

**A FITOKRÓM B FOTORECEPTOR SZEREPE A VIRÁGZÁS  
FOTOPERIODIKUS SZABÁLYOZÁSÁBAN**

**Hajdu Anita**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Témavezető: Dr. Kozma-Bognár László - tudományos főmunkatárs**

**Biológia Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem**

**MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet**

**2015**

**Szeged**

## A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

Minden élőlény számára esszenciális a reprodukció megfelelő időzítése, különösen igaz ez a helyhez kötött életmódot folytató organizmusok (pl.: növények) esetében. A virágzási idő meghatározásában a megfelelő fejlődési stádiumon kívül jelentős szerep jut a külső környezeti hatásoknak, mint a nappal hosszúsága, a fény minősége vagy az abiotikus stressz. Számos növény esetében a nappal hosszúsága az a külső paraméter, amely elindítja a magképzéshez vezető folyamatokat. Az *Arabidopsisthaliana* egy fakultatív hosszú nappalos növény, ami azt jelenti, hogy a virágzás sokkal hamarabb megtörténik hosszú nappalon (16 óra fény/ 8 óra sötét), mint rövid nappalon (8 óra fény/ 16 óra sötét). A fotoperiodikus idő mérése Arabidopsisban a belső cirkadián óra és a külső környezeti fényjelek közötti interakción alapul, amelynek közvetítői speciális fotoreceptorok.

A cirkadián óra ritmikusan szabályozza a *CONSTANS (CO)* transzkripcióját, oly módon, hogy a CO kifejeződés maximuma csak hosszú nappalon, akkor is az esti órákban esik megvilágított napszakra. Ekkor, a fény jelenlétében, a fitokrómA (phyA) és kriptokróm 1-2 (CRY1 és CRY2) stabilizálja a CO fehérjét azáltal, hogy gátolja a CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) E3 ubikvitin ligáz működését. Ezen fotoreceptorok akciós spektrumából következik, hogy a távoli vörös és a kék fény a leghatékonyabb ebben a folyamatban. Ezzel ellentétben a phyB – a fényen nőtt növények esetében a domináns vörös fényt elnyelő fotoreceptor – indukálja a CO degradációját a nappal első felében, azáltal, hogy egy eddig még ismeretlen ubikvitinligázot aktivál. Ezeknek a hatásoknak az eredménye a CO fehérje felhalmozódása az este során hosszú nappalos körülmények között.

A CO egy „zinc-finger-box” típusú transzkripciófaktor, ami indukálni képes a *FLOWERING LOCUS T (FT)* transzkripcióját. Az FT fehérjéről állapították meg, hogy ez a régóta keresett ún. florigén, amely a levélben keletkezik, de az apikálisajtásmerisztémába vándorol a floémen keresztül, ahol indukálja a vegetatív állapotból a reprodukív állapotba való áttérést, azáltal, hogy virág merisztémaazonossági géneket aktivál. A virágzás fotoperiodikus szabályozását befolyásolják a cirkadián óra és/vagy a fotoreceptorok funkciójának változásai. Például egy rövid periódusú cirkadián óra mutáns korai fázisú cirkadián ritmusokat mutat fény/sötét ciklusokon. Az ilyen mutánsok többsége korán virágzik rövid nappalon, mert a CO transzkripciójának a maximuma eltolódik az éjszakából a megelőző nappal időszakába, ezáltal lehetővé téve a phyA/CRY1/CRY2 általi stabilizálódását a CO fehérjének, ami így indukálni képes az FT transzkripcióját. Másrészt a phyA vagy CRY1-2 hiányos mutáns növények később virágznak hosszú nappalon, a CO

stabilizációjának a hiánya miatt. A *phyB* mutánsok viszont korábban virágoznak, ami a felhalmozódó CO fehérjének és a nappal során magas *FT* transzkripció szintnek köszönhető.

