

**A fitokróm fotoreceptorok irányította jelátvitelben szerepet játszó
transzkripciós faktor funkcionális vizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: Viczián András

Témavezető: Dr. Nagy Ferenc

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

Szegedi Tudományegyetem
Molekuláris és Sejtbiológia Doktori Program
Szeged
2004

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1 NÖVÉNYI FOTORECEPTOROK	9
2.1.1 UV-B receptorok.....	9
2.1.2 Kék és UV-A fényreceptorok.....	10
2.1.2.1 A kriptokrómok.....	10
2.1.2.2 A fototropinok.....	11
2.1.3. Vörös fényreceptorok.....	13
2.1.3.1 A vörös fény receptorai a fitokrómok	13
2.1.3.2 A fitokrómok felépítése és működése	15
2.1.3.3 A fitokróm-specifikus jelátvitel.....	22
2.1.3.4 A fitokrómok sejten belüli lokalizációja	28
2.2 A PIF3, MINT A FÉNYINDUKÁLT GÉNEXPRESSZIÓ EGYIK KÖZPONTI ELEME	29
2.2.1 A PIF3 azonosítása és molekuláris szerkezete.....	29
2.2.2 A PIF3 kölcsönhatásba lép a fitokrómokkal és specifikus DNS-motívumhoz kötődik.....	30
2.2.3 A PIF3 heterodimerizációja más faktorokkal.....	35
2.2.4 A PIF3 megváltozott mRNS szintje által okozott fenotípusok.....	36
2.2.5 A PIF3 feltételezett szerepe.....	38
2.2.5.1 A PIF3 szerepe a fitokróm-specifikus jelátvitelben.....	38
2.2.5.2 A PIF3 feltételezett szerepe a növényi cirkadián óra szabályozásában.....	39
3. CÉLKITŰZÉSEK	43
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	44
4.1 KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS ORGANIZMUSOK.....	44
4.1.1. Vegyszerek és forgalmazók.....	44
4.1.2. Tápanyokok és táptalajok, antibiotikumok, szelekció	44
4.1.3 Plazmidok és cDNS klónok	46
4.1.4. Baktériumok.....	47
4.1.5 Növények.....	47
4.2 MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK	48
4.2.1. Plazmidvektor-konstrukciók készítése.....	48
4.2.2. Agrobacterium konjugáció	50
4.2.3 Növényi össz-RNS tisztítás	50
4.2.4 Az mRNS szint vizsgálata RN-áz protekcióval.....	51
4.2.5 Növényi össz-protein tisztítás és Western-blot analízis	52

4.3 NÖVÉNYEKEN ALKALMAZOTT TECHNIKÁK.....	53
4.3.1 Magsterilizálás, növénynevelés.....	53
4.3.2 Transzgenikus növények előállítása.....	53
4.3.3 Hipokotilhossz-mérés.....	53
4.3.4 Fénykezelések.....	54
4.3.5 Virágzási idő meghatározása	54
4.3.6 Epifluoreszcens, fény- és konfokális mikroszkópia	54
4.3.7 Luciferáz enzimaktivitás meghatározása CCD kamerával	55
4.3.8 <i>In vivo</i> lumineszcencia-mérés luminométerrel.....	55
4.4 ADATFELDOLGOZÁSI, INTERPRETÁLÁSI IRÁNYELVEK	56
5. EREDMÉNYEK.....	57
5.1 A <i>PIF3</i> MUTÁNS NÖVÉNYEK VIZSGÁLATA.....	57
5.2 A <i>POC1</i> MUTÁNS NEM TARTALMAZ <i>PIF3</i> FEHÉRJÉT	59
5.3 <i>PIF3</i> TÚLTERMELŐ TRANZGENIKUS NÖVÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSA, FENOTÍPUS-VIZSGÁLATOK.....	60
5.4 A <i>PIF3</i> FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉSE A FEJLŐDÉSI ÁLLAPOTTÓL FÜGG	62
5.5 A <i>PIF3</i> SEJTEN BELÜLI ELOSZLÁSÁNAK FÉNYFÜGGÉSE ÉS FÉNYINDUKÁLT LEBOMLÁSA	64
5.6 A <i>COP1</i> SZÜKSÉGES A <i>PIF3</i> FELHALMOZÓDÁSÁHOZ SÖTÉTBEN	70
5.7 A <i>PIF3</i> ÉS FITOKRÓM MOLEKULÁK <i>IN VIVO</i> KO-LOKALIZÁCIÓJA	72
5.8 A <i>PIF3</i> SZEREPE A <i>PHYB</i> “KORAI” ÉS “KÉSŐI” SEJTMAGI FOLTFORMÁLÁSÁBAN	77
5.10 A <i>PIF3</i> LEBOMLÁSÁNAK KÖVETÉSE LUCIFERÁZ RIPORTERGEN SEGÍTSÉGÉVEL	78
5.11 A <i>PIF3</i> SZEREPE A NÖVÉNYI CIRKADIÁN ÓRA MŰKÖDÉSÉBEN	82
6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	87
6.1 A <i>PIF3</i> A FOTOMORFOGENEZISNEK NEM POZITÍV, HANEM NEGATÍV REGULÁTORA.....	87
6.2 A <i>PIF3</i> FEHÉRJE FÉNYINDUKÁLT LEBOMLÁSA A FOTOMORFOGENEZIS SZABÁLYOZÓ LÉPÉSE	88
6.3 A <i>PIF3</i> SPECIÁLIS SEJTMAGI FEHÉRJEKOMPLEXEK FELÉPÍTÉSÉBEN VESZ RÉSZT	90
6.4 A <i>COP1</i> FEHÉRJE KETTŐS FUNKCIÓJA.....	91
6.5 A <i>PIF3</i> SZEREPE A NÖVÉNYI CIRKADIÁN ÓRA MŰKÖDÉSÉBEN ÚJRAÉRTÉKELÉSRE VÁR	92
6.6 EGY ÚJ MUTÁNSKERESÉSI MÓDSZER ALAPJAI	94
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	95
8. SUMMARY	98
8.1 INTRODUCTION.....	98
8.2 RESEARCH OBJECTIVES	102
8.3 METHODS	102
8.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	103
8.5 CONCLUSIONS	106
9. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	107

10. IRODALOMJEGYZÉK.....	108
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	126

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

(35S) _{2x}	karfiolmozaik vírus 35S RNS-ének promótere, duplikált enhanszer régióval
ATE	amino-terminal extension
BAR	bialophos resistance
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolfoszfát toluidin
bHLH	„basic helix-loop-helix” motívum
bZIP	„basic zipper” motívum
CAB	chlorophyll a,b-binding protein
CCA1	circadian clock associated 1
CCD	charge coupled device
CCR2	cold, circadian regulated 2
CFP	cyano fluorescent protein
CHS	chalcone synthase
Col	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Columbia ökotípus
COP	constitutively photomorphogenic
Cph1	cyanobacterial phytochrome 1
cpm	counts per minute
DTT	dithiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
GFP	green fluorescent protein
GUS	β-glükuronidáz
HFR1	long hypocotyl in far-red 1
HKRD	histidine kinase-related domain
HY5	long hypocotyl 5
HYH	HY5 homolog
IPTG	izopropil-tio-β-D-galaktozid
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
LAF1	long after far-red light 1
Ler	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Landsberg erecta ökotípus
LHY	late-elongated hypocotyl
LUC	<i>Photinus pyralis</i> (szentjánosbogár) luciferáz

NBT	nitro blue tetrazolium
NLS	nuclear localization signal
NOS3'	nopalín-szintáz gén 3' nem transzlálódó szekvenciája
ORF	open reading frame
PAS	Per/Arnt/Sim domén
Pfr	A fitokróm távoli-vörös fényt abszorbeáló konfomerje
PHOT	phototropin
PHR	photolyase related domain
PHY	phytochrome (fitokróm)
PIF3	phytochrome interacting factor 3
PIL1	PIF3 like 1
PIPES	piperazin-1,4 bis(2-etánszulfonsav)
PKS1	phytochrome kinase substrate 1
PMSF	fenil-metil-szulfonil fluorid
<i>poc1</i>	photocurrent 1
pPCV	plant cloning vector
Pr	A fitokróm vörös fényt abszorbeáló konfomerje
Rcp1	response regulator for cyanobacterial phytochrome 1
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SPA1	suppressor of phytochrome A 1
T _{nos}	nopalín-szintáz gén 3' nem transzlálódó szekvenciája
TOC1	timing of CAB 1
TRIS	trisz(hidroximetil)amino-metán (C ₄ H ₁₁ NO ₃)
ULI3	UV-B light insensitive 3
UTP	uridin-trifoszfát
UV-A/B/C	ultraibolya-A/B/C sugárzás
Ws	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Wassilevskaya ökotípus
ZT	Zeitgeber time (az utolsó sötét/fény átmenettől számított idő)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid
YFP	yellow fluorescent protein

1. BEVEZETÉS

Az külső környezethez való alkalmazkodás képessége az élőlények számára alapvető fontosságú a túlélés szempontjából. A környezetből származó pozitív hatások mind hatékonyabb kihasználása érdekében, illetve a negatív hatások kivédésére különböző stratégiák alakultak ki. Az állatok döntő többsége aktív helyváltoztatással találja meg a számára legmegfelelőbb környezetet, míg a helyhez kötött növények számára a változó környezeti tényezőkhez történő mind optimálisabb alkalmazkodás a lét- és fajfenntartás záloga.

A fény az egyik legfontosabb növényekre ható környezeti tényező, mivel döntő többségük fotoszintézis révén állítja elő a szervezete felépítéséhez szükséges energiát és szerves szénvegyületeket. A fény azonban kettős szerepet játszik a növények életében: egyrészt a fotoszintézis gépezetét hajtó energiaforrás, másrészt a környezet állapotáról információt hordozó nagyon fontos jel. A növények a fény érzékelésére kifinomult szenzorokat, ún. fotoreceptorokat fejlesztettek ki. Ezekkel a receptorokkal képesek a fény meglétét vagy hiányát, hullámhosszát, intenzitását, irányát, a megvilágítás időtartamát és napi ritmusát érzékelni, és a növény fejlődésében, élettani válaszaiban megjeleníteni. A fotoreceptorok által szabályozott fiziológias folyamatok az alábbiakban foglalhatók össze (Sullivan és Deng, 2003):

- (I) Csírázás;
- (II) Csíranövények fényfüggő fejlődése;
- (III) Árnyékelkerülés;
- (IV) Fototropizmus;
- (V) Színtestek mozgása, gázcserenyílás nyitásának szabályozása;
- (VI) A nappalok hosszának érzékelése.

A fényjel feldolgozásának és hatásának vizsgálatával a fotobiológia foglalkozik. Ebből a felsorolásból is látható, hogy a fény, mint jel a növény egész életére hatással van, mégis a legtöbb rendelkezésre álló adat fiatal csíranövényeken végzett fotobiológiai vizsgálatok során született. A fény hatása akkor a legfeltűnőbb, ha egy faj két egyforma korú, sötétben vagy fényen nőtt csíranövényének felépítését hasonlítjuk össze. A sötétben nőtt növény hipokotilja hosszú, hipokotilkampóban végződik; sziklevelei kicsik, összezártak; éretlen, klorofillt nem tartalmazó etioplasztiszokat tartalmaz, ezért sárga színű: összességében a sötétben fejlődés,

azaz szkotomorfogenezis jellemzőit mutatja. Ezzel szemben a fényben nőtt növény hipokotilja a megnyúlás gátlása miatt rövid; a hipokotilkampó kiegyenesedett; sziklevelei szétnyíltak, és a klorofill jelenléte miatt zöld kloroplasztiszokat tartalmaznak: azaz a fényben fejlődés, a fotomorfogenezis jellemzőit mutatja. A sötétben fejlődött növényeket szokás etiolálnak, a fényben fejlődötteket de-etiolálnak nevezni. Természetes körülmények között a különböző fejlődési programok fontossága egyértelmű: csírázás után a talajban kevés a fény (vagy egyáltalán nincs), ezért a növény célja az éltető fényforrás mind hamarabbi elérése, a hipokotil gyors megnyúlásával. A sziklevelek szétnyitása a talajban felfedné a sérülékeny merisztémát, és a fotoszintetikus apparátus kiépítése is felesleges energiapazarlás lenne, ha nincs fotoszintézisre elegendő fény. Ha a növény fénybe kerül, például eléri a talajfelszínt, akkor megnyúlása lelassul, kifejlődik a fotoszintetikus apparátus, kialakulnak a zöld levelek. Fontos megemlíteni, hogy ezekben a folyamatokban a növény a fényjelet a fotoszintetikus apparátustól függetlenül érzékeli. Ezt bizonyítják azok a kísérletek, amelyekben olyan hullámhosszú és intenzitású fényt alkalmaznak, amely elégtelen a fotoszintetikus folyamatok számára, a de-etiolációra jellemző morfológiai jegyek mégis kialakulnak.

Napjainkra az is nyilvánvalóvá vált, hogy a fotoreceptorok bonyolult jelátviteli hálózatok kiindulópontjai, amelyek működése változásokat eredményez bizonyos gének kifejeződési mintázatában. Az általánosan használt modellnövényvel, az *Arabidopsis thaliana*-val végzett vizsgálatok során megállapították, hogy a fény néhány óra alatt az összes vizsgált gén hozzávetőlegesen 30%-ának expresszióját változtatja meg (Ma és mtsai, 2001). Napjainkban a fotobiológiai kutatások legintenzívebben kutatott területe a fényspecifikus jelátvitel. Ennek a folyamatnak a bonyolultságát jelzi, hogy a benne közreműködő komponensek listája hónapról-hónapra bővül. 1998-ban azonosítottak egy *Arabidopsis* transzkripciós faktort, a PIF3-mat (phytochrome interacting factor 3) (Ni és mtsai, 1998), amely alaposan megváltoztatta a vörös fény által kiváltott jelátvitelről addig kialakult képet. Munkánk célja az volt, hogy ismereteinket ennek a faktornak a biokémiai tulajdonságairól és funkciójáról *in vivo* vizsgálatok révén gyarapítsuk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Növényi fotoreceptorok

A növények a fényt fotoreceptoraik segítségével érzékelik, jelenlegi tudásunk szerint három hullámhossztartományban:

- UV-B receptorok (létezésükre egyelőre csak indirekt bizonyíték van);
- UV-A és kék fényreceptorok (kriptokrómok, fototropinok);
- vörös/távoli vörös fényreceptorok (fitokrómok).

(A fotoreceptorok nevének írásmódjánál az egységesítési törekvéseket (Briggs és mtsai, 2001; Quail és mtsai, 1994) vettem figyelembe.)

2.1.1 UV-B receptorok

A napsugárzás ultraibolya tartományából az UV-A (320-400 nm) akadálytalanul eléri a földfelszínt, míg az UV-C (<280 nm) teljes mértékben visszaverődik a légkörről. Az e két tartomány közé eső UV-B sugárzás (280-320 nm) földfelszínre jutó mennyisége a sztratoszférikus ózonréteg pillanatnyi állapotától függ (McKenzie és mtsai, 2003). Napjainkban az ózonréteg károsodása felgyorsult, ezért ennek a hullámhossztartománynak az élő szervezetekre gyakorolt hatása kiemelkedő jelentőségű kutatási területté lépett elő. Az UV-B sugárzás növényeket károsító hatása az általános stresszválasz-reakciók indukálásán keresztül követhető figyelemmel, például DNS és fehérjék roncsolódása, lipid peroxidáció, stb. (Brosché és Strid, 2003). Az alacsony intenzitású UV-B sugárzás azonban fontos környezeti faktorként, a növények növekedését, fejlődését szabályozó jelként is funkcionál (Jansen, és mtsai, 1998; Jansen, 2002). Ezeknek a fotomorfogenikus válaszoknak a kiváltása feltételezett, jelenleg még azonosítatlan UV-B-specifikus receptor által történhet (Stapleton, 1992; Jenkins, 1997; Kim és mtsai, 1998). Az UV fény indukálta jelátvitelről keveset tudunk, a nemrégiben azonosított ULI3 (UV-B light insensitive 3) fehérje az első, amely az UV-B-specifikus jelátvitelben játszik szerepet (Suesslin és Frohnmeyer, 2003). Az UV-B-érzékelés mechanizmusának feltárása a napjaink genomikai áttörésének számító gén-chipnek köszönhetően jelentősen felgyorsult (Ulm és mtsai, 2004).

2.1.2 Kék és UV-A fényreceptorok

A kék fény jelentős szerepet tölt be a növények életében, hiszen – többek között – gátolja a hipokotil-megnyúlást, serkenti a sziklevelek növekedését, szabályozza a virágzási időt, a fototropikus reakciókat, részt vesz a cirkadián óra beállításában, szabályozza a génexpressziót stb. (Lin, 2000). Charles Darwin már 1881-ben megfigyelt egy kék fény-specifikus válaszreakciót, amelyet ma már kék fény indukálta fototropizmusnak nevezünk (Darwin, 1881). A korai megfigyelés ellenére a kék fény érzékeléséért felelős fotoreceptorok felfedezésére egészen a közelmúltig várni kellett. Eddig *Arabidopsis*-ban négy kék fényt érzékelő fotoreceptort azonosítottak, a következő alfejezetek ezeket tekintik át röviden.

2.1.2.1 A kriptokrómok

Az 1980-ban izolált, *hy4* nevű *Arabidopsis* mutáns (Koornneef és mtsai, 1980) kék fényben növesztve hosszú hipokotilú volt, tehát a hipokotilnövekedés gátlása sérült ilyen körülmények között. A mutációt szenvedett gént később T-DNS mutáns *hy4* növényből izolálták, és a kriptokróm 1 (*CRY1*) nevet kapta (Ahmad és Cashmore, 1993, Lin és mtsai, 1996a). A kriptokróm család második tagját *Arabidopsis*-ban egy cDNS könyvtárból – a *CRY1* cDNS-ét próbaként használva – izolálták (Lin és mtsai, 1996; Hoffmann és mtsai, 1996, Lin és mtsai, 1998). A filogenetikai analízis feltárta, hogy a kriptokrómok szerkezetileg közeli rokonságban állnak a baktériumokban már vizsgált ún. 6-4 DNS fotoliázokkal, amelyek a DNS-en a rövid hullámhosszú ultraibolya (UV-B és UV-C) fény hatására kialakuló 6-4 típusú pirimidin dimereket távolítják el, a tevékenységükhöz szükséges energiát pedig kék/UV-A fényből nyerik (Cashmore és mtsai, 1999). Kriptokrómok az állatokban is megtalálhatók, de sem az állati, sem a növényi változatok nem képesek DNS hibák javítására. A növényi kriptokrómok 70-80 kDA nagyságú fehérjék, két jól elkülönülő domént tartalmaznak. E fehérjék N-terminális régiói igen konzerváltak, ezek tartalmazzák az ún. PHR (photolyase related) domént, amely a fotoliázokhoz hasonlóan a fényérzékenységért felelős két kromofórt köti: a pterint és a FAD-ot (flavin adenin dinukelotid). Minden aminosav, amely a kromofórok kötéséhez szükséges, megegyezik a fotoliázokéval, míg azok az aminosavak, amelyek a fotoliázokban a DNS hibák javításához szükségesek, nem konzerváltak a kriptokrómokban (Lin, 2000). A kriptokrómok C-terminálisának szerkezete sokkal kevésbé konzervált, mint az N-terminálisuk, de az ott található, mindmáig ismeretlen funkciójú

úgynevezett DAS domén fontosságára utal, hogy mutációja a funkció jelentős sérülésével jár (Lin és Shalitin 2003). A C-terminális régióknak valószínűleg a jelátvitelben lehet szerepe (Yang és mtsai, 2001). Kék fény hatására a cry2 mennyisége csökken, míg a cry1 fehérje szintje nem változik, valószínűleg ezért fontosabb a cry2 szerepe alacsony, míg a cry1-é inkább magasabb fényintenzitáson. Állatokban a kriptokrómoknak egyértelműen a cirkadián ritmus kialakításában van szerepe (Cashmore és mtsai, 1999; Young és Kay, 2001). *Arabidopsis*-ban fontos szerepet játszanak a de-etiolációban, a virágzásban, a cirkadián óra beállításában és a fényindukált génexpresszió irányításában (Lin, 2002, Cashmore és mtsai, 1999; Guo és mtsai, 1998). Érdekes tény, hogy a jelátviteli elemek azonosítása érdekében tett jelentős erőfeszítések ellenére eddig mindössze egy kriptokróm-specifikus jelátviteli elemet találtak (Moller és mtsai, 2003), így ezekről a szignálátviteli utakról viszonylag keveset tudunk. Ennek az információhiánynak több oka is lehet, de a legvalószínűbb magyarázat a magas fokú genetikai redundancia, esetleg a fitokrómok és kriptokrómok jelátviteli útjai közötti konvergencia (Lin és Shalitin 2003). Ez utóbbi feltételezést támasztják alá többek között az e fotoreceptorok kapcsolatáról szóló beszámolók: a fitokróm B és a cry2 megfigyelt sejtmagi kolokalizációja (Más és mtsai, 2000); a fitokróm D és a cry1 funkcionális interakciója (Hennig és mtsai, 1999b); a cry1 és a cry2 fotoreceptorok fitokróm A általi foszforilációja *in vitro* (a cry1 vörös fényben *in vivo* is foszforilálódik) (Ahmad és mtsai, 1998).

