

**A brassinoszteroid bioszintézis és érzékelés napszakos
szabályozása**

Ph.D. értekezés

Szatmári Anna-Mária

Témavezető: Dr. Szekeres Miklós

MTA Szegedi Biológiai Központ

Növénybiológiai Intézet

Foto- és Kronobiológiai Csoport

Szegedi Tudományegyetem

Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

Szeged

2007.

TARTALOMJEGYZÉK

	RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	1
1.	BEVEZETÉS	2
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1.	A brasszinoszteroidok (BR-ok)	4
2.1.1.	Szerkezeti tulajdonságok	4
2.1.2.	Természetes BR-ok	5
2.1.3.	Élettani hatások	6
2.1.4.	A BR érzékelés és jelátvitel	7
2.2.	A BR-ok bioszintézise	8
2.2.1.	A bioszintézis út lépései	8
2.2.2.	A BR bioszintézis enzimei	10
2.2.2.1.	Citokróm P450 monooxygenázok	12
2.2.2.2.	A BR bioszintézis enzimeinek katalitikus tulajdonságai	14
2.2.2.3.	A bioszintézis sebességmeghatározó lépései	15
2.3.	Az endogén BR szint regulációja	15
2.3.1.	Transzport és inaktiváció	16
2.3.2.	A bioszintézis génjeinek transzkripciós szabályozása	17
2.3.2.1.	Végtermékgátlás	17
2.3.2.2.	Fejlődési stádiumtól függő szabályozás	18
2.3.2.3.	Szervspecifikus reguláció	18
2.4.	A növények életfolyamatainak napszakos szabályozása	19
2.4.1.	Diurnális reguláció	19
2.4.1.1.	Fényszabályozás	19
2.4.1.2.	A fotoreceptorok	20
2.4.2.	Cirkadián szabályozás	21
2.4.2.1.	A cirkadián biológiai ritmus	21
2.4.2.2.	A cirkadián reguláció élettani jelentősége	22
2.4.3.	A hormonális folyamatok napszakos változásai	23
3.	CÉLKITŰZÉSEK	24
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
4.1.	Növényi anyag és nevelési körülmények	25
4.2.	Transzgenikus növények előállítása	26
4.2.1.	Promóter:luciferáz fúziós génkonstrukciók létrehozása	26
4.2.2.	Stabil transzformáns <i>Arabidopsis</i> vonalak kialakítása	26
4.3.	mRNS szint meghatározás	28
4.3.1.	RNS izolálás	28
4.3.2.	Northern-blot analízis	29
4.3.3.	Reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR analízis	29
4.4.	A luciferáz aktivitás meghatározása transzgenikus növényekben	30
4.5.	Az endogén BR-ok analízise	31

4.5.1.	A növényi minták előkészítése	31
4.5.2.	A BR-ok izolálása és mennyiségi meghatározása	31
5.	EREDMÉNYEK	33
5.1.	<i>CPD</i> és <i>CYP85A2</i> gének napszakos kifejeződése	33
5.1.1.	A luciferáz aktivitás mérésének beállítása	33
5.1.2.	<i>CPD</i> és <i>CYP85A2</i> promóterek diurnális expressziós profilja	34
5.1.3.	A <i>CPD</i> mRNS mennyiségének napi változása	35
5.2.	A diurnális expressziós szabályozás alapvető tényezői	37
5.2.1.	Cirkadián reguláció	37
5.2.2.	Fényszabályozás	37
5.2.3.	A cirkadián szabályozás hatása a fényválasz mértékére	39
5.3.	A fényszabályozásért felelős regulációs mechanizmus azonosítása	39
5.3.1.	A fényhatás hullámhosszfüggése	39
5.3.2.	A fitokróm rendszer szerepe	41
5.4.	A hormonális végtermékgátlás hatása a <i>CPD</i> napszakos szabályozására	43
5.5.	Az endogén BR tartalom napszakos változása	45
5.6.	Tartós sötét kezelés hatása a BR tartalomra	45
5.7.	A BZR1 transzkripciós faktor szerepe a visszacsatolós szabályozásban	48
6.	MEGVITATÁS	51
6.1.	A <i>CPD</i> gén összetett transzkripciós szabályozása	51
6.1.1.	A diurnális reguláció sajátosságai	51
6.1.2.	A <i>CPD</i> és <i>CYP85A2</i> gének hasonló napszakos kifejeződése	53
6.2.	A fény hatása a BR anyagcserére	53
6.2.1.	A BR bioszintézis génjeinek fényszabályozása	53
6.2.2.	A BR inaktiváció génjeinek regulációja	54
6.2.3.	A fényviszonyok hatása az endogén BR tartalomra	54
6.2.4.	A fitohormonok napszakos szabályozó szerepe	55
6.3.	A BR bioszintézis végtermékgátlásának funkcionális hatásai	56
6.3.1.	A <i>CPD</i> gén diurnális kifejeződésének hormonális befolyásoltsága	56
6.3.2.	A BZR1 transzkripciós faktor szerepe a <i>CPD</i> gén sötét repressziójában	57
6.4.	A fény hatása a növények BR-érzékenységére	57
6.5.	A BR bioszintézis génjeinek kifejeződése és a hormonhatás közti kapcsolat	58
7.	KÖVETKEZTETÉSEK	59
	IRODALOMJEGYZÉK	60
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	68
	KIEGÉSZÍTŐ ÁBRÁK	69
	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK	71
	ÖSSZEFOGLALÁSOK	72

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

BL	brassinolid
BR	brassinoszteroid
BRRE	brassinoszteroid reszponz elem
CCD	"charge-coupled device"
DD	állandó sötét ("dark/dark") nevelési körülmények
GC-MS	gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
LD	fény-sötét ("light/dark": 12 h fény, 12 h sötét ciklusok) nevelési körülmények
LL	állandó fény ("light/light") nevelési körülmények
RT-PCR	reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR

1. BEVEZETÉS

A brasszinoszteroidok polihidroxilált szteroid vegyületek, melyeket - főként az elmúlt évtizedben elért kutatási eredmények alapján - önálló növényi hormoncsaládként ismernek el. Erős növekedést és megnyúlást serkentő hatásukat igen alacsony, nM-os koncentráció tartományban fejtik ki. A megnyúlásos folyamatok szabályozásán túl meghatározó szerepük van a fényfüggő morfogénikus folyamatok irányításában, továbbá a fertilitás és csírázás biztosításában is. A közelmúlt kutatásai során viszonylag pontosan tisztázódtak a brasszinoszteroidok bioszintézisének egyes lépései, és sikerült azonosítani az ezekben résztvevő enzimek többségét is. Laboratóriumunk korábbi vizsgálatai kimutatták, hogy *Arabidopsis thaliana*-ban (lúdfű) a bioszintézis génjei közül legerősebben kifejeződő *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM* elsősorban a transzkripció szintjén szabályozott, és mRNS-ének mennyisége szoros korrelációt mutat a hormontartalommal. Ismertté vált továbbá, hogy e gén expresszióját a többi bioszintézis génével azonos, transzkripciós szintű végtermékgátlás regulálja.

A növények optimális fejlődéséhez szükséges életfolyamataik precíz összehangolása a környezeti tényezőkkel. Ezek közül legfontosabb a fény szerepe, mely nemcsak a fotoszintézis energiaforrása, hanem olyan szabályozó inger is, amely révén az egyedfejlődési, fiziológiai és biokémiai funkciók a külső körülményeknek legmegfelelőbb módon koordinálhatók, és emellett követni képesek a fény és sötét periódusok naponta rendszeresen ismétlődő változásait is. A fényviszonyoknak legmegfelelőbb reakciók kialakításában a közvetlen (akut) fényválasz mellett jelentős szerepe van a szervezet biológiai órája által biztosított napi ciklusos, ún. cirkadián szabályozásnak is. Ez teszi lehetővé a periodikus változások érzékelését, rögzítését és előrejelzését, biztosítva azt, hogy belső folyamataik időben történő átállításával a növény időben felkészülhessen a környezetében bekövetkező változásokra. A cirkadián kifejeződés ciklusainak fázisát a közvetlen (diurnális) fényszabályozás állítja be, így e két regulációs rendszer egymással összehangoltan fejt ki hatását.

Az *Arabidopsis* modellnövényen a molekuláris genetika hatékony eszközeinek felhasználásával elért eredmények meggyőző adatokat szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a fitohormonoknak fontos szerepük van mind a fényválasz, mind a cirkadián hatás kiváltásában. Ez a két szabályozó folyamat hatással van több fontos hormon aktuális szintjére, valamint a

hormonérzékenység mértékére is. Ezen ismeretek alapján a hormonális reguláció a napszakos változásokat meghatározó jelátviteli rendszerek integráns részének tekinthető.

Munkacsoportunk előzetes eredményei arra utaltak, hogy a brassinoszteroid bioszintézis kulcsenzimeinek génjei napszakos szabályozás alatt állnak. Vizsgálataink annak tisztázására irányultak, hogy milyen környezeti tényezők és szignálátviteli utak felelősek a génexpresszió kontrolljáért, és hogy ez utóbbinak van-e tényleges hatása a hormon bioszintézis hatékonyságára, illetve ezáltal a tényleges hormonszint alakulására.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A brasszinoszteroidok (BR-ok)

Az eredetileg Mitchell és mtsai (1970) által brasszinokként leírt BR-okkal kapcsolatos kezdeti vizsgálatokat elsősorban markáns növekedésserkentő tulajdonságuk inspirálta. Az azóta eltelt időszakban ezek a kutatások látványos eredményeket produkáltak, és mára a BR-ok a növények egyik legjobban ismert, hatásmódjuk tekintetében is részletesen jellemzett hormoncsaládjának számítanak (Vert és mtsai, 2005).

A BR-ok tanulmányozásának jelentős lendületet adott, amikor sikerült izolálni a brasszin biológiai aktivitásáért felelős brasszinolid (BL) vegyületet, és meghatározni annak pontos kémiai szerkezetét (Grove és mtsai, 1979). A polihidroxilált szteroidok közé tartozó BR-oknak mára már több mint 50 természetben előforduló formája vált ismertté (Bajguz és Tretny, 2003).

Az élettani funkciók és a hatásmechanizmus vizsgálata szempontjából nagy jelentőségű lépés volt az első BR-deficiens (Li és mtsai, 1996; Szekeres és mtsai, 1996) és -inszenzitív (Clouse és mtsai, 1996) mutánsok izolálása. Ezek segítségével pontosan megismerhetővé váltak a BR-ok által szabályozott biológiai folyamatok, és ezeken keresztül a vegyületeknek az egyedfejlődésben játszott esszenciális szerepe. Rövid idő elteltével a BR-okat egy új növényi hormoncsaládnak tekintette a tudományos közvélemény (Yokota, 1997).

2.1.1. Szerkezeti tulajdonságok

A BR-ok az edényes növényekben általánosan előforduló, erős növekedés-serkentő hatású szteroidok. Számos ide tartozó vegyület azonosítása révén megállapítható volt, hogy valamennyi BR 5α -kolesztán vázú hidroxilált szteroid (Mandava, 1988). Mai ismereteink szerint ezek közül tényleges biológiai aktivitással csupán a BR bioszintézis végtermékének számító BL, és az ennek közvetlen prekursorául szolgáló kasztaszteron (Yokota és mtsai, 1982) rendelkezik. A BL (racionális elnevezés szerint: 22R,23R,24S- $2\alpha,3\alpha,22,23$ -tetrahidroxi-24-metil-B-homo-7-oxa- 5α -kolesztán-6-on) molekulának az ismert szteroidok közt egyedülálló tulajdonsága, hogy héttagú, heterociklusos, oxa-lakton típusú B gyűrűvel rendelkezik. (A két bioaktív BR szerkezetét, a szteroid váz szénatomjainak számozását, valamint anellált gyűrűinek jelölését az 1. ábra mutatja be.) A közvetlen hormonhatású

vegyületeken kívül a BR-ok közé sorolják még a fitoszterolokból kiinduló BL szintézisút intermediereit, valamint ezek acilált, ill. glikozilált konjugátumait is (Bajguz és Tretyn, 2003).

1. ábra: A biológiailag aktív BR formák molekulaszervezete

A szteroid váz szénatomjainak számozását és a gyűrűk jelölését a BL szerkezeti képletén tüntettük fel.

Az egyes BR származékok a szteroid oldallánc 24-es szénatomjának alkilációs állapotában, valamint az oxigén tartalmú szubsztituensek számában és helyzetében különböznek egymástól (Yokota, 1997). Élettani szempontból és mennyiségileg is legjelentősebbek a C₂₈ (C-24 metilált) vázzal rendelkező BR-ok. A molekulák szénatomjai közül a C-3 minden esetben hidroxilált, és további hidroxiláció fordulhat elő a C-2, C-22 és C-23 pozíciókban is. Oxo-, valamint oxa-csoport esetenként a C-6, ill. C-7 helyzetben található. A BR-ok strukturális alapú pontos, a többi hidroxiszteroidtól való világos elkülönítést lehetővé tevő definícióját Bishop és Yokota (2001) javaslata alapján fogadták el. Eszerint azok a szteroidok tartoznak ebbe a vegyületcsoportba, amelyek az 5 α -kolesztán vázon a C-3 hidroxiláción kívül még egy, vagy több oxigén tartalmú szubsztituenst hordoznak a C-2, C-6, C-22, és C-23 pozíciókban.

2.1.2. Természetes BR-ok

A BR-ok az edényes növények körében általánosan elterjedt szabályozó vegyületek, amelyeket emellett néhány alacsonyabbrendű szervezetből (pl. mohák, zöldségfélék) is ki tudtak mutatni. Egy közelmúltban megjelent áttekintés (Bajguz és Tretyn, 2003) 59 természetes BR-ot tart számon. Bár e vegyületek többségét csupán egy, vagy néhány növényfajban találták meg, a hormonális hatásért elsődlegesen felelős C₂₈ vázú BR-ok, és ezeken belül a BL szintézis intermedierei minden vizsgált szervezetben előfordultak.

Máig nem tisztázott kérdés, hogy a kasztaszeronénál erősebb élettani hatású BL mennyire tekinthető általánosan elterjedtnek a magasabbrendű növények körében. Számos fajból mindeddig nem sikerült kimutatni ezt a vegyületet, és feltételezik, hogy ezekben a szervezetekben a kasztaszeron lehet az egyedüli bioaktív BR. Ugyanakkor a BL igen alacsony (ng/kg nagyságrendű) fiziológiás szintje miatt elképzelhető, hogy detektálása esetenként csupán a felhasznált analitikai módszerek érzékenységének korlátai miatt nem volt lehetséges. Ezzel kapcsolatban említésre érdemes, hogy a korábban BL-ot nem termelő növényekként számontartott *Arabidopsis* és paradicsom esetében is csak nemrég nyert bizonyítást bennük ennek a BR formának a jelenléte (Fujioka és mtsai, 1998; Montoya és mtsai, 2005).

2.1.3. Élettani hatások

A BR-ok fiziológiai hatásai közül legszembeötlőbb, hogy a növényeken erőteljes növekedést, megnyúlást váltanak ki. Ennek alapján az auxin és gibberellin hormonsaládokkal együtt a növekedésserkentő fitohormonok közé sorolhatók. E funkciójukkal összhangban a BR-deficiens (a hormon szintézisében sérült) mutánsok markáns törpe fenotípust mutatnak, amely ugyanakkor BR kezeléssel helyrehozható (Li és mtsai., 1996; Szekeres és mtsai., 1996). A BR-hiányos növények szöveti szintű vizsgálata kimutatta, hogy a törpe fenotípus kialakulását a jelentősen csökkent mértékű sejtmegnyúlás és xilém differenciáció okozza (Szekeres és mtsai., 1996; Azpiroz és mtsai, 1998).

A bioszintézis mutánsainak karakterizálása során ismertté váltak a BR-ok további fontos regulatív funkciói is. Az erős fenotípusú mutánsok ún. konstitutív fotomorfofenikus fejlődést mutattak, melynek során a csíranövényeknél sötétben is rövid hipokotilt és nyitott szikleveleket figyeltek meg. E morfológiai jegyeken túlmenően kimutatható volt a normális sötétfejlődés (szkotomorfofenézis) során egyébként represszált sejtmagi fényindukált gének (pl. a ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz kis alegységét kódoló *RBCS*, valamint a klorofill a/b-kötő fehérjét kódoló *CAB*) magas szintű kifejeződése (Chory és mtsai, 1991; Szekeres és mtsai., 1996; Azpiroz és mtsai, 1998).

Ezeken kívül is több fontos életfolyamat szabályozásában vesznek részt a BR-ok. *Arabidopsis*-ban e hormon hiánya a pollenfejlődés visszamaradása révén hímsterilitást okoz (Chory és mtsai, 1991; Szekeres és mtsai., 1996), és a BR-ok megfelelő szintje a csírázás biztosításához is szükséges (Steber és McCourt, 2001). A termés kialakulása és korai fejlődése során a bioaktív BR-ok jelentős felhalmozódását írták le paradicsomban (Montoya

és mtsai, 2005) és szőlőben (Symons és mtsai, 2006), ami a reproduktív fejlődésben játszott fontos regulatív szerepre utal. BR-deficiens növényekben megfigyelhető több tipikusan stresszindukált gén fokozott kifejeződése (Szekeres és mtsai., 1996), és részletes vizsgálatok igazolták a BR protektív hatását több abiotikus stressztényezővel szemben (Kagale és mtsai, 2007). Az eddigi ismeretek alapján az is világossá vált, hogy a BR-ok szabályozó hatása minden fiziológiai funkció esetében más fitohormonok hatásával együtt, részben a jelátviteli utak kölcsönös befolyásolásán keresztül valósul meg (Vert és mtsai, 2005).

2.1.4. A BR érzékelés és jelátvitel

A szteroidok fontos hormonális szabályozó funkciót töltenek be a gombák, állatok és növények körében egyaránt. Bár maga a szabályozó rendszer a törzsfejlődés során nagyon korán kialakult, és egyes elemei strukturálisan igen konzerváltak, a növényvilágban az érzékelési és jelátviteli folyamatok lényegesen különböznek attól a korábban a többi eukariota szervezet alapján általánosnak vélt hatásmódtól, melyben a szteroid hormonok transzkripciós faktorként is működő sejtmagi receptorokhoz kötődve közvetlenül befolyásolják azok aktivitását (Belkhadir és Chory, 2006).

A BR szabályozás molekuláris hátterének felderítését nagyban segítette, hogy viszonylag könnyen izolálhatók voltak az érzékelés és jelátvitel elemeiben sérült mutánsok. Ez jórészt annak volt köszönhető, hogy *Arabidopsis*-ban ezekért a funkciókért rendszerint egyetlen gén felelős. A mindössze egy évtizedre visszanyúló intenzív kutatások nyomán mára a fitohormonok között a BR-ok hatásmechanizmusa tekinthető az egyik legrészletesebben jellemzett jelátviteli rendszernek (Li és Jin, 2007). Az *Arabidopsis*-ban megismert, az alábbiakban ismertető szabályozás néhány elemét kétszikű és egyszikű fajokban egyaránt sikerült azonosítani (Bishop, 2003).

A BR érzékelését a sejt felszín plazmamembránjában lokalizált BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) receptor biztosítja. Ez az ún. leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó receptor kinázok (LRRK) csoportjába tartozik, melynek tagjai általában peptid természetű ligandumok érzékelésében játszanak szerepet. A BRI1 esetében a BR kötődését az extracelluláris receptor domén leucin-gazdag ismétlődései közé beékelte, csak a BRI1-ben előforduló ún. sziget régió biztosítja (Li és Chory, 1997). A hormon kötődése elősegíti a BRI1-nek a szerkezetileg hasonló BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1) membránproteinnel való heterodimerizációját, ami transzfoszforilációs reakciókat követően a BRI1 intracelluláris kináz doménjének aktiválódását eredményezi (Li és mtsai, 2002).

A hormon kötődését követően a BRI1 kináz doménje egy foszforilációs szignált indít el, amely ma még ismeretlen lépéseken keresztül a BR szabályozás központi elemének tekintett BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2) kináz inaktiválásához vezet. A BIN2 az állatvilágból ismert GSK3/SHAGGY-típusú kinázok körébe sorolható (Choe és mtsai., 2002; Li és Nam, 2002). Aktív állapotában foszforilálja, és ezáltal destabilizálja a BR hatást a génexpresszió szintjén közvetítő BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) és BES1 (BRI1 EMS SUPPRESSOR 1) transzkripciós faktorokat. A BR szignál a BIN2 kinázt inaktiválja, így a BZR1 és BES1 a sejtmagba juthat, és biztosítani tudja a hormonhatás megnyilvánulásához szükséges transzkripciós szabályozó hatást (Zhao és mtsai., 2002).

A szerkezetileg hasonló de funkciójukban legalább részben ellentétes hatású BZR1 és BES1 a transzkripciós faktorok egy önálló családját képezik (Li és Deng, 2005). Míg a BR-szabályozott promóterek CANNTG szekvencia-motívumaihoz kötődő BES1 főként negatív regulátorként funkcionál (Li és Jin, 2007), a CGTG(T/C)G BR rezponz elemhez (BRRE) kapcsolódó BZR1 inkább a hormonhatás pozitív szabályozója (He és mtsai, 2002; He és mtsai, 2005).

