Putterill J: *Arabidopsis* GIGANTEA protein is post-transcriptionally regulated by light and dark. *FEBS Letters* 2006, **580**(5): 1193-1197.
69. Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T: Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant and Cell Physiology* 2000, **41**(9): 1002-1012.
70. Eriksson ME, Hanano S, Southern MM, Hall A, Millar AJ: Response regulator homologues have complementary, light-dependent functions in the *Arabidopsis* circadian clock. *Planta* 2003, **218**(1): 159-162.
71. Yamamoto Y, Sato E, Shimizu T, Nakamichi N, Sato S, Kato T, Tabata S, Nagatani A, Yamashino T, Mizuno T: Comparative genetic studies on the APRR5 and APRR7 genes belonging to the APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythm, control of flowering time, and early photomorphogenesis. *Plant and Cell Physiology* 2003, **44**(11): 1119-1130.
72. Mizuno T, Nakamichi N: Pseudo-Response Regulators (PRRs) or True Oscillator Components (TOCs). *Plant and Cell Physiology* 2005, **46**(5): 677-685.
73. Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA, Kay SA: Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 2000, **289**(5480): 768-771.
74. Nakamichi N, Murakami-Kojima M, Sato E, Kishi Y, Yamashino T, Mizuno T: Compilation and characterization of a novel WNK family of protein kinases in *Arabidopsis thaliana* with reference to circadian rhythms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2002, **66**(11): 2429-2436.
75. Murakami-Kojima M, Nakamichi N, Yamashino T, Mizuno T: The APRR3 component of the clock-associated APRR1/TOC1 quintet is phosphorylated by a novel protein kinase belonging to the WNK family, the gene for which is also transcribed rhythmically in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 2002, **43**(6): 675-683.
76. Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T: Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 2000, **41**(6): 791-803.
77. Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper-Bamnlolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E: The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant Journal* 2006, **46**(3): 462-476.

78. Farré EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA: Overlapping and distinct roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Current Biology* 2005, **15**(1): 47-54.
79. Kaczorowski KA, Quail PH: *Arabidopsis PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7* is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock. *Plant Cell* 2003, **15**(11): 2654-2665.
80. Nakamichi N, Kita M, Ito S, Sato E, Yamashino T, Mizuno T: The *Arabidopsis* pseudo-response regulators, *PRR5* and *PRR7*, coordinately play essential roles for circadian clock function. *Plant and Cell Physiology* 2005, **46**(4): 609-619.
81. 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 and Cell Physiology* 2005, **46**(5): 686-698.
82. Zeilinger MN, Farré EM, Taylor SR, Kay SA, Doyle FJ, 3rd: A novel computational model of the circadian clock in *Arabidopsis* that incorporates *PRR7* and *PRR9*. *Molecular Systems Biology* 2006, **2**: 58.
83. Hazen SP, Schultz TF, Pruneda-Paz JL, Borevitz JO, Ecker JR, Kay SA: *LUX ARRHYTHMO* encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(29): 10387-10392.
84. Onai K, Ishiura M: *PHYTOCLOCK 1* encoding a novel GARP protein essential for the *Arabidopsis* circadian clock. *Genes to Cells* 2005, **10**(10): 963-972.
85. Zhang X, Chen Y, Wang ZY, Chen Z, Gu H, Qu LJ: Constitutive expression of *CIR1 (RVE2)* affects several circadian-regulated processes and seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 2007, **51**(3): 512-525.
86. Hanano S, Stracke R, Jakoby M, Merkle T, Domagalska MA, Weisshaar B, Davis SJ: A systematic survey in *Arabidopsis thaliana* of transcription factors that modulate circadian parameters. *BMC Genomics* 2008, **9**(1): 182.
87. Covington MF, Panda S, Liu XL, Strayer CA, Wagner DR, Kay SA: *ELF3* modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001, **13**(6): 1305-1315.
88. McWatters HG, Kolmos E, Hall A, Doyle MR, Amasino RM, Gyula P, Nagy F, Millar AJ, Davis SJ: *ELF4* is required for oscillatory properties of the circadian clock. *Plant Physiology* 2007, **144**(1): 391-401.
89. Makino S, Matsushika A, Kojima M, Yamashino T, Mizuno T: The *APRR1/TOC1* quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with *APRR1*-overexpressing plants. *Plant and Cell Physiology* 2002, **43**(1): 58-69.
90. Daniel X, Sugano S, Tobin EM: CK2 phosphorylation of *CCA1* is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(9): 3292-3297.
91. Sugano S, Andronis C, Ong MS, Green RM, Tobin EM: The protein kinase *CK2* is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(22): 12362-12366.
92. Portolés S, Más P: Altered oscillator function affects clock resonance and is responsible for the reduced day-length sensitivity of *CKB4* overexpressing plants. *Plant Journal* 2007, **51**(6): 966-977.
93. Fujiwara S, Wang L, Han L, Suh SS, Salomé PA, McClung CR, Somers DE: Post-translational regulation of the *Arabidopsis* circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *Journal of Biological Chemistry* 2008, **283**(34): 23073-23083.
94. Farré EM, Kay SA: *PRR7* protein levels are regulated by light and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 2007, **52**(3): 548-560.
95. Song HR, Carré IA: *DET1* regulates the proteasomal degradation of *LHY*, a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Molecular Biology* 2005, **57**(5): 761-771.
96. Perales M, Portolés S, Más P: The proteasome-dependent degradation of *CKB4* is regulated by the *Arabidopsis* biological clock. *Plant Journal* 2006, **46**(5): 849-860.
97. Martin-Tryon EL, Harmer SL: *XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER* coordinates light signals for proper timing of photomorphogenesis and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008, **20**(5): 1244-1259.
98. Tomita J, Nakajima M, Kondo T, Iwasaki H: No transcription-translation feedback in circadian rhythm of *KaiC* phosphorylation. *Science* 2005, **307**(5707): 251-254.