2.1.2.2 *A fototropinok*

Az *Arabidopsis cry1/cry2* dupla mutánsban a növények kék fény hatására bekövetkező tropizmusa még mindig megfigyelhető volt, így logikusnak tűnt további fotoreceptorok keresése, melyek a tropizmusok szabályozásában játszanak szerepet. Ennek a munkának az eredménye az *nph1* (nonphototropic hypocotyl) mutáns izolálása, amelyben a fény hatására bekövetkező hipokotil ill. gyökérgörbülés folyamata sérült (Liscum és Briggs, 1995). Ugyanez a munkacsoport azonosította és jellemezte a mutációért felelős gént is (Huala és mtsai, 1997, Christie és mtsai, 1998). Ennek a génnek a szekvenciáját felhasználva azonosítottak egy fehérjét, amely aminosav szinten 58%-ban egyezik és 67%-ban hasonlít az NPH1-hez, ezért NPL1-nek (NPH1 like) nevezték el (Jarillo és mtsai, 1998). Az *npl1* mutáns vizsgálata során kiderült, hogy a fehérje a magas intenzitású kék fény hatására bekövetkező kloroplasztisz elmozdulást szabályozza (Jarillo és mtsai, 2001a; Kagawa és mtsai, 2001). A

két fotoreceptor funkciója a sztómanyítás szabályozásában és a magas fényintenzitáson történő fototropizmus irányításában redundáns, de alacsonyabb fényintenzitáson az NPH1 játszik fontosabb szerepet (Fankhauser és Staiger, 2002).

Mivel ezeknek a géneknek több homológja is ismert volt más növényi rendszerekből, ezért a nevezéktanukat egységesítették: az *NPH1* a *PHOT1* nevet kapta, az *NPL1* pedig a *PHOT2*-t (Briggs és mtsai, 2001). Meghatározták azt a négy ismérvet, amelyek alapján egy fotoreceptort fototropinnak (PHOT) nevezhetünk:

- (I) Két LOV (light oxygen voltage) domén jelenléte az N-terminális részen, amelyek mindegyike a kromofórként funkcionáló FMN (flavin mononukleotid) csoportot köti (Christie és mtsai, 1999). (A LOV domén olyan típusú PAS domén, amelyet gyakran találhatunk különböző környezeti jeleket érzékelő fehérjékben.)
- (II) Szerin/treonin-típusú protein kinázdomén a C-terminálisukon.
- (III) Fény hatására bekövetkező autofoszforyláció.
- (IV) Flavin C(4a)-ciszteinhíd keletkezése fény hatására, majd lebomlása sötétben.

A fototropin irányította jelátvitelről viszonylag keveset tudunk. Eddig három jelátviteli elemet írtak le, ezek: NPH3 (Motchoulski és Liscum, 1999); RPT2 (Sakai és mtsai, 2000); ARF7 (Harper és mtsai, 2000). A fototropinok ugyan nem vesznek részt olyan kriptokrómok és fitokrómok által irányított folyamatokban, mint a de-etioláció, a virágzás indukálása vagy a cirkadián óra fény általi szabályozása, azonban valószínű, hogy létezik kapcsolat a fototropinok és a fitokrómok szignálátvitel között (Fankhauser és Staiger, 2002). A feltételezett kapcsolatra utal az a megfigyelés, hogy a kék fény hatására bekövetkező fototropizmus mértékét növeli a fénykezelés előtt adott vörös fényimpulzus (Stowe-Evans és mtsai, 2001).

2.1.3. Vörös fényreceptorok

2.1.3.1 A vörös fény receptorai a fitokrómok

A XX. század 30-as éveiben fedezték fel azt, hogy a vörös fény serkenti, a távoli vörös fény pedig gátolja a salátamagvak csírázását (Flint, 1936). Annak felfedezése azonban, hogy a vörös fénykezelés hatását a távoli-vörös megvilágítás megszünteti és viszont, még éveket kellett várni (Borthwick és mtsai, 1952). A salátamagvak csírázását az utoljára kapott fényimpulzus hullámhossza határozza meg: ha vörös (~600-700 nm) volt ez az impulzus, akkor csíráztak, ha távoli-vörös (~700-750 nm), akkor nem, függetlenül attól, hogy előzőleg hány alkalommal váltogatták a fényimpulzusokat. Ez a vörös/távoli-vörös fotoreverzibilitás lett a klasszikus fitokróm-közvetítette válaszok védjegye. A fitokrómok kutatásának kezdeti szakaszát a fitokróm-specifikus válaszok leírása jellemezte, majd az 1960-as, 1970-es években spektrofotometriai mérések révén jöttek rá arra, hogy a fitokrómok két – fiziológiailag aktív és inaktív – formában léteznek. A következő jelentős áttörés az 1970-80-as években következett be, amikor kimutatták, hogy a növényekben két különböző típusú fitokróm található, az I-es típusú, amely fényben gyorsan elbomlik (akár 1 órás féléletidővel), és a fényben stabil, II-es típusú (Furuya, 1989; Furuya és Schäfer, 1996). A következő fontos lépés a fitokróm-kutatás terén a fitokrómokat kódoló gének azonosítása és izolálása volt. A sokféle szervezetből azonosított fitokrómok nevezéktanát egységesítve sikerült a szerteágazó kutatási eredményeket egymással összehasonlíthatóvá tenni (Quail és mtsai, 1994).

Arabidopsis-ban a fitokrómokat egy kis öttagú géncsalád kódolja, melynek tagjai a *PHYA, B, C, D, E* nevet kapták (Sharrock és Quail, 1989; Clack és mtsai, 1994). Az egyes gének által kódolt fehérjék nagyon hasonlítanak egymásra, szerkezetük, doménjeik is megegyeznek, de a meglévő különbségek egyben eltérő funkciókkal ruházzák fel őket. A *phyA* bizonyult az ún. I-es típusú fitokrómnak: mivel fényben gyorsan elbomlik, főleg az etiolált növényben játszik szerepet a csírázás megindításában és a de-etiolációban. A II-es típusú fitokróm-készletet a többi (*PHYB-E*) gén terméke alkotja, ezek fényben stabil molekulák, a zöld növények domináns fitokrómjai, amelyek szabályozzák többek között a szár megnyúlását, az árnyékelkerülést, a virágzást. Az egyes fitokrómok egymáshoz viszonyított aránya etiolált csíranövényben: $phyA:phyB:phyC:phyD:phyE = 85:10:2:1.5:1.5$. A folyamatos fényen nőtt csíranövényekben a *phyA* jelentős része lebomlik, a többi fitokróm mennyisége azonban nem változik jelentősen, így a fenti arány módosul: 5:40:15:15:25 (Sharrock és Clack, 2002).

Látható, hogy az etiolált növények legabundánsabb, vörös fény érzékelésért felelős fotoreceptora a phyA, míg a fényen nőtt növényeké a phyB. A fitokrómok szerepe a növények élete során túlságosan szerteágazó ahhoz, hogy e dolgozat keretein belül annak minden aspektusát érintsem. Az alábbi felsorolás számba veszi mindazokat a fotomorfogénikus folyamatokat, amelyekben a fitokrómok szerepét jelentősnek találták. Ezeket a folyamatokat természetesen nemcsak a fitokrómok szabályozzák, hanem a kriptokrómok és a hormonok szerepe is kimutatható.

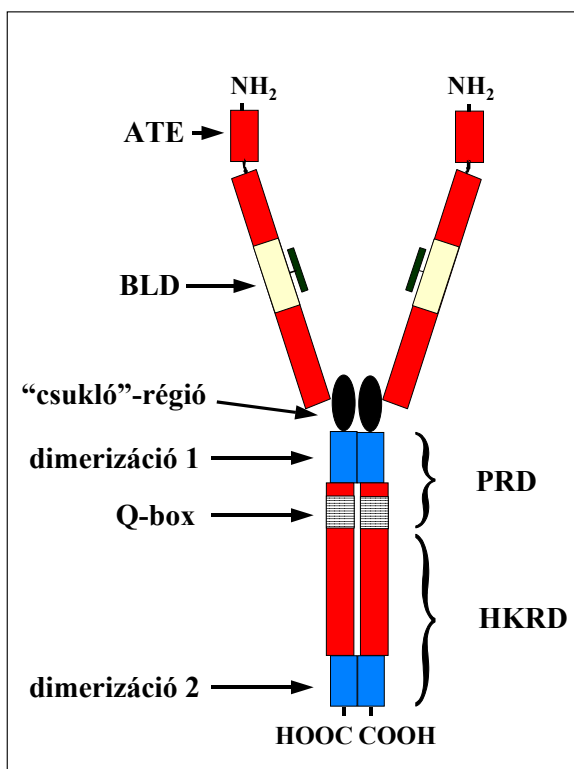
- (I) Csírázás: vörös fényben a *PHYB* szerepe tűnik dominánsnak, távoli vörös fényben pedig a *PHYA*-é, de újabban a *PHYE* szerepét is megfigyelték (Hennig és mtsai, 2002).
- (II) De-etioláció: a de-etioláció során az egyik legkönnyebben mérhető morfológiai jelleg a hipokotilhossz változása. A hipokotil megnyúlásának fény általi gátlásában bekövetkezett sérülés vezetett a *PHYA* és *PHYB* fotoreceptor-mutánsok mellett több jelátviteli komponens azonosításához is. Alacsony vörös és távoli-vörös fényintenzitáson a phyA, magasabb vörös intenzitáson pedig a phyB a de-etioláció domináns fotoreceptora. A többi fitokróm szerepe ezeknél jóval kisebb (egyszeres mutánsaik fenotípusa alig észrevehető), de nagyon jelentős a kriptokrómok és különböző növényi hormonok hozzájárulása és komplex interakciója (Sullivan és Deng, 2003).
- (III) Árnyékelkerülés: árnyék hatására az árnyékot elkerülő növényeken (ilyen az *Arabidopsis* is) a növekedés gyorsulása, oldalhajtások számának csökkenése, erős apikális dominancia, kisebb méretű levelek fejlesztése, korai virágzás és termésérés figyelhető meg. Az árnyék érzékelése a természetben legtöbbször a szomszédos növények jelenlétének érzékelését jelenti. A mechanizmus alapja az, hogy a fotoszintetikus pigmentek a vörös és távoli-vörös hullámhossztartományt eltérően nyelik el, így a növény érzékeli tudja, ha a szomszédos növényekről visszaverődő vagy azokon átszűrődő fény távoli-vörös összetétele megnő. Ennek érzékelésében a phyB a domináns fotoreceptor, de újabban a phyD és phyE szerepét is kimutatták (Sullivan és Deng, 2003).
- (IV) Virágzásindukció: az *Arabidopsis* fakultatív hosszúnappalos növény, amelynél a virágzást a 12 óránál hosszabb nappal váltja ki. A rövid nappalon nevelt növények virágzásának kiváltására akár egyetlen hosszú nappal is elegendő. Nem induktív

viszonyok között a virágzás repressziójában szintén a phyB a domináns gátló fotoreceptor (Mouradov és mtsai, 2002).

- (V) A cirkadián óra beállítása: a cirkadián óra olyan endogén molekuláris mechanizmus, amely autonóm módon képes hozzátévelegesen 24 órás ritmusok kialakítására és fenntartására. A ritmusok fázisát bizonyos külső környezeti hatások képesek pontosan hozzáigazítani a napszakok váltakozásához. Erről a folyamatról a 2.2.5 fejezetben bővebben lesz szó. A kriptokrómok, valamint a *PHYA*, *PHYB*, *PHYD*, és *PHYE* órabeállító szerepét már bebizonyították (Somers és mtsai.,1998; Devlin és Kay, 2001).

2.1.3.2 A fitokrómok felépítése és működése

A fitokrómok két ~125 kDa-os monomerből álló homodimer formájában működnek a növényi sejtekben. A monomerek egy konzervált helyzetű cisztein aminosavához tio-észter kötéssel kapcsolódik a kromofórként funkcionáló fitokromobilin. A fitokróm molekula vázlatos szerkezetét a 2.1 ábra mutatja be.



2.1 ábra A fitokróm fotoreceptorok vázlatos szerkezete

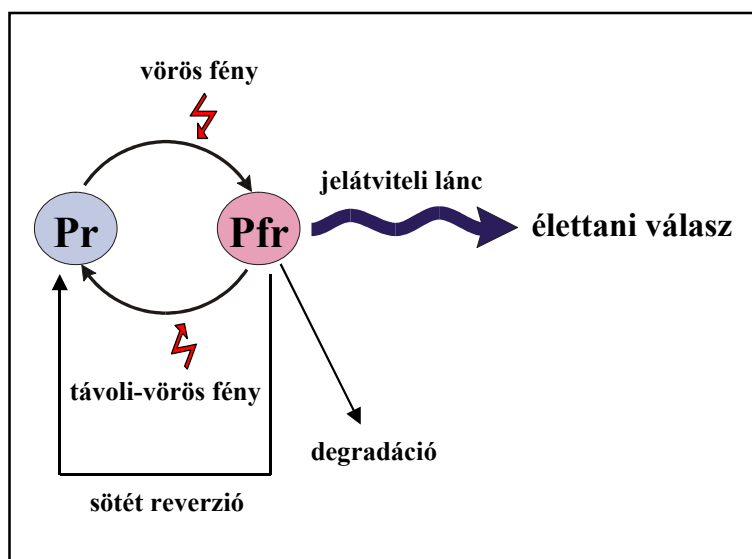
Az ábra a fitokrómok eddig azonosított főbb szerkezeti egységeit Nakasako és mtsai, 1990; Fankhauser, 2001, közleményei alapján tünteti fel. A fekete téglalapok a kromofórokat jelölik, bővebb magyarázatot lásd a szövegben.

A molekula hozzávetőlegesen 60 kDa méretű N-terminális fele hordozza a kromofórt kötő cisztein aminosavat, így ez a része felelős a fényérzékelésért. Ebben a régióban található a körülbelül 200 aminosav hosszúságú ún. BLD (bilin lyase domain), amely a kromofór autokatalitikus megkötésben játszik főszerepet. Kiemelkedő fontosságú a molekula N-terminálisának első 60 aminosavnyi szakasza (ATE: amino-terminal extension), amely a különböző fitokrómok körében nagyfokú változatosságot mutat. A térszerkezet-vizsgálatok szerint az aktív állapotú fehérjékben ez a régió visszahajolva a kromofór közvetlen környezetébe kerül. Ez lehet az oka annak, hogy a különböző fitokrómok – annak ellenére, hogy azonos kromofórt kötnek – eltérő abszorpciós tulajdonságokkal rendelkeznek (Song, 1999). Az N-terminális részt a C-terminálishoz az úgynevezett “csukló”- (“hinge”) régió köti, amely proteáz-emésztésre különösen érzékeny. A C-terminálison találjuk meg az ún. regulátor domént (Q-box, Quail és mtsai, 1995), amely valószínűleg a fitokróm-specifikus jelátviteli lánc aktiválásában játszik szerepet. Ennek – a különböző fitokrómok körében nagyon konzervált szakasznak – a mutációi jelátvitelben sérült molekulát eredményeznek (Quail és mtsai, 1995). A C-terminálison találjuk a két dimerizációs domént, amelyek a monomerek összekapcsolódásáért felelősek. Az ábrán bejelöltünk még két régiót, amelyek az előbb említetteket átfedik. A PRD (PAS-related domain) két PAS-domén-szerű régiót tartalmaz, ezek a struktúrák a protein-protein kapcsolatok fenntartásában játszhatnak szerepet, így feltételezhető, hogy ez a régió felelős a fitokrómnak a jelátviteli partnereivel létesített közvetlen interakcióiért (Fankhauser, 2001). A HKRD (histidine kinase-related domain) a fitokrómoknak, a bakteriális hisztidin kinázokhoz hasonló szakasza (Schneider-Poetsch, és mtsai, 1991).

Régóta ismert, hogy a fitokrómok két, spektroszkópiailag különböző formában léteznek (Schäfer és mtsai, 1972). Arra is fény derült, hogy ezeknek a formáknak a biológiai aktivitása különböző, és egyfajta biológiai “kapcsolóként” át tudnak alakulni egymásba (Song, 1999). A fitokrómok biológiailag inaktív, ún. Pr formában szintetizálódnak, amelynek elnyelési maximuma a vörös hullámhossz-tartományban ($\lambda_{\max}=660$ nm) van. A foton elnyelésével a molekula szerkezete megváltozik, kialakul az ún. Pfr forma, amely a fitokróm fotoreceptorok biológiailag aktív formája, így a jelátviteli utak kiindulópontja (2.2 ábra). Ennek a formának az abszorpciós maximuma a távoli-vörös hullámhossz-tartományba esik ($\lambda_{\max}=730$ nm), és foton elnyelésével visszaalakul Pr formává, azaz inaktiválódik. Ez a jelenség a fotokonverzió. A különböző formák egymásba alakulása újra és újra megtörténhet. A Pfr forma fény hatása nélkül is átalakulhat Pr formává: ezt a jelenséget sötét reverziónak

nevezzük, melynek sebessége minden fitokróm esetében más és más. A Pfr forma megszűnésének harmadik módja a lebomlás: phyA esetében a Pfr forma sokkal instabilabb a Pr-nél (Quail és mtsai, 1973; Hennig és mtsai, 1999a), így e fotoreceptor esetében a degradációnak jelentős szerepe van a biológiailag aktív forma eltávolításában. Fontos megjegyeznünk, hogy a Pr és Pfr formák nem csak térszerkezetükben, hanem foszforilációs állapotukban is különböznek. Ebből a szempontból a legrészletesebben a zab phyA-t vizsgálták. E molekula N-terminálisának ATE részében 10 szerin aminosav található, amelyek közül a molekula amino-végétől számított hetedik szerin Pr és Pfr formában is foszforilált. A csukló-régióban található 599-es szerin azonban csak a Pfr formában foszforilált, így valószínű, hogy ennek a szerinnek a foszforilációja a jelátvitel fontos kezdeti lépése (Song, 1999).

A fitokróm-rendszer egyszerűsített vázlata a 2.2 ábrán látható. Szükséges megjegyeznem, hogy a valós kép ennél a vázlatnál sokkal árnyaltabb. A fitokróмок Pfr formái a távoli-vörös fénynél kisebb hatékonysággal ugyan, de elnyelik a vörös fényt is, így egy részük visszaalakul Pr formájúvá, míg a Pr forma a vörös fény hatására kisebb hatékonysággal a távoli-vörös fényt nyeli el. (Érdekes továbbá, hogy a fitokróмок mindkét formája kis mértékben a kék fényt is elnyeli (Mancinelli, 1994, Neff és mtsai, 2000).) Azt is megállapították, hogy vörös ill. távoli-vörös fény hatására a jelenlevő fitokróмокoknak csak bizonyos – a fitokróm típusától, az alkalmazott fény hullámhosszától és intenzitásától függő – hányada alakul át Pfr,



2.2 ábra A fitokróмок működésének egyszerűsített modellje

Magyarázatot lásd a szövegben (Bowler és Schäfer, 2002 után).

ill. Pr formává. Ezek a tényezők játszanak közre abban, hogy az aktuális fényviszonyoknak megfelelő dinamikus egyensúly alakul ki a Pr és Pfr formák arányában, amely minden fitokrómnál más és más. Az így kialakult arány az, amely a fiziológias válasz intenzitását, természetét meghatározza. Igaz tehát, hogy minden fitokróm valamilyen mértékben elnyeli a távoli-vörös és kék fényt is, de ennek fiziológias hatását egyedül a fitokróm-A esetében tapasztalták. (Egyetlen kivétel a phyE távoli-vörös érzékenységének megnyilvánulása a csírázás irányításában (Hennig és mtsai, 1999).) Ennek az oka az lehet, hogy a phyA molekulák Pfr formája fiziológiasan nagyon hatékony: nagyon nagy Pr/Pfr arány esetében is megfigyelhetők általa kiváltott élettani válaszok. Ezért bizonyul a phyA a nagyon alacsony fényintenzitás és a távoli-vörös fény érzékelésében domináns fotoreceptornak. Tovább árnyalja a képet az, hogy a laboratóriumi körülmények monokromatikus fényviszonyai helyett a természetben összetett fény éri a növényeket. A természetes fény vörös és távoli-vörös összetevői állandóan változnak. A fitokrómok Pr \leftrightarrow Pfr fotokonverziója így az aktuális fényviszonyok között tapasztalható vörös/távoli-vörös összetevők hányadosától függően alakítja ki az adott fényviszonyokra jellemző Pr/Pfr arányt. Egy nyári napon a direkt napsütésben a vörös/távoli-vörös fény hányadosának értéke nagy, tehát jelentős a Pfr fitokróm formák túlsúlya, míg sűrű lombkorona alatt, ahol a fény aránylag dúsabb a távoli-vörös összetevőben, ez a hányados sokkal kisebb, tehát a fitokrómok Pr/Pfr hányadosa nő (Genick és Chory, 2000).