2.2. A BR-ok bioszintézise

A növényekben előforduló számos BR forma megismerése jó alapot biztosított az ezek szintéziséért felelős anyagcsereutak felderítésének megkezdéséhez. Kezdetben ezen vizsgálatok során a bioszintézis feltételezett intermediereinek szintetikus, deutériummal jelölt formáinak *in vivo* átalakulásait követték a konverziós termékek gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) analízisével. E munka során kísérleti objektumként elsősorban a viszonylag magas endogén BR szinttel rendelkező *Catharanthus roseus* sejtszuspenziós kultúráit használták. A konverziós kísérletek révén ismertté váltak a bioszintézis legfontosabb intermedierei, és nagy vonalakban a kialakításukért felelős biokémiai lépések sorrendje is. Ahhoz viszont, hogy a bioszintézisben résztvevő enzimek, és ezek szabályozása is ismertté válhasson, szükség volt az egyes átalakulási lépésekben sérült BR-deficiens mutánsok azonosítására (Altmann, 1999).

2.2.1. A bioszintézis út lépései

A BR-ok bioszintézise a növények sejtmembránjaiban nagy mennyiségben előforduló fitoszteroloktól számos, főként oxidatív lépést követően jut el a végtermék BL-ig.

2. ábra: A BR bioszintézis metabolit-konverziós adatokból levezetett modellje
A vázlat az élettani szempontból legfontosabb C₂₈ típusú BR-ok szintézisének lépéseit mutatja be a membrán szteroloktól kiindulva Suzuki és mtsai (1994 és 1995), Choi és mtsai (1997), valamint Fujioka és mtsai (2002) munkái alapján.

A *Catharanthus* kultúrákon és más kétszikűek csíranövényein izotóppal jelölt szubsztrátokkal végzett konverziós kísérletek eredményeként meghatározhatóak voltak a C₂₈ vázú kampeszerolból kiinduló fő szintézisút legfontosabb intermedierei (Suzuki és mtsai, 1994 és 1995). További vizsgálatok során Choi és mtsai (1997) arra a következtetésre jutottak, hogy a BR bioszintézis folyamata a kezdeti lépéseket követően két párhuzamosan haladó ágra válik szét, amelyek csak a végső oxidációs reakciónál egyesülnek újra. A korai és késői C-6 oxidációs utaknak elnevezett reakcióláncokra épülő modellnek meghatározó szerepe volt a BR bioszintézisről alkotott elméletek kialakításában, annak ellenére, hogy a korai oxidációs reakció minden növényben alárendelt jelentőségű, és egyes (pl. a Solanaceae családba tartozó) fajokban ennek termékei nem is mutathatók ki (Nomura és mtsai, 2001). A később megismert korai C-22 hidroxilációs mellékúttal (Fujioka, 2002) kiegészített anyagcsereút séma (2. ábra) mindmáig a BR bioszintézis általánosan elfogadott modelljének volt tekinthető (Fujioka és Yokota, 2003).

A metabolit konverziós vizsgálatok alapján tisztázódott, hogy magasabbrendű növényekben a szteroid hormon alapvetően egységes metabolikus folyamatok révén termelődik (Nomura és mtsai, 2001). A BR szintézis intermediereinek, továbbá ezek képződési sorrendjének megismerése jelentősen hozzájárult a molekuláris genetika módszereivel azonosított bioszintézis gének, ill. termékeik funkcióinak pontos meghatározásához. Ezek a kísérleti eredmények egy új bioszintézis modell megalkotásához vezettek (Ohnishi és mtsai, 2006). Ennek egyszerűsített vázlatát a 3. ábra mutatja be.

2.2.2. A BR bioszintézis enzimei

A BR bioszintézis enzimeinek azonosítása jórészt azoknak a hatékony genetikai módszereknek köszönhető, melyek lehetővé tették BR-hiányos mutánsok izolálását és karakterizálását. Az *Arabidopsis* modellnövényben létrehozott mutánsgyűjtemények vizsgálata során hamar az érdeklődés középpontjába kerültek a törpe fenotípust eredményező mutációk, melyek gyakran bizonyultak defektívnek a növekedést serkentő hormonok (pl. gibberellinek) szintézisében (Feldman, 1991). A külső BR kezeléssel helyrehozható törpe vonalak közül kerültek ki az elsőként jellemzett BR hiánymutánsok (Li és mtsai, 1996; Szekeres és mtsai, 1996), amiket rövidesen továbbiak megismerése követett. A teljes *Arabidopsis* genom szekvenciájának ismertetésével lehetővé vált a bioszintézisben résztvevőkkel közeli rokon gének azonosítása, és ezek többsége esetében a BR szintézisben

3. ábra: A BR bioszintézis fő reakcióútja

A vázlat a C₂₈ BR-ok szintézisének az egyes bioszintetikus enzimek szubsztrát-preferenciái alapján levezetett legvalószínűbb modellje. Az egyes konverziós lépéseket jelölő nyilak mellett - ahol ez ismert - feltüntettük az azokat katalizáló enzimek szimbólumait.

játszott szerepük bizonyítása (Shimada és mtsai 2001; Kim és mtsai 2005a). Mára az *Arabidopsis* BR bioszintézis génjeinek nagy része ismertté vált. Ezek a szteroid-5 α -reduktáz funkciójú *DE-ETIOLATED 2 (DET2)* enzim (Li et al., 1996) génjétől eltekintve valamennyien citokróm P450 monooxigenázokat kódolnak. Bár a bioszintetikus funkciók közül néhányat más növényfajokban is azonosítottak, itt csupán a munkámhoz közvetlenül kapcsolódó *Arabidopsis* enzimek ismertetésére szeretnék szorítkozni. Az ezek által katalizált ismert konverziós lépéseket a 3. ábrán bemutatott szintézisút sémán is feltüntettük.

2.2.2.1. Citokróm P450 monooxigenázok

A citokróm P450 monooxigenázok (röviden: P450-ek) igen ősi típusú hem proteinek, amelyek valamennyi prokariota és eukariota szervezetben előfordulnak, és jellemzően főként hidrofób karakterű szubsztrátok oxidatív szubsztitúciós reakcióit katalizálják molekuláris oxigén felhasználásával. Az enzimsoport elnevezése tagjainak a hem redukált állapotában mérhető jellegzetes, 450 nm-es abszorpciós maximumából ered. Az eukariota (de nem mitokondriális) P450-ek a sejtek endoplazmatikus retikulumában lokalizált membránproteinek. Enzimatis reakciójukat követően oxidatív regenerációjukat a velük strukturális komplexet képező NADPH-függő P450 reduktázok biztosítják (Nelson és mtsai, 2004). Mivel a P450-ek egy része széles szubsztrát-spektrummal rendelkezik, csoportosításuk alapjául a szokásos enzim katalógus (EC) besorolás helyett az enzimeket aminosav-szekvenciájuk alapján, a 40%-nál nagyobb azonosságot mutató tagokból álló, sorszámozott CYP családokba osztották be. A növényvilágban különösen nagy formagazdagságban előforduló P450-ek közül az *Arabidopsis* genomban 47 család tagjait kódoló több mint 270 gént azonosítottak. Ezek jórészt másodlagos anyagcsere-folyamatokban vesznek részt, meghatározó szerepet betöltve például a fenil-propanoid anyagcserében. Emellett fontos feladatuk van az alkaloidok, terpének és egyes fitohormonok (gibberellinek, BR-ok, auxinok és jazmonsav) bioszintézisében is (Chapple, 1998). A BR-ok szintézisében résztvevő, itt röviden ismertetendő P450 típusú enzimek az egymással szoros rokonságot mutató CYP90 és CYP85 családokba tartoznak.

CPD/CYP90A1

A CPD enzimológiai elnevezése CYP90A1, ami a CYP90-es család prototípusát jelöli. Az enzim génjét a T-DNS inszerció révén létrehozott *cpd* mutáns segítségével azonosították (Szekeres és mtsai, 1996). A BR-hiányos, törpe habitusú és konstitutív

fotomorfofenikus tulajdonságokat mutató *cpd* fenotípusa BR kezeléssel hatékonyan helyreállítható. A BR bioszintézis intermediereivel végzett menekítési kísérletek a CPD-nek a szteroid oldallánc C-23-as helyzetű hidroxilációjában betöltött szerepére utaltak (Szekeres és mtsai, 1996), de újabb vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a C-3 helyzetű hidroxil csoport oxidatív izomerizációját katalizálja (Ohnishi és mtsai, 2006; M. Mizutani, személyes közlése).

DWF4/CYP90B1

A *dwf4* (*dwarf 4*) szintén T-DNS inszercióval létrehozott BR-hiányos mutáns, amely a *cpd*-hez rendkívül hasonló fenotipikus jegyeket mutat (Azpiroz és mtsai, 1998). Az inszerció segítségével azonosított *DWF4* gén a CPD/CYP90A1-gyel nagyfokú aminosav sorrend egyezést mutató CYP90B1 enzimet kódolja. BR intermedierekkel végzett fenotípus helyreállítási kísérletek alapján ismert, hogy ez a P450 a szteroid oldallánc C-22 helyzetű hidroxilációját végzi (Choe és mtsai, 1998), bár konkrét szerepéről és a reakcióban résztvevő szubsztrátokról alkotott kép az újabb, közvetlen enzimológiai vizsgálatok alapján lényegesen átalakult (Fujita és mtsai, 2006).

ROT3/CYP90C1 és CYP90D1

A *cpd* és *dwf4* számos alléljével ellentétben ezen két enzimben deficiens vonalak nem fordultak elő az *Arabidopsis* törpe mutáns gyűjteményekben. A *CYP90C1* génben sérült *rotundifolia 3* (*rot3*) mutáns igen enyhe levél fenotípust mutat, amit eredetileg csak a levélsejtek hosszanti megnyúlásának zavarával hoztak összefüggésbe (Kim és mtsai, 1998). A ROT3/CYP90C1 és CYP90D1 esetleges szerepe a BR bioszintézisben a CYP90 családba való tartozásuk alapján vetődött fel, és ezt megerősítették azok az adatok, melyek szerint a BL mint végtermék valamennyi *CYP90* gén kifejeződését azonos módon gátolja (Bancos és mtsai, 2002). A T-DNS inszerció null mutáns *cyp90c1* és *cyp90d1* vonalak vizsgálata során kiderült, hogy bár ezek külön-külön igen gyenge fenotípusúak, a *cyp90c1cyp90d1* dupla mutáció BR-deficiens törpe növényeket eredményez (Kim és mtsai, 2005a; Ohnishi és mtsai, 2006). A baculovírus-fertőzött rovarsejtekben kifejeztetett CYP90C1 és CYP90D1 részletes enzimológiai vizsgálata tisztázta, hogy ezek redundáns szerepű, a szteroid oldallánc C-23 pozíciójának hidroxilációját végző P450-ek (Ohnishi és mtsai, 2006).

CYP85A1 és CYP85A2

*Arabidopsis*ban a BR bioszintézis mutánsokat általában a nagy számban izolált törpe vonalak köréből azonosították. A *CYP85A1* és *CYP85A2* géneket érintő ilyen mutánsok

ugyanakkor nem álltak rendelkezésre, ezért ezeket a paradicsom *Dwarf/CYP85A1* génnel (Bishop és mtsai, 1996) mutatott szekvencia homológia alapján ismerték fel. A paradicsom CYP85A1 szerepének *in vivo* (Bishop és mtsai, 1996) és *in vitro* (Bishop és mtsai, 1999) vizsgálata tisztázta, hogy az enzim a már biológiailag aktív kasztaszteront létrehozó C-6 oxidációs lépést katalizálja. Az *Arabidopsis CYP85* génjei által kódolt, egymással 82%-os aminosav szekvencia egyezést mutató P450-ek redundáns funkciójukra utalt, hogy a jellegzetes BR-hiányos törpe fenotípust csak a *cyp85a1cyp85a2* kettős mutáns mutatta, míg az egyszeres mutánsok nem, vagy alig voltak megkülönböztethetők a vad típusú növényektől (Kwon és mtsai, 2005; Nomura és mtsai, 2005).

A C-6 oxidázok részletesebb funkcionális vizsgálata feltárta, hogy a nagyfokú aminosav sorrend azonosság ellenére a két *Arabidopsis* enzim szerepe különböző. Míg a CYP85A1 reakciójának a kasztaszteron a végterméke, addig a CYP85A2 ezen túl BL-szintáz aktivitással is rendelkezik, a C-6 oxidáció mellett ugyancsak katalizálva a kasztaszteronból BL-ot létrehozó Baeyer-Villiger-típusú laktamizációs reakciót (Kim és mtsai, 2005b; Nomura és mtsai, 2005). Ezzel egyidejűleg vált ismertté a C-6 oxidázok hasonlóan elkülönülő szerepe paradicsomban is, ahol a CYP85A1 a vegetatív szervek kasztaszteron szintézisét végzi, míg a bogyóspecifikusan kifejeződő CYP85A3 a csak a bogyóban képződő BL létrehozására is képes (Nomura és mtsai, 2005).

2.2.2.2. A BR bioszintézis enzimeinek katalitikus tulajdonságai

A CYP85 és CYP90 családokba tartozó egyes, heterológ rendszerben kifejeztetett enzimek biokémiai vizsgálata (Bishop és mtsai, 1999; Shimada és mtsai, 2001; Fujita és mtsai, 2006; Ohnishi és mtsai, 2006), valamint elsősorban az *Arabidopsis* és paradicsom endogén BR intermediereinek analízise (Bishop és mtsai, 1999; Fujioka és mtsai, 2002; Ohnishi és mtsai, 2006) azt mutatja, hogy ezen P450-ek rendre többféle, szerkezetileg hasonló molekulát is elfogadnak szubsztrátként. Mindezek alapján nagyon valószínű, hogy a növényben a BL nem egyetlen úton, hanem sokkal inkább hálózatszerű reakciók sorozatának eredményeként jön létre. Néhány enzimmél pontosan meghatározták az egyes szubsztrátok affinitási értékeit, és ezek esetenként nagy, akár két nagyságrendnyi különbséget is mutattak (Fujita és mtsai, 2006; Ohnishi és mtsai, 2006). Jelenleg az ismert konverziós sebességi adatok alapján meghatározható BR bioszintézisnek az a leghatékonyabb útja (3. ábra), amely optimális enzim- és szubsztrátellátottság mellett valószínűsíthető. Ugyanakkor ismert, hogy mind a bioszintézis génjeinek kifejeződése, mind a BR intermedierek spektruma összetett

egyedfejlődési és szervspecifikus szabályozás alatt áll, ami az egyes reakcióutak fontosságának lényeges átrendeződését eredményezheti. Feltételezhető tehát, hogy ezen tényezők függvényében a CYP85 és CYP90 enzimek relaxált szubsztrátspecifitása fontos szerepet játszhat a BR szintézis hatékonyságának pontos beállításában.

2.2.2.3. A bioszintézis sebesség-meghatározó lépései

A fiziológias hormonszint homeosztázisának fenntartásában fontos szerepe van a bioszintetikus és inaktivációs folyamatok összehangolt szabályozásának. A bioszintézis hatékonyságát a sebesség-meghatározó lépéseket katalizáló enzimek kontrollálják. Ezen enzimek azonosítása céljából Nomura és mtsai (2001) részletesen összehasonlították az egyes BR intermedierek felhalmozódását *Arabidopsis*-ban, borsóban (*Pisum sativum*) és paradicsomban (*Lycopersicon esculentum*). Vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy ezekben a növényekben a CYP90A, CYP90B és CYP85A enzimek szubsztrátjai a többi intermedier mennyiségéhez viszonyítva jelentősen felhalmozódnak. Ez arra utalt, hogy ezeknek az enzimeknek a kifejeződése és aktuális aktivitása meghatározó lehet a BR bioszintézis lokális szabályozásában (Nomura és mtsai, 2001). Bár minden egyes esetben csupán egy sebesség-meghatározó reakció áteresztőképességétől függ a szintézis hatékonysága, az anyagcsereút hálózatos voltából, valamint a bioszintetikus gének expressziójának különbségeiből adódóan egyes szervekben vagy fejlődési szakaszokban az említett három enzim bármelyike által katalizált konverziós lépés limitálóvá válhat. A BR intermedierek mennyiségi viszonyainak összevetése fontos adatokkal szolgált az anyagcsereút szabályozásának megismeréséhez, és rávilágított arra is, hogy ezek a folyamatok igen hasonlóak a vizsgált három kétszikű faj esetében (Nomura és mtsai, 2001).

2.3. Az endogén BR szint regulációja

A növények életfolyamatait nagymértékben befolyásolják a környezeti hatások. A környezeti ingerek érzékelése az egyes sejtekben lezajló folyamat, ugyanakkor élettani szempontból igen fontos a válaszreakcióknak a szövetek és szervek szintjén történő összehangolása, amelyben a fitohormonoknak van meghatározó szerepe. A hormonválasz kialakulásában fontos tényező egy adott hormon lokális koncentrációja, mely az aktuális hormonérzékenységgel együtt a biológiai válasz mértékének meghatározója. Az endogén

hormonkoncentráció függ a *de novo* hormonszintézistől, a jelenlevő hormon reverzibilis vagy végleges inaktivációjától, valamint a szervezetben lejátszódó transzport folyamatoktól.

2.3.1. Transzport és inaktiváció

Számos kísérleti adat bizonyítja, hogy a BR-ok transzportja a növényen belül elhanyagolható. Erre utal, hogy a paradicsom transzpozonos mutagenézisével létrehozott *dwarf* mutáns levelének revertáns mozaikfoltjai nem befolyásoják a BR-deficiens szegmensek zsugorodott fenotípusát (Bishop és mtsai, 1996), és hogy borsón és paradicsomon végzett oltási kísérletekben a vad típusú rész sem alanyként, sem oltványként nem képes a hormonhiányos rész fenotípusának helyreállítására (Symons és mtsai, 2004; Montoya és mtsai, 2005). Jelenlegi ismereteink szerint a BR-ok hatása a szintézisük helyéhez közel, ún. parakrin/autokrin módon érvényesül.

Az utóbbi évek során *Arabidopsis*-ban olyan enzimeket azonosítottak, melyek a bioaktív BR-ok inaktiválásáért felelősek. Ezen reakciók egy részét a BR bioszintetikus génekkel közelebbi rokonságot nem mutató citokróm P450-ek végzik. A *PHYB4 ACTIVATION-TAGGED SUPPRESSOR 1 (BAS1)* gén által kódolt CYP734A1 (Turk és mtsai, 2003) és a *CHIBI 2 (CHI2)* által kódolt CYP72C1 (Nakamura és mtsai, 2005) rendkívül alacsony szinten expresszálódik. Kifejeződésük magas BL szint esetén vagy erős fényhatásra indukálódik, de a kiváltó inger megszűnését követően gyorsan visszaáll az alapszintre. Ez arra utal, hogy e két enzimnek fontos szerepe van a hormon homeosztázis fenntartásában (Turk és mtsai, 2003; 2005). A CYP734-ról ismert, hogy a bioaktív BR-ok (BL és kasztaszteron) irreverzibilis inaktivációjáért felelős C-26 helyzetű hidroxilációt katalizálja, de a CYP72C1 pontos funkciója jelenleg még ismeretlen (Turk és mtsai, 2003).

A biológiailag aktív BR formák inaktiválásában résztvevő enzimek mellett repceből és *Arabidopsis*-ból olyan szulfotranszferáz és glikoziltranszferáz enzimeket is leírtak, amelyek a BR bioszintézis számos intermediereit képesek szulfonálni, ill. glikozilálni *in vitro* körülmények között (Rouleau és mtsai, 1999; Poppenberger és mtsai, 2005). Bár ezeknek a reakcióknak az élettani szerepe ismeretlen, a glikozilációról feltételezik, hogy egyes prekursorok reverzibilis konjugációjával kivonja azokat a bioszintézisből. A konjugált formák mennyiségi vizsgálataira arra utalnak, hogy a reverzibilis inaktivációs folyamatok a korai BR intermediereket és az aktív származékokat egyaránt érinthetik (Szekeres és Bishop, 2006). Jelenlegi ismereteink szerint a BR inaktivációért felelős enzimek feladata elsősorban a hormon homeosztázis biztosítása. Ez történhet a fölösleges aktív formák irreverzibilis

átalakításával, vagy - elsősorban a BR felhalmozást igénylő reproduktív képletekben - a bioszintetikus intermedierek/termékek átmeneti konjugációjával.

A rendelkezésre álló adatok alapján az aktív BR formák inaktivációjában résztvevő enzimek fiziológiás körülmények között csak rendkívül alacsony szinten fejeződnek ki, és a szteroid hormon növényen belüli eloszlását érdemben transzport folyamatok sem befolyásolják. Mindez arra utal, hogy BR-ok lokális felhalmozódásában a *de novo* bioszintézisnek van meghatározó szerepe.