99. Tseng TS, Salomé PA, McClung CR, Olszewski NE: SPINDLY and GIGANTEA interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements. *Plant Cell* 2004, **16**(6): 1550-1563.
100. Panda S, Poirier GG, Kay SA: *tej* defines a role for poly(ADP-ribosyl)ation in establishing period length of the *Arabidopsis* circadian oscillator. *Developmental Cell* 2002, **3**(1): 51-61.
101. Kim J, Kim Y, Yeom M, Kim JH, Nam HG: FIONA1 is essential for regulating period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 2008, **20**(2): 307-319.
102. Hyun Y, Lee I: KIDARI, encoding a non-DNA Binding bHLH protein, represses light signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 2006, **61**(1-2): 283-296.
103. Tamanini F, Yagita K, Okamura H, van der Horst GT: Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. *Methods in Enzymology* 2005, **393**: 418-435.
104. Perales M, Más P: A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the *Arabidopsis* biological clock. *Plant Cell* 2007, **19**(7): 2111-2123.
105. Etchegaray JP, Lee C, Wade PA, Reppert SM: Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 2003, **421**(6919): 177-182.
106. Kim JY, Song HR, Taylor BL, Carré IA: Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LHY. *EMBO J* 2003, **22**(4): 935-944.
107. Makino S, Matsushika A, Kojima M, Oda Y, Mizuno T: Light response of the circadian waves of the APRR1/TOC1 quintet: when does the quintet start singing rhythmically in *Arabidopsis*? *Plant and Cell Physiology* 2001, **42**(3): 334-339.
108. Yakir E, Hilman D, Hassidim M, Green RM: *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1* transcript stability and the entrainment of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2007, **145**(3): 925-932.
109. Yu JW, Rubio V, Lee NY, Bai S, Lee SY, Kim SS, Liu L, Zhang Y, Irigoyen ML, Sullivan JA, Lee I, Xie Q, Paek NC, Deng XW: COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Molecular Cell* 2008, **32**(5): 617-630.
110. Kim WY, Geng R, Somers DE: Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(8): 4933-4938.
111. Chen M, Chory J, Fankhauser C: Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics* 2004, **38**: 87-117.
112. Bae G, Choi G: Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual Review of Plant Biology* 2008, **59**: 281-311.
113. Kevei É, Schäfer E, Nagy F: Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* 2007, **58**(12): 3113-3124.
114. Lin C, Shalitin D: Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 2003, **54**: 469-496.
115. Briggs WR, Huala E: Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1999, **15**: 33-62.
116. Briggs WR: The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. *Journal of Biomedical Science* 2007, **14**(4): 499-504.
117. Somers DE, Devlin PF, Kay SA: Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 1998, **282**(5393): 1488-1490.
118. Yanovsky MJ, Mazzella MA, Whitelam GC, Casal JJ: Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Rhythms* 2001, **16**(6): 523-530.
119. Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA: FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 2003, **426**(6964): 302-306.
120. Schultz TF, Kiyosue T, Yanovsky M, Wada M, Kay SA: A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001, **13**(12): 2659-2670.
121. Matsushita T, Mochizuki N, Nagatani A: Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* 2003, **424**(6948): 571-574.
122. Furuya M, Schäfer E: Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends in Plant Science* 1996, **1**(9): 301-307.
123. Sharrock RA, Clack T: Heterodimerization of type II phytochromes in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(31): 11500-11505.

124. Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D: Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 1999, **284**(5415): 760-765.
125. Yu X, Klejnot J, Zhao X, Shalitin D, Maymon M, Yang H, Lee J, Liu X, Lopez J, Lin C: *Arabidopsis* cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell* 2007, **19**(10): 3146-3156.
126. Yanovsky MJ, Mazzella MA, Casal JJ: A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Current Biology* 2000, **10**(16): 1013-1015.
127. Crosson S, Moffat K: Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(6): 2995-3000.
128. Cheng P, He Q, Yang Y, Wang L, Liu Y: Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(10): 5938-5943.
129. Zikihara K, Iwata T, Matsuoka D, Kandori H, Todo T, Tokutomi S: Photoreaction cycle of the light, oxygen, and voltage domain in FKF1 determined by low-temperature absorption spectroscopy. *Biochemistry* 2006, **45**(36): 10828-10837.
130. Cardozo T, Pagano M: The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004, **5**(9): 739-751.
131. Kipreos ET, Pagano M: The F-box protein family. *Genome Biol* 2000, **1**(5): REVIEWS3002.
132. Ho MS, Ou C, Chan YR, Chien CT, Pi H: The utility F-box for protein destruction. *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**(13): 1977-2000.
133. Xiao W, Jang J: F-box proteins in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 2000, **5**(11): 454-457.
134. Adams J, Kelso R, Cooley L: The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in Cell Biology* 2000, **10**(1): 17-24.
135. Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay SA: *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 2000, **101**(3): 319-329.
136. Nelson DC, Lasswell J, Rogg LE, Cohen MA, Bartel B: *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 2000, **101**(3): 331-340.
137. Yasuhara M, Mitsui S, Hirano H, Takanabe R, Tokioka Y, Ihara N, Komatsu A, Seki M, Shinozaki K, Kiyosue T: Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 2004, **55**(405): 2015-2027.
138. Tóth R, Kevei É, Hall A, Millar AJ, Nagy F, Kozma-Bognár L: Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2001, **127**(4): 1607-1616.
139. Devlin PF, Kay SA: Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 2000, **12**(12): 2499-2510.
140. Más P, Devlin PF, Panda S, Kay SA: Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 2000, **408**(6809): 207-211.
141. Jarillo JA, Capel J, Tang RH, Yang HQ, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR: An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* 2001, **410**(6827): 487-490.
142. Millar AJ, Straume M, Chory J, Chua NH, Kay SA: The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 1995, **267**(5201): 1163-1166.
143. Yanovsky MJ, Whitelam GC, Casal JJ: *phy3-1* retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiology* 2000, **123**(1): 235-242.
144. Allen T, Koustenis A, Theodorou G, Somers DE, Kay SA, Whitelam GC, Devlin PF: *Arabidopsis* FHY3 specifically gates phytochrome signaling to the circadian clock. *Plant Cell* 2006, **18**(10): 2506-2516.
145. Li QH, Yang HQ: Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and Photobiology* 2007, **83**(1): 94-101.
146. Khanna R, Huq E, Kikis EA, Al-Sady B, Lanzatella C, Quail PH: A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* 2004, **16**(11): 3033-3044.
147. Castillon A, Shen H, Huq E: Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in Plant Science* 2007, **12**(11): 514-521.