A fitokróm-függő válaszok klasszikus felosztása a fény hullámhossza és intenzitása szerint történik. A VLFR (very low fluence response) típusú válaszokat a különösen kis intenzitású fény váltja ki. Jellemzője, hogy semmilyen besugárzással nem visszafordítható, mivel a kiváltásában főszerepet játszó phyA Pr formája igen széles elnyelési spektrummal rendelkezik, különleges érzékenységét pedig az adja, hogy a phyA-indukált válaszok kialakításához elég, ha a teljes phyA mennyiség 0.1%-a Pfr formába kerül (Shinomura és mtsai., 1996). Nagyobb fényintenzitás váltja ki a LFR (low fluence response) típusú válaszokat. Ezek a vörös/távoli-vörös fény általi fotoreverzibilitás szerint viselkedő klasszikus fitokróm-válaszok, mint például a bevezetőben említett salátamag-csírázás. Az ilyen típusú válaszokat főként a phyB közvetíti. A válaszok harmadik típusa a HIR (high irradiance response) nevet kapta, ezeket a kiváltó fény fajtája szerint vörös (R-HIR) vagy távoli-vörös (FR-HIR) típusba soroljuk. Közös jellemzőjük, hogy csak kellően magas intenzitású fény váltja ki őket, és nem mutatják a vörös/távoli vörös fotoreverzibilitás tulajdonságát. A fitokróm-válaszok típusainak összefoglalása a 2.1 táblázatban látható.

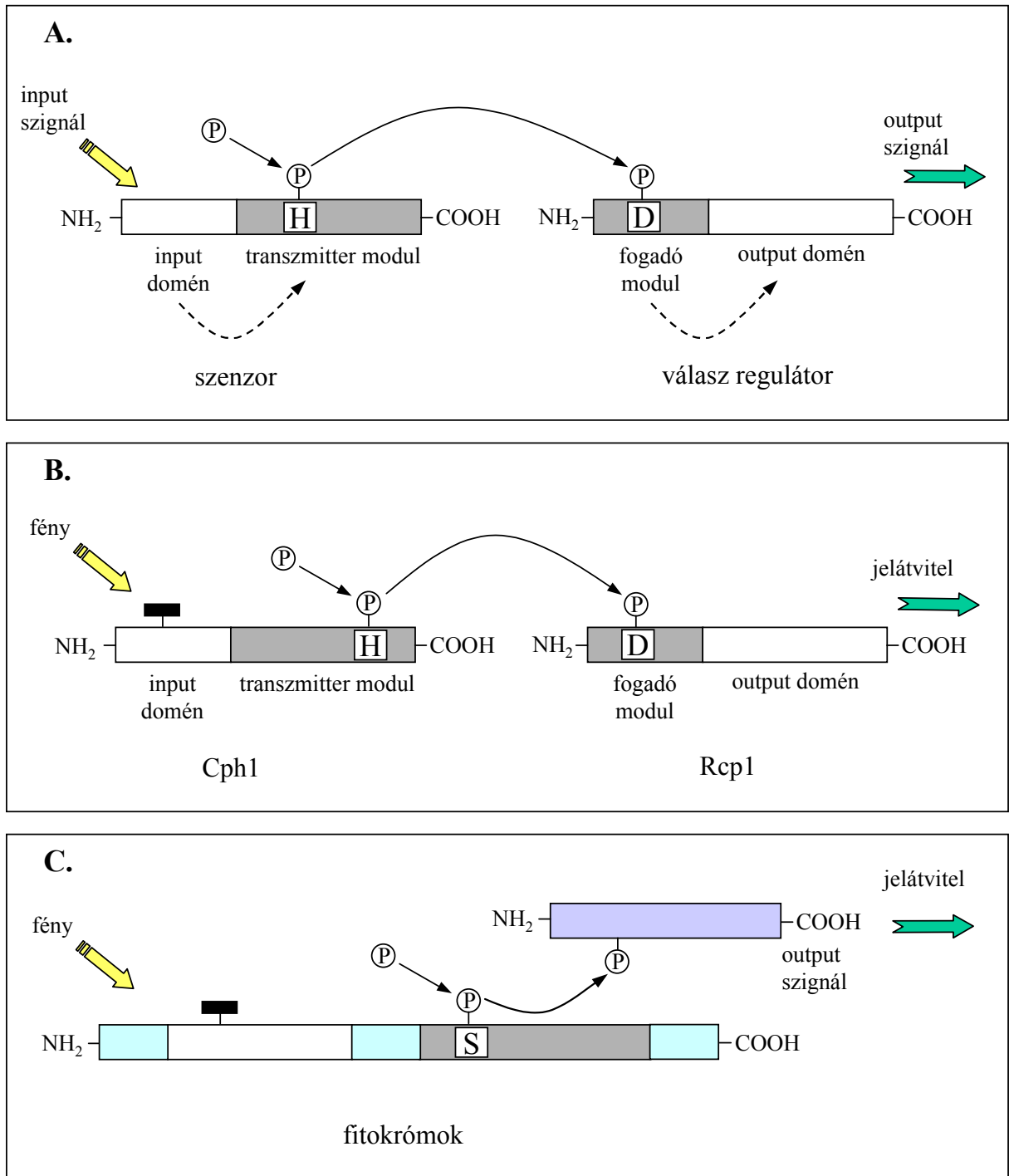
2.1 táblázat A fitokróm válaszok típusai

A részletes magyarázatot lásd a szövegben (Genick és Chory, 2000; Schäfer és Bowler, 2002 után)

A válasz típusa	Vörös fény hatása	Távoli-vörös fény hatása	közvetítő fitokróm	vörös/távoli vörös fotoreverzibilitás
VLFR	+	+	phyA	nem
LFR	+	–	phyB	igen
R-HIR	+		phyB	nem
FR-HIR		+	phyA	nem

Az 1990-es évek elején, amikor az első szekvenciaadatokat adatbázisokba kezdték rendezni, az akkor ismert fitokrómok szekvenciáját is összehasonlították a már ismert molekulákéval. Kiderült, hogy a fitokrómok C-terminális részén elkülöníthető egy domén, amely jelentős hasonlóságot mutat a bakteriális kétkomponensű jelátviteli rendszerek transzmitter egységének hisztidin kináz moduljával (Schneider-Poetsch, és mtsai, 1991). Egy tipikus bakteriális kétkomponensű (két proteinnél álló) jelátviteli rendszer az alábbi módon épül fel (2.3/A ábra). A szenzor fehérje N-terminális szakasza az input domén (érzékelő egység), ez fogja fel az adott környezeti jelet. A molekula C-terminálisán található transzmitter modul képes arra, hogy egy konzervált helyzetű hisztidin aminosavat foszforiláljon a modulon belül. A másik fehérje az ún. válasz (reszponz) regulátor, amelynek N-terminálisán található a fogadó (receiver) modul, amelynek konzervált helyzetű aszparaginsav aminosavjára kerül a transzmitter modul hisztidin aminosavjáról a foszfátcsoport. Ezzel kerül át a szenzor által érzékelt jel a reszponz regulátor komponensre, amelynek C-terminálisán található output (kimeneti) domén képes további komponensek vagy célgének működését szabályozni (Parkinson és Kofoid, 1992). Bár a jel típusa és továbbításának módja általánosan elterjedt az élővilágban, a rendszer specificitását a szenzor adott jellel szembeni specifikus érzékenysége és a transzmitter modul – fogadó modul közötti specifikus kapcsolat biztosítja.

A fitokrómok szerkezetében egyfajta hasonlóság felfedezhető a bakteriális szenzorokhoz (N-terminális – érzékelő egység; C-terminális – transzmitter modul), ezért az ezirányú vizsgálatok tovább folytak: a *Synechocystis* nevű prokarióta kéalgában azonosítottak egy fitokróm-szerű molekulát, amely a Cph1 (cyanobacterial phytochrome 1) nevet kapta. Az N-terminális szakasza a fitokrómok N-terminálisához (36% aminosav egyezés, és 60% hasonlóság), C-terminálisa pedig a bakteriális szenzorok transzmitter moduljához és a fitokrómok C-terminálisához (20% aminosav egyezés és 52% hasonlóság)



2.3 ábra A fitokrómok és a bakteriális két-komponensű kinázrendszer hasonlósága.

A. A bakteriális két-komponensű kinázrendszer vázlatos felépítése (Parkinson és Kofoid, 1992). A körbe foglalt P betű a foszfátcsoportot szimbolizálja, a nyilak pedig a foszforilálási reakciókat. A szaggatott nyilak az információ áramlását szemléltetik a molekulák részei között. **B.** A *Synechocystis* fitokrómja (Cph1), mint kináz (Yeh és mtsai, 1997). **C.** A magasabb rendű növények fitokrómja kinázként is működik (Yeh és Lagarias, 1998; Fankhauser és mtsai, 1999). A részletes magyarázatot lásd a szövegben. A fekete színű vízszintes téglalapok a kromofórt szimbolizálják. H: hisztidin, D: aszparaginsav, S: szerin

hasonlít. A Cph1 képes a fitokromobilin autoligációjára és vörös/távoli-vörös fény indukálta reverzibilis fotokonverzióra. A fehérje C-terminálisa fényfüggő módon (Pr formában) autofoszforilál egy hisztidin aminosavat és a foszfátcsoportot egy másik fehérje aszpartát aminosavára továbbítja. A kutatók ezt a rezponzregulátor-típusú fehérjét is azonosították, és az Rcp1 (response regulator for cyanobacterial phytochrome 1) nevet kapta (Yeh és mtsai, 1997). A prokarióták ősi fitokrómrendszerének vizsgálata tehát a fitokrómok kináz voltát erősítette meg (2.3/B ábra). Nem váratott sokat magára az a felfedezés, hogy az eukarióta fitokróm is képes kinázként működni. A molekuláris szintű hasonlóság mellett jelentős különbség a *Synechocystis* Cph1 és a zab phyA molekulája közt, hogy míg az előbbi Pr formában hisztidin és aszparaginsav aminosavakat, addig az utóbbi Pfr formában szerin és treonin aminosavakat foszforilál (Yeh és Lagarias, 1998).

Mivel az imént említett kísérletekben a fitokróm kinázaktivitásának vizsgálatakor nem valós szubsztrátokat használtak, megindult azoknak a fehérjéknek a keresése, amelyeket a fitokróm valóban foszforilál. Hamarosan igazolták, hogy a cry1 és cry2 fotoreceptorokat a phyA *in vitro* foszforilálja, és a cry1 protein *in vivo* foszforilálása vörös fényben nagyobb mértékű (Ahmad és mtsai, 1998). Nem kellett sokáig várni egy specifikusan fitokróm-foszforilálás révén működő jelátviteli elem felfedezésére sem: a PKS1 (phytochrome kinase substrate 1) fehérjét Fankhauser és mtsai (1999) izolálták. Ez a protein képes *in vitro* kapcsolódni a phyA és phyB fotoreceptorok C-terminálisának HKRD részéhez (l. 2.1 ábra) és bár ez az interakció független a fotoreceptor Pr/Pfr konformációjától, a zab phyA fotobiológiailag aktív (Pfr) formában nagyobb mértékben foszforilálja a PKS1-et (2.3/C ábra). Azt is kimutatták, hogy a fitokróm 599-es helyzetű szerinjének lizinre cserélésével a fényindukált autofoszforiláció és PKS1 foszforiláció megszűnik. Mivel a PKS1 túltermelése a fitokróm-specifikus hipokotilmegnyúlás gátlásának zavarát okozza, ezért a PKS1 a fitokróm-specifikus jelátviteli utak gátló regulátorának tűnik. A PKS1-hiányos antiszensz növények nem mutatnak fitokróm-specifikus fenotípust: ennek az oka funkcionális redundancia lehet, azaz más PKS1 szerepű molekulák is működhetnek a fitokróm-specifikus jelátviteli utokban (Fankhauser és mtsai, 1999).

2.1.3.3 A fitokróm-specifikus jelátvitel

A fitokróm-specifikus jelátviteli komponensek vizsgálatát alapvetően négy különböző módszerrel végezték. A következőkben ezeket fogom röviden áttekinteni.

Az élettani megközelítések során a fitokrómok működésével kapcsolatos gyors válaszokat azonosították és jellemezték. Kimutatták, hogy etiolált szövetekben a fitokrómok részt vesznek a fény hatására bekövetkező membránpotenciál-változások kialakításában (Racusen és Galston. 1983). Az is kiderült, hogy zöld növényekben, főleg zöldalgákban, az ionáramlás kiváltása mellett a kloroplasztiszok fény hatására bekövetkező viszonylag gyors elmozdulása is részben fitokrómok által irányított (Neff és mtsai, 2000).

A farmakológiai megközelítések lényege az volt, hogy a paradicsom fitokróm-mutáns egyedeinek a sejtjeibe különböző másodlagos átvivőanyagokat mikroinjektáltak és fitokróm-specifikus hatások megjelenését figyelték (Neuhaus és mtsai, 1993; Bowler és mtsai, 1994a). Kimutatták, hogy a membránkött heterotrimerikus G-protein szerepet játszik a fitokróm-specifikus jelátvitelben. Ezen a ponton a jelátviteli lánc két ágra szakad: az egyik a cGMP szint szabályozásán keresztül a CHS (chalcone synthase) expresszióját serkenti, a másik pedig a kalcium/kalmodulin szint befolyásolása révén szabályozza több gén, például a CAB (chlorophyll a,b-binding protein) expresszióját. Azt is kimutatták, hogy cGMP- és Ca^{2+} -specifikus szabályozó utak egymást negatívan szabályozzák, de együttesen represszálják az AS1 (asparagine synthase 1) gén működését és közösen játszanak szerepet a kloroplasztiszok fejlődésében (Bowler és mtsai, 1994b; Neuhaus és mtsai, 1997). Ezek a kutatások – annak ellenére, hogy egykor a figyelem középpontjában álltak és eredményeiket igen rangos tudományos szaklapok közölték – megtorpantak: további jelátvivő partnereket nem sikerült azonosítani és a később felfedezett fitokróm-specifikus jelátvitelben sérült mutánsok vizsgálatával nyert eredményeket nehezen lehet a mikroinjektációs kísérletek eredményeivel összefüggésbe hozni.

A genetikai alapú megközelítéssel olyan mutánsokat azonosítottak, amelyekben a fitokróm-válaszok sérültek. Mivel a teljes *Arabidopsis* genom szekvenálása befejeződött (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), kézenfekvő a mutánsok előállítására és egyszerű genetikai térképezésre ebben a könnyen kezelhető modellnövényben. Az *Arabidopsis* genomban különböző módon véletlenszerű mutációkat hoznak létre és bizonyos fotomorfojenikus jellegben sérült növényeket izolálnak. Ezekben a növényekben azután genetikai térképezéssel azonosítják a mutációt szenvedett gént, amelynek hibás működése az

adott jelátviteli út sérülését okozza. Az elsőként azonosított mutánsokat az alábbi két csoportba sorolták:

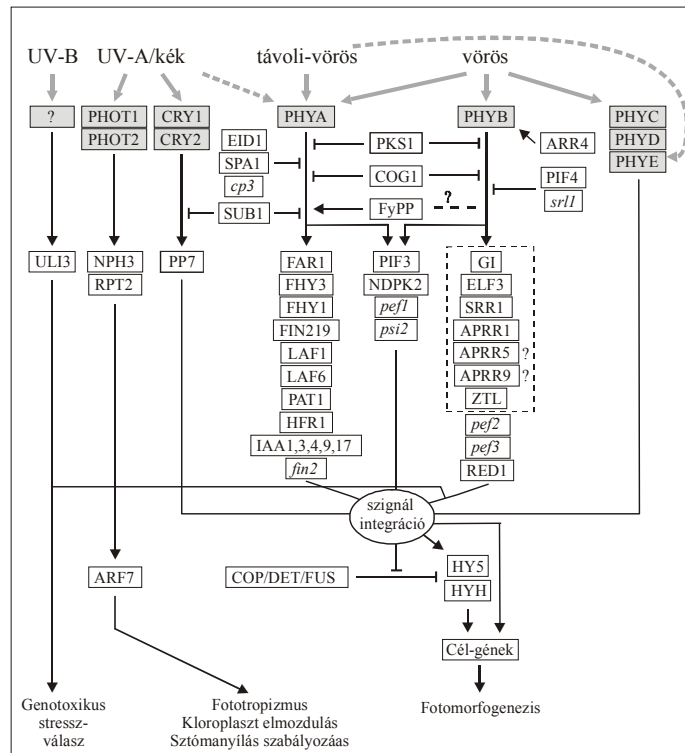
(I) Azok a növények, amelyek fényben nevelve úgy néznek ki, mintha sötétben nőttek volna. Ezekben a növényekben a fotomorfogenezis pozitív elemei sérültek. Egy részükről kiderült, hogy a fotoreceptor-gének funkcióvesztéses mutációja miatt nem érzékelik a fényt. Olyan mutánsokat is találtak, amelyekben a fitokrómok kromofórjának szintézise sérült (Parks és Quail, 1991; Whitelam és mtsai, 1993; Reed és mtsai, 1993; Parks és Quail, 1993; Wester és mtsai, 1994; Oyama és mtsai, 1997). Azonosítottak egy, a fotomorfogenezis fejlődésre pozitív hatású transzkripciós faktort, a HY5-öt (long hypocotyl 5). A *hy5* növények etiolált fenotípust mutattak, függetlenül a fény hullámhosszától (Koorneef és mtsai, 1980), tehát úgy tűnik, hogy ennek a bZIP típusú transzkripciós faktornak, amely a fényregulált gének egy részének promóterében levő ún. G-boxhoz kötődik, a fotomorfogenezis kialakításában központi szerepe van (Oyama és mtsai, 1997).

(II) A mutáns növények másik csoportjába azok tartoznak, amelyek fény hiányában is de-etiolált fenotípusúak. Ezek a csíranövények tehát úgy néznek ki, mintha állandóan fényben nőnének. A mutánskeresési erőfeszítések eredménye a COP (constitutive photomorphogenesis), a DET (de-etiolated) és a FUS (*fusca*) géncsaládok felfedezése (Chory és mtsai, 1989, 1991; Deng és mtsai, 1991; Wei és Deng, 1996). Ezek a gének olyan fehérjéket kódolnak, amelyek sötétben megakadályozzák a növények fotomorfogenezis fejlődését, így fenntartják a skotomorfogenezist. A fény ezt a gátlást kapcsolja ki, így a fotomorfogenezisre jellemző molekuláris folyamatok lejátszódása ezután nem ütközik akadályba. Jelenleg 11, a COP/DET/FUS csoportba tartozó gén ismert, fontosságukat mutatja, hogy teljes hiányuk letális (Wei és Deng, 1996; Hardtke és Deng, 2000). Ebből a csoportból a COP1 (FUS1) fehérje funkcióját ismerjük a legteljesebben. Kimutatták, hogy a COP1 fehérje egy E3 típusú ubiquitin ligáz-komplex részeként működik a sejtmagban és ennek a komplexnek a specificitását adja meg: segítségével történik a fotomorfogenezis pozitív komponenseinek ubiquitinnel történő megjelölése. Ezeknek a fehérjéknek a lebontása a COP9 szignálszóma közreműködésével a 26S proteaszóma révén következik be (Hardtke és Deng, 2000; von Arnim, 2000). (A COP9 szignálszóma onnan kapta a nevét, hogy alkotórészeit a *cop/det/fus* mutánsok izolálása során azonosították, mutációjuk konstitutív fotomorfogenezis kialakulásához vezet.) Megfigyelték, hogy a COP1 fehérjék közvetlen kölcsönhatása a HY5 fehérjékkel (Ang és mtsai, 1998) a HY5 molekulák ubiquitinációját eredményezi. Ezen mechanizmus révén történik meg a fotomorfogenezis egyik központi szerepű pozitív

faktorának COP1-függő lebontása sötétben, amely folyamat a szkotomorfogenikus fejlődés döntő fontosságú lépése. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, amely szerint a HY5 ugyanúgy felhalmozódik a *cop1* mutáns növények sejtmagjában sötétben, mind a vad típusú növényekében fényben (Hardtke és mtsai, 2000; Osterlund és mtsai, 2000a, 2000b). A COP1 ezen funkciójának uniformitására utal az a nemrégiben megjelent közlemény, amelyben feltárják a COP1 szerepét a LAF1 (long after far-red light 1) nevű, fotomorfogenezisre pozitív hatású transzkripciós faktor ubiquitinációjában (Seo és mtsai, 2003).

A fényben nőtt *hy5* mutáns növények vizsgálatakor megállapították, hogy azok nem teljesen etiolált fenotípusúak, ezért más HY5-szerű és szerepű molekulák létezését valószínűsítették. Ezek egyikének felfedezése a közelmúltban történt meg: a HYH (HY5 homolog), mint a neve is utal rá, egy HY5-höz hasonló szerkezetű transzkripciós faktor, amely szintén a promóterek G-box eleméhez kötődik. (A *hyh* mutáns hasonlít a *hy5*-höz, de a mutáció hatása kék fényben kifejezettebb, mint más hullámhossztartományban.) A HYH szintén közvetlen kölcsönhatásba kerül a COP1-el, amely részt vesz annak sötét-specifikus lebontásában. A HYH-HY5 funkcionális kölcsönhatás pedig a szabályozás egy újabb szintjére enged bepillantást (Holm és mtsai, 2002). A COP1 fehérje fény hatására kölcsönhatásba lép a *cry1* és a *cry2* fotoreceptorokkal, ez az interakció szerepet játszik a COP1 funkciójának gátlásában és a fényindukálható gének aktiválásában (Wang és mtsai, 2001; Yang és mtsai, 2001). Érdekes megfigyelés, hogy az imént említett kriptokróm-COP1 kapcsolat hatása csak átmeneti. Folyamatos fényben a COP1 inaktiválása annak sejtmagból történő eltávolítása révén valósul meg (Wang és Deng, 2003).