2.3.2. A bioszintézis géneinek transzkripció szabályozása

A BR bioszintézis hatékonysága jelentős mértékben függ a sebesség-meghatározó reakció(ka)t katalizáló enzim(ek) mennyiségétől. A CPD/CYP90A1 esetében ismert, hogy az egyes szervekben fő szubsztrátjának felhalmozódása fordított arányban áll a CPD mRNS mennyiségével (Bancos és mtsai, 2002), és az is, hogy ez utóbbi alapvetően a transzkripció szintjén szabályozott. (Mathur és mtsai, 1998). Ez a regulációs folyamat több olyan belső tényező és külső inger által determinált, amelyek igen hasonló módon - és valószínűleg jórészt azonos mechanizmusok révén - hatnak valamennyi BR bioszintézis gén kifejeződésére (Bancos és mtsai, 2002; Tanaka és mtsai, 2005).

2.3.2.1. Végtermékgátlás

A BR bioszintézisben résztvevő gének közül először a CPD-ről mutatták ki, hogy kifejeződését a szintézisút végtermékének tekintett BL koncentráció-függő módon gátolja (Mathur és mtsai, 1998). További vizsgálatok kiderítették, hogy *Arabidopsis*-ban a BR szintézis valamennyi P450 génjének expressziója hasonló végtermékgátlás révén kontrollált (Bancos és mtsai, 2002; Tanaka és mtsai, 2005). Annak alapján, hogy ezeknek a géneknek a BR-függő aktivitása igen széles, 15-20-szoros különbségeket mutató skálán mozog, de az egyedfejlődés folyamán valamilyen mértékben végig részlegesen represszált állapotban marad, ez a visszacsatolós szabályozó mechanizmus a bioszintézis fontos fiziológiás regulátorának tekinthető (Bancos és mtsai, 2002). Ez a szigorúan stringensen működő negatív visszacsatolós rendszer a BR bioszintézis gének kifejeződésének erőssége és az aktív BR-ok szintje közti szoros kapcsolatot bizonyítja. A bioszintetikus funkciók transzkripció szintű végtermékgátlása más növényi hormoncsaládok esetében is ismert, és különösen jól

dokumentált a gibberellin szintézis utolsó két reakcióját katalizáló enzimek génjeinek esetében (Yamaguchi és Kamiya, 2000).

He és mtsai (2005) kimutatták, hogy a BR bioszintézis génjeinek BL-függő represszióját a BZR1 transzkripciós faktor biztosítja. Ez a protein számos BR-regulált gén kifejeződését befolyásolja, és a kölcsönható partnerek természetétől függően mind pozitív, mind negatív szabályozó komplexek kialakításában részt vehet (He és mtsai, 2002). A BZR1 közvetlenül kapcsolódik a valamennyi BR bioszintézis gén promóterében megtalálható hat nukleotidányi BRRE elemhez, ami erős repressziós hatást eredményez (He és mtsai, 2005).

2.3.2.2. Fejlődési stádiumtól függő szabályozás

A BR bioszintetikus gének expressziós vizsgálatai azt is kimutatták, hogy ezek jellegzetes, fejlődési stádiumtól függő kifejeződési mintázatot mutatnak. Ez összhangban van azzal, hogy a BR-oknak fontos szerepük van az egyes fejlődési szakaszok elindításában, illetve szabályozásában. *Arabidopsis*-ban kimutatták, hogy valamennyi BR bioszintetikus P450 gén nagymértékben indukálódik a csírázás első hetében, majd kifejeződésük szintje a második hét végére erősen lecsökken. A transzkriptumok szintje ezután az első heti maximum 10%-a alatti értéken stabilizálódik, csupán a többi génnél végig magasabb szinten expresszálódó *CPD* esetében marad annak kb. 30%-a körül (Bancos és mtsai, 2002). A korai csíranövény szakaszban - a végtermékgátláshoz hasonlóan - valamennyi *CYP85* és *CYP90* gén nagyjából azonos módon szabályozódik. Az *Arabidopsis*-on, paradicsomon és szőlőn végzett vizsgálatok szerint viszont sokkal differenciáltabbak azok a már szervspecifitást is tükröző aktiválódási mintázatok, amelyek felnőtt növényekben a reproduktív szervek kialakulását kísérik (Castle és mtsai, 2005; Montoya és mtsai, 2005; Nomura és mtsai, 2005; Symons és mtsai, 2006).

2.3.2.3. Szervspecifikus reguláció

Az összehangoltan érvényesülő végtermékgátlásos és korai fejlődési szabályozással ellentétben az egyes BR bioszintézis gének jellegzetes szervspecifikus kifejeződési mintázatot mutatnak. *Arabidopsis*-ban a potenciális sebesség-meghatározó lépéseket katalizáló enzimek génjei (*CPD*, *DWF4* és *CYP85A2*) már csíranövény korban elsősorban a hajtáscsúcsban és a differenciálódó levélkezdeményekben expresszálódnak, míg a *CYP85A1*, *CYP90C1* és *CYP90D1* transzkriptumok szintje a gyökérben a legmagasabb (Bancos és mtsai, 2002;

Shimada és mtsai, 2003). A génaktivitások szervspecifitásának feltehetően fontos szerepe van a lokális BR szintek beállításában, koncentráció grádiensek kialakulásában, és ezáltal - más fitohormonok hatásával összhangban - differenciációs folyamatok elindításában. Paradicsomban a reproduktív szervek kialakulása során a bioaktív kasztaszeron szintéziséhez szükséges *DWARF/CYP85A1* gén erős átmeneti aktiválódást mutat (Montoya és mtsai, 2005), és a más stádiumokban nem megnyilvánuló *CYP85A3* is magas szinten kifejeződik (Nomura és mtsai, 2005). Hasonlóan szembetűnő átmeneti indukciót figyeltek meg a szőlő *CYP85* esetében is a bogyóérés során (Symons és mtsai, 2006).

2.4. A növények életfolyamatainak napszakos szabályozása

Helyhez kötött életmódjuk miatt a magasabbrendű növényeknek gyorsan és hatékonyan kell alkalmazkodniuk a környezeti feltételek alakulásához. Az egyik legfontosabb ilyen tényező a nappalok és éjszakák 24 órás rendszerességű ismétlődése, amely a fényviszonyok és a hőmérséklet jelentős változásaival jár. Ez az életfolyamatoknak a világos és sötét szakaszoknak megfelelő átrendeződését igényli, amely a gének jelentős részének kifejeződését is érinti. A Shaeffer és mtsai (2001) által közölt expressziós vizsgálatok adatai szerint az *Arabidopsis* génjeinek kb. 10%-a napszakos kifejeződésű, azaz - definíciójuk szerint - transzkriptumaik mennyisége a nap folyamán legalább kétszeres különbséget mutat. A gének expressziójának napi változásaiért alapvetően két regulációs rendszer felelős. Az egyik az ún. diurnális szabályozás, amely közvetlenül a környezeti fényviszonyok által meghatározott. A másik a szervezet biológiai órájától függő cirkadián (latin "circa diem": nagyjából egynapos) reguláció, amely - rendszerint fény általi - beállítását követően állandó környezeti körülmények mellett is biztosítja a génkifejeződés napi periodicitását.

2.4.1. Diurnális reguláció

2.4.1.1. Fényszabályozás

A növények döntő többsége a fotoszintézis révén termeli meg a számára szükséges szerves vegyületeket és energiát, ezért fejlődésükre a fény minden életszakaszban fontos befolyással van. Fény szabályozza a csírázást és a csíranövények morfogenezisét, a fototropizmus és árnyékkerülés révén a növekedés irányát, a szintestek és gázcserenyílások mozgását, valamint a napi megvilágítottság hosszán keresztül a virágzás szezonális

időzítését (Sullivan és Deng, 2003). A növény életfolyamatai közvetlenül reagálnak a fényintenzitás változásaira az ún. akut fényválasz útján. Ez a folyamat igen fontos a biokémiai és élettani funkciók finom szabályozásában és összehangolásában. Mindezen túl akut fényreakció eredménye a növény cirkadián órájának beállítása is, ami a fény és sötét szakaszok várható változásaira készíti fel szervezetüket. A környezeti fényhatásokat a növények jól meghatározott elnyelési tulajdonságokkal rendelkező fotoreceptorok útján érzékelik, és válaszreakcióik az érzékelés során elinduló jelátviteli láncok hatásán keresztül alakulnak ki.

2.4.1.2. A fotoreceptorok

A növények a fényt három hullámhossz tartományban érzékelik. A 280-320 nm közötti régióba eső UV-B receptora jelenleg ismeretlen, és igen kevés információ áll rendelkezésre az UV-B hatást közvetítő jelátviteli utakról is. A 320-400 nm-es tartományú UV-A és a kék fény érzékelésében a kriptokróm, valamint a fototropin fotoreceptorok vesznek részt. A kriptokróмок flavoproteinek, amelyek a szinte valamennyi élőlénycsoportban megtalálható, és az UV általi DNS károsodás javítását végző fotoliázokkal mutatnak szerkezeti hasonlóságot. Az *Arabidopsis*-ban a *CRY1* és *CRY2* gének által kódolt két kriptokróm forma elsősorban csíranövények fényfüggő morfogenezisét, a virágzást, valamint a cirkadián óra beállítást meghatározó jelátviteli utak aktiválásáért felelős. Ugyanebbe a hullámhossztartományba eső fény érzékelésére képesek a fototropinok is, amelyeket *Arabidopsis*-ban szintén két gén: az *NPH1* és az *NPL1* kódol. A fototropinokról kiinduló jelátviteli utak a gázcsereenyílások és kloroplasztiszok fényfüggő mozgását, valamint a fototropizmust szabályozzák (Sullivan és Deng, 2003).

Az *Arabidopsis* esetében a vörös fény érzékelését öt fitokróm (PHYA, B, C, D és E) biztosítja. Ezek közül az egymáshoz igen hasonló szerkezetű, és szerepüket tekintve is átfedő fotoreceptorok közül említésre érdemes PHYA néhány eltérő sajátossága. Ez a fitokróm a többitől eltérően fényben instabil. Míg sötétben csírázó növényekben az összes fitokróm mintegy 85%-át adja, zöld csíranövényekben mennyisége csupán 5% (Sharrock és Clack, 2002). Ezen kívül a PHYA-t megkülönbözteti a többi formától nagyobb fényérzékenysége, továbbá az is, hogy érzékelési tartománya részben átfed az UV-A és kék fotoreceptorokéval. A fényben stabil fitokrómok közül a PHYB a leggyakoribb forma mind sötétben, mind világosban csírázó növénykékből, ahol előfordulási aránya 10, ill. 40% (Sharrock és Clack, 2002). Funkcióit tekintve is ez a legjobban jellemzett fitokróm, amely olyan fontos élettani

folyamatok szabályozásában vesz részt, mint a csírázás, fényfüggő morfogenezis (ún. de-etioláció), árnyék elkerülés, virágzás indukció, valamint a cirkadián óra beállítása (Sullivan és Deng, 2003).

A fotoreceptorok fény hatására olyan - rendszerint foszforilációs lépésekre épülő - jelátviteli utakat aktiválnak, amelyek a fényregulált gének kifejeződését szabályozzák. Számos ilyen gén fény általi kontrollja nem függ a megvilágítás hullámhosszától, így ezeket több fotoreceptor típus szignál rendszere együttesen, átfedő módon regulálja. Az egyes fotoreceptor családok, vagy ezeken belül pl. az egyes kriptokróm, ill. fitokróm formák génexpressziós hatásának specificitása jelenleg is a fotobiológia egyik intenzíven kutatott területe.

2.4.2. Cirkadián szabályozás

2.4.2.1. A cirkadián biológiai ritmus

Az egyes élettani funkciók intenzitásának cirkadián váltakozása valamennyi élőlénycsoportra jellemző jelenség, ami a nappalok és éjszakák rendszeres váltakozásához való alkalmazkodás során alakult ki. Az ennek szabályozásáért felelős cirkadián biológiai óra működésének elve hasonló a fotoszintetizáló baktériumokban, gombákban, rovarokban, emlősökben és növényekben, de e rendszerek molekuláris komponenseinek jelentős különbségei arra utalnak, hogy kialakulása az egyes nagyobb élőlénycsoportokban jórészt párhuzamos fejlődés eredménye (Young és Kay, 2001). A napszakosan ismétlődő környezeti - rendszerint fény - jelek által naponta újra beállított cirkadián órának fontos szerepe van a szervezet felkészítésében a várható változásokra. Állandó környezetben pedig több napon át biztosítani tudja az általa szabályozott folyamatok, pl. a génexpresszió közel 24 órás ciklikusságát.

Laboratóriumi körülmények között a cirkadián óra által szabályozott gének működését változatlan környezetben tanulmányozzák, és kifejeződésüket néhány jellegzetes paraméterrel jellemzik. Ezek legegyszerűbben egy sematikus expressziós görbe (4. ábra) segítségével ismertethők. Periódushossznak az oszcilláló görbe két azonos helyzetű (pl. két maximum) pontja közti, 24 órához közeli időt nevezünk. Az expresszió az ún. ZT (Zeitgeber time) függvényében ábrázolható, aminek kiindulópontja (ZT = 0) mindig az utolsó megvilágítási szakasz kezdte. A kifejeződés fázisa a ciklikus jelleggörbe egy jellemző

pontjának, rendszerint első maximumának helyzete a ZT időskálán. A jelleggörbe amplitúdója pedig a ciklusok maximum és minimum értékei közti ingadozás fele.

4. ábra: A cirkadián szabályozású folyamatok jellemző tulajdonságai

A cirkadián óra által meghatározott folyamat egy mérhető paraméterének változása az idő függvényében. A vizsgálat során alkalmazott fényviszonyokat fehér, ill. fekete szakaszok jelzik az időtengelyen. A ZT 0 időpont az utolsó megvilágítás kezdetének felel meg. A ritmus fázisa a jelleggörbe egy jellemző pontjának (általában első maximumának) a ZT 0-tól mért időbeni távolsága órákban kifejezve. A periódushossz a görbe két azonos (pl. maximum) pontja közti idő. A cirkadián ciklus amplitúdója a minimum és maximum értékek különbségének fele.

2.4.2.2. A cirkadián reguláció élettani jelentősége

A cirkadián szabályozás egymástól független utakon történt kialakulása az élővilág fejlődése során erősen valószínűsítette, hogy e mechanizmus szelekciós előnyt biztosít az egyes élőlények számára (Harmer és mtsai, 2001). Kísérleti adatok bizonyítják rovarok és cianobaktériumok esetében, hogy a környezeti hatások és a cirkadián reguláció közti összhang hiánya jelentősen hátráltatta a vizsgált egyedek fejlődését, vagy csökkentette életképességüket (Saunders, 1972; Klarsfeld és Rouyer, 1998; Ouyang és mtsai, 1998). Növények esetében már régóta ismert volt, hogy állandó fényben nevelt paradicsom egyedek rosszul fejlődnek és kevés termést hoznak (Highkin és Hanson, 1954). Újabban a cirkadián óra működésében sérült mutáns *Arabidopsis* csíranövényeken végzett vizsgálatokkal meggyőzően bizonyítható volt, hogy a környezeti hatások és a belső ritmus egyezésének hiánya jelentősen hátráltatja az egyedfejlődést, és hogy ez legalább részben a fotoszintézisen alapuló metabolikus funkciók összehangoltságának hiányával magyarázható (Dodd és mtsai, 2005).

A cirkadián szabályozás legfontosabb feladata valószínűleg az, hogy az élőlény számára előre jelzi a környezeti tényezők várható változásait, lehetővé téve, hogy szervezetük ezekre megfelelően felkészülhessen. Ezáltal biztosítható például, hogy egymással nem összeegyeztethető biokémiai folyamatok - éjjeli, ill. nappali időzítéssel - jó hatékonysággal működhessenek egyazon sejtben.

2.4.3. A hormonális folyamatok napszakos változásai

A fényhatás a növényi szervek szintjén hormonális közvetítéssel érvényesül, amelyet gyakran a hormon bioszintézis gének expressziós szabályozása determinál. Egyes hormon bioszintézis gének fényfüggő regulációja jól dokumentált pl. az etilén és a gibberellinek esetében. Ismert, hogy *Arabidopsis*-ban és salátában (*Lactuca seriola*) a fénynek induktív hatása van a gibberellin szintézis kulcsenzimeit kódoló génekre, elősegítve ezáltal a magok csírázását (Toyomasu és mtsai, 1998; Yamaguchi és mtsai, 1998). A gének egy részénél a fényreguláció egyértelműen a fitokróm fotoreceptorokhoz volt köthető, mások esetében viszont a hullámhossztól függetlennek bizonyult (Toyomasu és mtsai, 1998; Yamaguchi és mtsai, 1998; Ait-Ali és mtsai, 1999). *Arabidopsis*-ban az etilén bioszintézis aktivációját figyelték meg távoli vörös fénykezelést követően. Kimutatták, hogy ez a hatás hormonálisan is szabályozott, mert nem érvényesül etilén-inszenzitív növényekben, és a gibberellin szintézis specifikus gátlószereinek jelenlétében sem (Pierik és mtsai, 2004). A BR anyagcsere fényszabályozásáról igen kevés adat áll rendelkezésre. Biztosan csupán annyi tudható, hogy a fénynek gátló hatása van az inaktivációs folyamatokért felelős *BAS/CYP734A1* és *CYP72C1* gének transzkripciójára (Turk és mtsai, 2003; Takahashi és mtsai, 2005).

Számos irodalmi adat utal arra, hogy a fényingerektől függetlenül is érvényesülő napi ciklusos szabályozás közvetítésében is fontos szerepük van a fitohormonoknak. Cirkadián periodicitást mutattak ki a hormonszint és hormonválasz alakulásában pl. az auxinok (Jouve és mtsai, 1999), etilén (Thain és mtsai, 2004) és a gibberellinek (Foster és Morgan, 1995) esetében is. Bár a cirkadián szabályozás hatása a hormon szintézis génjeinek aktivitására alig ismert, a burgonya (*Solanum tuberosum*) egyik gibberellin 20-oxidázát kódoló *GA20ox1-3* bifázisos napi ciklust követő kifejeződése alapján erősen valószínűsíthető, hogy regulációjában a fény és az endogén ritmus hatása együttesen érvényesül (Carrera és mtsai, 1999; Jackson és mtsai, 2000).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A BR bioszintézis kulcsenzimeit kódoló *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* gének szabályozásának *in vivo* tanulmányozása céljából létrehozott promóter:luciferáz riporter fúziók transzgenikus *Arabidopsis* növényekben jellegzetes, naponta ismétlődő kifejeződési mintázatot mutattak. Mivel feltételezhető volt, hogy ezeknek a kifejeződési változásoknak szerepük lehet a BR-ok szintjének és hatásának kialakításában, a napszakos reguláció módjának és jelentőségének megismerése céljából az alábbi vizsgálatok elvégzését terveztük:

- (1) a *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* napszakos kifejeződési profiljának jellemzését, és az ezek kialakításában résztvevő alapvető regulációs rendszerek meghatározását;
- (2) a periodikus expressziós változásokban meghatározó fényreguláció szerepének tisztázását, és az ezért felelős jelátviteli utak azonosítását;
- (3) a BR bioszintézis P450 gének ismert transzkripciós szintű végtermékgátlása és a napszakos szabályozás közti esetleges okozati összefüggés megállapítását;
- (4) valamint annak kiderítését, hogy a *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* diurnális kifejeződése együtt jár-e a BR-ok mennyiségének és hatásának napszakos változásával.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A felhasznált módszerek közül elsősorban azokat ismertetem részletesen, amelyeknél ez a vizsgálatok pontos megértése és reprodukálhatósága szempontjából fontos. Terjedelmi okokból a széles körben használt - főként általános molekuláris biológiai - metodikákra csak hivatkozom, ill. bemutatásuknál mindössze ezek sajátos vonásainak, vagy kivitelezésük megszokottól eltérő részleteinek bemutatására szorítkozom. Az általános molekuláris biológiai munkákat - ahol erre vonatkozóan más utalás nincs - a Sambrook és Russell (2001) által közreadott módszerek szerint végeztük.

4.1. Növényi anyag és nevelési körülmények

A génextpressziós vizsgálatokhoz az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) Columbia-0 ökotípusának, illetve az ebből létrehozott transzgenikus vonalaknak *in vitro* nevelt egyedeit használtuk. A magokat 10 perces, 5%-os kalcium-hipoklorit oldatban történt felszíni sterilizálást és többszörös steril desztillált vizes öblítést követően 1% szaharózzal kiegészített, 0,2% Phytagellel (Sigma) szilárdított MS táptalajon (Murashige és Skoog, 1962) csíráztattuk. A csíranövények nevelése klímakamrában (SANYO Electronic) 22°C hőmérsékleten, fluoreszcens fehér megvilágítás (50-60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) alkalmazásával, 12 h fény/12 h sötét (LD: "light/dark") ciklusok mellett történt. Esetenként folyamatos fény (LL: "light/light") és folyamatos sötét (DD: "dark/dark") kezeléseket is alkalmaztunk. Egyes kísérletekben a fehér fényt helyettesítő monokromatikus vörös ($\lambda_{\text{max}} = 660 \pm 5$ nm), ill. kék ($\lambda_{\text{max}} = 470 \pm 5$ nm) megvilágítást Snaplite LED fényforrások (Quantum Devices, Inc.) biztosították. Ezeknél a fényintenzitást (10-15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) úgy állítottuk be, hogy az hasonló legyen a más kísérletek során alkalmazott fehér fény vörös, ill. kék tartományba eső komponenseivel. A transzgenikus vonalak izolálása és ellenőrzése során a médiumot 15 mg/l higromicinnel (Calbiochem) egészítettük ki. A felhasznált maganyag létrehozása során a talajba ültetett növényeket üvegházban, 22 \pm 2°C hőmérsékleten neveltük, a csírázástól számított négy hétig rövidnappalos (8 óra fény/16 óra sötét), majd ezt követően a termésérésig hosszúnappalos (16 óra sötét/8 óra fény) körülmények között.