148. Josse EM, Foreman J, Halliday KJ: Paths through the phytochrome network. *Plant Cell and Environment* 2008, **31**(5): 667-678.
149. Martínez-García JF, Huq E, Quail PH: Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 2000, **288**(5467): 859-863.
150. Viczián A, Kircher S, Fejes E, Millar AJ, Schäfer E, Kozma-Bognár L, Nagy F: Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 for the *Arabidopsis thaliana* circadian clockwork. *Plant and Cell Physiology* 2005, **46**(10): 1591-1602.
151. Ptitsyn A: Comprehensive analysis of circadian periodic pattern in plant transcriptome. *BMC Bioinformatics* 2008, **9**(Suppl 9): S18.
152. Harmer SL, Kay SA: Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005, **17**(7): 1926-1940.
153. Staiger D, Zecca L, Wieczorek Kirk DA, Apel K, Eckstein L: The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant Journal* 2003, **33**(2): 361-371.
154. Kuno N, Moller SG, Shinomura T, Xu X, Chua NH, Furuya M: The novel MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2003, **15**(10): 2476-2488.
155. Hassidim M, Yakir E, Fradkin D, Hilman D, Kron I, Keren N, Harir Y, Yerushalmi S, Green RM: Mutations in *CHLOROPLAST RNA BINDING* provide evidence for the involvement of the chloroplast in the regulation of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 2007, **51**(4): 551-562.
156. Dodd AN, Gardner MJ, Hotta CT, Hubbard KE, Dalchau N, Love J, Assie JM, Robertson FC, Jakobsen MK, Goncalves J, Sanders D, Webb AA: The *Arabidopsis* circadian clock incorporates a cADPR-based feedback loop. *Science* 2007, **318**(5857): 1789-1792.
157. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ: The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 2005, **118**(Pt 5): 843-846.
158. Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L: Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology* 2002, **317**(1): 41-72.
159. Assmann SM: Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* 2002, **14**(Suppl): S355-373.
160. Paduch M, Jelen F, Otlewski J: Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochimica Polonica* 2001, **48**(4): 829-850.
161. Geyer M, Wittinghofer A: GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 1997, **7**(6): 786-792.
162. Vetter IR, Wittinghofer A: The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001, **294**(5545): 1299-1304.
163. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A: GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 2007, **129**(5): 865-877.
164. García-Mata R, Burridge K: Catching a GEF by its tail. *Trends in Cell Biology* 2007, **17**(1): 36-43.
165. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews* 2001, **81**(1): 153-208.
166. Aspenstrom P, Ruusala A, Pacholsky D: Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Experimental Cell Research* 2007, **313**(17): 3673-3679.
167. Nielsen E, Cheung AY, Ueda T: The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology* 2008, **147**(4): 1516-1526.
168. Reuther GW, Der CJ: The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Current Opinion in Cell Biology* 2000, **12**(2): 157-165.
169. Etienne-Manneville S, Hall A: Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002, **420**(6916): 629-635.
170. Settleman J: Intercalating *Arabidopsis* leaf cells: a jigsaw puzzle of lobes, necks, ROPs, and RICs. *Cell* 2005, **120**(5): 570-572.
171. Berken A, Thomas C, Wittinghofer A: A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* 2005, **436**(7054): 1176-1180.
172. Wu G, Li H, Yang Z: *Arabidopsis* RopGAPs are a novel family of rho GTPase-activating proteins that require the Cdc42/Rac-interactive binding motif for rop-specific GTPase stimulation. *Plant Physiology* 2000, **124**(4): 1625-1636.

173. Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y: Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology* 2008, **4**: 193.
174. Kaothien P, Ok SH, Shuai B, Wengier D, Cotter R, Kelley D, Kiriakopolos S, Muschietti J, McCormick S: Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. *Plant Journal* 2005, **42**(4): 492-503.
175. Tena G, Asai T, Chiu WL, Sheen J: Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* 2001, **4**(5): 392-400.
176. Colcombet J, Hirt H: *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 2008, **413**(2): 217-226.
177. Murashige T, Skoog F: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 1962, **15**(3): 473-497.
178. Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S: The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(21): 9578-9582.
179. Koncz C, Martini N, Szabados L, Hroudá M, Bachmair A, Schell J: Specialized vectors for gene tagging and expression studies. *Plant Molecular Biology Manual 2*. kiadás, szerk: Gelvin SB, Schilperoort RA, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994, **2**(B2): 1-22.
180. Töpfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH: A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research* 1987, **15**(14): 5890.
181. Koncz C, Schell J: The promoter of T₁-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* 1986, **204**(3): 383-396.
182. James P, Halladay J, Craig EA: Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996, **144**(4): 1425-1436.
183. Millar AJ, Carré IA, Strayer CA, Chua NH, Kay SA: Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 1995, **267**(5201): 1161-1163.
184. Page DR, Grossniklaus U: The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* 2002, **3**(2): 124-136.
185. Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible WR: Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiology* 2000, **123**(3): 795-805.
186. Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL: *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiology* 2002, **129**(2): 440-450.
187. Kim Y, Schumaker KS, Zhu JK: EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology* 2006, **323**: 101-103.
188. Millar AJ, Short SR, Chua NH, Kay SA: A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 1992, **4**(9): 1075-1087.
189. Southern MM, Millar AJ: Circadian genetics in the model higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Enzymology* 2005, **393**: 23-35.
190. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(21): 9828-9832.
191. Neff MM, Neff JD, Chory J, Pepper AE: dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant Journal* 1998, **14**(3): 387-392.
192. Seki M, Narusaka M, Kamiya A, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Oono Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y, Kawai J, Carninci P, Itoh M, Ishii Y, Arakawa T, Shibata K, Shinagawa A, Shinozaki K: Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 2002, **296**(5565): 141-145.
193. Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990, **96**(1): 23-28.
194. Pope B, Kent HM: High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 1996, **24**(3): 536-537.
195. Ahn SC, Baek BS, Oh T, Song CS, Chatterjee B: Rapid mini-scale plasmid isolation for DNA sequencing and restriction mapping. *BioTechniques* 2000, **29**(3): 466-468.