Az előzőkben bemutatott mutációk közös jellemzője, hogy hatásuk a növények fejlődésére nézve dramatikus és a mutáció által érintett gén a hatását (a fotoreceptor-mutánsok kivételével) a fény hullámhosszától független fényspecifikus jelátviteli utak késői szakaszában fejt ki. Jelenlegi ismereteink alapján ez nem véletlen: ez első mutánsokat izoláló kutatók a legszembetűnőbb fenotípusú egyedeket választották ki a további vizsgálatokhoz, és mivel a fényspecifikus jelátviteli utak felépítésében egyfajta konvergenciát figyelhetünk meg, általános hatású faktorokat találhatunk a jelátvitel késői szakaszában. A fotoreceptorok tehát ismereteink szerint sokféle jel forrásai egyidejűleg, az így kibontakozó jelátviteli utak részben egymástól függetlenül haladva, részben egymásra hatva konvergálnak egyfajta “szignál-integrációt” megvalósítva (Quail, 2002). A 2.4 ábra az ebben a jelátvitelben közreműködő komponensekről ad áttekintést. A bemutatott eredmények fiatal *Arabidopsis* csíranövények vizsgálatából származnak, és a de-etioláció vizsgálata nyomán születtek meg. Az ábrán



2.4 ábra A fotoreceptorok által irányított jelátvitel vázlata

A fényreceptorokat besötétített téglalapok szimbolizálják, az eddig nem azonosított UV-B receptor/receptorokat egyetlen idom jeleníti meg. A vastagabb szürke nyilak utalnak arra, hogy az adott receptor mely hullámhossztartományban érzékeny. A szaggatott nyíl az érzékelés kisebb élettani fontosságára utal. Az UV-B, UVA/kék fényreceptorok által irányított jelátvitel összes leírt komponensét feltüntettük; a PHYA- és PHYB-specifikus jelátviteli utak vizsgálata során szinte hetente azonosítanak újabb komponenseket, így ez a lista korántsem teljes. A különböző receptoroktól kiinduló jelátviteli utak egyes komponenseinek funkciójáról és a „szignál integráció” mechanizmusáról keveset tudunk, a COP/DET/FUS és HY5/HYH faktorok eddigi vizsgálata azonban feltárta a jelátviteli utak itt ábrázolt konvergenciáját. Az azonosított gének nevét nagybetűvel, a még csak mutánsként ismert komponensekét kis dőlt betűvel tüntettem fel. A merőleges vonalkában végződő vonal gátló hatást jelöl. Azok a komponensek, melyek működése a cirkadián órában is bizonyított, szaggatott vonallal vannak bekeretezve. További magyarázatot lásd a szövegben. Azok a komponensek, melyek teljes neve a szövegben vagy a Rövidítések jegyzékében említésre került, az alábbi felsorolásból hiányoznak:

APRR1/5/9, *Arabidopsis* pseudo-response regulator 1/5/9; ARF7, auxin response factor 7; COG1, cogwheel 1; cp3, compacta 3; EID1, empfindlicher im dunkelroten licht 1; ELF3, early flowering 3; FAR1, far-red impaired response 1; FHY 1/3, long hypocotyl in far-red light 1/2; FIN219, far-red insensitive 219; GI, gigantea; HFR1, long hypocotyl in far-red light 1; IAA1/3/4/9/17, indole-3-acetic acid response factor 1/3/4/9/17; PAT1, PHYA signal transduction 1; PSI2, phytochrome signalling 2; RED1, red light elongated; srl1, short hypocotyl in red light; SRR1, sensitivity to red light reduced 1; SUB1, short under blue light 1. ULI3, UV-B light insensitive 3. (Quail, 2002; Gyula és mtsai, 2003 után)

feltüntettem az UV-B, UVA/kék fényreceptor-specifikus jelátvitel eddig megismert komponenseit is, szemléltetendő a különböző jelátviteli utak viszonyát. A PHYC-, D-, E-, specifikus jelátvitel kutatása még gyermekcipőben jár. Ennek oka, hogy a vörös és távoli vörös fény-specifikus de-etiolációs folyamatok döntő többségének kialakításáért a PHYA és PHYB a felelős.

A molekuláris biológiai megközelítések lényege, hogy élesztő két-hibrid rendszer felhasználásával fitokrómokkal kölcsönható fehérjéket keresnek, remélve, hogy így a jelátvitel korai szakaszára derülhet fény. Mivel a fitokrómok az élesztő két-hibrid rendszerben nem a valós kölcsönható partnerekkel lépnek kapcsolatba (transzaktiválnak), a molekuláris partner keresését a fitokrómok gondosan kiválasztott doménjaival végezték. A “csalínak” használt szakaszok kivétel nélkül a C-terminális régióból kerültek ki, hiszen az addigi eredmények azt mutatták, hogy a molekula ezen része játszik szerepet a jelátvitelben. Ez nem a legjobb megoldás, hiszen egyrészt a phyA és phyB C-terminálisának a funkciója annyira hasonló, hogy akár fel is cserélhetők (Wagner és mtsai, 1996). Másrészt az N-terminális és a hozzá kötött kromofór figyelmen kívül hagyása a fitokróm működésében döntő szerepet játszó Pr–Pfr formák kialakulását teszi lehetetlenné. A meglevő módszertani problémák ellenére találtak olyan kölcsönható partnereket, amelyeknek a fitokróm-specifikus jelátvitelre tett *in vivo* hatását igazolták, illetve mutációjuk fitokróm-specifikus fenotípust okozott. A jelenleg ismert kölcsönható partnerek főbb tulajdonságait a 2.2 táblázat foglalja össze. A következőkben azt a négy proteint vesszük sorra, amelyet kifejezetten a fitokrómokkal létrejövő kapcsolatuk révén azonosítottak ill. jellemeztek. Azokat, amelyeket más jellegű munkák során azonosítottak és később igazolták interakciójukat a fitokrómokkal, csak a 2.2 táblázatban említem.

A **PKS1** fehérjéről és annak a fitokróm-kináz rendszer működésében betöltött szerepéről a dolgozat korábbi részében már volt szó (2.1.3.2 fejezet).

Az **NDPK2** (nukleotid diphosphate kinase 2) aktivitása megnő, ha kölcsönhatásba kerül a phyA Pfr formájával. Meghatározták azt is, hogy a phyA PAS doménjének van szerepe az NDPK2-vel való kölcsönhatásban. Az NDPK2 fehérje hiánya igen enyhe fenotípust okoz: érdekes módon mind a phyA-, mind a phyB-specifikus de-etiolációt csökkenti, tehát pozitív faktorról van szó (Choi és mtsai, 1999). Ezekon az adatokon túl azonban semmit nem tudunk az NDPK2 hatásmechanizmusáról és a jelátvitelben betöltött szerepéről.

2.2 táblázat Az eddig azonosított fitokrómokkal kölcsönhatásba kerülő fehérjék (Schäfer és Bowler, 2002)

A rövidítések magyarázata: Y2H: élesztő két-hibrid rendszer; Co-IP: koimmunoprecipitáció; IvB: *in vitro* kötési kísérlet; N: sejtmagi lokalizáció; C: lokalizáció a sejt plazmában; ARR4: *Arabidopsis* response regulator 4; Aux/IAA: auxin/indoleacetic acid; ELF3: early-flowering 3; NDPK2: nukleotid diphosphate kinase 2; PIF3-4; phytochrome interacting factor 3-4; ZTL/ADO: zeitlupe/adagio.

Kölcsönható partner	A kölcsönhatás vizsgálata	A kölcsönható fitokróm	A fitokróm konformációja	A faktor lokalizációja	Feltételezett szerep	Hivatkozás
ARR4	Y2H, Co-IP, IvB	phyB	Pr, Pfr	N, C	phyB pozitív regulátora	Sweere és mtsai, 2001
Aux/IAA	IvB	phyA	Pr, Pfr	N	kapcsolat az auxin vezérelt jelátvitel felé	Colón-Carmona és mtsai, 2000
Cry1	Y2H, IvB	phyA	?	N	fotoreceptorok közös hatása	Ahmad és mtsai, 1998
Cry2	Co-IP, FRET	phyB	?	N	fotoreceptorok közös hatása	Más és mtsai, 2000
ELF3	Y2H, IvB	phyB	Pr, Pfr	N	phyB pozitív regulátora a cirkadián órában	Liu és mtsai, 2001
NDPK2	Y2H, IvB	phyA	Pr < Pfr	N, C	phyA és phyB pozitív regulátora	Choi és mtsai, 1999
PIF3	Y2H, IvB	(phyA<) phyB	Pfr	N	(phyA és) phyB pozitív regulátora	Ni és mtsai, 1999
PIF4	IvB	phyB	Pfr	N	phyB negatív regulátora	Huq és Quail, 2002
PKS1	Y2H, IvB	phyA, phyB	Pr, Pfr	C	phyB negatív regulátora	Fankhauser és mtsai, 1999
ZTL/ADO	Y2H	phyB	?	N, C	phyB és cry1 pozitív regulátora a cirkadián órában	Jarillo és mtsai, 2001

A **PIF3** bHLH (basic helix-loop-helix) típusú transzkripciós faktor, amely a phyB és phyA Pfr formájához képes kapcsolódni. Mivel e dolgozat témája a PIF3 működésének vizsgálata növényi rendszerben, a PIF3-ról összegyűlt, a munkánk kiindulásául szolgáló adatok külön fejezetben kerülnek bemutatásra (2.2 fejezet).

A **PIF4** (phytochrome interacting factor 4) fehérje erős homológiát mutat a PIF3-hoz. A PIF4 fehérje a phyB Pfr formájához kötődik, és a vörös fény specifikus hipokotilnövekedésgátlás negatív regulátora. A vizsgált fitokróm-specifikus fenotipikus jellegek közül a PIF4 megváltozott expressziós szintje csak a hipokotilhossz-változást érintette, így feltételezhető, hogy a phyB-függő sejtmegnyúlás szabályozásában van szerepe, valószínűleg gének kifejeződésének szabályozásával. A phyB–PIF4 kölcsönhatásának szerepe ebben a folyamatban egyelőre nem tisztázott (Huq és Quail, 2002).

A fitokróm-specifikus jelátvitelben sérült mutánsok és a fitokrómokkal kölcsönhatásba lépő partnerek vizsgálata egyre nagyobb mértékű betekintést enged a fény specifikus jelátvitelbe. Az eddig ismert elemeket és azok feltételezett helyét a fényfüggő jelátvitelben a 2.4 ábra mutatja be.

2.1.3.4 A fitokrómok sejten belüli lokalizációja

A fitokróm-specifikus jelátviteli utak vizsgálata mellett a fitokrómok sejten belüli lokalizációjának kérdése is állandóan foglalkoztatja a tudományos közvéleményt. A biokémiai és immunocitokémiai tanulmányok eredményei azt mutatták, hogy a fitokrómok – főleg a phyA – az etiolált növények sejtplazmájában egyenletesen oszlanak el (Pratt, 1994). Fénykezelés hatására a citoplazmában fitokróm-molekulákat tartalmazó, körülbelül 200 nm hosszúságú testecskék alakulnak ki, amelyeket SAP-nak (sequestered areas of phytochrome) neveztek el. Egyes elméletek szerint ezekben a testekben zajlik a phyA lebontása (Vierstra, 1994). A fitokrómok citoplazmatikus aktivitásának elméletét támasztották alá a mikroinjektációs kísérleti megközelítések is, hiszen ezek eredményei szerint a sejtmembránban elhelyezkedő heterotrimerikus G-protein, valamint másodlagos közvetítőanyagok (Ca^{2+} és cGMP) révén történik meg a fitokróm-specifikus jelátvitel. Az egyre koherensebbé váló kép ellenére ellentmondás volt tapasztalható ezen eredmények, illetve aközött a mind valószínűbbé váló lépés között, hogy a fitokróm-specifikus jelátvitel során bizonyos gének transzkripciójának megváltozása sejtmagi folyamatok lejátsszódását igényli (Nagy és Schäfer, 2000). Ennek az ellentmondásnak a feloldása – legalábbis részben – 1996-ban történt meg. Sakamoto és Nagatani, (1996) kimutatták, hogy a fényen nőtt *Arabidopsis* növények sejtmagjában megtalálható a phyB. Azt is megfigyelték, hogy a PHYB C-terminálisa gyenge NLS motívumot tartalmaz és a sejtmagban lokalizálódik. Ezeket a megfigyeléseket ugyanez a laboratórium további eredményekkel támasztotta alá: a phyB-GFP molekula funkcionális fotoreceptorként komplementálja a *phyB* mutáns fenotípust és fényfüggő sejtmagi lokalizációt mutat (Yamaguchi és mtsai, 1999). Ugyanebben az évben jelent meg egy másik közlemény, amelyben bizonyításra került, hogy nemcsak a phyB-GFP, hanem a phyA-GFP is funkcionális protein és lejátsszódik a fényfüggő (Pfr állapotú) sejtmagi transzlokációja (Kircher és mtsai, 1999). Megfigyelték azt is, hogy a phyA és phyB lokalizációs mintázata különböző. A phyB sejtmagi transzlokációja vörös/távoli-vörös reverzibilitást mutat. Vörös fény hatására a phyB-GFP kis fénylő testecskéket formál a sejtmagban, amelyek a mikroszkópban foltoknak látszanak. Sötétben ezek a foltok felbomlanak, majd a diffúz festődés is lassan eltűnik, bár a sejtmagok egy részében megmarad. A phyA-GFP molekulák sejtmagi transzlokációja és foltformálása a phyB-nél gyorsabb. Ezek vörös fényben rövid, távoli-vörös fényben viszont hosszú életűnek

bizonyultak. A sejtmagi transzlokáció és foltformálás phyB esetében LFR, phyA esetében pedig VLFR és FR-HIR típusú válasz, ami szoros összefüggést mutat ezeknek a fotoreceptoroknak a különböző fényválaszokban történő részvételével (l. 2.1 táblázat) (Nagy és Schäfer, 2000). Nemrégiben közölt eredmények szerint mind az öt *Arabidopsis* fitokróm (phyA-E) fényindukált sejtmagi transzlokációt és foltképződést mutat, utóbbit különböző kinetika, hullámhossz-, és fényintenzitás-függés, valamint diurnális (napszaktól függő) szabályozottság jellemzi. A jelátvitelben sérült fitokróm-mutánsok a fényfüggő sejtmagi transzlokáció ellenére foltformálásra képtelenek. Ebből a szerzők arra következtettek, hogy a sejtmagi komplexek fitokróm-specifikus dinamikája a fotoreceptorok különböző funkcióiból adódik, továbbá hogy a foltok megjelenése aktív fitokróm-specifikus jelátvitelre utal (Kircher és mtsai, 2002).

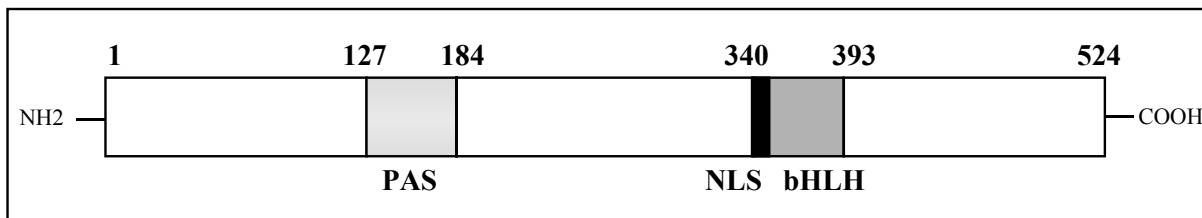
A fitokróm-specifikus jelátvitel új színterének, a sejtmagnak a bevonása a kutatásokba új típusú jelátviteli elemek azonosításának "létjogosultságát" hívta életre. Ennek egy 1998-ban megjelent közlemény (Ni és mtsai, 1998) adott új lendületet: bebizonyították, hogy a fitokrómok képesek a PIF3-mal, egy konstitutívan sejtmagi lokalizáltságú transzkripciós faktorról közvetlen kölcsönhatásba lépni. Valószínűsítették, hogy ezzel a fitokróm – a jelátviteli utak egy részét jelentősen megrövidítve – a fényjelet közvetlenül a transzkripciós komplexre juttatja. A következő fejezet azt foglalja össze, hogy munkánk megkezdése előtt milyen adatok álltak rendelkezésre a PIF3 transzkripciós faktorról.

2.2 A PIF3, mint a fényindukált génextpresszió egyik központi eleme

2.2.1 A PIF3 azonosítása és molekuláris szerkezete

A PIF3 (phytochrome interacting factor 3) volt az első protein, amelyet a fitokrómmal létrejövő kölcsönhatása alapján azonosítottak (Ni és mtsai, 1998). A fitokróm-B molekula teljes C-terminális darabját – amely tartalmazza a PAR és HKLD régiókat (l. 2.1 ábra) – használták élesztő két-hibrid rendszerben kölcsönható partnerek keresésére ("csaliként"). Az így azonosított fehérje 524 aminosavból áll és három jól körülhatárolható régiót tartalmaz (2.5 ábra). A legerősebb hasonlóságot már ismert fehérjékkel a bHLH (basic helix-loop-helix) fehérjemoitívum mutatja. Ennek bázikus aminosavakat tartalmazó része a molekula DNS kötésének a specificitásáért, míg a hélixek a dimerizációért felelősek. A PIF3-mat e motívum

megléte miatt a bHLH típusú transzkripciós faktorok családjába sorolták be, amelynek *Arabidopsis*-ban, a legfrissebb szekvenciaelemzések szerint, 162 tagja ismert (Bailey és mtsai, 2003).



2.5 ábra. A PIF3 fehérje vázlatos szerkezete

Részletes magyarázatot lásd a szövegben. A számok aminosav-pozíciókat jelölnek. PAS: Per/Arnt/Sim domén; NLS: nuclear localization signal; bHLH: basic helix-loop-helix domén. (Ni és mtsai, 1998).

A bHLH doménnel átfedésben található egy klasszikus felépítésű, két részből álló (ún. bipartite) NLS. Ez a nukleáris lokalizációs szignál lehet a felelős a PIF3 sejtmagba történő importjáért. A PIF3 sejten belüli lokalizációját heterológ rendszerben vizsgálták: PIF3-GUS fúziós fehérjéket expresszáltak hagyma epidermiszsejtekben. A fúziós fehérje jelenlétére utaló elszíneződést csak a sejtmagokban kaptak. A különböző fénykezeléseknek alávetett mintákban a PIF3 lokalizációja nem változott, amiből azt a következtetést vonták le, hogy a fitokróm-specifikus jelátvitel nincs hatással a PIF3 lokalizációjára.

A PIF3 harmadik azonosított motívuma a PAS domén, amely viszonylag kis fokú hasonlóságot mutat sok tipikus PAS domént hordozó molekula azonos régiójával, szekvencia-homológiáját viszont a fitokrómokon és a PAS névadó fehérjéken található motívummal kimutatták (Ni és mtsai, 1998). Feltételezték, hogy ennek a protein régióknak a PIF3 fehérje-fehérje kapcsolatainak kialakításában van szerepe (lásd: következő alfejezet).

2.2.2 A PIF3 kölcsönhatásba lép a fitokrómokkal és specifikus DNS-motívumhoz kötődik

A PIF3 protein kölcsönhatását a fitokrómokkal először élesztő két-hibrid rendszerben vizsgálták: a PIF3 kölcsönhatásba lép az *Arabidopsis* PHYA és PHYB, valamint a rizs PHYB C-terminális régiójával. Igazolták azt is, hogy a fitokrómok jelátvitelében központi szerepűnek gondolt regulátor domén (Q-box, Quail és mtsai, 1995) mutációi a PIF3 és a

fitokrómok közötti kapcsolat erősségét különböző mértékben csökkentik, vagy teljesen meg is szüntetik azt (Ni és mtsai, 1998). A PIF3 molekuláris kapcsolatait ezek után egy egyedülálló rendszerben vizsgálták: *in vitro* szintetizált PIF3 és fitokróm molekulákkal végeztek kötési kísérleteket. A kísérletek során kihasználták a fitokrómnak azt a tulajdonságát, hogy autokatalitikusan kötni képesek a kromofórt, így a reakcióelegyben lejátszódhat a Pr-Pfr konformációváltozásuk. Mesterséges volta ellenére ennek a rendszernek az az előnye, hogy a fitokrómok teljes hosszúságú formái is felhasználhatók, amelyek a PIF3-mal együtt élesztőben expresszáva transzaktiválást, vagyis nem specifikus kölcsönhatást adnak. Az első eredmények egyértelműek voltak: a PIF3 fehérje kötődik a teljes hosszúságú phyB-hez (Ni és mtsai, 1999). Azt is igazolták, hogy ez a molekuláris kölcsönhatás sokkal erősebb, ha a phyB a fotobiológiailag aktív, Pfr formában van jelen. A PIF3 azokkal a phyB molekulákkal, amelyek regulátor doménjükben mutációt tartalmaznak – az élesztő két-hibrid rendszerből származó adatokhoz hasonlóan – gyengébb kötést létesített, mint a vad típusú phyB-vel. Kimutatták azt is, hogy a PIF3 kötődik a teljes hosszúságú phyA molekulákhoz is: a Pfr formához erősebben, mint a Pr formához. Ennek a kötésnek az erőssége azonban körülbelül tízszer gyengébb, mint a PIF3 és a phyB közöttié (Zhu és mtsai, 2000). Megpróbálták meghatározni azt is – a PHYB, illetve a PIF3 különböző hosszúságú darabjait a teljes hosszúságú másik molekulával egy kötési kísérletben tesztelve – hogy a PHYB és a PIF3 mely részei játszanak döntő szerepet a két molekula közötti kötés kialakításában. A következőkben ennek a munkának az eredményeit tekintem át.