4.2. Transzgenikus növények előállítása

4.2.1. Promóter:luciferáz fúziós génkonstrukciók létrehozása

A kimérés promóter:riporter génkonstrukciókat transzkripció fúzióval hoztuk létre nagy kópiaszámú pBluescript II (SK+) (Stratagene) plazmid vektorban. A molekuláris klónozás során az *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsét (Stratagene) használtuk. A *CPD* gén promóteréből az ATG transzlációs starthelyhez (+1) viszonyított -968 és -5 helyzetű nukleotidák közti szakaszt PCR amplifikációval, a CPDpr-F és CPDpr-R primerek (I. táblázat) felhasználásával izoláltuk a promótert teljes egészében tartalmazó λ EMBL 3 klónból (Szekeres és mtsai, 1996) oly módon, hogy egyúttal a 3'-végen egy *Sma*I restrikciós hasítóhelyet is kialakítottunk. A *CYP85A2* promóter -971 és -5 nukleotida pozíciók közti szakaszát ugyanilyen módon állítottuk elő Col-0 genomi DNS-ből, a *CYP85A2pr-F* és *CYP85A2pr-R* primerek segítségével. Ezt követően a promóter szakaszokat *Bam*HI-*Sma*I fragmentumként klónoztuk a szentjánosbogár (*Photynus pyralis*) módosított luciferáz génjének (LUC+, Promega Biotech; a továbbiakban egyszerűen LUC) kódoló szekvenciáját már tartalmazó pBluescript vektorba. A kapott klónok szekvenálásával győződünk meg arról, hogy azok PCR eredetű hibát nem tartalmaznak. A létrehozott génfúziókat a plazmid klónokból *Bam*HI-*Sac*I fragmentumként izoláltuk, és a T-DNS alapú bináris pPCV812 vektorba (Koncz és mtsai, 1994) építettük be azokat a *Bgl*II-*Sac*I emésztéssel eltávolított *E. coli uidA* (*GUS*; β -glukuronidáz) gén kódoló régiójának helyére. A *CPD* promóter PCR mutagenézisével létrehozott, a -80-as pozícióban G>A mutációt hordozó *mCPD* promóterrel képzett fúziókat ugyanilyen módon alakítottuk ki. A munkánk során felhasznált promóter:riporter konstrukciókat a 5. ábra mutatja be.

4.2.2. Stabil transzformáns *Arabidopsis* vonalak kialakítása

A riporter fúziókat tartalmazó pPCV plazmidokat a széles spektrumú mobilizációs funkciókat hordozó *E. coli* S17-1 törzsbe transzformáltuk, majd ebből konjugáció révén a növény transzformációhoz Koncz és mtsai (1994) által kifejlesztett *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM90RK) törzsbe juttattuk. A génaktivitási vizsgálatokhoz szükséges stabil transzformáns vonalakat a Clough és Bent (1998) által leírt, *Agrobacterium*mal történő virág infiltrációs módszer alkalmazásával hoztuk létre. Az ennek eredményeként kapott

magpopulációból származó csíranövények közül higromicin szelekciót követően izoláltuk a transzgéneket hordozó növényeket.

I. táblázat: A felhasznált PCR primerek

Az egyes gének promóterinek (pr) amplifikálásához, ill. az RT-PCR reakciókhoz (rt) használt F (forward) és R (reverse) primerek. Kisbetűvel a genomi szekvenciától eltérő nukleotidákat jelöltük.

primer	gén	szekvencia (5' > 3')
CYP85A2pr-F	<i>CYP85A2</i>	TTTAGTATCACGGTTATAACT
CYP85A2pr-R	<i>CYP85A2</i>	GgGTGTTTTTTTTGCTCTGTCTTTT
CPDpr-F	<i>CPD/CYP90A1</i>	ACTAGTGGATCCAAACAAAATG
CPDpr-R	<i>CPD/CYP90A1</i>	ggGAAGAAGATGATGATGAGAGAAG
CPDrt-F	<i>CPD/CYP90A1</i>	GAATGGAGTGATTACAAGTC
CPDrt-R	<i>CPD/CYP90A1</i>	GTGAACACATTAGAAGGGCCTG
UBQ10rt-F	<i>POLYUBIQUITIN 10</i>	GGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCT
UBQ10rt-R	<i>POLYUBIQUITIN 10</i>	CTTATTCATCAGGGATTATACAAGGCC

A higromicin rezisztenciát 3:1 arányban szegregáló elsődleges (független genomi integrációval kialakult) transzformáns vonalakból önbeporzással a transzgenre nézve homozigóta növényeket hoztunk létre. Minden riporter konstrukció esetében 10-10 elsődleges transzformáns utódainak génkifejeződési mintázatát vizsgáltuk meg, és ez alapján választottuk ki azt a reprezentatív vonalat, amelyet később, a kísérleti munka során használtunk.

A BR-, ill. fitokróm AB-hiányos háttérű transzgenikus növényeket a *bri1-101* (Li és Chory, 1997) mutánsnak a kiválasztott transzformáns vonallal való keresztezés útján, míg a *phyA-201phyB-5* (Reed és mtsai, 1994) dupla mutáns esetében transzformációval hoztuk létre. Ezek esetében is a későbbiekben használandó reprezentatív vonalat a riporter gén kifejeződési mintázata alapján választottuk ki. (A disszertáció végén található 1. kiegészítő ábra a tesztelt elsődleges transzformánsok luciferáz aktivitási görbéit mutatja. Bár ezek esetében az aktivitási értékek esetenként erősen különböznek, a görbék napi lefutása minden esetben igen hasonló. Vizsgálataink céljára mindig közepes szinten kifejeződő, jellemző mintázatot mutató reprezentatív vonalat választottunk.)

5. ábra: A felhasznált luciferáz riporter konstrukciók

A vázlat a T-DNS alapú pPCV bináris vektorban a bal- és jobboldali határszekvenciák (fekete háromszögek) közötti régiót mutatja a kialakított riporter fúziókkal. Ezekben a kódoló szekvenciákat fehér, míg a regulátor szakaszokat (promótereket, ill. a nopalín-szintáz gén transzkripció terminátorát) fekete téglalapok jelölik. A mutáns *CPD* promóter (*mCPD*) fölötti csillag a mutáció helyét jelöli. A szelekciókhoz szükséges β -laktamáz (*BAL*) és higromicin-foszfotranszferáz (*HPT*) géneket csak egyszerűsítve, nem méretarányosan ábrázoltuk (szürke ellipszisek), a restrikciós hasítóhelyek közül pedig csak a klónozás során felhasználtakat tüntettük fel.

4.3. mRNS szint meghatározás

4.3.1. RNS izolálás

Az mRNS szintek meghatározásához a begyűjtött növényi anyagot folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és a felhasználásig -80°C -on tároltuk. Az RNS tisztítását a Chomczynski és Sacchi (1987) módszere alapján kifejlesztett TRI-reagens (Sigma) felhasználásával végeztük a gyártó útmutatása szerint. Ennek során 1 g növényi anyagot folyékony nitrogénben homogenizáltunk, majd 10 ml TRI-reagensben szuszpendáltunk. A növényi anyag teljes lízise után a kivonathoz szobahőmérsékleten 2 ml kloroformot adtunk,

majd alapos keverés és ezt követő 3 perc inkubálás után a fázisokat centrifugálással szétválasztottuk (12000 g, 4°C, 15 perc). Ezt követően a vizes fázisból az RNS-t 0,6x térfogatnyi izopropanol hozzáadásával kicsaptuk, majd centrifugálással (12000 g, 4°C, 10 perc) összegyűjtöttük. A csapadékot 70%-os, majd abszolút etanollal mostuk, vákuum alatt szárítottuk, végül steril, RN-áz mentes desztillált vízben visszaoldottuk. Az RNS preparátumok koncentrációját a 260 nm-en mért elnyelésük alapján határoztuk meg, minőségüket pedig formaldehid tartalmú denaturáló agaróz gélen való futtatással ellenőriztük. Az RNS mintákat végül egységesen 2 mg/ml koncentrációra állítottuk be.

4.3.2. Northern-blot analízis

Az egyes transzkriptumok mennyiségi összehasonlítása céljából végzett Northern-analízis során mintánként 20-20 µg RNS-t denaturáltunk, majd formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélen történt elektroforézissel frakcionáltunk. A gélek rövid etidium-bromidos festése után a 275 nm-es UV fényben fluoreszkáló RNS mintázatról fényképet készítettünk. Ezután a gélből az RNS-eket 20x SSC pufferben végzett kapilláris transzferrel Nytran N hibridizációs membránra (Schleicher & Schuell) kötöttük, majd 275 nm-es UV kezeléssel rögzítettük. Szükség esetén a további felhasználásig a membránokat szárazon, légmentesen lezárva -20°C-on tároltuk.

A hibridizációs próbát a teljes *LUC* cDNS-t tartalmazó DNS fragmentumból (20 ng) állítottuk elő Megaprime (Amersham) jelölő kit és [α -³²P]dCTP (Izotóp Intézet) felhasználásával. A membránhoz kötött RNS hibridizációját Church-pufferben (Church és Gilber, 1984) végeztük 68 °C-on, éjszakán át. Ezt követően a membránról a nem specifikusan kötött próbát előmosással (2x SSC, 0,1% Na-dodecilszulfát; szobahőmérséklet, 60 perc), majd háromszor ismételt stringens mosással (0,1x SSC, 0,2% Na-dodecilszulfát; 0,05% Na-pirofoszfát; 68°C, 15 perc) távolítottuk el. A hibridizációs membránt ezután megszáritottuk, és rajta a radioaktív hibridizációs jeleket Phosphoimager 445 SI (Molecular Dynamics) készülék segítségével detektáltuk és értékeltük.

4.3.3. Reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR analízis

Az mRNS szintek szemikvantitatív, reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR (RT-PCR) módszerrel történő meghatározásához az RNS-t olyan növénymintákból izoláltuk, amelyeket a luciferáz aktivitás mérésekhez használtakkal párhuzamosan, ugyanolyan körülmények

között neveltünk. Az analízisekhez a cDNS-t 5 µg RNs-ből kiindulva, oligo-dT primer segítségével szintetizáltuk Ready-to-Go (Pharmacia Biotech) első szál szintézis kit felhasználásával. A PCR amplifikációhoz a vizsgált gének kódoló szekvenciáinak 3' végéhez közeli, 250-350 bp-nyi terméket adó primereket használtunk. Az egyes reakciókban a reverz-transzkripcióval kapott cDNS 10%-át használtuk a következő körülmények között: denaturáció 94°C 2 perc; amplifikációs ciklusok 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s. A *CPD* mRNS analízise esetében 15, míg a konstitutív kontrollként használt *UBQ10* (*POLIUBIQUITIN 10*) transzkript detektálásánál 20 PCR ciklust használtunk. Az alkalmazott génspecifikus primerek szekvenciáit az I. táblázatban adtuk meg.

Azért, hogy megbízható képet kapjunk a kiindulási cDNS-ek mennyiségi viszonyairól, a PCR reakciókat azok exponenciális fázisában állítottuk le, és a detektálhatóság növelése céljából izotópos jelölést alkalmaztunk. Ennek során a PCR termékek 10%-át friss, dCTP-mentes reakcióelegybe vittük, majd ezen denaturálás után 72°C-on két percig [α -³²P]-dCTP, majd további két percig feleslegben hozzáadott "hideg" dCTP jelenlétében egy további extenziós reakciót hajtottunk végre egy, az amplifikáció során használtén 3' irányban három nukleotidával túlnyúló belső ("nested") primerrel. A kapott DNS termékeket 2%-os agaróz gélen szeparáltuk, majd a gélt Whatman 3MM szűrőpapírra szárítottuk, és a radioaktivitást autoradiográfiával detektáltuk.

4.4. A luciferáz aktivitás meghatározása transzgenikus növényekben

Kísérleteink során LD ciklusokban nevelt egyhetes, *LUC* riporter konstrukciót hordozó transzgenikus csíranövényeket használtunk fel. A csíranövényekből 100-100-at szoros csoportokat kialakítva friss táptalajra helyeztünk, majd ezeket a mérés kezdete előtt 36 és 24 órával steril, 25 mM-os D-luciferin (Biosynth A.G.) oldattal permeteztük. A mérések a csírátztatás utáni 8. napon, a fény szakasz végén kezdődtek, ami állandó (LL, ill. DD) fényviszonyok mellett a ZT 12 időpontnak (ZT: "Zeitgeber time", az utolsó fényszakasz kezdetétől eltelt idő) felelt meg.

Az *in vivo* lumineszcencia méréseket folyékony nitrogénnel hűtött, nagy érzékenységű CCD ("charge-coupled device") kamerával (LN-CCD-512-TKB, Princeton Instruments) végeztük. Az egyes növénymintákról kétórás időközönként 25 perces digitális felvételeket készítettünk, majd az így rögzített lumineszcenciát Metamorph program (Meta 4.5 programcsomag, Universal Imaging) segítségével számszerűsítettük. A - főként fotoszintetikus pigmentektől eredő - késleltetett fluoreszcencia kiküszöbölése érdekében a

mintákat már öt perccel az expozíció kezdete előtt sötétbe helyeztük. A mért fotonszámból a kamera háttérét levonva a kapott, egyes növényekre számított értékeket az idő függvényében ábrázoltuk. Minden mérést legalább négy alkalommal ismételtünk. A párhuzamos mérések között nem találtunk jelentős eltérést, ezért ezekből rendre egy-egy reprezentatív adatsort mutatunk be. (A párhuzamos minták kifejeződési mintázatainak eltérései és az egyes időpontokban mért értékek szórásai a 2. kiegészítő ábrán láthatók.).

4.5. Az endogén BR-ok mennyiségi analízise

4.5.1. A növényi minták előkészítése

A BR tartalom analíziséhez *in vitro*, LD körülmények között előnevelt egyhetes csíranövényeket használtunk. A mintánként 30-40 g friss növényi anyagot azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és liofilizálásukig -80°C -on tároltuk.

A hormonszint napszakos változásának vizsgálatához az egyhetes csíranövény anyag egy-egy negyedét a fény szakasz kezdetétől hatórás időközönként (0, 6, 12 és 18 h) gyűjtöttük be. A sötét szakasz során szedett mintákat gyenge fénynél szedtük le, és a sötétből kikerülésüket követő öt perccel belül lefagyasztottuk.

A folyamatos sötét (DD) hormonszintre gyakorolt hatásának vizsgálata során a csíranövény anyag egyik felét a nyolcadik sötét szakasz kezdetétől 48 órára folyamatos sötétbe helyeztük, míg a másik (kontroll) felét ugyanennyi ideig változatlan LD ciklusokban neveltük tovább. Ezután a mintákat a már leírt módon gyűjtöttük és készítettük elő a hormon extrakcióhoz.

4.5.2. A BR-ok izolálása és mennyiségi meghatározása

Az endogén BR-ok kivonását és mennyiségi analízisét Dr. T. Yokota laboratóriumában (Teikyo Egyetem, Utsunomiya) végezték a Nomura és mtsai (2001) által leírt módon. A liofilizált növényi anyagot homogenizálták, metanollal extrahálták, majd az extraktumhoz referenciaként szintetikus előállított deuterált BR formákat adtak. A mintákat bepárlásukat követően etilacetátban visszaoldották, majd 0,5 M-os K_2HPO_4 -tal történt particionálást követően ismét szárazra párolták. Ezt 80%-os metanolban való visszaoldás után újabb, hexánnal végzett particionálás követte. A metanos fázist bepárolták, majd egymást követően aktív szén és Sephadex LH-20 oszlopokon tisztították. A kombinált BR tartalmú

frakciókat koncentrálták, Senshu-Pak ODS 3251-D oszlopon tovább tisztították, majd SIM ("selected ion monitoring") típusú gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) analízisnek vetették alá. A hormon analíziseket rendre három-három független kísérletből származó minták sorozatán végezték.

5. EREDMÉNYEK

Az ebben a fejezetben bemutatásra kerülő adatok alapvetően saját munkám eredményei. Laboratóriumunkban az mRNS szintek meghatározására irányuló Northern-hibridizációs vizsgálatok egy részét Simona Bancos végezte, míg a BR-ok mennyiségi analízise teljes egészében Dr. Takao Yokota intézetében készült.

5.1. A *CPD* és *CYP85A2* gének napszakos kifejeződése

A *CPD* gén kifejeződésének vizsgálata céljából létrehozott, *CPD:LUC* riporter konstrukciót hordozó transzgenikus növények előzetes karakterizálása során azt találtuk, hogy ezekben a luciferáz aktivitás az egyes napok folyamán periodikusan ismétlődő változásokat mutat. Ebből a felismerésből kiindulva kezdtük vizsgálni a *CPD* expresszió napszakos szabályozását.

5.1.1. A luciferáz aktivitás mérésének beállítása

A *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* transzkriptumok szintjének szervspecifikus eloszlása, valamint ezen gének promótereinek az *E. coli* β -galakturonidáz (GUS) riporter segítségével detektált kifejeződési mintázatai alapján tudtuk, hogy e két BR bioszintézis gén elsődlegesen a differenciálódó levélkezdeményekben fejeződik ki (Mathur és mtsai, 1998; Bancos és mtsai 2002; Castle és mtsai, 2005). Az expressziós szintek napszakos vizsgálata céljára kiválasztott *CPD:LUC* és *CYP85A2:LUC* vonalaknál az *in vivo* lumineszcencia ezzel megegyező szervspecifitása (6. ábra) azt mutatta, hogy a riporter aktivitások megbízhatóan tükrözik az endogén *CPD* és *CYP85A2* kifejeződési viszonyait.

Az egyes mRNS-ek relatív mennyiségeit is tükröző "microarray" hibridizációs adatok (Shimada és mtsai, 2003; Genvestigator adatbázis: www.genevestigator.ethz.ch, Zimmermann és mtsai, 2004) alapján a BR bioszintézisben résztvevő *CYP85* és *CYP90* gének igen alacsony szinten fejeződnek ki. A legerősebben kifejeződő *CPD/CYP90A1* transzkriptum szintje a többi généhez viszonyítva általában öt-tízszer magasabb, ami ideális alannya teszi a génexpressziós vizsgálatok számára. Előkísérleteink azt mutatták, hogy a CCD kamerás mérések során 25 perces expozíció esetén már egyes növények szintjén is reprodukálható napszakos kifejeződési értékeket kaphatunk. Rövidebb idejű expozíciók esetén a mérési értékek nagyobb szóródását tapasztaltuk, míg hosszabbak alkalmazása a fényben végzett

méréseket torzította volna a sötét expozíciós időszakok viszonylagos nagysága miatt. A nagyobb pontosság érdekében a méréseket 100 csíranövényből álló mintákon végeztük. A kísérleti eredmények reprodukálhatóságát a 2. kiegészítő ábra mutatja.

6. ábra: A *CPD:LUC* és *CYP85A2:LUC* transz gének kifejeződése
CPD:LUC transz gént hordozó egyhetes csíranövényről (A és B), ill. *CYP85A2:LUC* transz gént hordozó 21 napos növényről (C és D) készült CCD kamerás (A és C) és hagyományos (B és D) fényképek. A hamis színezett CCD kamerás felvételeken a fehér és piros színek az erős, míg a kék és lila a gyenge lumineszcenciát mutató régióknak felelnek meg.

5.1.2. A *CPD* és *CYP85A2* promóterek diurnális expressziós profilja

Vizsgálatainkhoz azért a *CPD* és *CYP85A2* géneket választottuk ki, mert ezek termékei a BR bioszintézis lehetséges sebesség-meghatározó lépéseit katalizálják.

Feltételezhető volt tehát, hogy transzkripciós szintjük befolyásolhatja a hormonszintézis hatékonyságát, és ennek következményeként az aktív BR formák felhalmozódását is. Mindezen túl a *CPD*-t a többi bioszintetikus génnél magasabb szintű kifejeződése is ideális kísérleti objektummá tette.

A *CPD* promóter kifejeződésének időbeni változásait LD körülmények között követtük egyhetes *CPD:LUC* transzgenikus csíranövényeken oly módon, hogy a LUC riporter aktivitását kétórás időközönként, a CCD kamerával észlelt lumineszcencia alapján határoztuk meg. A 24 órás LD ciklusok folyamán az aktivitási értékek jellegzetes bifázisos görbét adtak, amelynek két határozott csúcsa a fény szakasz kezdete utáni első, ill. annak végével egybeeső időpontokra estek (7. ábra A).