196. Steiner JJ, Poklemba CJ, Fjellstrom RG, Elliott LF: A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research* 1995, **23**(13): 2569-2570.
197. Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 2001.
198. MacDonald PN (szerk): *Two-Hybrid Systems* Totowa (NJ), Humana Press Inc, 2001.
199. Clough SJ, Bent AF: Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 1998, **16**(6): 735-743.
200. Hall A, Brown P: Monitoring circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana* using luciferase reporter genes. *Methods in Molecular Biology* 2007, **362**: 143-152.
201. Edwards KD, Millar AJ: Analysis of circadian leaf movement rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Molecular Biology* 2007, **362**: 103-113.
202. Plautz JD, Straume M, Stanewsky R, Jamison CF, Brandes C, Dowse HB, Hall JC, Kay SA: Quantitative analysis of *Drosophila* period gene transcription in living animals. *Journal of Biological Rhythms* 1997, **12**(3): 204-217.
203. Kevei É, Gyula P, Hall A, Kozma-Bognár L, Kim WY, Eriksson ME, Tóth R, Hanano S, Fehér B, Southern MM, Bastow RM, Viczián A, Hibberd V, Davis SJ, Somers DE, Nagy F, Millar AJ: Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of *ZEITLUPE*. *Plant Physiology* 2006, **140**(3): 933-945.
204. Anderson SL, Teakle GR, Martino-Catt SJ, Kay SA: Circadian clock- and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78 bp cis-acting domain of the *Arabidopsis CAB2* promoter. *Plant Journal* 1994, **6**(4): 457-470.
205. Heintzen C, Nater M, Apel K, Staiger D: AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(16): 8515-8520.
206. Thain SC, Murtas G, Lynn JR, McGrath RB, Millar AJ: The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant Physiology* 2002, **130**(1): 102-110.
207. Para A, Farré EM, Imaizumi T, Pruneda-Paz JL, Harmon FG, Kay SA: PRR3 is a vascular regulator of TOC1 stability in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 2007, **19**(11): 3462-3473.
208. Hall A, Kozma-Bognár L, Bastow RM, Nagy F, Millar AJ: Distinct regulation of *CAB* and *PHYB* gene expression by similar circadian clocks. *Plant Journal* 2002, **32**(4): 529-537.
209. Lakin-Thomas PL: Circadian rhythms: new functions for old clock genes. *Trends in Genetics* 2000, **16**(3): 135-142.
210. Fu Y, Li H, Yang Z: The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis. *Plant Cell* 2002, **14**(4): 777-794.
211. Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, Yang Z: *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 2005, **120**(5): 687-700.
212. Imaizumi T, Kay SA: Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in Plant Science* 2006, **11**(11): 550-558.
213. Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E: Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2003, **131**(3): 1191-1208.
214. Li SS: Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochemical Journal* 2005, **390**(Pt 3): 641-653.
215. Rechsteiner M, Rogers SW: PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 1996, **21**(7): 267-271.
216. Gorl M, Merrow M, Huttner B, Johnson J, Roenneberg T, Brunner M: A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora crassa*. *EMBO J* 2001, **20**(24): 7074-7084.
217. Maciejewski PM, Peterson FC, Anderson PJ, Brooks CL: Mutation of serine 90 to glutamic acid mimics phosphorylation of bovine prolactin. *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**(46): 27661-27665.
218. Park HJ, Ding L, Dai M, Lin R, Wang H: Multisite phosphorylation of *Arabidopsis* HFR1 by casein kinase II and a plausible role in regulating its degradation rate. *Journal of Biological Chemistry* 2008.

219. Scrima A, Thomas C, Deaconescu D, Wittinghofer A: The Rap-RapGAP complex: GTP hydrolysis without catalytic glutamine and arginine residues. *EMBO J* 2008, **27**(7): 1145-1153.
220. Lee K, Loros JJ, Dunlap JC: Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science* 2000, **289**(5476): 107-110.
221. van Leeuwen W, Hagendoorn MJM, Ruttink T, van Poecke R, van der Plas LHW, van der Krol AR: The use of the luciferase reporter system for *in planta* gene expression studies. *Plant Molecular Biology Reporter* 2000, **18**(2): 143a-143t.
222. Kozma-Bognár L, Hall A, Ádám É, Thain SC, Nagy F, Millar AJ: The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(25): 14652-14657.
223. Nebenführ A, Staehelin LA: Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends in Plant Science* 2001, **6**(4): 160-167.
224. Más P, Kim WY, Somers DE, Kay SA: Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2003, **426**(6966): 567-570.
225. Schafmeier T, Káldi K, Diernfellner A, Mohr C, Brunner M: Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes & Development* 2006, **20**(3): 297-306.
226. Kapfhamer D, Valladares O, Sun Y, Nolan PM, Rux JJ, Arnold SE, Veasey SC, Bucan M: Mutations in Rab3a alter circadian period and homeostatic response to sleep loss in the mouse. *Nature Genetics* 2002, **32**(2): 290-295.
227. Cheng HY, Dziema H, Papp J, Mathur DP, Koletar M, Ralph MR, Penninger JM, Obrietan K: The molecular gatekeeper Dexas1 sculpts the photic responsiveness of the mammalian circadian clock. *Journal of Neuroscience* 2006, **26**(50): 12984-12995.
228. Knight H, Thomson AJ, McWatters HG: *SENSITIVE TO FREEZING6* integrates cellular and environmental inputs to the plant circadian clock. *Plant Physiology* 2008, **148**(1): 293-303.
229. Meggio F, Pinna LA: One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB Journal* 2003, **17**(3): 349-368.
230. Kang JG, Yun J, Kim DH, Chung KS, Fujioka S, Kim JI, Dae HW, Yoshida S, Takatsuto S, Song PS, Park CM: Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell* 2001, **105**(5): 625-636.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