A PIF3 molekula különböző mértékben rövidített formáinak vizsgálatával megállapították, hogy a molekula N-terminálisának első 120 aminosava nem játszik döntő szerepet a phyB-vel kialakított kötésben. Ha azonban a PAS domént mutációval megváltoztatják, akkor a kötési erősség jelentősen csökken, eltávolítása esetén pedig megszűnik. Mivel a PAS domén általában fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításában vesz részt, ezért szerepe a PIF3 és phyB közötti interakcióban nem meglepő. Érdekes azonban, hogy ha a PIF3 C-terminálisának vége és a molekula bHLH doménja közötti szakaszt távolítják el, a kötés megszűnik, tehát ez a régió is részt vesz annak kialakításában (Zhu és mtsai, 2000). (Napjainkban egy érdekes közlés látott napvilágot. A szerzők a legújabb szekvenciaelemzési adatok alapján korábbi állításaikat bírálják felül és visszavonják a PIF3-ban és közeli homológjában, a PIF4-ben azonosított PAS domén meglétéről közölt korábbi adataikat. Ezzel nem tagadják ennek a régióknak a PIF3 fehérje molekuláris kapcsolataiban

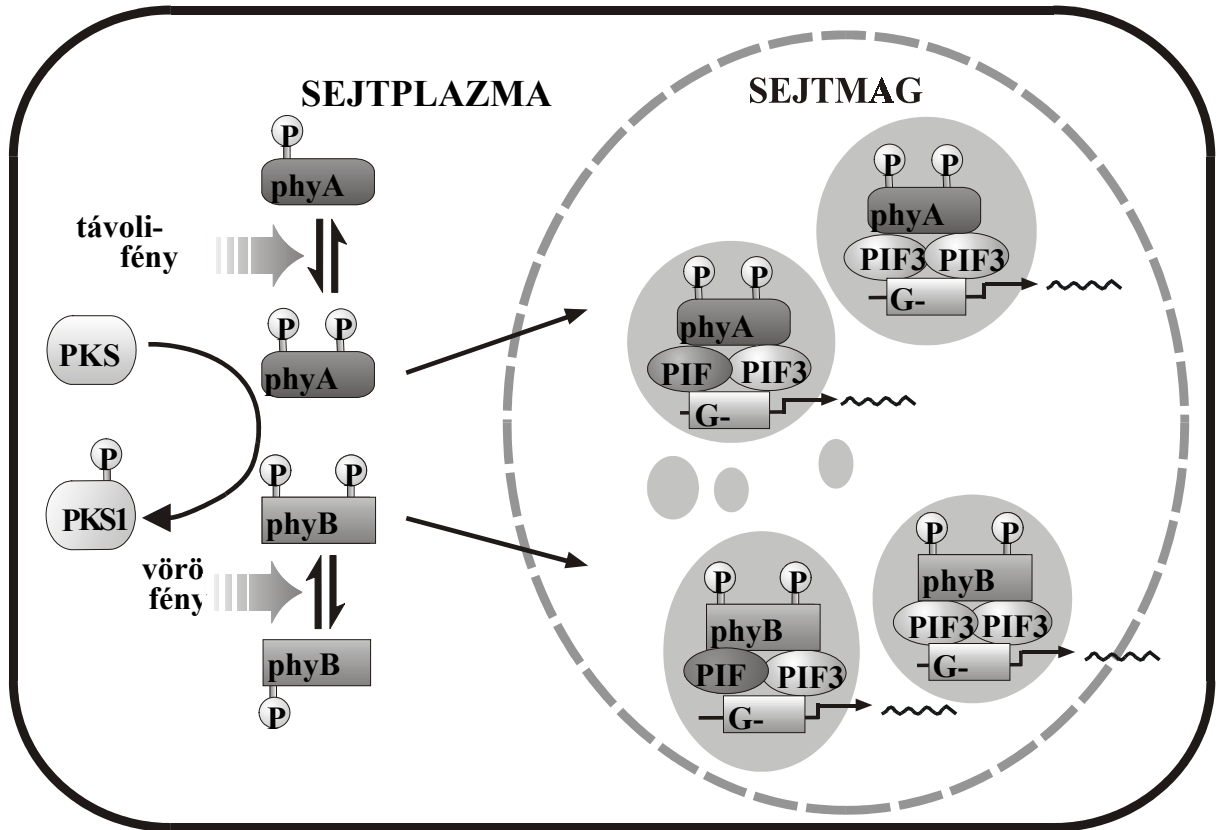
betöltött szerepének a fontosságát, de PAS doménként említeni véleményük szerint a továbbiakban idejélmúlt álláspont (Toledo-Ortiz és mtsai, 2003.)

A PHYB PIF3-al való interakciójáért felelős régióinak térképezése nem adott olyan egyértelmű képet, mint azt a kutatók várták, sőt egyazon munkacsoport két közleménye között zavaró ellentmondások is feszülnek (Ni és mtsai, 1999; Zhu és mtsai, 2000). Ezeken felülemelkedve, e két munkát alapul véve azonban bizonyos trendeket határozhatunk meg. A PHYB fotoreceptorának sem a konformációváltozásért felelős N-terminális része, sem a PIF3 azonosításában döntő szerepet játszó C-terminális szakasza önmagában nem elegendő ahhoz, hogy a teljes hosszúságú molekulára jellemző erősségű kötés kialakuljon. A kötés kialakításában fontos szerepet játszik a PHYB molekula N-terminálisának első 37, ill. C-terminálisának utolsó 30 aminosava. Ezek eltávolítása a kötés erősségét hozzávetőlegesen a 25%-ára csökkenti, míg további 53 vagy 30 aminosav eltávolítása lényegében a kötés megszűnését eredményezi. Érdekes annak a PHYB molekulának a viselkedése, amelynek az első 37 N-terminális aminosava hiányzik: ez a molekula hozzávetőlegesen olyan erősséggel kötődik a PIF3-hoz, mint a teljes hosszúságú PHYA molekula. Ha a PHYA és PHYB aminosavsorrendjét szekvenciahasonlóság alapján egymás mellé rendezzük, látható, hogy a PHYB az N-terminális szakasza az elején (ATE régió) éppen ezzel a 37 aminosav hosszúságú szakasszal hosszabb a PHYA-nál. Lehetséges, hogy a phyB phyA-nál nagyobb affinitását a PIF3-hoz ez a szakasz okozza (Zhu és mtsai, 2000). A szerzők arra is felhívják a figyelmet, hogy ennek az eltérő erősségű kölcsönhatásnak hatása lehet a jelátvitelre: a PIF3-nak a PHYB-specifikus jelátvitelben lehet döntő szerepe, a PHYA-specifikus jelátvitelben a jelentősége valószínűleg kisebb. Nem szabad elfelejteni ugyanakkor, hogy a phyA fotoreceptor mennyisége a növényben igen változó: kevés fényben sokkal nagyobb mennyiségben van jelen, mint erős fényben, ekkor tehát a phyA mennyiségének növekedése ellensúlyozni tudja a kisebb kötési affinitását a PIF3-hoz, biztosítva ezzel a hatékony jelátvitelt. Fény hatására a phyA mennyiségének jelentős része lebomlik, és arányaiban a phyB válik a legabundánsabb fitokrómmá, így a phyB-PIF3 interakció szerepe kerül előtérbe.

Megvizsgálták a PIF3 DNS-kötő tulajdonságait is. A számítógépes predikció szerint az *Arabidopsis* bHLH transzkripciós faktorainak megközelítőleg 80%-a képes DNS-kötésre, és a PIF3 ebbe a csoportba tartozik (Toledo-Ortiz és mtsai, 2003). Elegáns *in vitro* módszerrel, ún. random kötőhely szelekcióval bizonyították, hogy a PIF3 specifikusan köt a G-box szekvenciához (CACGTG), és ebben a kötésben egyedül a PIF3 bHLH motívumának van szerepe (Martinez-García és mtsai, 2000). (A későbbi elemzések kimutatták, hogy az

Arabidopsis DNS kötésére képes bHLH transzkripciós faktorainak döntő többsége (~90%) az ún. E-box nevű motívumhoz kapcsolódik. Ennek egy altípusa a G-box, ehhez kötődik az E-box kötő bHLH fehérjék ~90%-a (Toledo-Ortiz és mtsai, 2003.) A szerzők megvizsgálták azt is, hogy milyen promóterszekvencia-környezetben ismeri fel a PIF3 a G-box motívumot. Mivel a G-box sok fényindukálható gén promóterében megtalálható, megvizsgálták ezek közül néhányat. Megállapították, hogy a G-boxot a PIF3 a környező szekvenciaelemektől függetlenül felismeri, míg más, G-boxot nem tartalmazó, de fényindukálható génekben megtalálható promóterekhez nem kötődik (Martinez-García és mtsai, 2000). Ezek után kézenfekvő volt megvizsgálni, vajon a G-boxhoz kötött PIF3 képes-e a phyB egyidejű kötésére. A kísérletekben *in vitro* szintetizált és kromofórral konjugált phyB és PIF3 molekulákat, valamint radioaktívan jelölt G-box motívumot tartalmazó DNS-t használtak. A G-boxhoz kötött PIF3 kapcsolódott a Pfr formájú phyB-hez, de a biológiailag inaktív Pr konformációjúhoz nem. Ha a PIF3 fehérjének csak a bHLH doménjét használták a kísérletben, az kötődött a G-boxhoz, de nem kapcsolódott hozzá a phyB, tehát a PIF3 bHLH doménje a szekvenciaspecifikus DNS-kötésért felel, míg a fehérje partnerekkel történő interakció specificitásáért a molekula többi része a felelős (Martinez-García és mtsai, 2000). (A PIF3 és a Pfr formájú phyB molekulák közötti interakció specificitását és intenzitását olyan magas szintűnek találták, hogy élesztő két-hibrid rendszer elemeit ezzel a két fehérjével összekapcsolva fényel működtethető transzkripciós komplexet hoztak létre. Vörös fényel megvilágítva a rendszert, a PIF3-phyB kapcsolat kialakulásával létrejön az aktív transzkripciós komplex a Gal1 promóteren. Távoli-vörös fény alkalmazásával a phyB Pr formába kerül, a komplex felbomlik, és a transzkripció leáll (Shimizu-Sato és mtsai, 2002).)

Az a tény, hogy a PIF3 csak a Pfr formájú fitokrómokhoz kapcsolódik, és ezzel egyidejűleg a fényindukálható gének specifikus promótereleméhez tud kötődni, alapjaiban változtatta meg a fitokróm-specifikus jelátvitelről addig kialakult elképzeléseinket. Ezek szerint a fitokrómról kiinduló jel nem egy hosszú, sok tagból álló jelátviteli lánc révén jut el a transzkripciós komplexhez, hanem csak néhány (vagy akár egyetlen) lépésben. A PIF3 lehetséges hatásmechanizmusát a 2.6 ábra szemlélteti.



2.6 ábra A PIF3 szerepe a fitokróm-specifikus jelátvitelben

Az ábra vázlatos áttekintést ad a PIF3 feltételezett hatásmechanizmusáról. A fitokrómok fény hatására bekövetkező Pr-Pfr átalakulása foszforiláltsági állapotuk megváltozásával is jár. Erre utalnak a foszfátcsoportokat szimbolizáló bekarikázott P betűk. A PKS1 fehérje feltüntetése utal arra, hogy a fitokróm-specifikus jelátvitelnek vannak a citoplazmában lejátszódó lépései is. A Pfr formájú fitokrómok sejtmagi transzlokációja után kialakuló – minden bizonnyal különböző összetételű – fehérjekomplexeket az eltérő méretű szürke foltok jelölik. A PIF3 képes kötődni a fényindukálható gének promóterében található G-boxhoz és egyidejűleg kapcsolódik a phyA és phyB Pfr formájához. Az ábra azt is bemutatja, hogy a PIF3 dimerek formájában funkcionális, és nem csak homodimereket, hanem heterodimereket is képes kialakítani hasonló szerkezetű faktorokkal (PIFX), mint például a PIF4, PIL1, HFR1, ami a komplex funkcionális sajátosságainak kialakításához járul hozzá. Azt, hogy a kialakult fehérjekomplexek milyen mechanizmus révén befolyásolják a transzkripciót, nem tudjuk. A hullámvonalak a működő transzkripciót (mRNS) szimbolizálják. (Kevei és Nagy, 2003; Gyula és mtsai, 2003 után)

2.2.3 A PIF3 heterodimerizációja más faktorokkal

A bHLH típusú transzkripciós faktorok DNS-kötő hatásukat dimerként tudják kifejteni, dimerizációjuk a bHLH domén segítségével történik meg. Ismert tény az is, hogy különböző, a bHLH családba tartozó transzkripciós faktorok egymással heterodimerizálódásra képesek. A különböző transzkripciós faktorok közötti kölcsönhatás a transzkripciós szabályozás újabb szintjét nyitja meg (Massari és Murre 2000, Ciarapica és mtsai, 2003). Logikusnak tűnt a kérdés, vajon a PIF3 képes-e heterodimereket formálni más bHLH faktorokkal. Ennek vizsgálatára olyan molekulákat választottak ki, amelyek szerkezetükben a PIF3-hoz hasonlítanak és a fény által szabályozott jelátvitelben játszanak szerepet. A HFR1 (long hypocotyl in far-red 1) gént egy PHYA jelátviteli mutáns izolálásával azonosították (Fairchild és mtsai, 2000). Kiderült, hogy a gén terméke egy bHLH típusú transzkripciós faktor, amely a távoli-vörös fény által indukált hipokotilhossz-rövidülés pozitív regulátora. Aminosavsorrendje nagyon hasonlít a PIF3-éra, ennek ellenére sem a phyA-hoz, sem a phyB-hez nem kötődik közvetlenül. Homodimerek létrehozása mellett azonban képes a PIF3-mal heterodimert létrehozni, és ezek a heterodimerek *in vitro* kötődnek a phyA és phyB Pfr formájához (Fairchild és mtsai, 2000).

Mint az előzőekben már említettük, a PIF4 molekula felépítése nagyon hasonlít a PIF3-éhoz. Képes kötődni a G-boxhoz és a phyB Pfr formájához, de – legalábbis *in vitro* rendszerben – nem egyidejűleg. A közelmúltban megvizsgálták, vajon képes-e heterodimert létrehozni a PIF3-mal. Kiderült, hogy igen, sőt azt is sikerült igazolni, hogy a PIF3-PIF4 heterodimer specifikusan kapcsolódik a G-boxhoz (Toledo-Ortiz és mtsai, 2003).

A TOC1 (timing of CAB 1) fehérjét a növényi cirkadián óra központi elemének gondolják (bővebben l. a 2.2.5 fejezetben). Mivel funkciója pontosan nem ismert, élesztő két-hibrid rendszerben keresték interakciós partnereit. Az egyik kölcsönható fehérje a PIF3-mal magas fokú szekvenciahasonlóságot mutató, bHLH motívumot tartalmazó fehérje volt, amelyet PIL1-nek (PIF3 like 1) neveztek el (Makino és mtsai, 2002). Munkánk során élesztő két-hibrid rendszerben vizsgálva a PIF3 és PIL1 között igen erős kapcsolatot találtunk, ez a két fehérje is képes tehát heterodimerek létrehozására (az adatok nem kerülnek bemutatásra). Makino és mtsai (2002) azt is kimutatták, hogy élesztő két-hibrid rendszerben a TOC1 fehérjével nem csak a PIL1, hanem a PIF3 is közvetlenül kölcsönhatásba lép. Itt természetesen nem heterodimerizációról van szó, lévén a TOC1 nem bHLH típusú faktor

hanem ún. pszeudo-reszponz regulátor (Matsushika és mtsai, 2000). Ennek az érdekes eredménynek a lehetséges következményeit a későbbiekben részletezzük (2.2.5 fejezet).

A bHLH típusú transzkripciós faktorokat aminosav sorrendjükben megfigyelhető hasonlóságuk alapján egy kutatócsoport 12 kategóriába rendezte. A PIF3 csoportjába 15, egymáshoz nagyon hasonló szerkezetű faktor került (Heim és mtsai, 2003). Az eddigi kutatások eredményei azt mutatják, hogy a PIF3-mal heterodimert létrehozó fehérjék ebből a csoportból kerültek ki. A tapasztalatok alapján feltételezhető, hogy ezek között a transzkripciós faktorok között ott vannak a PIF3 további potenciális heterodimerizációs partnerei is. Egyre jobban megismerünk tehát egy intermolekuláris kapcsolatokon alapuló hálózatot, amelyben a meglevő elemek “építőkövekként” viselkedve új típusú DNS kötőhelyek felismerésére specializálódott transzkripciós faktor heterodimereket hozhatnak létre. Ezen felül a heterodimerek különböző fehérjepartnerekkel való eltérő interakciós képessége a jelátvitelben betöltött szerepüket sokkal árnyaltabbá teheti.

2.2.4 A PIF3 megváltozott mRNA szintje által okozott fenotípusok

Az eddig ismertetett eredmények után a következő fejezetben áttekintjük, milyen változásokat okoz a *PIF3* megváltozott mRNA szintje *in vivo*, transzgenikus *Arabidopsis* növényekben. Az eddigi munkák során antiszensz (csökkent *PIF3* mRNA szinttel) és túltermelő (megemelt *PIF3* mRNA szinttel, amelyet az N-terminális 63 aminosavát kódoló régiót nem tartalmazó *PIF3* molekulák okoztak) növények hipokotilhossz-változását vizsgálták. A vörös fényben nőtt *PIF3*-túltermelő csíranövények a kontrollhoz viszonyítva rövidebb, az antiszensz csíranövények hosszabb hipokotillal rendelkeztek. Távoli-vörös fényben nevelve a növényeket, a *PIF3*-túltermelők hipokotilhossza nem mutatott különbséget a vad típusúakhoz képest, az antiszenszek azonban – főleg alacsonyabb fényintenzitáson – csökkent érzékenységet (hosszabb hipokotil) mutattak. Ezek az adatok, kiegészítve azzal a ténnyel, hogy a sötétben nőtt megváltozott *PIF3* mRNA szintű csíranövények hipokotilhossza nem különbözik a kontroll növényektől, azt jelentik, hogy a *PIF3* szerepet játszik a fotomorfogenezisben. A csíranövények hipokotilhosszának a kontrollhoz viszonyított különbsége vörös fényben (mivel ekkor a phyB a domináns fotoreceptor) a phyB-specifikus; távoli vörös fényben (mivel ennek a hullámhossznak az érzékelésért a phyA felelős) a phyA-specifikus válasz *PIF3* általi érintettségét mutatja. A *PIF3* ezeknek a válaszoknak a pozitív hatású közvetítő faktora (Ni és mtsai, 1998). Ugyanez a kutatócsoport egy másik

megközelítést alkalmazva is ugyanezre következtetésre jutott. Egy mutánsgyűjteményből izolálták a *poc1* (photocurrent 1) nevű mutáns növényt, amelynek hipokotilhossza vörös fényben nőtt növények esetében a kontrollhoz képest rövidebbnek bizonyult, míg távol-vörös fényben vagy sötétben nem tapasztaltak különbséget. A mutáció tehát fokozta a növények vörös fényspecifikus érzékenységét. Megállapították, hogy a fenotípust egy a *PIF3* promóterében lévő T-DNS inszerció okozza, amely a vörös fényben nőtt *poc1* növényekben a *PIF3* mRNS szintjét a vad típusúban mérhető szint fölé emeli, így a növény *PIF3*-túltermelőként viselkedik. (Halliday és mtsai, 1999).