A *CYP85A2* gén kifejeződésének vizsgálatát ugyanilyen körülmények között végeztük *CYP85A2:LUC* transzgenikus csíranövényeken. A kapott expressziós profil a *CPD*-éhez igen hasonló, két maximumot mutató görbét adott (7. ábra B). Érdeemi különbség volt viszont a két gén kifejeződésében a *CYP85A2*-nek a *CPD*-hez viszonyított lényegesen alacsonyabb (mintegy 10%-ának megfelelő) aktivitása. A *CYP85A2* promóter aktivitása emellett jóval nagyobb (kb. hatszoros) napi amplitúdót mutatott a *CPD* esetében észlelt (kb. kétszeres) ingadozásnál, és a *CYP85A2*-nél a fény szakaszok kezdete utáni maximumok elérése a *CPD*-hez viszonyítva hosszabb időt: négytől hat órát vett igénybe (7. ábra A és B). Mindezek ellenére a két BR bioszintézis gén napi expressziós profiljának nyilvánvaló hasonlósága arra utal, hogy kialakulásukban közös szabályozási mechanizmusok vehetnek részt.

5.1.3. A *CPD* mRNS mennyiségének napi változása

A kapott eredmények értelmezése szempontjából fontos volt ellenőriznünk, hogy a *CPD:LUC* riporter konstrukcióval kapott lumineszcencia értékek valóban hűen tükrözik-e a *CPD* promóter aktivitást. Ezért a CCD kamerás luciferáz aktivitás mérésekhez használt mintákkal párhuzamosan, azonos körülmények között nevelt csíranövényekből RT-PCR analízis segítségével meghatároztuk az endogén *CPD*-ről átírt mRNS mennyiségének alakulását is. A LD ciklus négy időpontjában, 0 (fény szakasz kezdete előtt), 6 (fény szakasz közepén), 12 (sötét szakasz kezdete előtt) és 18 (sötét szakasz közepén) órákor vett mintákban a transzkriptum mennyiségek az ugyanezen időpontokban mért luciferáz aktivitásokkal összhangban változtak (7. ábra C), ami igazolta, hogy a riporter géneket hordozó

transzgenikus növények révén megbízható képet kaphatunk a promóter aktivitás napi alakulásáról.

7. ábra: A *CPD* és *CYP85A2* promóterek aktivitásának diurnális változása

Az expressziós szintek időbeni változásai egyhetes transzgenikus csíranövényekben LD körülmények között. A nulla időpont a nyolcadik fény periódus kezdetének felel meg. A és B: a *CPD:LUC* (A), ill. *CYP85A2:LUC* (B) transzgént hordozó növények biolumineszcencia profilja. Az időtengelyen a fehér szakaszok a fény, míg a feketék a sötét időszakoknak felelnek meg. C: az endogén *CPD* és *UBQ10* (konstitutív kontroll) mRNS-ek RT-PCR módszerrel detektált mennyiségi változásai *CPD:LUC* csíranövényekben (autoradiogram).

5.2. A diurnális expressziós szabályozás alapvető tényezői

5.2.1. Cirkadián reguláció

A *CPD* gén LD körülmények között kapott expressziós görbéjén (7. ábra A) a fény- és sötét periódusok kezdetét követően markáns aktivitás változások voltak megfigyelhetők. Ez arra utalt, hogy a fénynek közvetlen szabályozó szerepe lehet a transzkripció szint beállításában. Ennek a feltevésnek az ellenőrzése céljából a LD viszonyok között kondicionált *CPD:LUC* csíranövények biolumineszcenciájának időbeni változásait megvizsgáltuk állandó fényviszonyok között is.

Méréseink során LL körülmények között a lumineszcencia értékek szabályos, nagyjából 24 órás ciklusokat mutató oszcillációját észleltük, amely a folyamatos fény szakasz kezdetétől több napon keresztül fennmaradt (8. ábra A). A cirkadián kifejeződési görbe minimumai a relatív nappalok (a LD kondicionálás során a fényperiódusoknak megfelelő időszak), míg maximumai a relatív éjszakák közepére estek. Bár a négy napig tartó mérés során az expresszió szintje lassú, egyenletes csökkenést mutatott, ciklusainak a minimumokhoz viszonyított amplitúdója végig a kétszeres érték körül maradt. A *CPD* cirkadián kifejeződése jól megfigyelhető volt DD körülmények között is, ahol a ciklusok periódushossza, valamint maximum és minimum értékeinek időpontjai megegyeztek a LL viszonyok mellett észleltekével (8. ábra B). Szembetűnő különbség volt viszont, hogy a DD mérés során az expresszió szintje gyorsan csökkent, ami egyre kisebb cirkadián amplitúdóhoz, végül pedig a ciklusok eltűnéséhez vezetett a mérés negyedik napjára.

5.2.2. Fényszabályozás

A *CPD*-nek a LL és DD viszonyok melletti időbeni expressziós profiljain (8. ábra A és B) nem láthatók azok gyors változások, amelyek a LD kifejeződési görbén (7. ábra A) a fény és sötét szakaszok átmeneteit követték. Emellett a LD kísérlet során a 24 órás periódus alatt két-két maximum, ill. minimum volt észlelhető, amelyek közül időben egyik sem esett egybe a LL és DD mérések cirkadián görbéinek szélső értékeivel. Mivel a különbségek kizárólag a fény és sötét szakaszok váltakozásából adódhattak, ezek az eredmények azt mutatták, hogy a *CPD* expresszió fényszabályozás alatt áll. Amint az a 7. ábra A panelén látható, LD viszonyok mellett az első maximum a lumineszcencia szintjének a megvilágítás kezdete utáni gyors növekedéséből, míg a második a sötét periódus kezdetét követő hirtelen

visszaeséséből ered. Mindebből a fénynek a *CPD* expresszióra gyakorolt induktív hatására következtethetünk.

8. ábra: A *CPD* expresszió cirkadián periodicitása állandó fényviszonyok mellett Egyhetes, LD fotoperiódusokkal kondicionált *CPD:LUC* transzgenikus csíranövények lumineszcenciájának változásai LL (A), ill. DD (B) viszonyok között. A nulla időpont a nyolcadik fény periódus kezdetének felel meg. Az időtengelyen a fehér és fekete szakaszok a fény, ill. sötét időszakokat jelölik.

A *CPD* gén LD és LL kifejeződési profiljainak (7. ábra A, ill. 8. ábra A) összehasonlításakor a LL görbén felismerhető a cirkadián oszcilláció minimuma a fény szakasz közepén, valamint egy határozott vállként annak maximuma is a sötét periódus közepén. Ennek alapján megállapítható volt, hogy a *CPD* napszakos (LD) kifejeződését egy alapszintű cirkadián oszcilláció, valamint egy erre ráépülő pozitív fényreguláció együttesen határozza meg. Bár a *CYP85A2:LUC* transzgén gyenge kifejeződése miatti viszonylagosan magas zajszint a *CYP85A2* promóter cirkadián szabályozottságának egyértelmű kimutatását

nem tette lehetővé, a *CPD*-éhez hasonló bifázisos LD kifejeződés alapján feltételezzük, hogy ennek során is a fény és az endogén ritmus általi kettős meghatározottság érvényesül.

5.2.3. A cirkadián szabályozás hatása a fényválasz mértékére

A fény és cirkadián kettős szabályozás alatt álló gének esetében ismert, hogy a fényválasz mértéke függ a cirkadián oszcilláció fázisától. Annak megállapítása céljából, hogy a cirkadián reguláció a *CPD* gén esetében is befolyásolja-e a fényindukció mértékét, LD kondicionálást követően DD körülmények közt tartott *CPD:LUC* csíranövényeken meghatároztuk a 24 órás ciklus különböző fázisaiban adott kétórás fénypulzusokkal kiváltott expressziós válaszok nagyságát. A kísérletben, melynek során négy párhuzamosan nevelt minta közül mindig csak egy-egy kapott fénykezelést a folyamatos sötét szakasz kezdetétől számított 12., 18., 24. és 30. órától (azaz a ZT 24, 30, 36 és 42 h időpontoktól), a fényválasz erőssége az egyes időpontokban lényegesen különböző volt (9. ábra). A *CPD* fényindukciója - a cirkadián kifejeződési profilnak megfelelően - a relatív nappal időszakában kisebb, míg a relatív éjszaka során nagyobb mértékű volt. Az endogén napi ritmus a fényválaszt követő génkifejeződést is lényegesen befolyásolta (9. ábra). Mindez azt mutatja, hogy a cirkadián szabályozásnak a válaszreakció mértékét meghatározó, ún. "gating" hatása van a *CPD* fényindukálhatóságára.

5.3. A fény szabályozásért felelős regulációs mechanizmus azonosítása

5.3.1. A fény hatás hullámhosszfüggése

Mivel úgy találtuk, hogy a fénynek fontos szerepe van a *CPD* expresszió szabályozásában, meg kívántuk határozni, hogy a növényi fotoreceptorok, ill. a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli utak közül melyek vesznek részt a fényindukció kialakulásában. Ezirányú vizsgálataink során első közelítésben arra voltunk kíváncsiak, hogy a látható fény spektrumának mely tartományai alkalmasak a fényválasz létrehozására.

Kísérletünkben *CPD:LUC* csíranövényeket egyhetes korrig növesztettünk LD körülmények között, majd a nyolcadik sötét periódus végétől kezdődően egy-egy mintát vörös/sötét, kék/sötét, ill. változatlan LD ciklusokban neveltünk tovább. A vörös és kék megvilágítást a fitokróm, ill. kriptokróm fotoreceptorok specifikus aktiválására alkalmas

9. ábra: A *CPD* fény általi indukálhatóságának függése a cirkadián ciklus fázisától
Egyhetes, LD fotoperiódusokkal kondicionált *CPD:LUC* transzgenikus csíranövények lumineszcenciájának változásai DD körülmények között, különböző napszakokban adott kétórás fénykezelés hatására. A nulla időpont a mérést megelőző utolsó, nyolcadik fényszakasz kezdetének felel meg. Az időtengely fehér és fekete szakaszai a fény, ill. sötét, míg a szürkék a sötét kezelés során a relatív nappaloknak megfelelő időszakokat jelölik. A négy minta mindegyike egyetlen, kétórás megvilágítást kapott az alsó nyilakkal jelzett időpontokban (24, 30, 36, ill. 42 h). A szürke profil a 12. órától folyamatos DD viszonyok közt tartott kontroll expresszióját mutatja. A felső nyilak a megvilágításokat követően mért aktivitási értékeket jelölik.

monokromatikus fényforrásokkal biztosítottuk, a LD kezelésével megegyező 12 órás fotoperiódusokat alkalmazva. A CCD kamerával végzett mérések adatai azt mutatták, hogy vörös/sötét ciklusokban a *CPD* expressziós profilja a LD görbével együtt haladt (10. ábra), ami azt mutatja, hogy a vörös fény önmagában elegendő a fényszabályozás fenntartásához. Kék/sötét ciklusok mellett viszont a kifejeződési szint, és ezzel együtt a fényválaszok erőteljes csökkenését tapasztaltuk (10. ábra). A kék/sötét ciklusok során észlelt, a DD körülményekéhez hasonlóan lecsengő kifejeződés a kék hullámhossz tartományban a *CPD* fényszabályozásában betöltött alárendelt szerepére utal.

10. ábra: A *CPD* diurnális kifejeződésének függése a fényperiódusok során kapott megvilágítás hullámhosszától

Egyhetes, LD fotoperiódusokkal kondicionált *CPD:LUC* transzgenikus csíranövények lumineszcenciájának változásai ugyanolyan periódushosszú vörös/sötét, ill. kék/sötét viszonyok között. A nulla időpont a mérést megelőző utolsó (nyolcadik) közös fehér fényszakasz kezdetének felel meg. Az időtengelyen a fehér és fekete szakaszok a megvilágított, ill. sötét időszakokat mutatják. A monokromatikus vörös, ill. kék fényforrásokkal kezelt minták lumineszcencia értékeit vörös és kék háromszögek, míg a kontroll LD növényekét fekete pontok jelölik.

5.3.2. A fitokróm rendszer szerepe

Annak alapján, hogy a vörös fény elegendő a *CPD* diurnális expressziós profiljának a fenntartásához, arra következtettünk, hogy a fényválasz kialakításában a fitokrómoknak, illetve a róluk kiinduló szignál utaknak meghatározó jelentősége van. E feltevés ellenőrzése végett a *CPD:LUC* transzgen kifejeződési profilját fitokróm A- és B-hiányos kettős mutáns háttérben is megvizsgáltuk. Mivel ebből a mutánsból az *Arabidopsis* ötféle fitokróm fotoreceptora közül a két legabundánsabb forma hiányzik, arra számítottunk, hogy fitokróm-mediált fényválasz esetén ennek hatása jól felismerhető expressziós különbséget eredményez.

A vad, ill. *phyAphyB* háttérű *CPD:LUC* transzgenikus csíranövényekben a lumineszcencia napszakos változásait párhuzamosan mértük LD körülmények között. Eredményeink azt mutatták, hogy a fitokróm-deficiens növényekben a *CPD* expresszió szintje a vad típusénál jóval alacsonyabb volt (11. ábra), és a mutáns háttérben létrehozott

valamennyi független transzformáns vonalban annak 10-25%-a között mozgott (1. kiegészítő ábra). Emellett lényegesen eltérő volt a napi kifejeződési görbe lefutása is, amennyiben a fény és sötét szakaszok határánál az aktivitási szintek változása igen kismértékű volt. A fitokróm-hiányos növényekben a *CPD* aktivitása a sötét periódusok közepén mutatott maximumot, hasonlóan a vad típusú háttérben kapott, maximumait a szubjektív sötét időszakokban elérő cirkadián kifejeződési profilhoz. Mindebből arra következtethetünk, hogy a fitokrómoknak (és ezeken belül is valószínűleg a zöld növényekben legfontosabb fitokróm B-nek) meghatározó hatása van a *CPD* gén transzkripciójának szabályozására. Ez egyrészt az expresszió alapszintjének beállításában, másrészt a fényviszonyok változására adott válasz kialakításában nyilvánul meg.

11. ábra: A *CPD* gén diurnális expressziója fitokróm-hiányos háttérben
A *CPD:LUC* transzgen kifejeződése egyhetes vad (WT), ill. fitokróm-hiányos (*phyAphyB*) háttérű transzgenikus csíranövényekben LD viszonyok mellett. A nulla időpont a nyolcadik fényszakasz kezdetének felel meg. Az időtengelyen a fehér és fekete szakaszok a fény, ill. sötét időszakokat jelölik. A: a mért lumineszcencia abszolút értékei, B: ugyanezen mérési eredményeknek az expressziós adatok átlagára normalizált értékeinek ábrázolása.

5.4. A hormonális végtermékgátlás hatása a *CPD* napszakos szabályozására

Csoportunk korábbi munkája nyomán ismert volt, hogy a *CPD* gén kifejeződését a BR bioszintézis végtermékeként keletkező BL a transzkripció szintjén gátolja. Ennek alapján várható volt, hogy amennyiben a *CPD* kifejeződés mértéke kihat a hormon szintézisére és felhalmozódására, ennek következményeként az expressziós változásokra visszahat a végtermékgátlásos szabályozás. Ezért tisztázni akartuk a BR-ok esetleges hatását a *CPD* napi kifejeződésére, különös tekintettel arra a lehetőségre, hogy a diurnális változások esetleg nem közvetlen szabályozás révén, hanem a fény és cirkadián faktorok által előidézett napszakos BR szint különbségek következtében jönnek létre.

Mivel a végtermékgátlásos szabályozás kialakulásához a BRI1 BR receptor szükséges, e regulációs rendszer hiányának hatása jól tanulmányozható a *bri1-101* nullmutáns felhasználásával. Így az erre a célra létrehozott *bri1* háttérű *CPD:LUC* transzgenikus vonal csíranövényein meghatároztuk a napszakos lumineszcencia szint változásokat LD, LL, ill. DD nevelési viszonyok mellett (12. ábra). A *bri1* növények BR-inszenzitivitásából adódóan ezekben a végtermékgátlás egyáltalán nem érvényesül, ezért bennük a fényviszonyoktól függetlenül a vad típusú kontrolléhoz viszonyítva nagyjából kétszeres kifejeződési szintet észleltünk.

A vad típusú, ill. *bri1* háttérben mért LD expressziós görbék - az abszolút aktivitási értékek különbsége ellenére - igen hasonlóak voltak, ugyanakkor lefutásukban bizonyos különbségeket is látni lehetett (12. ábra A). A BR-inszenzitív növényekben a fényviszonyok változására adott válaszok kialakulása valamivel hosszabb időt vett igénybe, és a fény szakasz kezdetének expressziós maximuma határozottan kisebb volt a sötét periódus kezdete előttinél. Mindezekből az látszik, hogy bár a *CPD* gén diurnális regulációja alapvetően független a bioaktív BR formák révén megvalósuló végtermékgátlásos szabályozástól, ám ez utóbbi mégis befolyásolja a napi expressziós profil kialakulását. Állandó fényviszonyok mellett a cirkadián oszcillációt mutató LL kifejeződésben nem tapasztaltunk érdemi különbséget (12. ábra B). Figyelemreméltó eltérést mutatott ugyanakkor a vad típusú, ill. *bri1* háttérben kapott DD expressziós görbe, amennyiben az utóbbi lefutása a LL profilhoz hasonló volt, és a vad háttérűvel ellentétben nem mutatta a *CPD* aktivitás tartós sötét hatásra bekövetkező csökkenését (12. ábra C). Ez a meglepő eredmény arra utalt, hogy a génaktivitás sötétben bekövetkező repressziójában a BR szignálnak fontos szerepe van.

12. ábra: Az endogén BR szint hatása a *CPD* promóter napszakos és cirkadián kifejeződésére. A *CPD:LUC* transzgén kifejeződése egyhetes vad (WT), ill. BR-inszenzitív (*bri1*) háttérű transzgenikus csíranövényekben LD (A), LL (B), valamint DD (C) körülmények között. A nulla időpont a nyolcadik fényszakasz kezdetének felel meg. Az időtengelyen a fehér és fekete szakaszok a fény, ill. sötét időszakokat jelölik.

5.5. Az endogén BR tartalom napszakos változása

A *CPD* és *CYP85A2* gének expressziójának diurnális változásai alapján feltételezhető volt, hogy ezek hatásaként a növények aktív BR tartalma is napszakos ingadozást mutathat. Ennek tisztázása céljából GC-MS analízis segítségével meghatároztuk az egyhetes csíranövények endogén BR-ok mennyiségének alakulását egy 24 órás LD ciklus során, a fény szakasz kezdete előtt, annak közepén, a sötét szakasz kezdete előtt, ill. annak közepén (0, 6, 12, ill. 18 h) vett mintákban (II. táblázat). Ezen vizsgálatok során az ún. korai C-6 oxidációs út intremediereit (kataszteron, teaszteron, 3-dehidroteaszteron és tifaszterol) alacsony (<10 ng/kg) szintjük miatt nem lehetett detektálni. A késői C-6 oxidációs út intremedierei jól kimutathatók voltak, ugyanakkor mennyiségükben érdemi eltérések nem voltak észlelhetők a LD ciklus során.

Kissé meglepő eredmény volt számunkra a biológiailag legaktívabb BR forma, a BL jelentős felhalmozódása a fény szakasz közepén (II. táblázat). Ez azért is figyelemreméltó, mert irodalmi adatok (Fujioka és mtsai, 1996 és 1998) szerint az *Arabidopsis* vegetatív szerveiben a BL mennyisége rendkívül alacsony, és méréseink másik három időpontjában is a kimutathatósági szint alatt maradt. A BR anyagcsere reakcióinak összehangoltságára utal, hogy az észlelt BL felhalmozódás során a BR intermedierek, köztük a kis mennyiségben előforduló közvetlen prekursor kasztaszteron mennyisége gyakorlatilag változatlan maradt. A BR tartalom GC-MS analíziseinek adatai azt mutatták, hogy a BL mennyisége is napszakosan változik, hirtelen és erős növekedéssel a fény periódus közepén. Ez a bioaktív BR-ok szintjének közel 200%-os tranziens emelkedéséhez vezet. Bár eredményeink nem bizonyítják a *CPD* és *CYP85A2* gének expressziójának, ill. a BL felhalmozódásának napi változásai közti kapcsolatot, és ez utóbbiban a lebontó folyamatok génjeinek fény általi repressziója is szerepet játszhat, mindenképp említésre érdemes, hogy a BL szint a *CPD* és *CYP85A2* erős reggeli fényindukációját követően mutat emelkedést.

5.6. Tartós sötét kezelés hatása a BR tartalomra

A csíranövények sötétben tapasztalható megnyúlása alapján logikusnak tűnt az a feltételezés (Ma és mtsai, 2001), hogy a növények aktív BR tartalma a sötét időszakok során megnő. Erre utaltak azok az eredményeink is, hogy DD körülmények közt a *CPD* expresszió a BR végtermékgátlás révén represszálódik (12. ábra C). Ezzel szemben a BR-bioszintetikus *CPD* és *CYP85A2* gének egyértelműen fényindukálóknak bizonyultak, és LD viszonyok közt az

endogén hormontartalom nem a sötét, hanem a fény időszakok során mutatott emelkedést. Ennek az ellentmondásnak a feloldásához fontosnak tűnt annak tisztázása, hogy miként alakul a BR tartalom DD kezelés hatására.