## CÉLKITŰZÉSEK

Már régóta ismert tény, hogy a *phyB* túltermelése korai virágzást eredményez kifejezetten rövid nappalon, ami ellentétben áll a fotoreceptor virágzás szabályozásában betöltött, jól meghatározott szerepével. A munkánk elsődleges célja az volt, hogy magyarázatot keressünk erre a paradoxonra, azáltal hogy leleplezzük a molekuláris mechanizmust, amely révén a *phyB* túltermelése korai virágzást eredményez.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- *Arabidospisthaliana* növények nevelése steril és üvegházi körülmények között
- Molekulárisklónozásitechnikák
- Növényi genomiális DNS tisztítás
- Növényi össz-RNS tisztítás
- kvantitatív valós idejű PCR
- Western-blot analízis
- Transzgenikus növények előállítása
- *In vivo* luciferáz enzimaktivitás-meghatározás

## EREDMÉNYEK

**1.** Ismert, hogy a *phyB* túltermelése fényfüggő módon gyorsítja a cirkadián órát (rövidíti a periódushosszt). Megmutattuk, hogy ez a hatás kifejezetten vörös fényre igaz, és nem eredményez korai fázist fehér fény/sötét ciklusokon, ahol a korai virágzás fenotípus egyértelműen látható. Így eredményeink kizárják azt a lehetőséget, hogy az óra egy megváltozott funkciója lenne felelős ezért a virágzás fenotípusért.

**2.** A következő lépésben meghatároztuk a *CO* és *FT* mRNS mennyiségének alakulását rövid és hosszú nappalon. A *phyB* túltermelésének nem volt hatása a *CO* mRNS szintjére, ám indukálta az *FT* transzkripcióját alkonyatkor és az éjszaka során. Az *FT* transzkripciójának megemelkedése a rövid nappalos éjszaka során igen jelentős mértékű a vad típusú növényekben kapott értékekhez képest. A *phyB*-t az *ft-10* mutáns háttérben túltermelő növények vizsgálatok kiderült, hogy a *phyB* túltermelésének virágzásra gyakorolt hatását

teljesen eltünteti az *ft-10* mutáció. Ez alátámasztotta azt, hogy a *phyB* túltermelő növények korai virágzás fenotípusa az *FT* expressziójának a megváltozásával magyarázható. Érdekességképpen elmondható, hogy a *phyB* mutáns növények korai virágzása is a megemelkedett *FT* transzkripciónak köszönhető, ám ebben az esetben ez a nappal időszakára korlátozódik, míg a túltermelő növények esetén az alkonyat és az éjszaka során tapasztalt megemelkedett *FT* kifejeződés a felelős a fenotípusért.

Mivel az *FT* fő aktivátora a CO, *phyB* túltermelő ([WT], [S86A] vagy [S86D]) *co-9* dupla mutáns növényeket hoztunk létre, hogy ellenőrizzük, vajon a CO szükséges-e a *phyB* túltermelő növények molekuláris és fiziológiai virágzás fenotípusához. Mind a korai virágzás, mind az *FT* éjszakai indukciója megszűnt a *co-9* mutáns háttérben, igazolva hogy a *phyB* magas szintje a CO fehérjén keresztül aktiválja az *FT* transzkripciót. Mivel a *CO* transzkripcióban nem történt változás, így levonhatjuk azt a következtetést, hogy a *phyB* túltermelése fokozza a CO funkcióját poszttranszkripciós szinten, valószínűleg a CO fehérje stabilizálása által.

**3.** Sötétben a fitokrómok inaktív, vörös fényt ( $\lambda_{\max}=600$  nm) elnyelő formában vannak jelen (Pr forma), ami vörös fény hatására átalakul biológiailag aktív, távoli vörös ( $\lambda_{\max}=730$  nm) fényt elnyelő formába (Pfr forma). Az aktív Pfr forma azonnal és hatékonyan alakul vissza inaktív Pr formába távoli vörös fény hatására (fotokonverzió), vagy egy lassabb, fénytől független folyamat során, amit sötét reverzióknak neveznek. Vad típusú növényekben a *phyB* indukálja a CO degradációját vörös fénytől függő módon (azaz Pfr formájától függő módon), a nappal első felében. Különböző megközelítéseket használva vizsgáltuk meg, hogy a *phyB* túltermelésének hatása is Pfr forma függő-e. Először „end-of-the-day” EOD távoli vörös kezelést alkalmaztunk a rövid nappal végén, hogy eltüntessük a Pfr formákat még az éjszakát megelőzően. A kezelés hatására a *phyB* túltermelő vonalakban erősen lecsökkent az *FT*mRNS szintje az éjszaka során, valamint az alkonyatkor mérhető expressziós csúcs mérete is kisebb lett, alátámasztva, hogy az *FT* szabályozása ezekben az időszakokban a túltermelt *phyB* Pfr formának köszönhető.