Vizsgálták a csökkentett *PIF3* szint fényindukált génextpresszióra gyakorolt hatását is. A fény által szabályozott kifejeződésű *CAB* és *CHS* mRNS szintű indukciója vörös fényvel megvilágított etiolált *PIF3* antiszensz növényekben jelentősen csökkent. A *PHYA* mRNS mennyisége fény hatására csökkent, ennek mértéke is alacsonyabb lett a *PIF3* antiszensz növényekben a kontrollhoz viszonyítva. Ez a tendencia minden esetben távoli-vörös fényben is hasonló volt, bár jóval kisebb mértékben (Ni és mtsai, 1999). Ezek az adatok is a *PIF3* pozitív fotomorfogenikus szerepét támasztják alá. *PIF3* antiszensz növényekben megvizsgálták azoknak a géneknek az expresszióját, amelyek promóteréhez a *PIF3* *in vitro* körülmények között kapcsolódik. Etiolált növényekben csökkent *PIF3* szint esetében a *CCA1* (circadian clock associated 1) és az *LHY* (late-elongated hypocotyl) gének vörös fény hatására bekövetkező akut indukciója a vad típusúhoz képest csökkent mértékű, míg *SPA1* (suppressor of phytochrome A 1) esetében nem figyelhető meg jelentős változás. Valószínű tehát, hogy az adott promóterben megtalálható *PIF3*-kötőhely (G-box: CACGTG) jelenléte még nem jelenti egyúttal az adott gén expressziójának *PIF3* általi szabályozását is. Vannak gének, amelyek expressziójának szabályozása a G-boxot tartalmazó promóterükön keresztül a *PIF3* segítségével történik, míg mások rendelkeznek ugyan ilyen G-boxszal de a *PIF3*, bár kötődik a G-boxhoz, az expresszió szabályozásában nem vesz részt (Martinez-García és mtsai, 2000).

Az eddigi kísérletek eredményeit támasztotta alá a mindmáig egyetlen nem csíranövényeken végzett fenotípusvizsgálat. A csökkent *PIF3* mRNS szintű antiszensz növények – a *phyB* mutánsokhoz hasonlóan – korábban virágoztak, mint a vad típusú növények. Ez arra utal, hogy a *PIF3*-nak a növény felnőtt korában is megmarad a szerepe és továbbra is a jelátviteli lánc pozitív hatású elemeként működik (Ni és mtsai, 1998).

2.2.5 A PIF3 feltételezett szerepe

2.2.5.1 A PIF3 szerepe a fitokróm-specifikus jelátvitelben

Az eddig megjelent közlemények szerint a PIF3 szerepének fontossága abban áll, hogy a fitokróm-specifikus jelátviteli utat a korábban feltételezethez képes jelentősen “lerövidíti” és a fitokrómok aktív, Pfr formában történő sejtmagba jutásának valószínűségére is rávilágít. Amint azt az előzőkben vázoltuk, a fitokrómok Pfr formában történő sejtmagi transzlokációjának funkcionális jelentősége minden részletében még ma sem teljesen tisztázott. A problémára a PIF3 izolálása és vizsgálata nyújtott – korántsem teljes körű – megoldási lehetőséget. A PIF3 egyidejű kapcsolódása a fitokrómok fotobiológiailag aktív formájához és a fényindukálható gének promóterében található G-boxhoz felveti annak lehetőségét, hogy a PIF3 közreműködésével a fényjel közvetlenül a fotoreceptor molekula segítségével jut a transzkripciós komplexre vagy annak közvetlen fizikai közelségébe. A fitokrómok jelentős része a jelátviteli lánc működésekor jól körülhatárolható sejtmagi molekulakomplexekben található. Ez a tény pedig felveti annak lehetőségét (annak ellenére is, hogy ezeknek a komplexeknek a pontos funkciójáról egymásnak ellentmondó közlemények láttak napvilágot), hogy ezek a komplexek az aktív fényindukált transzkripció színterei. Figyelembe véve ezt a feltételezést, a megváltoztatott *PIF3* mRNS szintű növényekben megfigyelhető fenotipikus hatásokat, a PIF3 DNS kötőhelyének széles elterjedtségét, valamint a PIF3 heterodimerizálódási hajlandóságát, valószínűsíthető, hogy ezek a komplexek változatos összetételűek és szerteágazó funkciójúak. Tepperman és mtsai (2001) nagyszámú gén expressziós mintázatát vizsgálva jutottak arra a következtetésre, hogy a fitokrómok vezérelte transzkripciós hálózat két lépcsőből áll. Az első lépcsőbe azok a transzkripciós faktorok tartoznak, amelyek fény érzékelésekor azonnal rendelkezésre állnak. Ezek vezérlik a második lépcsőbe tartozó transzkripciós faktorok expresszióját, amelyek meghatározott specifikus cél-gének szabályozását látják el, és ezek működésének eredménye a növény fényindukált válaszreakciója. A PIF3 az első lépcsőben kap helyet és olyan, második lépcsőbe tartozó transzkripciós faktorok kifejeződését vezérli, amelyek promótere G-boxot tartalmaz, mint például a *CCA1* és az *LHY*.

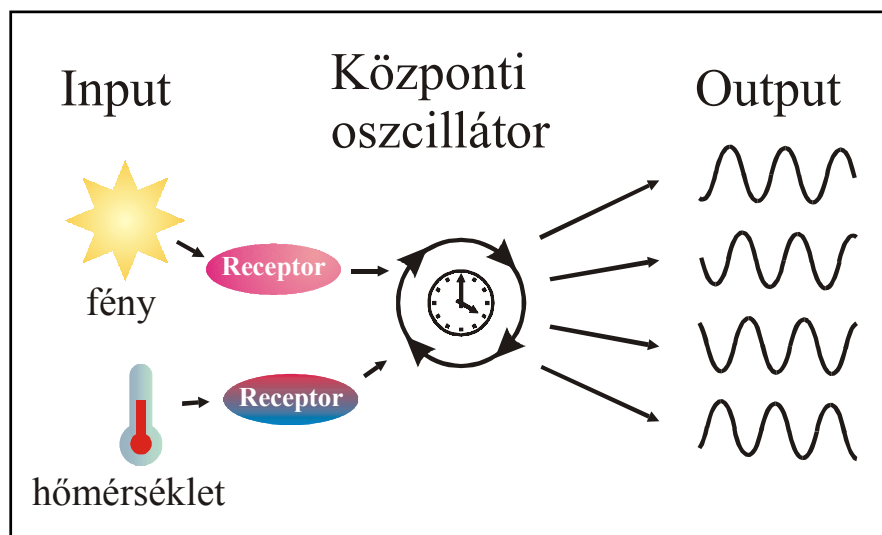
Az eddigi eredmények alapján nyilvánvaló, hogy a PIF3 részt vesz a fotomorfofenikus fenotípus kialakításában, nem esett szó azonban arról a feltételezésről, hogy a PIF3 molekuláris kapcsolatai révén hogyan szabályozhatja a növényi cirkadián óra

működését. Ennek részletezése előtt vázoló a növényi cirkadián óra működéséről a munkánk megkezdésekor kialakult képet.

2.2.5.2 A PIF3 feltételezett szerepe a növényi cirkadián óra szabályozásában

A Földön a nappalok és éjszakák váltakozásának 24 órás ritmusa az élőlények többsége számára alapvető fontosságú környezeti tényező. Az ehhez való alkalmazkodás hívott életre egy mechanizmust, egy olyan molekuláris órát (cirkadián óra), amelynek révén az élőlények követni tudják a környezetükben napi ritmussal változó körülményeket.

A cirkadián óra vázlatos felépítését a 2.7 ábra mutatja be. A központi oszcillátor az óra “lelke”. Valószínűleg többfehérje komponens (központi óraelem) alkotja, amelyek egymás működésére nézve pozitív illetve negatív faktorként, visszacsatolás útján kölcsönösen szabályozzák egymás fehérjeszintjét. Ez a mechanizmus képes arra, hogy autonóm és endogén módon, hozzávetőlegesen 24 órás ritmust alakítson ki és tartson fenn, amely akkor is fennmarad, ha az élőlény a ritmikusan változó környezetből állandó körülmények közé kerül (azaz a váltakozó külső hatások megszűnnek). Ez a cirkadián ritmusok jellegzetes tulajdonsága (Somers, 1999). A “szabadon futó” ritmus vizsgálata a központi oszcillátor működéséről ad felvilágosítást, ezért az élőlények változatlan körülmények (állandó fény, ill. sötét; egyenletes hőmérséklet) közötti vizsgálatát gyakran alkalmazzák a laboratóriumi munkában.



2.7 ábra A cirkadián óra vázlatos felépítése

A részletes magyarázatot lásd a szövegben (Somers, 1999 után).

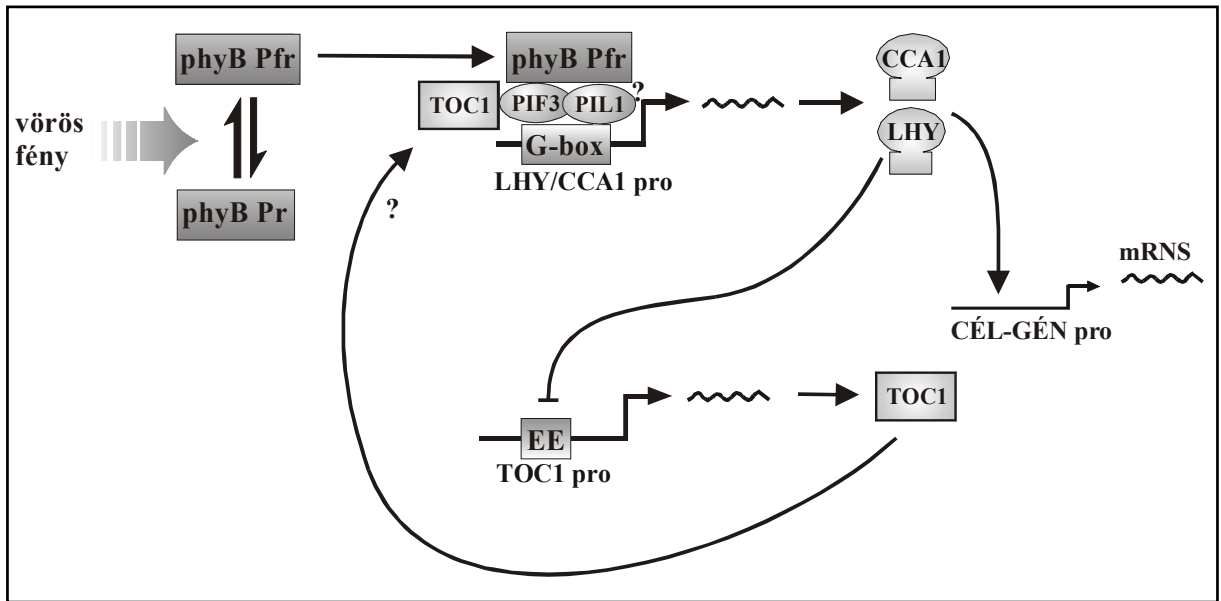
Az oszcillátortól kiinduló jelátvitel vezet el a cirkadián óra output (kimeneti) oldalához, amely minden cirkadián szabályozás alatt álló folyamatot magába foglal. Ide értjük (I) bizonyos gének ritmikus kifejeződését: a gén-chip vizsgálatok szerint az *Arabidopsis* géneinek 2-6%-a cirkadián kifejeződést mutat (Harmer és mtsai, 2000; Schaffer és mtsai, 2001); (II) biokémiai folyamatok lejátszódásának ritmusát: például antocianin termelődése (Thain és mtsai, 2002), (III) a növény fiziológiás folyamataiban: például levélmozgás, sztómányitás (Somers, 1999), és (IV) fejlődésében: például virágzásindukció (Mouradov és mtsai, 2002) megjelenő napi ritmusokat. A jelátviteli lánc végén elhelyezkedő elemek működése nem hat vissza a központi oszcillátorra, így a cirkadián óra kutatásában leggyakrabban használt riportergének is ezek közül kerülnek ki: a legszélesebb körben használtak a *CAB* (Millar és mtsai, 1992a) és a *CCR2* (cold, circadian regulated 2) (Carpenter és mtsai, 1994).

A cirkadián óra állandó kapcsolatot tart fenn a külső környezettel és az abból érkező jelek segítségével a központi oszcillátor által generált ritmus beállítható. A külső környezettel történő szinkronizálhatóság (entrainment) a cirkadián ritmusok fontos jellemzője (Somers, 1999). Az oszcillátor a környezet jeleit az input (bemeneti) oldalról kapja: a legfontosabb szabályozók a fény és hőmérséklet. A fényjelet a kriptokrómok és a fitokrómok közvetítik (Somers és mtsai, 1998), a hőmérséklet érzékelésének módja még nem ismert.

Az *ecetmuslica* cirkadián órájának input és központi oszcillátor része meglehetősen jól ismert (Williams és Shegal, 2001), ehhez képest a növényi órákról összegyűjtött ismeretek nagyon hiányosak. Az utóbbi évek kutatásai jelentős lépéseket tettek a központi oszcillátor komponenseinek azonosítása érdekében. Jelenleg legalább egy, gének működésére ható visszacsatolási hurok létezése ismert. A 2.2.3 fejezetben már említett *TOC1* fehérjét a cirkadián óra összes kimenetét befolyásoló elemként azonosították (Strayer és mtsai, 2000). A központi oszcillátorban a negatív faktorok szerepét a már említett MYB domént tartalmazó *CCA1* és *LHY* transzkripció faktorok képesek ellátni. Mutáns alléljeik az output folyamatok ritmusának rövidülését, túltermelésük pedig aritmiát okoz. Mindemellett fényfüggő fenotípus is megfigyelhető mutációjuk vagy túltermelésük esetén, ami kettős szerepükre utal (Schaffer és mtsai, 1998; Wang és Tobin 1998; Alabadi és mtsai, 2001). Úgy találták, hogy a *TOC1* és *CCA1/LHY* mRNS-ek mennyisége ritmikusán változik, mégpedig ellenkező fázisban, a *TOC1* a fényszakasz végén (este), a *CCA1/LHY* pedig a fényszakasz kezdetén (hajnal) mutat

maximumot. Kiderült, hogy a TOC1 pozitív szabályozója a *CCA1* és *LHY* transzkripciójának. A *TOC1* promóter tartalmaz egy esti elemnek (evening element) elnevezett motívumot, amely olyan gének promóterében található meg, melyek transzkripciója az esti órákban ér el maximumot. Az is kiderült, hogy ehhez az elemhez kötődnek a *CCA1* és *LHY* fehérjék, ezáltal negatív hatást fejtve ki a *TOC1* transzkripciójára (Alabadí és mtsai, 2001). Ezek ismeretében egy pozitív és negatív elemeket tartalmazó szabályozó kör állítható össze: hajnalban a *CCA1/LHY* gének expressziója eléri maximumát, ezek a fehérjék a *TOC1* promóteréhez kapcsolódva represszálják annak kifejeződését, ezzel alacsony TOC1 szintet idéznek elő. Mivel így a TOC1 serkentő hatása nem érvényesülhet, a *CCA1/LHY* gének transzkripciójának mértéke csökken, este érve el a minimumot. Ezzel párhuzamosan szabadul fel a *CCA1/LHY* fehérjék okozta gátlás alól a *TOC1* promóter, a *TOC1* mRNS szintje nőni kezd, estére eléri maximumát, serkenti a *CCA1* és *LHY* gének expresszióját és a ciklikus szabályozás kezdődik előlről. A kép korántsem teljes: a TOC1 nem képes DNS kötésre, hiánya pedig nem okozza a *CCA1/LHY* transzkripció aritmiáját. Mivel az e faktorok hiányakor vagy túltermelésekor kialakuló ritmus nem magyaráz meg minden felvetődő kérdést, így más faktorok közreműködése is valószínűsíthető (Fankhauser és Staiger 2002).

Az eddigi adatok alapján a 2.8 ábrán látható modellt állíthatjuk össze. Fény hatására a phyB Pfr formába kerül és belép a sejtmagba, ahol a PIF3-mal összekapcsolódva (esetleg más faktorokkal kiegészülve) a komplex a *CCA1* és *LHY* gének promóterében levő G-boxhoz kapcsolódik. Ez a mozzanat a *CCA1* és *LHY* expressziójának gyors emelkedését okozza. Ha az élesztő két-hibrid rendszerből származó adatok (Makino és mtsai, 2002) *in vivo* is relevánsak, akkor a TOC1 és PIF3 fehérjék összekapcsolódása (illetve a TOC1 kapcsolódása a PIF3/PIL1 heterodimerhez) állhat a TOC1 fény-inputban betöltött szerepének hátterében. Ezt a feltételezést valószínűsíti az a megfigyelés, hogy a *toc1* mutáns növényekben a *CCA1/LHY* gének vörös fény általi indukálhatósága jelentősen csökken (Más és mtsai, 2003). Ezek az adatok valószínűvé teszik, hogy a phyB/PIF3/TOC1 nukleáris komplex a fény-input és a központi oszcillátor közötti kapcsolat kulcsfontosságú szereplője.



2.8 ábra A PIF3 lehetséges szerepe az cirkadián óra fény-inputjában

Az ábra a PIF3 feltételezett szerepét mutatja be a fényjelnek a cirkadián óra központi oszcillátorához juttatásában. A phyB/PIF3/TOC1 komplex lehetséges létrejötté és funkciója mellett a *TOC1-CCA1/LHY* alapú szabályozó kör lehetséges felépítése is bemutatásra kerül. A kérdőjelek növényi rendszerben nem bizonyított lépéseket szimbolizálnak: a PIF3-PIL1 és PIF3-TOC1 ill. PIL1-TOC1 kölcsönhatás csak élesztő két-hibrid rendszerben bizonyított. Bővebb magyarázatot lásd a szövegben. A transzkripció lejátszódását hullámvonal, a feltételezett gátló hatást a merőleges vonalkával lezárt végű vonal jelöli. pro: promóter; EE: esti elem. (Kevei és Nagy, 2003 után)

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk megkezdéséig a PIF3-ról közölt adatok döntő többségéhez *in vitro* kísérletek révén jutottak hozzá. A laboratóriumunkban folyó kutatómunka egyik fő jellemzője, hogy eredményeink jelentős részét transzgenikus növények vizsgálata révén érjük el. Éppen ezért volt számunkra érdekes a PIF3 *in vivo* vizsgálata: transzgenikus növények alkalmazásával szerettük volna ellenőrizni az eddigi eredmények helyességét. A PIF3 sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata szintén kitüntetett jelentőséggel bírt számunkra, hiszen csoportunk eddigi eredményei nagyban hozzájárultak a fitokrómok sejten belüli lokalizációjának feltárásához. Reméltük, hogy egy fitokrómmal kölcsönható faktorról elvégzendő kísérleteink újabb érdekes összefüggésekre világítanak rá.

Fotobiológiai kutatásaink mellett a növényi cirkadián óra vizsgálata is hozzátartozik laboratóriumunk profiljához. A PIF3-mat az is érdekessé tette számunkra, hogy a munkánk megkezdésekor érvényes modell szerint fontos szerepet játszhat a cirkadián óra fény általi szabályozásában. Mivel ez a modell jórészt elméleti alapokra épült, vizsgálataink során ennek ellenőrzése is terveink közt szerepelt.

Munkánk kezdetekor az alábbi főbb célokat tűztük magunk elé:

1. A teljes hosszúságú PIF3 fehérje és a PIF3-GFP fúziós fehérje kifejeztetése transzgenikus növényekben, és a fúziós fehérje biológiai aktivitásának igazolása.
2. Fenotípusvizsgálatok megváltozott PIF3 szintű növényekkel.
3. A PIF3-GFP molekulák különböző fénykezelések hatására bekövetkező sejten belüli lokalizációjának vizsgálata.
4. A PIF3 és fitokróm molekulák ko-lokalizációjának igazolása növényi rendszerben (*in planta*).
5. A PIF3 szerepének vizsgálata a cirkadián óra fény-inputjában.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Kísérleti anyagok és organizmusok

4.1.1. Vegyszerek és forgalmazók

A kísérletek során használt vegyszereket az alábbi gyártóktól ill. szállítóktól szereztük be:

Amersham-Pharmacia AB (HVD Kereskedelmi és Szolgáltató Kft., Budapest)

Merck (Merck Kft., Budapest),

Reanal/Molar Kft. (Budapest),

Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Kft., Budapest)

Izinta Kft. (Budapest) radioaktív izotóppal jelölt nukleotidok

Biosynth AG (Staad, Svájc) luciferin

MBI/Fermentas (Biocenter Kft., Szeged) restrikciós endonukleázok, DNS módosító enzimek és puffereik; dATP, dGTP, dCTP, dTTP nukleotidok

4.1.2. Tápoldatok és táptalajok, antibiotikumok, szelekció

LB (Luria-Bertani Medium) (pH=7.0)

1% (w/v) tripton

0.5% (w/v) élesztő kivonat

1% (w/v) NaCl

táptalajhoz: 1.5% (w/v) agar

YEB (pH=7.0)

0.5% (w/v) beef extract

0.1% (w/v) élesztő kivonat

0.5% (w/v) pepton

0.5% (w/v) szaharóz

2 mM MgCl₂ (sterilre szűrve, autoklávozás után hozzáadva)

táptalajhoz: 1.5% (w/v) agar

MS (Murashige-Skoog Medium) (pH=5.6)

4.3 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma)

3% (w/v) szaharóz

1% (w/v) agar

AM (*Arabidopsis* Medium) (pH=5.6)

2.16 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma)

1% (w/v) szaharóz

0.2% (w/v) phytigel (Sigma)

Munkánk során az alábbi antibiotikumokat használtuk, melyeket sterilre szűrten, autoklávozás (121 °C, 25 perc) és 60 °C-ra hűtés után kevertünk a tápoldatba, ill. táptalajba. Az antibiotikumok felsorolását az alkalmazott végkoncentrációval együtt a kísérleti organizmus szerint csoportosítottuk:

Escherichia coli:

Ampicillin (Amp) 100 µg/ml

Streptomycin (Sm) 100 µg/ml

Tetraciklin (Tet) 100 µg/ml

Agrobacterium tumefaciens:

Karbencillin (Cb) 100 µg/ml

Rifampicin (Rif) 25 µg/ml

Arabidopsis thaliana:

Higromicin (Hyg) 15 µg/ml

Kanamicin (Km) 25 µg/ml

Klaforán (Cf)* 200 µg/ml

BASTA** 20000x

* Klaforánt nem szelekciós célra használtuk AM és MS táptalajokban, hanem azért, hogy csökkentsük a bakteriális eredetű fertőződés esélyét.