II. táblázat: Az endogén BR tartalom napszakos változása egyhetes csíranövényekben

Az egyes időpontoknak megfelelő BR adatok három független analízisből származnak, melyeket 95 g, 83 g, 80 g, ill. 98 g (első sorok), 37 g, 32 g, 40 g, ill. 31 g (második sorok), valamint 40 g, 36 g, 40 g, ill. 37 g (harmadik sorok) friss növényből kiindulva végeztek.

BR	BR tartalom (ng kg ⁻¹ friss tömeg)			
	a fényszakasz kezdetétől mért idő (h)			
	0	6	12	18
brassinolid	ND ^a	151	ND	ND
	ND	87	ND	ND
	ND	136	ND	ND
kasztaszteron	47	45	38	46
	72	83	75	64
	73	84	83	64
6-dezoxokasztaszteron	1237	1379	1470	1422
	1114	1152	1044	1242
	1196	1156	1178	1239
6-dezoxotifaszterol	445	491	438	420
	496	495	527	548
	740	412	584	653
3-dehidro-6-dezoxoteaszteron	192	232	205	223
	287	275	270	324
	276	318	269	434
6-dezoxoteaszteron	68	71	87	66
	182	71	98	77
	80	70	111	79
6-dezoxokataszteron	1394	1689	1638	1346
	2124	1819	1661	1756
	2779	1856	1554	1590

^a nem detektálható

Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy kétnapos DD kezelést követően a *CPD* expresszió szintje az eredetinek mintegy 20%-ára csökken. Ezért a hormonszint vizsgálatokor egyhetes, LD fotoperiódusok mellett növesztett csíranövény minták egyikét a 8. fény szakasz

végétől 48 órára folyamatos sötétbe helyeztük, míg ezek kontrollját ugyanennyi ideig LD körülmények közt neveltük tovább. Ezt követően GC-MS analízissel határoztuk meg a növényekben az endogén BR-ok mennyiségét. E vizsgálat eredményei szerint az egyedüli kimutatható bioaktív BR, a kasztaszteron szintje a tartós sötét szakasz során érdemben nem változott, és a többi intermedier mennyisége is lényegében változatlan maradt (III. táblázat). Ez azt mutatja, hogy a 48 órás DD kezelés nem eredményez aktív BR felhalmozódást, miáltal a *CPD* sötétben kialakuló végtermékgátlása sem lehet a megemelkedett hormonszint következménye.

III. Táblázat: Tartós sötét kezelés hatása az endogén BR-ok szintjére

Az egyes időpontoknak megfelelő BR adatok három független analízisből származnak, amelyeket 125 g, ill. 132 g (első sorok), 87 g, ill. 109 g (második sorok), valamint 101 g, ill. 100 g (harmadik sorok) friss növényből kiindulva végeztek.

BR	BR tartalom (ng kg ⁻¹ friss tömeg)	
	48 h DD	LD kontroll
brassinolid	ND ^a	ND
	ND	ND
	ND	ND
kasztaszteron	79	85
	63	54
	55	65
6-dezoxokasztaszteron	531	977
	802	905
	891	1032
6-dezoxotifaszterol	387	521
	nd	79
	nd	155
3-dehidro-6-dezoxoteaszteron	192	201
	188	182
	220	182
6-dezoxoteaszteron	52	49
	143	99
	120	114
6-dezoxokataszteron	1405	1608
	887	1356
	1336	2198

^a nem detektálható

5.7. A BZR1 transzkripciós faktor szerepe a visszacsatolós szabályozásban

Megfigyelésünk, miszerint a *CPD* kifejeződés sötétbeni végtermékgátlásos repressziója nem jár együtt az endogén hormonszint megnövekedésével azt sugallta, hogy a fény valamilyen módon a növények hormonérzékenységét is befolyásolni tudja. E lehetőség ellenőrzése végett megvizsgáltuk, hogy DD körülmények közt az expresszió csökkenése valóban a BZR1 transzkripciós faktor által mediált hormonális BR regulációnak köszönhető-e. Kísérleteinkhez olyan riporter konstrukciót állítottunk elő, amelyben a *CPD* promóter BRRE szekvencia-motívumának egyetlen nukleotidát érintő mutációjával lehetetlenné válik a BZR1 kötődése (He és mtsai, 2005). Az így kapott *mCPD:LUC* fúzióval, amely az ATG transzlációs starthelyhez viszonyított -80-as helyzetű G>A tranzíciótól eltekintve megegyezett a *CPD:LUC* konstrukcióval, transzgenikus növényeket hoztunk létre. Ezekben *LUC* próbával végzett blot hibridizációval a *CPD:LUC* kontrollénál lényegesen magasabb, közel tízszeres mRNS szintet tudtunk kimutatni, és a kifejeződés mértéke - a kontrollal ellentétben - külső BL kezeléssel nem volt befolyásolható (13. ábra).

13. ábra: A *CPD:LUC* és *mCPD:LUC* transzkriptumok szintjének BR általi szabályozása
A *CPD:LUC* és *mCPD:LUC* transzgenekről átíródó transzkriptumok relatív mennyiségei nyolcnapos, két órán át 100 nM BL-dal kezelt (+BL), ill. kezeletlen (-BL) csíranövényekben. Az autoradiogram (felső kép) a luciferáz kódoló régiójával hibridizált Northern-blotról készült. Az alsó kép kontrollként a Nytran filteren megkötött, etidium-bromiddal festett riboszómális RNS-ek UV fluoreszcenciáját mutatja.

14. ábra: Tartós sötét kezelés hatása a *CPD* és *mCPD* promóterek aktivitására
Egyhetes, LD fotoperiódusokkal kondicionált *CPD:LUC* és *mCPD:LUC* transzgenikus csíranövények lumineszcenciájának változásai LD > DD átmenet során. A nulla időpont a hetedik fényszakasz kezdetének felel meg. Az időtengelyen a fehér és fekete szakaszok a fény, ill. sötét időszakokat jelölik. A: a mért lumineszcencia abszolút értékei, B: ugyanezen mérési eredmények normalizált értékeinek ábrázolása.

Miután igazoltuk, hogy az *mCPD:LUC* fúziós gén esetében nem érvényesül a transzkripció végtermékgátlás általi szabályozása, CCD kamerás méréssel meghatároztuk az expresszió szintjének alakulását DD körülmények között. A transzgenikus csíranövények lumineszcencia adatai megerősítették, hogy az *mCPD:LUC* konstrukció a kontroll *CPD:LUC*-nál erősebb kifejeződést mutat (14. ábra A), bár a különbség a blot hibridizációval kimutatottnál kisebb mértékű volt. Ezen túl ugyanakkor a DD expresszió vizsgálata azt is megmutatta, hogy tartós sötétben a mutáns promóter aktivitása a vad típusúénál kevésbé gátlódik, és görbájén - a vad típusúéval ellentétben - a cirkadián oszcilláció még a harmadik napon is jól felismerhető (14. ábra A és B). Ez a kifejeződési mintázat igen hasonló ahhoz a DD mintázathoz, amit a *CPD:LUC* növények esetében kaptunk BR-inszenzitív háttérben (12.

ábra A). Ez egyrészt megerősítette, hogy a BRRE elemet érintő pontmutáció következtében az *mCPD* promóter elvesztette a BR-ok általi szabályozhatóságát, másrészt igazolta azt a feltevésünket, hogy a *CPD* gén aktivitásának sötétbeni gátlása elsődlegesen a hormonális hatás következménye. Mivel a represszió sötétben változatlan aktív BR szint mellett alakul ki, adataink arra utalnak, hogy a csíranövényekben a tartós sötét a BR-érzékenység fokozódását idézi elő.

6. MEGVITATÁS

6.1. A *CPD* gén összetett transzkripciós szabályozása

A BR-ok a szintézisük helyéhez közel hatnak, ezért a bioszintézis lehetséges sebesség-meghatározó reakcióit katalizáló enzimek génjeinek fokozott expressziója időben, ill. helyileg általában egybeesik a BR-indukált élettani folyamatokkal (Bancos és mtsai, 2002; Castle és mtsai, 2005; Nomura és mtsai, 2005; Symons és mtsai, 2006). Mindezek alapján feltételezhető, hogy az *Arabidopsis* esetében a 6-dezoxo intermedierek mennyiségét meghatározó *CPD/CYP90A1*, és a bioaktív kasztaszteront és BL-ot létrehozó *CYP85A2* génjeinek szabályozása egyúttal a hormontermelés hatékonyságát is megszabhatja. Mindezen szempontok mellett a *CPD* gén azért is megfelelőnek tűnt a génexpressziós vizsgálatok számára, mert a többi BR-bioszintetikus génénél magasabb szintű kifejeződése kísérletileg megbízhatóbban követhető.

A jórészt *Arabidopsis*on végzett eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy a BR bioszintetikus gének kifejeződése elsődlegesen a transzkripció szintjén kontrollált, és valamennyi *CYP85* és *CYP90* gén esetében együtt mutatható ki a fejlődési stádiumtól függő, a szervspecifikus, valamint a végtermékgátlásos szabályozás (Bancos és mtsai, 2002). Munkánk során ezen túlmenően kimutattuk a *CPD* és *CYP85A2* aktivitás napszakos regulációját is. A BR bioszintézis génjeinek ez a komplex transzkripciós szabályozottsága arra utal, hogy kifejeződési szintjük a hormon felhalmozódását, és ezáltal élettani hatását is befolyásolhatja.

6.1.1. A diurnális reguláció sajátosságai

A *CPD* és *CYP85A2* gének aktivitásának *in vivo* vizsgálatához ezek promótereivel fuzionált luciferáz riporter konstrukciókat hoztunk létre. A szentjánosbogár luciferáz rövid féléletideje révén ideális riporternek bizonyult a transzkripció időbeni változásainak pontos nyomonkövetésére (Millar és mtsai, 1992). Annak igazolására, hogy a riporter fúziót hordozó transzgenikus növényekben az aktuális luciferáz aktivitás hűen tükrözi a transzkripció szintjét, a *CPD:LUC* növények lumineszcenciájának CCD kamerás mérésével párhuzamosan megvizsgáltuk ezekben az endogén *CPD*-ről átíródó mRNS szintjének alakulását is RT-PCR analízissel. Kísérleteinkben a transzkriptum szint és a luciferáz aktivitás napszakos változásai

összhangban voltak, jelezve hogy a riporter konstrukciók segítségével megbízható képet kaphatunk a vizsgált promóterek aktivitásáról.

LD ciklusok során a *CPD* és *CYP85A2* gének bifázisos expressziót mutatnak, melynek csúcsai a fény szakasz kezdetét követően, valamint a sötét szakasz kezdete előtt figyelhetők meg. Ennek megfelelően a *CPD* esetében igazolni lehetett a kifejeződés fényindukáltságát, amire már korábbi, az *Arabidopsis* napszakosan regulált génjeinek azonosítása céljából végzett fény/sötét microarray hibridizációs adatok is utaltak (Schaeffer és mtsai, 2001, kiegészítő adatok: genome-www.stanford.edu/microarray).

A luciferáz által létrehozott biolumineszcencia egy ATP-igényes enzimreakció következménye, ezért ezt befolyásolja a sejtek energizáltsági állapota, ami fotoszintetizáló növények esetében a fényviszonyoktól függ. Ismert, hogy sötét szakaszt követően a fény bekapcsolásakor a karfiol mozaik vírus (CaMV) nem fényszabályozott 35S promótere által vezérelt luciferáz aktivitása is enyhe emelkedést mutat (Millar és mtsai, 1992). Ez a hatás hozzájárulhat a *CPD:LUC* fényindukcióját kísérő aktivitás növekedéshez, bár mértéke annál nagyságrendileg kisebb. Szerepe lehet viszont - a fitokróm A-val együtt - az expresszió kismértékű növekedésében a kék/sötét ciklusok során a fény szakaszok kezdetét követően (10. ábra).

Változatlan fényviszonyok mellett a LD kondicionált transzgenikus csíranövényekben a *CPD* expresszió cirkadián oszcillációt mutat. A LL körülmények között több napon át fennmaradó ciklusok maximumai a sötét, míg minimumai a világos periódusok közepére esnek. A *CPD* cirkadián amplitúdója hasonló az *Arabidopsis* más, cirkadián szabályozott génjeinek esetében tapasztaltakhoz (Harmer és mtsai, 2000). Az endogén ritmus által meghatározott oszcilláció jól felismerhető a *CPD* gén LD kifejeződési profilján, azt mutatva, hogy a napszakos változások során a fényindukciós hatás egy alap cirkadián regulációra tevődik rá.

Említésre érdemes, hogy a *CPD* és *CYP85A2* promóter egyaránt tartalmaz egy AAAATCT szekvencia motívumot, amely a cirkadián szabályozásban mind pozitív, mind negatív regulációs komplexek kialakítására képes (Harmer és Kay, 2005), és a fitokrómok általi fényszabályozásban is szerepet játszó (Green és Tobin, 1999) CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) transzkripciós faktor kötőhelye. Tisztázásra váró kérdés, hogy ez a szabályozó elem részt vesz-e, és ha igen, akkor milyen módon a BR bioszintézis génjeinek napszakos regulációjában.

6.1.2. A *CPD* és *CYP85A2* gének hasonló napszakos kifejeződése

A *CYP85A2* gén a *CPD*-hez hasonlóan a hajtáscsúcs közelében fejeződik ki, de nagyságrendileg alacsonyabb szinten (saját adataink, ill. Genevestigator adatbank: www.genvestigator.ethz.ch), ami megnehezíti kifejeződésének nyomkövetését. A *CYP85A2:LUC* riporter konstrukcióval végzett lumineszcencia mérések eredményeként a *CPD* LD expressziós profiljához igen hasonló görbét kaptunk. Lényeges eltérésnek tekinthető ugyanakkor a *CYP85A2* expresszió jóval nagyobb mértékű napi ingadozása, ami az aktív BR formák létrehozásáért felelős gén szigorúbb napszakos szabályozottságára utal. A *CYP85A2* és a *CPD* fejlődési stádiumtól függő és szervspecifikus kifejeződése is jórészt megegyezik, és aktivitásuk a BR végtermékgátlás által is meghatározott. Mindezek arra utalnak, hogy a BR bioszintézis kulcsenzimeinek génjei finoman összehangolt transzkripciós szabályozás alatt állnak.

6.2. A fény hatása a BR anyagcserére

6.2.1. A BR bioszintézis génjeinek fény szabályozása

Vizsgálataink kimutatták, hogy a fény serkenti a *CPD* expresszióját, és azt is, hogy a fényindukció erőssége a cirkadián ciklus fázisától függ. Ez a jelenség a kettős, fény- és cirkadián-szabályozott gének körében általánosnak tekinthető (McClung, 2001).

A fényválasz hullámhossz-függésének tisztázására irányuló vizsgálataink kimutatták, hogy a vörös fény elegendő a *CPD* diurnális kifejeződési mintázatának fenntartásához. Ezzel szemben a kék fény hatástalannak bizonyult: kék/sötét ciklusok mellett az expresszió szintje erősen lecsökkent, időbeni lefutása pedig a DD körülmények között mérhetőhöz hasonló volt. Ez a fitokrómoknak a fény szabályozásban betöltött szerepére utal, amit megerősít, hogy fitokróm A- és B-hiányos kettős mutáns háttérben ugyancsak igen alacsony szintű *CPD* kifejeződést tapasztaltunk, és ennek diurnális profilján elsődlegesen a cirkadián reguláció érvényesülése látszott. Bár a kék/sötét ciklusok során is megfigyelhető volt a transzgén aktivitás gyenge emelkedése a fény szakaszok kezdetén, ez a hatás valószínűleg a fitokróm A szélesebb elnyelési spektrumának, és/vagy a korábban már említett fény általi aspecifikus luciferáz aktivitás növekedésnek tulajdonítható. Zöld *Arabidopsis* növényekben a fitokróm B a legabundánsabb vörös fotoreceptor, míg a fitokróm A szintje igen alacsony (Sharrock és Clack, 2002). Így a *CPD* expressziójának a *phyAphyB* mutáns háttérben észlelt erőteljes

csökkenése arra enged következtetni, hogy a fényindukciós hatás elsődlegesen a fitokróm B-n keresztül valósul meg.

A gibberellin bioszintézisben résztvevő fényszabályozott gének tanulmányozása során ismertté vált, hogy ezek működését részben széles hullámhossz tartomány által aktiválható, részben pedig hullámhossz-specifikus folyamatok irányítják. Eddig *Arabidopsis*-ban, salátában, és borsóban váltak ismertté olyan gibberellin 3 β -hidroxiláz és 20-oxidáz izoformákat kódoló gének, amelyek kifejeződése kizárólagosan, vagy részben a fitokróm fotoreceptorokon keresztül szabályozott (Toyomasu és mtsai, 1998; Yamaguchi és mtsai, 1998; Ait-Ali és mtsai, 1999; Jackson és mtsai, 2000).

6.2.2. A BR inaktiváció génjeinek regulációja

Míg a BR bioszintézis génjeinek fényszabályozásáról korábbi adatok nem álltak rendelkezésre, az aktív BR formák inaktivációjában szerepet játszó *Arabidopsis CYP734A1* és *CYP72C1* fényfüggő kifejeződését részletesen tanulmányozták. Szemben a bioszintetikus gének fényindukált kifejeződésével, ezen gének expressziója fényrepresszálnak bizonyult (Turk és mtsai, 2003; Takahasi és mtsai, 2005). Az ellentétes szerepű gének ellentétes szabályozottsága arra utal, hogy a növényekben a BR anyagcsere folyamatainak összehangolásában a fénynek fontos szerepe van. A bioszintetikus enzimek fokozott, míg az inaktivációs enzimek csökkent termelődése a fény szakaszok során jó összhangban van a bioaktív BL általunk megfigyelt jelentős felhalmozódásával a napi megvilágítási időszak közepén.

6.2.3. A fényviszonyok hatása az endogén BR tartalomra

A BR bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének aktivitása kihathat az adott enzimek mennyiségének alakulására, és ezáltal a bioszintézis hatékonyságára, ami végül az aktív BR formák mennyiségének megváltozását eredményezheti. Bár vizsgálataink eredményei nem elégségesek ilyen közvetlen kapcsolat kimutatására, mindenképp figyelemre méltó, hogy a *CPD* és *CYP85A2* expresszió, valamint az endogén BL tartalom egyaránt napszakosan változik. Ezen túlmenően, a BL felhalmozódása közvetlenül követi a szintéziséért felelős *CYP85A2* génjének a fény szakasz elején megfigyelhető mintegy ötszörös indukcióját.

Annak ellenére, hogy a BR-oknak fontos szabályozó szerepe van a fotomorfofenikus folyamatokban, a BR szint és a fényviszonyok kapcsolatáról igen keveset tudtak.

*Arabidopsis*on végzett GC-MS analízisek során a sötétben neveltekénél magasabb hormonszintet mutattak ki fényben nevelt minták esetében, bár a méréshez használt növények nem voltak azonos korúak (Choe és mtsai, 2001). Meggyőzőbb eredményeket kaptak borsóban a fény és a BR tartalom közti összefüggés vizsgálatakor. Ennek során a fényben nevelt csíranövényekben a sötétben nőttekéhez viszonyítva 14-szer magasabb BL, ill. négyszer magasabb kasztaszteron szintet mutattak ki (Symons és mtsai, 2002). Borsóban a sötét/fény, ill. fény/sötét átmeneteket követően nem észleltek jelentős változást a kasztaszteron és prekursorainak mennyiségében (Symons és Reid, 2003).

6.2.4. A fitohormonok napszakos szabályozó szerepe

A növényeknek a környezet napszakos változásaira adott összehangolt válaszreakcióiban fontos szerep jut a fitohormonok által regulált folyamatoknak. Több hormonsalád esetében ismert, hogy szintézisük, ill. hatásuk napszakosan változik, és ezen változásokban a cirkadián és fény általi szabályozás egyaránt érvényesül.

A cirkadián reguláció szükséges a növények zavartalan morfogenezisének biztosításához. Az *Arabidopsis* csíranövények hipokotil megnyúlása cirkadián ciklikusságot mutat (Dowson-Day és Millar, 1999), microarray hibridizációs vizsgálatok során több, a sejtmegnyúláshoz szükséges gén esetében tapasztaltak cirkadián kifejeződést (Harmer és mtsai, 2000). A cirkadián óra elemeit érintő mutációk minden esetben valamilyen hatással vannak a hipokotil megnyúlására. A *toc1-3* mutáció pl. a gibberellin 20-oxidázt kódoló *GA5* gén fokozott kifejeződéséhez vezet (Blázquez és mtsai, 2002). Burgonyában a *GA20ox2* gén expressziójának, kölesben (*Sorghum bicolor*) a gibberellinek felhalmozódásának cirkadián szabályozottságát írták le (Carrera és mtsai, 1999; Jackson és mtsai, 2000; Foster és Morgan, 1995). A megnyúlást szabályozó fitohormonok közül az auxinok és az etilén termelődése is cirkadián oszcillációt követ (Jouve és mtsai, 1999; Thain és mtsai, 2004). Mindezek arra utalnak, hogy a belső ritmus általi szabályozásnak fontos szerep jut a morfogénikus folyamatok zavartalanságának biztosításában.