**4.** A következő lépésben megvizsgáltuk a molekuláris és fiziológiai fenotípusát olyan *phyB* túltermelő transzgenikus vonalaknak, amelyekben kondicionálisan vagy konstitutívan változik a *phyB* Pfr mennyisége. A *phyB* Ser-86 aminosavfoszforilációja gyorsítja a receptor sötét reverzióját, ami negatívan befolyásolja a jelátvitelt nem telítési fényintenzitáson.

Rövid nappalon, a phyB[S86A] - nem foszforilálható mutánsphyB-t túltermelő-növényekben az éjszaka során magasabb *FT* indukciót kaptunk, és korábban is virágoztak, mint a phyB[WT] -vad típusú phyB-t túltermelő - növények. Ezzel szemben alkonyatkor a phyB[S86D]- állandó foszforilált állapotot utánozó mutáns phyB-t túltermelő) - növényekben látható *FT*mRNS emelkedés megegyezik a phyB[WT] és phyB[S86A] vonalakban kapott szinttel, ám az éjszakai *FT* maximum teljesen hiányzik a phyB[S86D] növényekből. Megjegyezendő, hogy a phyB[S86D] növények sokkal később (44 levéllel) virágoztak, mint a phyB[WT] (23 levéllel) vagy a phyB[S86A] (17 levéllel) vonalak, ám korábban, mint a Col vad típusú(54 levél) növények. Ezekből az adatokból következik, hogy az *FT*éjszakai indukciója a legfontosabb tényező a phyB túltermelő vonalak rövid nappalon megfigyelhető korai virágzás fenotípusának kialakításában.

Hosszú nappalon, minden phyB túltermelő vonal hasonló *FT*mRNS szintet mutat alkonyatkor, ami megközelítőleg kétszer nagyobb, mint a Col esetén kapott szintek. Az *FT* szint emelkedett marad a phyB[WT] és phyB[S86A] növényekben az éjszaka során, de jelentősen lecsökkent a phyB[S86D] vonalakban. Mivel minden túltermelő vonal hasonló időben virágzott és korábban, mint a Col növények, azt mondhatjuk, hogy az alkonyatkor megemelkedett *FT*expressziója legmeghatározóbb tényező a korai virágzás kialakításában hosszú nappalon és az *FT* tartósan magas szintje az éjszaka során nem járul hozzá jelentősen a fenotípushoz. Rövid- és hosszú nappalos körülmények között is, a fény periódus alatt a növények telítési fényintenzitásnak voltak kitéve, ezáltal megközelítőleg azonos mennyiségű Pfr képződött a nappal végére minden vonalban, ami nagyon hasonló *FT* indukciót eredményezett alkonyatkor. A sötét periódus alatt, a phyB Pfr formák mennyisége gyorsan csökken a phyB[S86D] növényekben, a gyorsabb sötét reverzió miatt, hosszú és rövid nappalon egyaránt. A Pfr formák mennyiségének a csökkenése lassabb a phyB[WT] esetén, de a leglassabb a phyB[S86A] növényekben. Ezzel magyarázható, hogy az *FT* mRNS mennyisége az éjszaka során alacsony volt a phyB[S86D] esetén, viszont magas volt phyB[WT] és phyB[S86A] növényekben. Mindent egybevetve az *FT*mRNS felhalmozódása összhangban van a várt Pfr szintekkel a különböző vonalakban és különböző körülmények között.

A phyB[Y276H] növények olyan phyB fotoreceptortexpresszálnak, amely folyamatosan aktív Pfr formában van, míg a phyB[C357T] vonalaka kromofór kötésére képtelen, folyamatosan inaktív Pr formáját fejezik ki a phyB fotoreceptornak; mindkét esetben a fényviszonyoktól függetlenül. A phyB[Y276H] az *FT*expressziós profil és virágzási idő tekintetében is hasonló eredményt adott, mint a phyB[S86A], míg a phyB[C357T] növények úgy viselkedtek, mint a

*phyB-9* mutáns, megerősítve ezzel a *phyB* Pfr forma szükségességét a *phyB* túltermelő növények korai virágzásának fenotípusának kialakulásához.