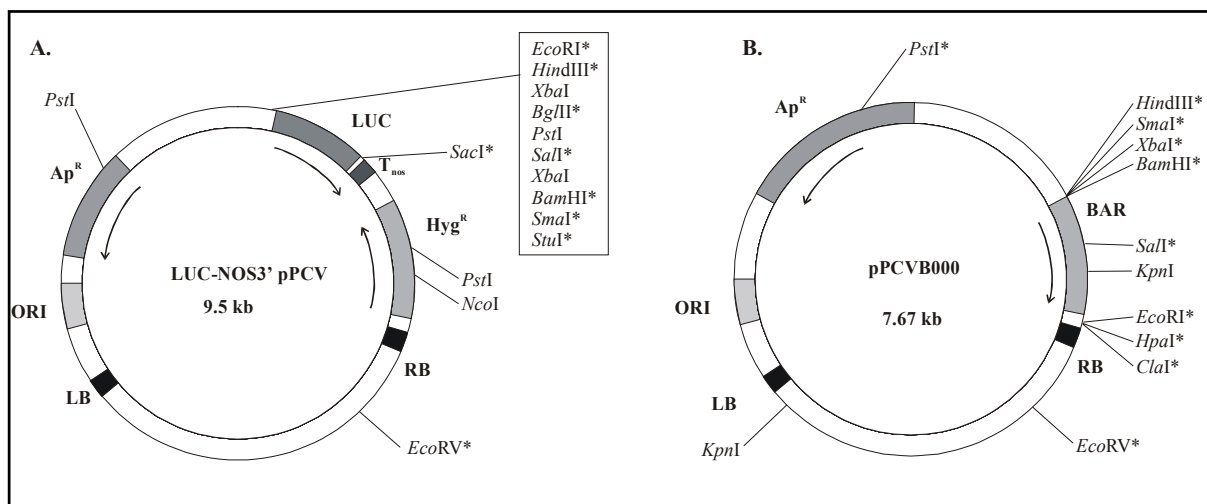
** A BASTA nem antibiotikum természetű anyag, hanem glufozinát-ammónium tartalmú herbicid. Az AgrEvo (Bad Soden, Németország) cég által forgalmazott oldatot sterilre szűrve a fenti hígításban használtuk szelekció céljára AM és MS táptalajban.

4.1.3 Plazmidok és cDNS klónok

A szubklónozási lépéseket pBluescriptII KS/SK plazmid vektort (Stratagene, La Jolla, CA) használva hajtottuk végre. A plazmid vektor mérete 2964 bp, ampicillin rezisztenciát hordoz és alkalmas kék/fehér színszelekcióra, amennyiben a táptalajt 25-25 µg/ml IPTG és X-GAL vegyületekkel egészítjük ki.

Az *Arabidopsis* transzformálására használt pPCV812 (plant cloning vector) bináris plazmidot (Koncz és mtsai, 1994) Koncz Csaba csoportjától kaptuk (Max-Planck Institut, Köln, Németország). Ennek átalakításával jutottunk a LUC-NOS3' pPCV vektorhoz. Ez a 9.5 kb méretű, *Agrobacterium* Ti-plazmid alapú vektor tartalmazza a jobb- és baloldali integrációs határszekvenciákat (LB, ill. RB), ezek közé építve a bakteriális replikációs origót (ORI_{ColE1}) és az ampicillin/karbenicillin rezisztenciát okozó β-laktamáz kazettát (Ap^R), valamint a növényi szelekciót lehetővé tevő higromicin rezisztenciáért felelős higromicinfoszotranszferáz (*hpt*) fehérjét konstitutívan kifejező kazettát is. A plazmid tartalmaz még egy, a molekuláris klónozást megkönnyítő, egyedi DNS endonukleáz hasítóhelyeket tartalmazó polilinker régiót, melytől 3' irányban építettük be a luciferáz fehérjét kódoló DNS szakaszt (LUC). Ezt a nopalin szintáz gén 3' poliadenilációs szignálja (NOS3' ill. T_{nos}) követi, mely az expresszált mRNS megfelelő processzálását irányítja növényben. Az így létrejött vektorkonstrukció vázlata a 4.1/A ábrán látható. Rendelkeztünk a pPCV812 alapú pPCVB000 bináris plazmid vektorral is, mely a *hpt* gén helyett a glufozinát rezisztenciáért felelős BAR gént hordozza (4.1/B ábra). A kiméra gének növényi kifejeződését – a jelzett esetek kivételével – a karfiolmozaik-vírus 35S RNS génje promotérének duplikált enhanszer régióval rendelkező változata ((35S)_{2x}) biztosította.

A teljes hosszúságú PHYA-E, PIF3 cDNS-eket Eberhard Schäfer csoportjától (Universität Freiburg, Freiburg, Németország), az mGFP4 cDNS-t Jim Haseloff csoportjától (University of Cambridge, Cambridge, Nagy-Britannia) kaptuk. A sárga ill. kék fluoreszcens fehérjék cDNS klónjait (YFP és CFP) a Clontech cégtől (Palo Alto, CA); a luciferáz (LUC) cDNS klónját a Promega cégtől (Madison, WI) vásároltuk.



4.1 ábra A LUC-NOS3' pPCV és a pPCVB000 növényi klónozó vektorok vázlatos szerkezete

A részletes magyarázatot l. a szövegben. A csillagok az egyedi restriktációs enzim hasítóhelyeket jelölik.

4.1.4. Baktériumok

Molekuláris klónozás során az *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsét (Tet^R) használtuk (Stratagene, La Jolla, CA). Az elkészült bináris plazmid vektort S17-1 *E. coli* törzsbe transzformáltuk, mely képes a konjugációra a növényi transzformáció során használt *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM90RK) (Rif^R) törzsével (Az utóbbi két törzs Koncz Csaba laboratóriumából származik (Max-Planck Institut, Köln, Németország).

4.1.5 Növények

Transzgenikus növények előállításához az *Arabidopsis thaliana* Wassilewskaja (Ws), ökotípusát használtuk, amelyben a PHYD gén nem funkcionális (Aukerman és mtsai, 1997). A *pif3* mutáns növény Columbia (Col) ökotípusú, és a GABI-Kat mutánsgyűjteményből (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/>) származik. Az ezzel a mutánssal kapcsolatos kísérletekben kontrollként Columbia növényeket használtunk. A munkánkban használt többi mutáns vonal összefoglaló adatait a 4.1 táblázat tartalmazza.

4.1 táblázat A munkánk során használt, korábban már jellemzett mutáns vonalak adatainak összefoglalása.

név	ökotípus	referencia
<i>phyA-201</i>	Ler	Nagatani és mtsai, 1993
<i>phyA-211</i>	Col	Reed és mtsai, 1994
<i>phyB-5</i>	Ler	Reed és mtsai, 1993
<i>phyB-9</i>	Col	Reed és mtsai, 1993
<i>phyA-201/phyB-5</i>	Ler	Reed és mtsai, 1994
<i>phyA-201/phyD-1</i>	Ler/Ws	Eberhard Schäfer laboratóriuma
<i>phyA-201/phyB-5/phyD-1</i>	Ler/Ws	Devlin és mtsai, 1999
<i>cop1-4</i>	Col	McNellis és mtsai, 1994
<i>eid6</i>	Ler	Dieterle és mtsai, 2003
<i>poc1</i>	Ws	Halliday és mtsai, 1999

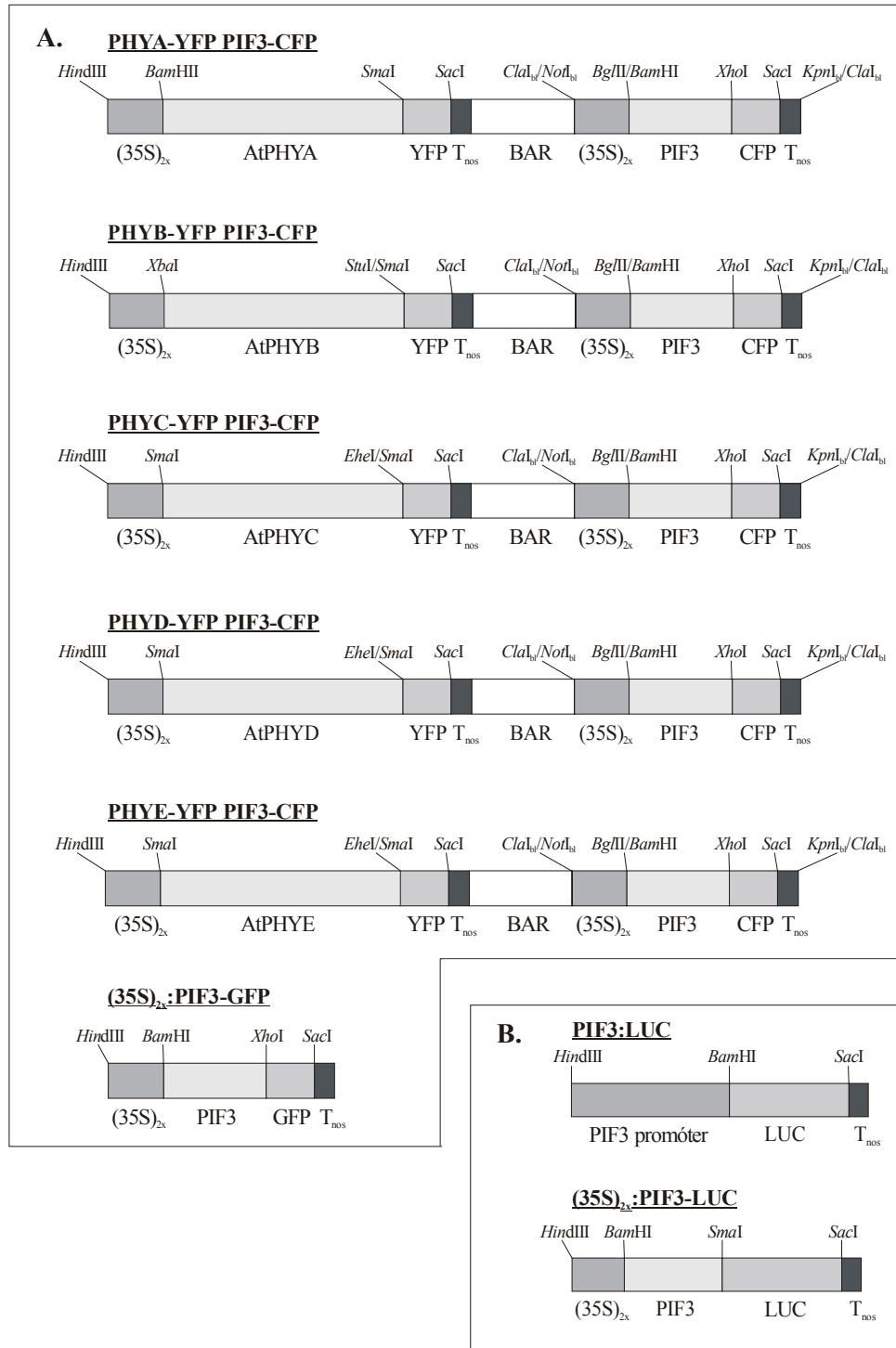
4.2 Molekuláris biológiai módszerek

4.2.1. Plazmidvektor-konstrukciók készítése

A plazmidvektor-konstrukciók készítése és a plazmid DNS *E. coli* sejtekből történő tisztításakor Sambrook és mtsai (1989) módszerét követtük. A génkonstrukciók készítése során alkalmazott összes lépés és szubklónozás folyamatának részletes leírása meghaladná a dolgozatban erre rendelkezésre álló helyet, ezért csak a főbb lépések és a végeredmény kerülnek bemutatásra.

pPCVB000 alapú klónozás

Első lépésként a 4.1/B ábrán látható *pPCVB000* vektorba a *Hind*III és *Bam*HI helyek közé (35S)_{2x} és NOS3' fragmentumokat építettünk, és néhány egyedi restriktós hasítóhelyet alakítottunk ki közöttük. Ezeket használva építettük be a vektorba a GFP ill. YFP fluoreszcens fehérjék kódoló régióit, majd a leolvasási keret figyelembe vételével, tőlük 5' irányba, a fitokróm ill. PIF3 fehérjéket kódoló cDNS szakaszokat. A két "kiméra" ORF-et tartalmazó vektor konstrukciók készítéséhez a (35S)_{2x}:PIF3-CFP-NOS3' kazettát *pBluescriptII* vektorban építettük össze, ahonnan *Not*I és *Kpn*I fragmentumként, a végeit T4 DNS polimerázzal (MBI/Fermentas) tompa végűvé téve a vektor – szintén tompa végűre alakított – *Cla*I helyére illesztettük.



4.2 ábra A dolgozatban használt kiméra konstrukciók vázlatos szerkezete

Az A ábrarész a pPCVB000, a B ábrarész a LUC-NOS3' pPCV növényi klónozó vektor alapú konstrukciók (l. 4.1 ábra) vázlatos szerkezetét mutatja be. Az egyes konstrukciók neveit aláhúzással jelöltük. A különböző eredetű DNS darabokat különböző szürke árnyalatú téglalapok jelzik. A konstrukciók felépítéséhez használt restriktív endonukleáz hasítóhelyeket a téglalapok felett tüntettük fel. bl: tompa végűvé alakított hasítóhely; AtPHYA-E: *Arabidopsis* fitokróm A-E teljes hosszúságú cDNS-ek; a további rövidítések magyarázatához lásd a Rövidítések jegyzékét.

pPCV alapú klónozás

A LUC-NOS3' pPCV vektor (4.1/A ábra) poliklónozó helyén található *Hind*III és *Bam*HI helyekre illesztettük a PIF3 gén 2391 bp hosszúságú promotorszakaszát. Ugyanebbe a kiindulási plazmid vektorba építettük a (35S)_{2x}:PIF3 kazettát *Hind*III-*Sma*I fragmentként.

Minden elkészült konstrukciót szekvenálással ellenőriztünk.

A dolgozatban használt kiméra konstrukciók vázlatát a 4.2 ábra mutatja be.

4.2.2. *Agrobacterium* konjugáció

Az elkészült bináris plazmid vektort *E. coli* S17-1 törzsbe transzformáltuk, majd 2 ml-es, ampicillinnel kiegészített LB folyadékkultúrában 16 órán át növesztettük. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzséből YEB tápoldatban, 24 óra alatt szintén friss folyadékkultúrát neveltünk. A két baktériumszuszpenzióból 1-1 ml-t összekevertünk és YEB táplemezen együtt növesztettük. 24 óra után a növekedésnek indult baktériumtenyészetből kis mennyiséget rifampicin és karbenicillin tartalmú YEB lemezre szélesztettünk, majd a felnövekvő rezisztens *Agrobacterium*-telepeket legalább 3 alkalommal passzáltuk. Az *E. coli*-tól ilyen módon megtisztított *Agrobacterium*ot használtuk *Arabidopsis* virág-infiltrációs transzformálásra (lásd: 4.3.2 alfejezet).

4.2.3 Növényi össz-RNS tisztítás

1 gramm növényi anyagot folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és dörzsmozsárban homogenizáltunk, üveg centrifugacsőbe helyeztük, majd 5 ml extrakciós puffert [50 mM TRIS-HCl pH=8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% SDS, 0.1% (v/v) β-merkaptó-etanol, 2 mM ATA (aurin-trikarboxilsav)] mértünk rá. 37 °C -on inkubáltuk 30 percig, majd 1 ml 2 M KCl oldat hozzáadása és összerázás után jégen tartottuk 30 percig. 10 perc centrifugálás után (15000 g, 4 °C) a felülúszót tiszta centrifugacsőbe mértük át és 2.5 ml 8 M LiCl oldat hozzáadása után 4 °C -on 12-16 óra alatt csaptuk ki az RNS-t, amit ismételt centrifugálással gyűjtöttünk össze (15000 g, 20 perc, 4 °C). A csapadékot 400 μl steril desztillált vízben oldotuk fel és 1.5 ml-es mikro-centrifugacsőben fenolos extrakcióval tisztítottuk, majd az RNS-t 1/10 térfogatnyi 5 M NaCl és 2.5x térfogatnyi etanollal -20 °C -on csaptuk ki 12 órán át. 20 perc 4 °C -on történő centrifugálást követően a csapadékot 70%-os etanollal mostuk,

vákuum alatt szárítottuk, majd 100 µl steril desztillált vízben oldottuk fel. A kapott RNS mennyiségét a minta 260 nm-en mért optikai denzitásából határoztuk meg.

Az RNS izolálás során használt üvegeszközöket 3%-os H₂O₂ oldatban áztattuk 60 percig, etanollal átöblítettük, majd megszártítottuk. Az RNS izolálás során használt oldatokat és desztillált vizet DEPC (diethyl-pirokarbonát) kezeléssel RNáz mentesítettük Sambrook és mtsai (1989) módszerét követve.

4.2.4 Az mRNS szint vizsgálata RN-áz protekcióval (Ádám és mtsai, 1994 után)

A pBluescriptII plazmid vektorba *XhoI-EcoRI* helyre klónozott próba a *PIF3* gén kódoló régiójának 198 bp hosszú 3'-régiójából és a GFP fehérjét kódoló DNS szakasz 165 bp-os 5'-régiójából áll. A rekombináns plazmidot *Ecl136II* restrikciós endonukleázzal linearizáltuk. A radioaktívan jelölt antiszensz RNS szálat 2 µg linearizált plazmid felhasználásával "T7 Transcription Kit"-et használva, a gyártó (MBI/Fermentas) utasításai alapján állítottuk elő [α -³²P]-UTP jelenlétében. A jelölt RNS fragmentumot 6%-os denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el, majd autoradiográfia alapján izoláltuk. A jelölt próbát steril RNS-extraháló pufferrel (0.5 M NH₄-acetát, 0.01 M Mg-acetát, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) eluáltuk a géldarabból ("crush-and-soak" módszer, Sambrook és mtsai, 1989). Hasonlóan jelöltük az ubiquitin10 (*UBQ*) (Tóth és mtsai, 2002) és a *CCA1* próbát is, mely a kódoló régió első 250 nukleotidját tartalmazta pBluescriptII plazmid vektorban *XhoI-EcoRI* helyre klónozva.

10⁵ cpm jelölt RNS próbát hibridizáltunk 20 µg RNS-hez 10 µl hibridizáló pufferben (80% formamid, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH=6.7), 46 °C -on 16 órán át. Ezután 100 µl RNáz oldatot adtunk a hibridizációs elegyhez (10 mM TRIS-HCl pH=7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM LiCl, 40 µg/ml RNáz A és 2 µg/ml RNáz T1). A mintákat 1 órán át 30°C-on emésztettük, majd 2 µl proteináz K-t (20 mg/ml) és 2 µl 10% SDS-t hozzáadva inkubáltuk 37 °C-on 15 percig. Fenol és kloroform 1:1 arányú keverékével extraháltuk a fehérjéket, majd a vizes fázisból 350 µl hideg etanollal csaptuk ki az RNS-t 15 µg tRNS jelenlétében. Centrifugálás után a mintákat 70%-os etanollal kétszer mostuk, szárítottuk, végül 4 µl formamidos festékoldatban (80% (v/v) formamid, 1x TBE (90 mM TRIS, 90 mM bórsav, 2 mM EDTA), 0.05% (w/v) xilén-cyanol, 0.05% (w/v) brómfenol-kék) oldottuk fel. A védett fragmentumokat 6%-os denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el. A megszártított gél speciális kazettákban exponáltuk egy napig, majd PhosphorImager

(Molecular Dynamics, USA) készülék segítségével tettük láthatóvá a radioaktív jeleket. A jeleket az ImageQuant (Molecular Dynamics, USA) szoftver használatával kvantitáltuk.