A fitohormonok szerepe jól ismert számos fényfüggő élettani folyamat szabályozásában is. *Arabidopsis*ban és salátában a fény fokozott gibberellin szintézist vált ki a 3 β -hidroxilázok aktiválása révén, ami a csírázás indukciójához vezet (Toyomasu és mtsai, 1998; Yamaguchi és mtsai, 1998). A gibberellin bioszintézis gátlása a fotomorfogenezis és a fényregulált sejtmagi gének kifejeződésének rendellenességeihez vezet (Alabadí és mtsai,

2004). Dohány (*Nicotiana tabacum*) növényekben összehangolt gibberellin és etilén hatás érvényesül a fitokróm-függő árnyékkerülési reakció kialakulásában (Pierik és mtsai, 2004).

A BR szintézis gének fényregulációjának élettani jelentősége ismeretlen, de elképzelhető, hogy kapcsolatban állhat pl. a virágzás indukciójával hosszúnappalos körülmények között. A BR-oknak a virágképződésben játszott szerepére utal az *Arabidopsis* BR hiánymutánsainak későn virágzó fenotípusa (Chory és mtsai, 1991; Szekeres és mtsai, 1996), valamint az *Arabidopsis* és paradicsom esetében is kimutatott fokozott BR termelés a bimbó differenciáció során (Montoya és mtsai, 2005). Ezzel kapcsolatban érdemes megemlíteni, hogy a gibberellinek esetében ismert ilyen jellegű hatás, melynek során hosszúnappalos növényekben a megnyúlt fény szakaszok által indukált gibberellin 20-oxidáz kifejeződés hormonszint emelkedést és virágzás indukciót eredményez (Blázquez és mtsai, 2002; Lee és Zeevaart, 2002).

6.3. A BR bioszintézis végtermékgátlásának funkcionális hatásai

A BR-ok és gibberellinek bioszintézise egyaránt végtermékgátlás alatt áll, és ennek a bioszintetikus gének transzkripciójának szintjén megvalósuló regulációnak fontos szerepe van a hormon homeosztázis fenntartásában. De míg a gibberellinek esetében ez a visszacsatolós szabályozás csupán az aktív hormon létrehozásáért felelős enzimek génjeire korlátozódik (Yamaguchi és Kamiya, 2000), addig a BR szintézisében résztvevő valamennyi *CYP85* és *CYP90* génje végtermék-szabályozott (Bancos és mtsai, 2002; Shimada és mtsai, 2003). Ezek a gének fiziológias körülmények között állandóan részlegesen represszált állapotban vannak, ezért feltételezhető, hogy a végtermékgátlós szabályozás folyamatosan résztvesz a hormonszint érzékelésében, és kívánatos mértékének fenntartásában (Bancos és mtsai, 2002).

6.3.1. A CPD gén diurnális kifejeződésének hormonális befolyásoltsága

A *CPD* expresszió diurnális változásai kapcsán elképzelhetőnek tűnt, hogy a napszakos ingadozásért esetleg a napi rendszerességgel változó BR szintből eredő végtermékgátlás a felelős. Mivel a visszacsatolós gátlás a BRI1 BR receptor közvetítésével működik (Bancos és mtsai, 2002), a BR-inszenzitív *bril* mutánsban a diurnális kifejeződés fennmaradása a szabályozásában résztvevő folyamatoknak a hormonszinttől való függetlenségét jelzi. Ugyanakkor *bril* háttérben mind a fényindukció, mind a sötét szakaszokra jellemző aktivitás csökkenés elnyújtottabban érvényesült. Eredményeink azt

mutatják, hogy a *CPD* gén kifejeződésében a diurnális kifejeződést meghatározó fény általi és cirkadián szabályozás, ill. a hormonális reguláció egymástól független, de egymásra ráépülő folyamatok.

6.3.2. A BZR1 transzkripció faktor szerepe a *CPD* gén sötét repressziójában

Bár a *CPD* LL körülmények közti cirkadián kifejeződését a BR-inszenzitív háttér érdemben nem befolyásolta, meglepő módon a *bri1* növényekben DD viszonyok között nem tapasztaltuk a vad típusú háttérben kapott gyors expressziós szint csökkenést. Ez arra utal, hogy a *CPD* sötétbeni gátlása BR-függő folyamat, amely a végtermékgátlást is közvetítő szabályozás által érvényesül. Ezt megerősítik azok az eredményeink, amelyek szerint a sötét represszió kialakulásához a BZR1 transzkripció faktor kötőhelyéül szolgáló BRRE promóter elem épsége szükséges. Ennek alapján megállapítható, hogy a BR jelátviteli lánc sérülése - akár a receptor, akár a transzkripció szabályozás szintjén - DD körülmények között is a *CPD* cirkadián kifejeződésének fennmaradását eredményezi.

6.4. A fény hatása a növények BR-érzékenységére

A hormonhatás szerepe a *CPD* sötét gátlásában arra utalt, hogy DD viszonyok között a bioaktív BR-ok szintje megemelkedik. Úgy tűnt, hogy ez összhangban van azzal a feltételezéssel is, hogy az etiolációt kísérő megnyúlás részben a sötétbeni BR felhalmozódás következménye. Ennek ellenőrzése céljából megvizsgáltuk a csíranövények BR tartalmát 48 óras sötét kezelést követően, amikor már a *CPD* kifejeződése a LD ciklusok szintjének kb. 20%-ára esik vissza (8. ábra B). A GC-MS analízis adatai szerint a BR-ok mennyisége a DD időszak alatt érdemben nem változott, ezért ez nem okozhatja az *CPD* aktivitásának a BR jelátviteli út által szabályozott represszióját. Ebből arra következtethetünk, hogy a génkifejeződést gátló hatás kialakulásáért a növények BR érzékenységének sötétbeni megnövekedése lehet felelős. A fény szerepét a BR érzékenység befolyásolásában mások is megfigyelték, és eredményeik szintén a sötét kezelés érzékenyítő hatására engedtek következtetni (Fujioka és mtsai, 1997; Choe és mtsai, 1998; Yang és mtsai, 2005). Hasonló jelenséget, azaz a hormonérzékenység sötétbeni fokozódását, a gibberellin érzékelés kapcsán is leírták (Reed és mtsai, 1996).

A hormonérzékenység fény általi befolyásolása elfogadható magyarázatot adhat arra az ellentmondásra, hogy míg a BR-ok bioszintézise és felhalmozódása a fény szakaszok során

fokozódik, a hormon közvetítésével megvalósuló hipokotil megnyúlás sötétben erőteljesebb. Ugyanakkor eredményeink megkérdőjelezték azt az értelmezést, amely az etioláció során bekövetkező intenzív megnyúlást a BR bioszintézis génjeinek fokozott kifejeződésével igyekezett kapcsolatba hozni (Kang és mtsai 2001; Ma és mtsai, 2001).

6.5. A BR bioszintézis génjeinek kifejeződése és a hormonhatás közti kapcsolat

A BR hatás a hormon szint növekedésének a következménye, és létrejöttében fontos szerepe van a bioszintetikus folyamatok helyi aktiválódásának. A BR szintézis kulcsenzimeit kódoló gének összetett transzkripciós szabályozása mindenesetre arra enged következtetni, hogy ez a regulációs szint fontos a hormönháztartás szempontjából. Amennyiben a bioszintézis enzimeinek termelődése és mennyisége arányos génjeik aktivitásával, a BR szint alakulását még a tényleges enzimaktivitást és a reakciótermékek sorsát meghatározó számos tényező (pl. szubsztrátok és redox partnerek hozzáférhetősége, ill. a lebontó folyamatok) is befolyásolja. További módosító tényező a BR-okkal szembeni érzékenység fény általi befolyásoltsága, ami sötétben erőteljesebb válaszreakciót eredményez. Ennek a megnyúlási folyamatokban szintén fontos szerepet játszó gibberellinek esetében is előforduló érzékenyítő mechanizmusnak a pontos funkciója még tisztázásra vár. Bár a bioszintetikus gének expressziója és a BR-ok mennyisége közti kapcsolat áttételes, a végtermékgátlásos szabályozás léte (Mathur és mtsai, 1998), valamint a génaktivitások és a hormonszint változásai közti összhang (Bancos és mtsai, 2002; Nomura és mtsai, 2005) a transzkripciós kontroll meghatározó voltára utal a BR szintézis hatékonyságának és a növények BR tartalmának a beállításában.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során a BR bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének kifejeződésében megfigyelhető napszakos változásokat, az ezek kialakulásában résztvevő külső és endogén tényezőket, valamint az ezek hatásait közvetítő mechanizmusokat igyekeztünk felderíteni. A diurnális szabályozás biológiai jelentőségének megismerése végett arra is választ kerestünk, hogy a transzkripció szintjén észlelhető változások befolyásolhatják-e a BR anyagcserét, ill. a bioaktív BR formák felhalmozódását. Vizsgálatainkkal a következőket sikerült tisztáznunk:

- (1) A *CPD* és *CYP85A2* gének kifejeződése hasonló, bifázisos napszakos ismétlődést mutat, és a *CPD* esetében bizonyítottuk, hogy ezt alapvetően egy belső cirkadián szabályozás, és az arra épülő közvetlen fényreguláció határozza meg.
- (2) A *CPD* fény általi indukciója elsődlegesen a fitokróm fotoreceptorok közvetítésével valósul meg.
- (3) A *CPD* promóter napszakos szabályozása független az aktív BR-ok általi gátlástól, de ez utóbbi kis mértékben befolyásolja a diurnális kifejeződési mintázatot.
- (4) A csíranövényekben a bioaktív BR-ok mennyisége jelentősen megnő a fény szakaszok közepén, nem sokkal a *CPD* és *CYP85A2* aktivitások reggeli fényindukcióját követően.
- (5) A *CPD* expresszió tartós sötétben a BR jelátviteli út révén represszálódik, és ezért a hatásért nem a hormonszint megemelkedése, hanem a BR-érzékenység fokozódása a felelős.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ait-Ali T, Frances S, Weller JL, Reid JB, Kendrick RE, Kamiya Y (1999) Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3-beta-hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol* 121: 783-791
- Alabadí D, Gil J, Blázquez MA, García-Martínez JL (2004) Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* 134: 1050-1057
- Altmann T (1999) Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta* 208: 1-11
- Azpiroz R, Wu YW, LoCascio JC, Feldmann KA (1998) An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* 10: 219-230
- Bajguz A, Tretyn A (2003) The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62: 1027-1046
- Bancos S, Nomura T, Sato T, Molnár G, Bishop GJ, Koncz C, Yokota T, Nagy F, Szekeres M (2002) Regulation of transcript levels of the Arabidopsis cytochrome P450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 130: 504-513
- Belkhadir Y, Chory J (2006) Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. *Science* 314: 1410-1411
- Bishop GJ, Harrison K, Jones JDG (1996) The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell* 8: 959-969
- Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JDG, Kamiya Y (1999) The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1761-1766
- Bishop GJ, Yokota T (2001) Plants steroid hormones, brassinosteroids: Current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol* 42: 114-120
- Bishop GJ (2003) Brassinosteroid mutants of crops. *J Plant Growth Regul* 22: 325-335
- Blázquez MA, Trénor M, Weigel D (2002) Independent control of gibberellin biosynthesis and flowering time by the circadian clock in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130: 1770-1775.
- Carrera E, Jackson SD, Prat S (1999) Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiol* 119: 765-774
- Castle J, Szekeres M, Jenkins G, Bishop GJ (2005) Unique and overlapping expression patterns of Arabidopsis CYP85 genes involved in brassinosteroid C-6 oxidation. *Plant Mol Biol* 57: 129-140

- Chapple C (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 311-343
- Choe SW, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA (1998) The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome-P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 10: 231-243
- Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann K (2001) Overexpression of *DWARF4* in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J* 26: 573-582
- Choe S, Schmitz RJ, Fujioka S, Takatsuto S, Lee M-O, Yoshida S, Feldmann KA, Tax FE (2002) *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive *dwarf12* mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3(β)-like kinase. *Plant Physiol* 130: 1506-1515
- Choi YH, Fujioka S, Nomura T, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A (1997) An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation. *Phytochemistry* 44: 609-613
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Chory J, Nagpal P, Peto C (1991) Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3: 445-459
- Church, GM, Gilbert W (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743
- Clouse SD, Langford M, McMorris TC (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111: 671-678
- Dodd, AN, Salathia N, Hall A, Kevei É, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AAR (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309: 630-633
- Dowson-Day MJ, Millar AJ (1999) Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J* 17: 63-71
- Feldmann KA (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Mutational spectrum. *Plant J* 1: 71-82
- Foster KR, Morgan PW (1995) Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. The *ma3^R* allele disrupts diurnal control of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* 108: 337-342

- Fujioka S, Choi YH, Takatsuto S, Yokota T, Li J, Chory J, Sakurai A (1996) Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, typhasterol and 6-deoxotyphasterol from the shoots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 37: 1201-1203
- Fujioka S, Li J, Choi YH, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J, Sakurai A (1997) The *Arabidopsis de-etiolated 2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 9: 1951-1962
- Fujioka S, Noguchi T, Yokota T, Takatsuto S, Yoshida S (1998) Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 48: 595-599
- Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S (2002) An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiol* 130: 930-939
- Fujioka S, Yokota T (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol* 54: 137-164
- Fujita S, Ohnishi T, Watanabe B, Yokota T, Takatsuto S, Fujioka S, Yoshida S, Sakata K, Mizutani M (2006) *Arabidopsis* CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C₂₇, C₂₈ and C₂₉, sterols. *Plant J* 45: 765-774
- Green RM, Tobin EM (1999) Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4176-4179
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippin-Anderson JL, Cook JC (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281: 216-217
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290: 2110-2113
- Harmer SL, Panda S, Kay SA (2001) Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 215-253
- Harmer SL, Kay SA (2005) Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1926-1940
- He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10185-10190
- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307: 1634-1638
- Highkin HR, Hanson JB (1954) Possible interaction between light-dark cycles and endogenous daily rhythms on the growth of tomato plants. *Plant Physiol* 29: 301-302

- Jackson SD, James PE, Carrera E, Prat S, Thomas B (2000) Regulation of transcript levels of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B. *Plant Physiol* 124: 423-430
- Jouve L, Gaspar T, Kevers C, Greppin H, Degli Agosti R (1999) Involvement of indole-3-acetic acid in the circadian growth of the first internode of *Arabidopsis*. *Planta* 209: 136-142
- Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225: 353-364
- Kang J-G, Yun J, Kim D-H, Chung K-S, Fujioka S, Kim J-I, Dae H-W, Yoshida S, Takatsuto S, Song P-S, Park C-M (2001) Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell* 105: 625-636
- Kim GT, Tsukaya H, Uchimiya H (1998) The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Genes Dev* 12: 2381-2391
- Kim GT, Fujioka S, Kozuka T, Tax FE, Takatsuto S, Yoshida S, Tsukaya H (2005a) CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 41: 710-721
- Kim TW, Hwang JY, Kim YS, Joo SH, Chang SC, Lee JS, Takatsuto S, Kim SK (2005b) *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 17: 2397-2412
- Klarsfeld A, Rouyer F (1998) Effects on circadian mutations and LD periodicity on the life span of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 13: 471-478
- Koncz C, Martini N, Szabados L, Hrouda M, Brachmair A, Schell J (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: *Plant Molecular Biology Manual* (SB Gelvin, AR Schilperoort, eds), Vol B2, pp 1-22, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Kwon M, Fujioka S, Jeon JH, Kim HB, Takatsuto S, Yoshida S, An CS, Choe S (2005) A double mutant for the *CYP85A1* and *CYP85A2* genes of *Arabidopsis* exhibits a brassinosteroid dwarf phenotype. *J Plant Biol* 48: 237-244
- Lee DJ, Zeevaart JAD (2002) Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. *Plant Physiol* 130: 2085-2094
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272: 398-401
- Li J, Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-938
- Li J, Nam KH (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295: 1299-1301

- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213-222
- Li L, Deng XW (2005) It runs in the family: Regulation of brassinosteroid signaling by the BZR1-BES1 class of transcription factors. *Trends Plant Sci* 10: 266-268
- Li J, Jin H (2007) Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant Sci* 12: 37-41
- Ma L, Li J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao H, Deng XW (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13: 2589-2607
- Mandava NB (1988) Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 23-52
- Mathur J, Molnár G, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yokota T, Adam G, Voigt B, Nagy F, Maas C, Schell J, Koncz C, Szekeres M (1998) Transcription of the *Arabidopsis* *CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J* 14: 593-602
- McClung CR (2001) Circadian rhythms in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 139-162
- Millar AJ, Short SR, Chua N-H, Kay SA (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4: 1075-1087
- Mitchell JW, Mandava N, Worley JF, Plimmer JR (1970): Brassins - a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* 225: 398-401
- Montoya T, Nomura T, Yokota T, Farrar K, Harrison K, Jones JGD, Kaneta T, Kamiya Y, Szekeres M, Bishop GJ (2005) Patterns of *Dwarf* expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *Plant J* 42: 262-269
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nakamura M, Satoh T, Tanaka SI, Mochizuki N, Yokota T, Nagatani A (2005) Activation of the cytochrome P450 gene, *CYP72C1*, reduces the levels of active brassinosteroids *in vivo*. *J Exp Bot* 56: 833-840
- Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S (2004) Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol* 135: 756-772
- Nomura T, Sato T, Bishop GJ, Kamiya Y, Takatsuto S, Yokota T (2001) Accumulation of 6-deoxocastasterone and 6-deoxocastasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. *Phytochemistry* 57: 171-178

- Nomura T, Kushiro T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yamaguchi S (2005) The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280: 17873-17879
- Ohnishi T, Szatmári A-M, Watanabe B, Fujita S, Bancos S, Koncz C, Lafos M, Shibata K, Yokota T, Sakata K, Szekeres M, Mizutani M (2006) C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 18: 3275-3288
- Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH (1998) Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8660-8664
- Pierik R, Cuppens MLC, Voesenek LACJ, and Eric J.W. Visser EJW (2004) Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. *Plant Physiol* 136: 2928-2936
- Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George GL, Vaistij FE, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G, Yoshida S, Bowles D (2005) The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 15253-15258
- Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M, Chory J (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* 104: 1139-1149
- Reed JW, Foster KR, Morgan PW, Chory J (1996) Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 112: 337-342
- Rouleau M, Marsolais F, Richard M, Nicolle L, Voigt B, Adam G, Varin L (1999) Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. *J Biol Chem* 274: 20925-20930
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Saunders DS (1972) Circadian control of larval growth rate in *Sarcophaga argyrostoma*. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2738-2740
- Schaeffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E (2001) Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 113-123
- Sharrock RA, Clack T (2002) Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant Physiol* 130: 442-456
- Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushiro M, Takatsuto S, Nomura T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yoshida S (2001) Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 126: 770-779
- Shimada Y, Goda H, Nakamura A, Takatsuto S, Fujioka S, Yoshida S (2003) Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 287-297

- Steber CM, McCourt P (2001) A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 125: 763-769
- Sullivan JA, Deng XW (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev Biol* 260: 289-297
- Suzuki H, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Murofushi N, Sakurai A (1994) Biosynthesis of brassinolide from teasterone via typhasterol and castasterone in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *J Plant Growth Regul* 13: 21-26
- Suzuki H, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Murofushi N, Sakurai A (1995) Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Oryza sativa*. *Biosci Biotech Biochem* 59: 168-172
- Symons GM, Schultz L, Kewrckhoffs LH, Davies LH, Gregory NW, Gregory D, Reid JB (2002) Uncoupling brassinosteroid levels and de-etiolation in pea. *Physiol Plant* 115: 311-319
- Symons GM, Reid JB (2003) Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta* 216: 422-431
- Symons GM, Reid JB (2004) Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiol* 135: 2196-2206
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol* 140: 150-158
- Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei G, Nagy F, Schell J, Koncz C (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85: 171-182
- Szekeres M, Bishop GJ (2006) Integration of brassinosteroid biosynthesis and signaling. In: *Plant hormone signaling*. Annual Plant Reviews (P. Hedden, S. Thomas, eds), pp. 67-92, Blackwell, Oxford
- Takahashi N, Nakazawa M, Shibata K, Yokota T, Ishikawa A, Suzuki K, Kawashima M, Ichikawa T, Shimada H, Matsui M (2005) *shk1-D*, a dwarf *Arabidopsis* mutant caused by activation of the *CYP72C1* gene, has altered brassinosteroid levels. *Plant J* 42: 13-22
- Tanaka K, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S (2005) Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. *Plant Physiol* 138: 1117-1125
- Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven LJJ, Dowson-Day MJ, Wang Z-Y, Tobin EM, Harren FJM, Millar AJ, Van Der Straeten D (2004) Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 3751-3761

- Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhashi W, Inoue Y, Kamiya Y (1998) Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol* 118: 1517-1523
- Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Denzel MA, Torres QI, Neff MM (2003) CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: an intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. *Plant Physiol* 133: 1643-1653
- Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Wang H, Torres QI, Ward JM, Murthy G, Zhang J, Walker JC, Neff MM (2005) *BASI* and *SOB7* act redundantly to modulate Arabidopsis photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant J* 42: 23-34
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 177-201
- Yamaguchi S, Smith MW, Brown RGS, Kamiya Y, Sun T-P (1998) Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 10: 2115-2126
- Yamaguchi S, Kamiya Y (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* 41: 251-257
- Yang XH, Xu ZH, Xue HW (2005) Arabidopsis Membrane Steroid-Binding Protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. *Plant Cell* 17: 116-131
- Yokota T, Arima M, Takahashi N (1982) Castasterone, a new phytosterol with plant hormone potency from chestnut insect gall. *Tetrahedron Lett* 23: 1275-1278
- Yokota T (1997) Structures, biosynthesis and functions of brassinosteroids. *Trends in Plant Sci* 2: 137-142
- Young MW, Kay SA (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* 2: 702-715
- Zhao J, Peng P, Schmitz RJ, Decker AD, Tax FE, Li J (2002) Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol* 130: 1221-1229
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR: Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621-2632

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban bemutatott kísérleteket a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetében, a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjaként végeztem. Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Szekeres Miklósnak nélkülözhetetlen szakmai irányítását és szellemi támogatását, amellyel mindvégig segítette munkámat. Köszönettel tartozom csoportunk vezetőjének, Nagy Ferencnek, továbbá Vass Imre igazgató és Dudits Dénes főigazgató uraknak, hogy munkámat lehetővé tették.