5. Az adataink alapján, a *phyB* Pfr forma nagy mennyisége feltehetően stabilizálja a CO fehérjét alkonyatkor és az éjszaka során. A COP1-SPA ubikvitin ligáz komplex fontos szerepet játszik a CO fehérje szint szabályozásában, ezekben az időszakokban. A négy SPA fehérje (SPA1-SPA4) jelentősen fokozza a COP1 ubikvitin ligáz aktivitását fizikai kölcsönhatás révén. A virágzás szabályozásában a SPA1 és a SPA4 játszik igazán fontos szerepet. A *cop1* és *spa* mutánsok kifejezetten rövid nappalon korábban virágoznak, és alkonyatkor, valamint részben az éjszaka során megemelkedett CO fehérje és az *FT* mRNS szint mérhető ezekben a mutánsokban. Ezek a fenotípusok minőségileg nagyon hasonlóak azokhoz, amiket a *phyB* túltermelő vonalak esetében tapasztaltunk, ami felvetette annak lehetőségét, hogy a *phyB* Pfr formája a COP1-SPA komplex részleges gátlása révén sietteti a virágzást. A közelmúltban vált ismertté, hogy a *phyA* és *phyB* Pfr formája képes kötődni a SPA1 fehérjéhez, ezáltal gátolva a COP1-SPA interakciót, amely a COP1 aktivitásának csökkenését, majd a COP1 célfehérjéinek (HFR1, HY5) a felszabadulását eredményezi. Élesztő két hibrid rendszert és limitált Pfr mennyiséget eredményező fényintenzitást alkalmazva megmutattuk, hogy a SPA1 kötési hatékonysága a vad típusú vagy foszfo mutáns *phyB* túltermelőkhöz szoros összefüggést mutat az éjszaka mért *FT* mRNS szintekkel az adott túltermelő vonalakban. Ez megerősíti azt, hogy a túltermelt Pfr formájú *phyB* szabályozza a CO fehérje szinteket és a virágzási időt, azáltal, hogy gyengíti a COP1-SPA interakciót. Ezzel ellentétben, a vad típusú növényben a *phyB* Pfr formája indukálja a CO degradációját a nappal során. Mivel a CO ebben az időszakban ubikvitinálódik és lebomlik a proteozómában, így a *phyB* ezen hatása egy ismeretlen ubikvitin ligáz *phyB* általi pozitív szabályozásán keresztül valósul meg.

6. Ellentétben a virágzási idő meghatározásában betöltött szerepével, a *phyB* hatása a cirkadián óra működésére folyamatos vörös fényben arányos a *phyB* fehérjék mennyiségével: a *phyB* mutáns hosszú periódusú fenotípust mutat, míg a *phyB* túltermelők periódushossza rövid. Összhangban a becsült *phyB* Pfr forma mennyiségével, alacsony intenzitású vörös fényben a *phyB*[S86A] rövidebb, a *phyB*[S86D] hosszabb periódust mutatott, mint a *phyB*[WT] növények, ám telítési fényintenzitáson a vonalak periódushossza azonos volt. Érdeemes megemlíteni, hogy 35  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  fényintenzitás alatt a *phyB*[S86D] periódushossza megegyezik a *phyB-9* növények esetén kapott értékekkel. Ezzel ellentétben a relatív