1. Ducza E, Gáspár R, Márki Á, **Gyula P**, Bottka S, Falkay G: Use of antisense oligonucleotides to verify the role of the α_{1A} -adrenergic receptor in the contractility of the rat uterus post partum. *Molecular Pharmacology* 2001, **59**(5): 1235-1242.
2. **Gyula P**, Schäfer E, Nagy F: Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2003, **6**(5): 446-452.
3. Edwards KD, Lynn JR, **Gyula P**, Nagy F, Millar AJ: Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Genetics* 2005, **170**(1): 387-400.
4. Kevei É, **Gyula P**, Hall A, Kozma-Bognár L, Kim WY, Eriksson ME, Tóth R, Hanano S, Fehér B, Southern MM, Bastow RM, Viczián A, Hibberd V, Davis SJ, Somers DE, Nagy F, Millar AJ: Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of ZEITLUPE. *Plant Physiology* 2006, **140**(3): 933-945.
5. Kevei É*, **Gyula P***, Fehér B, Tóth R, Viczián A, Kircher S, Rea D, Dorjgotov D, Schäfer E, Millar AJ, Kozma-Bognár L, Nagy F: *Arabidopsis thaliana* circadian clock is regulated by the small GTPase LIP1. *Current Biology* 2007, **17**(17): 1456-1464.†
6. McWatters HG, Kolmos E, Hall A, Doyle MR, Amasino RM, **Gyula P**, Nagy F, Millar AJ, Davis SJ: ELF4 is required for oscillatory properties of the circadian clock. *Plant Physiology* 2007, **144**(1): 391-401.
7. Kerényi Z, Mérai Z, Hiripi L, Benkovics A, **Gyula P**, Lacomme C, Barta E, Nagy F, Silhavy D: Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Journal* 2008, **27**(11): 1585-1595.

* Megosztott első szerzők

† A dolgozat alapjául szolgáló közlemény

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban szereplő eredmények a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetében, a Foto- és Kronobiológiai Csoport együttes erőfeszítésével születtek meg. Külön köszönet illeti Dr. Nagy Ferencet, aki éveken át anyagilag és szellemileg is támogatta és irányította kutatásainkat, és akinek nem kis szerepe volt abban, hogy eredményeinket megfelelő színvonalon tudtuk közzé tenni. Köszönjük Dr. Vass Imrének és Dr. Dudits Dénesnek, hogy kutatásainkat az intézetben lehetővé tették.

Köszönöm munkatársaimnak a kísérleti munkához való hozzájárulásukat: Dr. Kevei Évának, Dr. Tóth Rékának, Fehér Baláznak, Dr. Viczián Andrásnak a térképezésben, valamint a *lip1* mutánsok élettani jellemzésében való részvételüket; Dr. Dean Rea-nak a LIP1 fehérje tisztítási módjának kidolgozását; Dorjgotov Dulguun-nak a LIP1 GTPáz biokémiai vizsgálatában nyújtott életmentő segítségét; Valkai Ildikónak a LIP1-gyel kölcsönható ROPGEF7 fehérje azonosítását; Dr. Bakó Lászlónak az élesztő kéthibrid kölcsönhatások növényi rendszerben való igazolását; Dr. Stefan Kircher-nak az YFP-LIP1 fehérje sejten belüli elhelyezkedésének leírását. Köszönöm Dr. Kozma-Bognár Lászlónak (és munkatársaimnak) a laboratóriumban eltöltött éveim alatt köztünk lezajlott rendkívül értékes és izgalmas tudományos eszmecsseréket, valamint tekintélyes mértékű hozzájárulását a dolgozatom alapját képező közlemény megírásához.

Külön köszönöm Dr. Szekeres Miklósnak az értekezésem tudományos bírálatát, értékes észrevételeit, javaslatait.

Köszönöm Józai Katalin és Majzik Hedvig laborsegédeknek a kísérletek előkészítésében és a növények gondozásában nyújtott pótolhatatlan segítségét.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak a kitartó érdeklődést és támogatást, amelyet munkám és tudományos előmenetelem iránt mindvégig tanúsítottak.