Köszönettel tartozom a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjainak, különösen Simona Bancosnak, akik munkámat messzemenően segítették. Hálás vagyok Takao Yokotának a gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás analízisekért, amelyeket intézetében végeztek (Teikyo Egyetem, Utsunomiya). Köszönöm családomnak és barátaimnak a munkám során tanúsított biztatást és támogatást.

KIEGÉSZÍTŐ ÁBRÁK

1. kiegészítő ábra: A munkánk során felhasznált riporter fúziókat hordozó elsődleges transzgenikus vonalak luciferáz aktivitásának diurnális mintázata
A *CPD:LUC* vad típusú (A) és *phyA-201phyB-5* (B) háttérben, valamint *mCPD:LUC* (C) és *CYP85A2:LUC* (D) vad típusú háttérben. A nulla időpont a nyolcadik fény periódus kezdetének felel meg. Az időtengelyen a fehér szakaszok a fény, míg a feketék a sötét időszakokat jelzik. A nyolc-nyolc bemutatott görbe közül a vizsgálatainkhoz kiválasztott növényekét vastagabb, folyamatos vonallal adtuk meg.

2. kiegészítő ábra: A *CPD:LUC* transzgén kifejeződése vad típusú csíranövényekben
A: négy független, 100-100 egyhetes csíranövényből álló minta luciferáz aktivitásának egyidejűleg mért értékei. B: az A panelen bemutatott mérésekből származó adatok átlagai és szórási értékei. A nulla időpont a nyolcadik fény periódus kezdetének felel meg. Az időtengelyen a fehér szakaszok a fény, míg a feketék a sötét időszakokat jelzik.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

A disszertáció anyagából készült publikáció:

Bancos S, Szatmári A-M, Castle J, Kozma-Bognár L, Shibata K, Yokota T, Bishop GJ, Nagy F, Szekeres M (2006) Diurnal regulation of the brassinosteroid-biosynthetic *CPD* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 299-309 (megosztott első szerzőséggel)

A disszertáció témaköréhez tartozó további publikációk:

Bishop G, Nomura T, Yokota T, Montoya T, Castle J, Harrison K, Kushiro T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Bancos S, Szatmári A-M, Szekeres M (2006) Dwarfism and P450-mediated C-6 oxidation of plant steroid hormones. *Biochem Soc Trans* 34: 1199-1201

Ohnishi T, Szatmári A-M, Watanabe B, Fujita S, Bancos S, Koncz C, Lafos M, Shibata K, Yokota T, Sakata K, Szekeres M, Mizutani M (2006) C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 18: 3275-3288 (megosztott első szerzőséggel)

ÖSSZEFOGLALÁS

A brasszinoszteroidoknak (BR-oknak) a növények normális fejlődésében és növekedésében betöltött szerepükhöz szükséges az optimális hormonszint kialakítása és fenntartása. Az endogén BR koncentráció nagymértékben függ a *de novo* hormonszintézistől, melyet az annak sebességmeghatározó lépéseit felelős enzimek aktivitása szabályoz. Korábbi vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy a BR bioszintézis kulcsenzimeit kódoló *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* kifejeződése napszakos váltakozást mutat. Mivel ezen gének kifejeződése közvetlenül befolyásolja a bioszintézis hatékonyságát és így az endogén hormonszintet, munkánk céljából tüztük ki a *CPD* és a *CYP85A2* napszakos kontrolljában résztvevő legfontosabb környezeti és endogén tényezőket azonosítását. Kísérleti eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. A *CPD* és *CYP85A2* gének *in vivo* kifejeződését lumineszcencia mérésével követtük nyomon ezen gének promóter-luciferáz riportergén konstrukciót hordozó transzgenikus növényekben. Hogy megbizonyosodjunk arról mennyire megbízhatóak a luciferáz riporter rendszerrel kapott adatok, a lumineszcencia mérésekkel párhuzamosan RT-PCR analízissel meghatároztuk az endogén *CPD*-ről átírt mRNS mennyiségének alakulását is. Eredményeink azt mutatták, hogy a transzkriptum mennyiségek a nap folyamán összhangban változtak a mért luciferáz aktivitásokkal, ami igazolta, hogy a luciferáz riportergén konstrukciókkal kapott értékek hűen tükrözik a promóter aktivitásának napi változásait. A *CPD* promóter kifejeződésének napi változásait fény/sötét (LD) körülmények között vizsgálva a kapott aktivitási értékek egy jellegzetes bifázisos görbét mutattak, melynek maximumai a fényszakasz kezdetére, ill. annak végével egybeeső időpontokra estek. A *CYP85A2* aktivitását vizsgálva LD körülmények között a *CPD*-éhez hasonló bifázisos görbét kaptunk. Megfigyeltük, hogy a *CYP85A2* sokkal alacsonyabb szinten fejeződik ki, mint a *CPD*. A két BR bioszintézis gén napi expressziós profiljának nyilvánvaló hasonlósága arra utal, hogy kialakulásukban közös szabályozási mechanizmusok vehetnek részt.

2. A fény szabályozó szerepének a kiderítése végett a *CPD:LUC* csíranövények biolumineszcenciájának időbeni változásait megvizsgáltuk konstans fényviszonyok között is. Méréseink során folyamatos fényben (LL) a lumineszcencia értékek szabályos, nagyjából 24 órás ciklusokat mutató, cirkadián oszcillációját észleltük, amely a több napon keresztül fennmaradt. A cirkadián kifejeződési görbe minimumai a relatív nappalok, míg maximumai a relatív éjszakák közepére estek. Ezt a cirkadián oszcillációt folyamatos sötétben is

megfigyeltük, de a *CPD* expressziós szintjében gyors csökkenés állt be, ami a ciklusok eltűnéséhez vezetett. A LD periódusokban tapasztalt hirtelen megnövekedett aktivitást a fény periódus kezdetén és a hirtelen bekövetkezett aktivitás csökkenést a sötét szakasz beállta után a folyamatos körülmények közt nem lehetett megfigyelni a fény sötét szakaszok váltakozásainak a hiánya miatt. Mindezek a fénynek a *CPD* expressziójára gyakorolt induktív hatására utalnak.

3. A *CPD* gén LD és LL kifejeződési profiljainak összehasonlításakor megfigyeltük, hogy a LL görbén felismerhető a cirkadián oszcilláció minimuma a fényszakasz közepén, valamint annak maximuma is egy határozott vállként a sötét periódus közepén. Ennek alapján megállapítható volt, hogy a *CPD* napszakos (LD) kifejeződését egy alapszintű cirkadián oszcilláció, valamint egy erre ráépülő pozitív fényreguláció együttesen határozza meg.

4. Megállapítottuk, hogy a cirkadián reguláció lényegesen befolyásolja a *CPD* gén esetében a fényindukció mértékét. Eredményeink azt mutatták, hogy a cirkadián szabályozásnak a válaszreakció mértékét meghatározó, ún. "gating" hatása van a *CPD* fényindukálhatóságára.

5. Megállapítottuk, hogy a *CPD* fényindukciójához a vörös fény önmagában elegendő. A fényhatás hullámhosszfüggését vizsgálva a transzgenikus növényekben a *CPD* kifejeződését olyan fény/sötét periódusokban követtük nyomon ahol a fehér fényt a fitokróm, ill. kriptokróm fotoreceptorok specifikus aktiválására alkalmas monokromatikus fényforrásokkal helyettesítettük. A mérések adatai azt mutatták, hogy vörös/sötét ciklusokban a *CPD* expressziós profilja a normális LD görbével együtt haladt. Eredményeink arra utaltak, hogy a *CPD* fényindukciójában a fitokróm fotoreceptoroknak van szerepük.

6. A *CPD:LUC* transzgén expressziós profilját vizsgálva fitokróm-hiányos *phyAphyB* mutáns háttérben LD körülmények között, megfigyeltük, hogy a fitokróm-deficiens növényekben a *CPD* aktivitása a vadhoz hasonlítva jóval alacsonyabb szintet mutatott és a kapott görbét a cirkadián oszcilláció határozta meg. Mindezek arra utalnak, hogy a *CPD* kifejeződésének fény szabályozásában a fitokróm fotoreceptoroknak (ezek közül is a zöld növényekben nagy mennyiségben előforduló fitokróm B-nek) és a róluk elinduló jelátviteli útnak van meghatározó szerepük.

7. Megvizsgáltuk az aktív BR-ok által kiváltott negatív visszacsatolás hatását BR inszenzitív háttérben, ahol nem érvényesül a végtermékgátlás. A BR receptorban hiányos *bri1* növényekben vizsgálva a *CPD:LUC* transzgén expressziós profilját különböző fényviszonyok közt megfigyeltük, hogy LD periódusokban a *bri1* háttérben a transzgén kifejeződése a vad háttérhez hasonló görbét eredményez. Ez arra utal, hogy a *CPD* napszakos

szabályozása alapvetően független a hormonhatástól. Folyamatos sötétben a BR inszenzitív háttérben a transzgén aktivitása a vad típusúéval ellentétben nem csökken és expressziós profilja cirkadián oszcillációt mutat. Ami arra enged következtetni, hogy a *CPD* sötétrepressziójáért a bioaktív BR-ok általi negatív végtermékgátlásos szabályozás a felelős.

8. Gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) analízis segítségével meghatároztuk az endogén BR tartalom napszakos változását. A *CPD* és *CYP85A2* gének expressziójának diurnális változásai alapján feltételezhető volt, hogy ezek hatásaként a növények aktív BR tartalma is napszakos ingadozást követhet. Egy 24 órás LD ciklus során, a nap 4 különböző időpontjaiban vett mintákban végzett analízisek adatai azt mutatták, hogy az intermedierek mennyisége érdemben nem változik, míg a bioaktív brasszínolid szintje erős felhalmozódást mutatott a fény periódus közepén. Bár eredményeink nem bizonyítják a *CPD* és *CYP85A2* gének expressziójának, ill. a brasszínolid felhalmozódásának napi változásai közti kapcsolatot, mindenképp említésre érdemes, hogy a brasszínolid szint a *CPD* és *CYP85A2* erős reggeli fényindukcióját követően mutat emelkedést.

9. GC-MS analízis segítségével meghatároztuk az endogén BR-ok mennyiségét 48 órás sötét kezelésnek kitett csíranövényekben. A vizsgálat eredményei alapján a BR-ok mennyisége lényegében nem változik, és brasszínolid felhalmozódást sem észleltünk a sötét kezelés hatására. Ami arra utal, hogy a *CPD* sötétbeni repressziójának végtermékgátlásos szabályozása nem a megemelkedett hormonszint eredménye.

10. Megállapítottuk, hogy a BZR1 transzkripciós faktornak szerepe van a hormonális végtermékgátlás kialakulásában. Northern blot analízissel igazoltuk, hogy az inaktivált BZR1 kötőhelyet tartalmazó módosított *mCPD* promóter esetében nem érvényesül a transzkripció végtermékgátlás általi szabályozása. A transzgenikus csíranövények lumineszcencia adatai azt mutatták, hogy az *mCPD:LUC* transzgén tartós sötétben a kontroll *CPD:LUC*-nál erősebb kifejeződést mutat. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a mutáns promóter aktivitása sötétben a vad típusúéhoz képest kevésbé represszálódik, és görbájén - a vad típusúéval ellentétben a cirkadián oszcilláció érvényesül. Ez igazolta azt a feltevésünket, hogy *CPD* gén aktivitásának sötétbeni repressziója elsődlegesen a hormonális hatás következménye. Mivel a sötétrepresszió nem a megnövekedett bioaktív BR szint mellett alakul ki, adataink arra utalnak, hogy a csíranövényekben a tartós sötét a BR-érzékenység fokozódását idézi elő.

Eredményeink alapján a BR bioszintézis sebességmeghatározó lépéseit felelős enzimeket kódoló gének napszakos kifejeződése a hormontartalomtól független transzkripciós szabályozás alatt áll, amelyet egy alapszintű cirkadián reguláció és az erre épülő fény szabályozás együttesen határoz meg. A fényhatás kialakulásában a fitokrómoknak és a

róluk elinduló jelrendszernek van meghatározó szerepük. A bioszintézisben kulcs szerepet betöltő gének kifejeződése befolyásolja az aktív hormontartalmat.

SUMMARY

INTRODUCTION

Brassinosteroids (BRs) are polyhydroxylated steroids that are ubiquitous in vascular plants. In addition to their strong growth promoting effect, BRs also control important developmental processes, such as photomorphogenesis, germination, fertility, and stress resistance. Due to their essential regulatory role and widespread occurrence, BRs have been recognized as an independent family of plant hormones. Like auxins and gibberellins, they have a major role in growth promotion. But unlike these other hormones, BRs act at, or very close to, the sites of their synthesis.

By now the pathways of BR synthesis are well known, and most of the genes encoding the biosynthetic enzymes have been identified. BRs are synthesized from abundant phytosterols via a series of oxidative reactions that are catalyzed by cytochrome P450-type monooxygenases, which belong to the CYP85 or CYP90 families. Local BR levels are thought to be dependent on the abundance of the enzymes that catalyze rate-limiting reactions in the synthesis route. In *Arabidopsis thaliana* these are encoded by *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM (CPD)* and *CYP85A2*. The characterization of these genes has shown that their expression is controlled primarily at the transcriptional level, and involves developmental, organ-specific and end product-dependent negative feedback regulation.

Plant development is determined by the interaction between endogenous and environmental cues. Among the latter, light is the most important, which is not only the basis of photosynthetic metabolism, but also a coordinator of development from germination to seed production. Regular daily changes in light conditions result in substantial rearrangements of biochemical functions. Preparation of the plant to changes in the light conditions is greatly facilitated by the endogenous circadian clock of the plants. Circadian timing is based on light signals, and allows the organism to adapt its functions properly in anticipation of the upcoming changes of the environment. Following entrainment, circadian regulation can maintain the endogenous rhythm for several days in constant environment. Direct (or acute) light regulation is mediated by photoreceptors, such as phytochromes and cryptochromes. To the tissue and organ level, light and circadian control is exerted mainly via the action of phytohormones. The roles of some hormone groups (e.g. gibberellins or ethylene) in relaying

diurnal regulation are well documented. Our project stemmed from the preliminary results that indicated diurnal expression patterns of the BR-biosynthetic *CPD* and *CYP85A2* genes.

OBJECTIVES

The aim of our work was to identify the main environmental and endogenous cues that contribute to the diurnal regulation of the *CPD* and *CYP85A2* genes. To this end, we set forward to the following goals:

(1) Characterization of the daily expression patterns of these two genes, and identification of the mechanisms ensuring their diurnal regulation.

(2) Clarifying the role of light in the regulatory processes, and defining the signaling route(s) that mediate light effect.

(3) Finding out the relationship between the mechanisms of diurnal regulation and the BR-dependent feedback control of *CPD* and *CYP85A2*.

(4) Determining if diurnal changes in the expression of BR-biosynthetic genes are associated with daily changes in the level of bioactive BRs.

METHODS

- Construction of luciferase-based reporter transgenes
- Generation and maintenance of transgenic *Arabidopsis* lines
- In vivo measurements of bioluminescence
- Isolation of total RNA
- Determination of transcript abundance by reverse transcription-based PCR (RT-PCR)
- Northern-blot analysis
- Isolation and quantitative analysis of BR content

RESULTS

(1) We followed the expression of *CPD* and *CYP85A2* promoter-driven luciferase reporter in transgenic *Arabidopsis* using in vivo imaging by CCD camera. Under Light/dark regimes (LD), *CPD* expression exhibited a biphasic diurnal profile, with maxima coinciding with the onset and the end of the light periods. A very similar type of activity was observed with *CYP85A2*, providing strong indication for the involvement of common regulatory

mechanisms in the diurnal control of the two key BR biosynthetic genes. In order to test the reliability of the reporter-based monitoring system, we also measured the daily activity of the *CPD* gene by directly determining its mRNA levels using RT-PCR assay. Parallel changes of the luciferase activity and the transcript amounts of the endogenous *CPD* confirmed that the promoter:reporter allow precise monitoring of *CPD* promoter activity.

(2) In order to clarify the role of light in the diurnal regulation, we measured the luminescence of the *CPD:LUC*-carrying seedlings under constant light conditions. We found that in continuous light *CPD* activity followed a circadian oscillation with maxima in the subjective night. This expression pattern was maintained for several days. By contrast, in continuous dark the activity of *CPD* rapidly decreased, so that its circadian cycling was lost after two days. Because under LD the expression of *CPD* showed sharp maxima, and these coincided with the changes of light regimes, these indicated a regulatory role for light in controlling *CPD* transcription.

(3) In the diurnal profile of *CPD* activity the minima and maxima of the circadian oscillation could be easily recognized. Therefore we concluded that the diurnal pattern *CPD* expression is under dual control: by a basic circadian rhythmicity, and a superimposed positive light regulation.

(4) To determine the spectral specificity of light regulation, we measured the diurnal profile of *CPD* activity under red/dark and blue/dark photoperiods. The monochromatic light sources used were specific for the absorption of the phytochrome and cryptochrome photoreceptors, respectively. These experiments revealed that red light alone was sufficient to maintain the diurnal expression of *CPD*. By contrast, in blue/dark a quick dampening of the gene activity was observed, which was similar to the one seen in continuous dark. These data indicated a major role for the phytochrome photoreceptors in the light regulation of *CPD*, therefore we measured *CPD:LUC* expression in phytochrome-deficient *phyAphyB* background. We found that deficiency in the two most abundant phytochromes substantially decreased the activity of the transgene, and that its expression profile in the double mutant was largely determined by the circadian regulation. These results suggest the primary importance of phytochrome signaling in the control of *CPD* activity.

(5) Because daily changes in the BR content can result in differential *CPD* activity via the hormonal feedback regulation, we checked the relationship of this control mechanism with those responsible for the diurnal expression. To this end, we measured *CPD:LUC* activity in the BR-insensitive *bri1* mutant background which lacks the BR receptor. We observed that BR-insensitivity did not abolish the diurnal regulation of *CPD*, but in

continuous dark it prevents the repression of the gene activity. This suggests that the repression is mediated by BR hormone action.

(6) We determined the endogenous BR content of *Arabidopsis* seedlings during a 24 h LD cycle to find out whether the levels of bioactive BRs show diurnal changes. Gas chromatography-coupled mass spectrometric analyses revealed a sharp transient accumulation of brassinolide, the biologically most active BR, in the middle of the light period. Remarkably, this increase follows the morning light induction of the BR-biosynthetic genes.

(7) The BR-dependent repression of *CPD* expression in the dark suggested that this might be the result of BR accumulation in the plants. Therefore we measured the BR content of seedlings following a 48 h dark incubation. The results of the GC-MS analysis showed no increase in the BR content compared to the LD control. This indicates that the observed exaggerated BR response is due to the increase of BR-responsiveness, rather than that of the BR content.

(8) Our data revealed that the repression of *CPD* activity in prolonged dark is mediated by the BZR1 transcription factor. In line with this, we found no dark repression in *mCPD:LUC* transgenic plants that carried a mutant version of the *CPD* promoter with inactivated BZR1 binding site. These data confirm that the repression of *CPD* in the dark is controlled by the BR signaling pathway.

CONCLUSIONS

The *CPD* and *CYP85A2* genes, which encode key enzymes of BR synthesis, are under diurnal regulation. This control mechanism acts primarily at the transcriptional level and consists of a basic circadian oscillation, and a superimposed light regulation.

The light induction of *CPD* and *CYP85A2* is mediated by phytochrome-dependent signaling pathways.

The diurnal expression of *CPD* is independent of the hormonal effects of BRs, but the repression of gene activity in extended dark requires BR signaling. The suppression of *CPD* activity in the dark is the result of increased BR sensitivity.

The amount of bioactive BRs also shows diurnal fluctuation, which is in good agreement with the expression patterns of the biosynthetic genes during the day.