hipokotilhossza ennek a két vonalnak csak egy nagyságrenddel alacsonyabb vörös fényintenzitáson válik azonossá. Ez arra utal, hogy az óra működése kevésbé érzékeny a phyB Pfr forma mennyiségére, szemben a hipokotil megnyúlás szabályozásával. Azt is megfigyeltük, hogy a fényintenzitás-válasz görbéje a phyB[S86A] vonalaknak kevésbé, míg a phyB[S86D] növényeknek fokozottabban meredek a phyB[WT] vonalakhoz viszonyítva. Ez arra utal, hogy a phyB Ser-86 esetlegesen fényfüggő foszforilációja szerepet játszhat abban a folyamatban, amely során az óra érzékeli a különböző intenzitású fényjeleket.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Adataink együttesen arra utalnak, hogy a phyB fotoreceptor szerteágazó hatásának a CO stabilitás meghatározásában három fő aspektusa van: a napszak, a phyB Pfr mennyisége és egy a phyB Pfr által vezérelt ubikvitin ligáz. A nap első felében a phyB indukálja a CO fehérje degradációját, függetlenül attól, hogy a phyB endogén (vad típusú), vagy túltermelt szinten van jelen. Ebben az időszakban a phyB valószínűleg fokozza a működését egy ismeretlen ubikvitin ligáznak, ami a CO stabilitás szempontjából sokkal jelentősebb esemény, mint a COP1-SPA1 komplex gátlása a phyB által. A nap második felében és alkonyat körül az ismeretlen ubikvitin ligáz szerepe lesz elhanyagolható, ami legalább részben a PHL fehérjének köszönhető, ellensúlyozván a phyB hatását. Jóllehet a megemelkedett *FT* szint a *phyB-9* növényekben a nap második felében azt jelzi, hogy ez a hatás még nem teljesen hiányzik. Ebben az időszakban a phyB túltermelése inkább indukálja, mint csökkenti az *FT* mRNS szintjét, indikálva ezzel a COP1-SPA1 komplex gátlásán keresztül érvényesülő fokozódó CO-stabilizáló hatás megjelenését. Éjszaka a COP1-SPA1 komplex hatása érvényesül leginkább a CO stabilitásán, így a phyB túltermelése erős *FT* indukciót eredményez, míg vad típusú növényekben az endogén phyB Pfr szintje valószínűleg nem elégséges ahhoz, hogy jelentős hatással legyen a COP1-SPA1 komplexre.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozatalapjáulszolgálóközlemény:

**Hajdu A**, Ádám É, Sheerin DJ, Dobos O, Bernula P, Hiltbrunner A, Kozma-Bognár L, Nagy F.(2015): High-level expression and phosphorylation of phytochrome B modulates flowering time in Arabidopsis. *Plant Journal* doi: 10.1111/tpj.12926  
**IF: 5.972**

Egyébközlemények:

Ádám É, **Hajdu A**, Nagy F, Viczián A. (2015) :Optogenetics: past, present and future. *ActaBiologicaSzegediensis***59** (Suppl.1): 2015

Kozma-Bognar L, **Hajdu A**, Nagy F.(2012) : Light-regulated gene expression in yeast. *Methods in Molecular Biology***813**:187-93.

Fehér B, Kozma-Bognár L, Kevei E, **Hajdu A**, Binkert M, Davis SJ, Schäfer E, Ulm R, Nagy F. (2011) :Functional 8-controlled interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE LOCUS UV-B signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*.**67**:37-48  
**IF: 6.16**

Sorokina O\*, **Kapus A**\*, Terecskei K, Dixon LE, Kozma-Bognar L, Nagy F, Millar AJ.(2009) : A switchable light-input, light-output system modelled and constructed in yeast. *Journal of Biological Engineering*.17;3:15  
**IF: 2.481**

\* *Megosztottelsőszerző*



## Társszerzői lemondó nyilatkozat

**Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, meghatározó szerepét a tézisekben/doktori értekezésben foglalt és a dolgozat alapjául szolgáló közleményben leírt tudományos eredményekhez elismerem, az eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.**

**Szeged, 2015. augusztus 18.**

**Dr. Ádám Éva** .....

**Dobos Orsolya** .....

**Bernula Péter** .....

**Dr. Kozma-Bognár László** .....

**Dr. Nagy Ferenc** .....

**Alulírott témavezető és** **a**  
**tézisek/doktori értekezés alapjául szolgáló közlemény felelős szerzője nyilatkozom,**  
**hogy az értekezésben felhasznált eredmények teljes mértékben tükrözik a jelölt, Hajdu**  
**Anita, hozzájárulását az okeléréséhez.**

**Szeged, 2015. augusztus 18.**

**Dr. Kozma-Bognár László** .....