4.2.5 Növényi össz-protein tisztítás és Western-blot analízis (Harter és mtsai, 1993 után)

200 milligramm növényi anyagot folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és dörzsmozsárban homogenizáltunk. Az elporított mintára 1 ml extrakciós puffert mértünk (65 mM TRIS-HCl, pH=7.8, 4 M urea, 5% (w/v) SDS, 14 mM 2-mercaptoethanol, 15% (v/v) glicerin és 0.05% (w/v) brómfenolkék). A homogenizálást a puffer feloldása után további 2 percig folytattuk. A sejtörmelékét centrifugálással távolítottuk el (15000 g, 15 perc, 4 °C). 200 µl felolúsót 1 ml 6x Laemmli SDS puffert (300 mM TRIS-HCL pH=6.8, 60% (v/v) glicerin, 12% (w/v) SDS, 0.6% (w/v) brómfenol-kék, 200 mM DTT) tartalmazó csövekbe mértünk, keverés után 100 °C-on inkubáltuk 3 percig. A felülúszó megmaradt részéből Bradford (1976) módszerével határoztuk meg a preparátumok össz-fehérje tartalmát.

Mintánként 20 µg össz-fehérjét szeparáltunk 8%-os poliakrilamid-SDS gélen (Laemmli, 1970). Az elválasztott fehérjéket Bio-Rad elektroblot készülékkel (25 V, 2 h) transzferáltuk PVDF (polivinil-difluorid) membránra (Millipore, USA). A filtereket blokkoló pufferben [10% (w/v) tejpor, TBST pufferben (50 mM TRIS pH=9.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20)] inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 óráig. Ezután a filtert anti-PIF3 elsődleges ellenanyag (Eberhard Schäfer laboratóriuma, Freiburg, Németország) jelenlétében (10 µg/ml antiszérum, TBST-ben) inkubáltuk 4 °C-on 16 órán át. Háromszor 10 perc TBST pufferben történő mosás után a filtert alkalikus-foszfátázhoz kapcsolt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk (1:1000 arányban hígított "Goat Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase Conjugate", (Biorad, USA), TBST-ben) szobahőmérsékleten 1 óráig. Ezt követően a filtert háromszor 10 percig TBST pufferben majd alkalikus-foszfátáz szubsztrát pufferben (0.1 M TRIS pH=9.5, 1 mM MgCl₂) öblítettük át, majd megfelelő szubsztrát oldatban (0.02% (w/v) BCIP, 0.03% (w/v) NBT, szubsztrát pufferben) inkubáltuk szobahőmérsékleten, míg a fehérjecsíkok láthatóvá nem váltak. A reakciót desztillált vizes öblítéssel leállítottuk, majd a filtert megszáritottuk. A hibridizációs reakciók során nem specifikus csíkok festődését is megfigyeltük, ami növényből készült fehérjekivonatok esetében nem számít ritkaságnak (ennek oka sokszor például a Rubisco nem specifikus festődése). A PIF3-mat szimbolizáló csíkot ezért minden esetben fehérje molekulásúly-marker (Invitrogen, USA) és kontrollként alkalmazott, baktériumból tisztított rekombináns PIF3 protein alkalmazásával azonosítottuk.

4.3 Növényeken alkalmazott technikák

4.3.1 Magsterilizálás, növénynevelés

A sterilizálandó magokat vízbe áztatás után 2 napig 4 °C-on tároltuk, majd 10 percig 5%-os (w/v) kalcium-hipoklorit oldatban áztattuk, ezután steril desztillált vízzel ötször átmostuk. A steril magok ezután AM ill. MS táptalajra kerültek és 12 h fény/12 h sötét körülmények között neveltük őket, ha másként nem jeleztük.

4.3.2 Transzgénikus növények előállítás (Clough és Bent, 1998 után)

A megfelelő pPCV vagy pPCVB000 alapú vektorkonstrukciót hordozó *Agrobacterium* törzset 300 ml, 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó YEB oldatban növesztettük 25 °C-on 2 napig ($OD_{600} = 2.5-3.0$), majd centrifugálással (4000 g, 20 perc, 25 °C) összegyűjtöttük és 3 ml YEB oldatban felszuszpendáltuk. Ezután lassan, folyamatos kevergetés mellett 300 ml 4%-os (w/v) szacharózoldatot, végül 40 µl Silwet L-77-et (Lehle Seeds, USA) adtunk a szuszpenzióhoz. A transzformálandó, üvegházban nevelt *Arabidopsis* növények virágzatát 10 másodpercre a szuszpenzióba merítettük, majd a növényeket 1 napig alumíniumfóliával letakarva, fénytől védve, tartottuk. A felnevelt növényekről magot gyűjtöttünk és a megfelelő szelektációs ágenssel és klaforánnal kiegészített AM táptalajon steril körülmények között szelektáltuk a transzformánsokat (T1 nemzedék), amelyeket, miután megfelelő erősségű gyökérzetet fejlesztettek (10-12 nap), földbe ültettünk és az üvegházban felneveltünk. Minden konstrukció esetében 20-30 független T1 transzformáns vonalat állítottunk elő. Vizsgálatainkat a T3 nemzedék transzgénre nézve homozigóta egyedein végeztük, melyekben a konstrukciók kifejeződését specifikus ellenanyagokkal végzett Western blot analízissel ellenőriztük.

4.3.3 Hipokotilhosszmérés

A magokat Petri-csészébe helyezett 4 réteg, desztillált vízzel megnedvesített szűrőpapírra szórtuk, majd 2 napra 4 °C-ra, sötétbe helyeztük. Ezután a magok 22 °C-ra kerültek: a csírázást indukáló 6 óra fehér fénykezelés ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) után 12 óra sötét, majd a

megfelelő intenzitású és hullámhosszú fénykezelés (vagy sötét) következett. A kezelés 4. napján a csíranövényeket 1%-os (w/v) agar lemezre fektettük, majd síkágas lapszkennelrel digitális képet készítettünk róluk. A képet a MetaMorph szoftverrel (Universal Imaging, USA) dolgoztuk fel, mely az adatokat az Excel szoftver (Microsoft, USA) által olvashatóvá alakította, így a statisztikai kiértékelést már ezzel végezhetjük. Az eredmények ábrázolásához a Sigmaplot (Scientific Graphic Software, USA) szoftvert használtuk.

4.3.4 Fénykezelések

A fénykezelések végrehajtásához a Quantum Devices Inc (USA) Snaplite LED lámpákat tartalmazó monokromatikus fényforrásait használtuk. Az alkalmazott vörös fény hullámhossza 665 ± 15 nm, intenzitása, $36 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; a távoli-vörös fény hullámhossza 730 ± 15 nm, az intenzitása $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; a kék fény hullámhossza 470 ± 15 nm, intenzitása $38 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ha máshogy nem jelöltük.

4.3.5 Virágzási idő meghatározása

A magokat nedves talajra vetettük, majd 2 napig sötétben, 4°C -on tartottuk. Ezután állandó hőmérsékletet (22°C) biztosító klímakamrákba helyeztük őket rövid- (8 óra fehér fény, 16 óra sötét), illetve hosszúnappalos (16 óra fehér fény, 8 óra sötét) körülményeket előállítva. A növények tőlevélrózsáinak leveleit akkor számoltuk meg, amikor a virágzati tengely hossza elérte az 1 centimétert. A virágzási idő azoknak a napoknak a száma, amelyek a fényre helyezéstől eddig a napig teltek el.

4.3.6 Epifluoreszcens, fény- és konfokális mikroszkópia (Kircher és mtsai (1999) után)

Epifluoreszcens és fénymikroszkópiához a csíranövényeket zöld biztonsági fényben helyeztük a mikroszkópi tárgylemezre, majd Axioskop mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) vizsgáltuk őket. A különböző fluoreszcens proteinek (GFP, CFP és YFP) gerjesztéséhez és detektálásához GFP-, CFP- és YFP-szűrőkészleteket használtunk (AHF Analysentechnik, Németország). A kísérletek eredményét digitális Axiocam kamerarendszerrel (Zeiss, Németország) dokumentáltuk a mikroszkópos vizsgálat kezdeti 30 másodpercében.

A konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos vizsgálatokhoz (LSM-510 nevű készülék, Zeiss, Németország) a fent leírtak szerint készítettük elő a vizsgálandó mintákat. A gerjesztőfényt argon lézer biztosította: 458 nm (CFP) és 514 nm (YFP). A CFP és YFP szimultán kétcsatornás detektálásához BP 535-590 IR illetve BP 480-520 IR szűrőket használtunk.

A digitális képek minőségét Photoshop 5.0 (Adobe Systems Europe, Nagy-Britannia) szoftverrel javítottuk.

4.3.7 Luciferáz enzimaktivitás meghatározása CCD kamerával

A LUC, ill. PIF3-LUC fehérjéket kifejező, transzgénikus csíranövényeket sötétben MS lemezen neveltünk. A csírázást kezdetét követő negyedik napon a növényeket – a kontroll kivételével – vörös (30 μmol foton/ m^2/s) vagy távoli-vörös (2 μmol foton/ m^2/s) fényvel kezeltük. Ezután a növényeket 2.5 mM luciferin oldattal permeteztük le, majd folyékony nitrogénnel hűtött nagy érzékenységű CCD kamerával (LN-CCD-512-TKB, Princeton Instruments, USA) digitális felvételt készítettünk, melyet MetaView szoftverrel (Universal Imaging, USA) elemeztünk. Az így kapott fényintenzitás-érték arányos a minta luciferáz aktivitásával, melyből a digitális kamera zaj-háttérét levonva kapott relatív aktivitásértéket grafikonon ábrázoltuk (Excel szoftver, Microsoft, USA). A csíranövényekről készült kép fényesség-küszöbértékeit a MetaView szoftverrel állítottuk be.

4.3.8 *In vivo* lumineszcencia-mérés luminométerrel

A CAB:LUC (Millar és mtsai, 1992a), CCR2:LUC (Doyle és mtsai, 2002) és CCA1:LUC (Doyle és mtsai, 2002) konstrukciót kifejező csíranövényeket 12 óra fény/12 óra sötét körülmények közt állandó 22 °C-on 6 napig neveltük. A mérés kezdete előtt 6 órával a csíranövényeket steril körülmények között egyenként egy 96 zsebes mikrotiterlemezbe helyeztük, melynek minden zsebe 0.25 ml MS táptalajt tartalmazott. Minden növényre 20 μl 2 mM-os luciferin oldatot cseppentettünk. A mérés a csírázást követő 7. napon indult. A méréseket Topcount automatizált luminométerrel (Packard) végeztük, mely minden, a mikrotiter lemez zsebeiben elhelyezett csíranövény által kibocsátott lumineszcenciát 1-2 óránként egyenként, a mérési idő végéig (3-7 nap) rögzítette. A luminométerben a mintákat a mérés módjától függően sötétben vagy vörös fényben tartottuk (7-8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). A folyamatos

fényben levő minták csupán a mérések alkalmával (1-2 óránként 9 percre) kerültek a mérőtér sötétjébe, ami a cirkadián óra működését nem befolyásolja (Millar és mtsai, 1995). A mérési eredmények feldolgozása a TopTemp nevű Microsoft Excel makro programmal (Dr. Andrew Millar, University of Warwick, UK ajándéka) történt. A csíranövények által kibocsátott lumineszcencia értékét az adott növény által a mérés során kibocsátott lumineszcencia átlagával osztottuk el. Ezt az adatot az idő függvényében ábrázoltuk. A skála kiindulópontja, a 0 idő a cirkadián órát beállító utolsó szignál bekövetkezésének időpontja. Az ettől számítva eltelt idő a Zeitgeber time (ZT), a $ZT=0$ a kísérleteinkben az utolsó sötét/fény átmenet időpontja.

4.4 Adatfeldolgozási, interpretálási irányelvek

Minden kísérletünket legalább 4-5 független transzgénikus növény-vonalon, ill. 2-3 egymástól függetlenül készült mintasoron is elvégeztük. Mivel ezek hasonló eredményt mutattak, így a dolgozatban – ha másként nem jeleztük – egy-egy kiválasztott reprezentatív ábrarozat, fotográfia kerül bemutatásra.

5. EREDMÉNYEK

5.1 A *pif3* mutáns növények vizsgálata

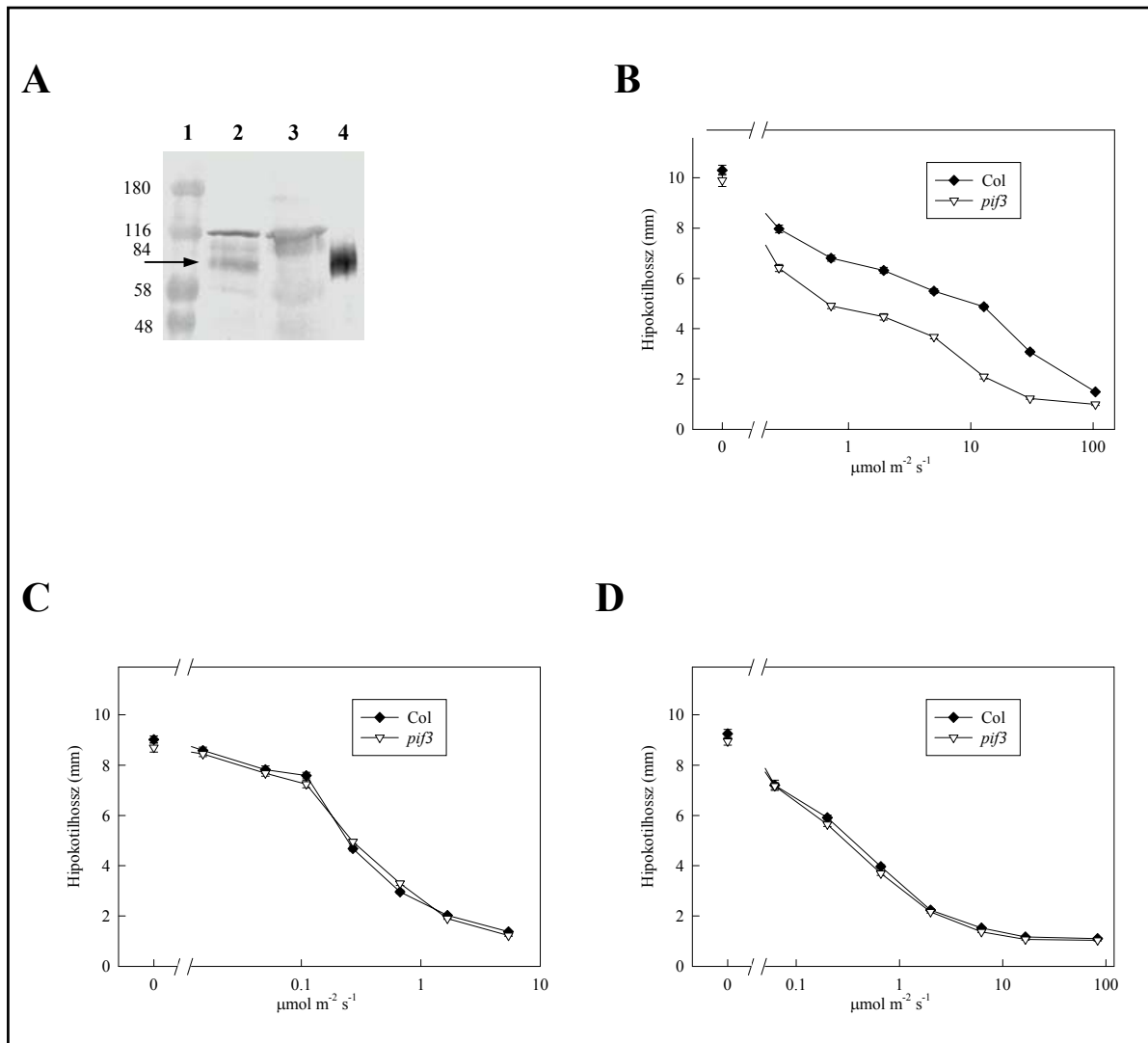
Az Irodalmi áttekintésben említettem, hogy PIF3 hiányos mutáns növényi vonal korábban nem állt rendelkezésre, ezért a kölni GABI-Kat mutánsgyűjteményből származó, nemrégiben azonosított PIF3 mutáns vonal vizsgálata különös jelentőséggel bírt. A mutációt okozó T-DNS a *PIF3* gén kódoló régiójának 5'-részébe épült be. Először igazolnunk kellett, hogy a mutáns nem tartalmaz PIF3 fehérjét. Amint az a 5.1/A ábrán látható, a T-DNS inszerció PIF3 nullmutánst eredményezett: a vizsgált fehérje mennyisége a detektálhatóság szintje alá csökkent.

A következőkben a mutáns csíranövények fényintenzitás- és hullámhossz-specifikus hipokotil megnyúlás gátlását vizsgáltuk meg. Az 5.1/B ábrán látható, hogy a kontroll növényhez képest a mutánsban vörös fény-specifikus hipokotilhossz-rövidülés figyelhető meg. Távoli-vörös (5.1/C ábra), és kék (5.1/D ábra) fényben elhanyagolható a vad típusú kontrollhoz viszonyított különbség. Ezek az adatok azonban ellentmondásban állnak a szakirodalomban (Ni és mtsai, 1998) már korábban közltekkel: vörös fényben hiperszenzitív válasz kaptunk a várt hiposzenzitív helyett.

Elvégeztük a *pif3* növények virágzási idejének meghatározását is. Az 5.1 táblázatban feltüntetett adatok szerint a PIF3 fehérje hiányának nincs jelentős hatása a virágzás idejére sem hosszú-, sem rövidnappalon nőtt növények esetében. Ez az adatunk is ellentmondásban áll Ni és mtsai (1998) megfigyelésével: ők a PIF3 antiszensz növényeket vizsgálva korai virágzást tapasztaltak.

5.1 táblázat A *pif3* növények virágzási ideje

Növények	Rövidnappal		Hosszúnappal	
	Tőlevelek száma	Virágzásig eltelt napok száma	Tőlevelek száma	Virágzásig eltelt napok száma
Col	47 ± 5	75 ± 9	13 ± 2	55 ± 5
<i>pif3</i>	45 ± 4	72 ± 7	12 ± 3	57 ± 6



5.1 ábra A *pif3* csíranövények hipokotil-fenótipusa *phyB*-specifikus

A. Csak a vad típusú 4 napos etiolált növényekben tudunk Western blot hibridizációval PIF3 fehérjét kimutatni (2. sáv), a *pif3* növény tehát nullmutánsnak bizonyul (3. sáv). Kontrollként molekulásúlymarkert (1. sáv) és *E. coli*-ből tisztított PIF3 fehérjét alkalmaztunk (4. sáv). A nyíl a PIF3 fehérje csíkját jelöli, a molekulásúlymarker melletti számok kDa értékeket jelentenek.

B. A 4 napos csíranövények hipokotilhossza vörös fényben.

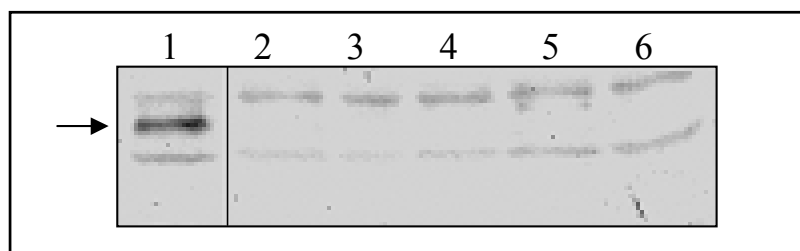
C. A 4 napos csíranövények hipokotilhossza távoli-vörös fényben.

D. A 4 napos csíranövények hipokotilhossza kék fényben.

Minden mérési pontnál ábrázoltuk a standard hiba értékét is, amelynek vonalát az értéket jelölő szimbólum eltakarja.

5.2 A *poc1* mutáns nem tartalmaz PIF3 fehérjét

Halliday és mtsai 1999-ben közölték eredményeiket egy általuk jellemzett *PIF3* mutáns növényi vonalról. Kimutatták, hogy a *PIF3* 5' nem transzlálódó ún. "leader" régiójába épült be egy T-DNS darab, amely a vizsgálatok során a vad típusú kontrollnövényhez képest magasabb *PIF3* mRNS szintet mutatott, ezért *PIF3* túltermelő mutáns vonalként jellemezték. Mivel a *poc1* csíranövények hiperszenzitívek voltak a hipokotilhossz-növekedés gátlására vörös fényben, ez az adat szoros korrelációt mutatott a Ni és mtsai által 1998-ban közölt adatokkal, amely szerint a *PIF3* a PHYB-specifikus jelátviteli utak pozitív szabályozóeleme. Az előző alfejezetben általunk jellemzett *bona fide* *PIF3* hiányos mutáns vörös fényben mutatott hipokotilhossz-növekedés gátlása azonban nagyon hasonlított a *PIF3* túltermelőként jellemzett *poc1* növényekéhez, ezért kézenfekvő volt, hogy megvizsgáljuk a rendelkezésünkre álló *PIF3*-specifikus antitesteket használva Western blot módszerrel a *poc1* növényekben a *PIF3* fehérje szintjét. A kapott eredmény meglepő volt, de nem váratlan: a *poc1* mutáns nem tartalmaz ezzel a módszerrel kimutatható mennyiségű *PIF3* proteint. Az 5.2 ábrán látható, hogy sem a fényel nem kezelt, sem a vörös vagy távoli-vörös fényel megvilágított csíranövényben nem mutatható ki a *PIF3* fehérje. Ezek az adatok tehát további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a *PIF3* fehérje a hipokotilhossz növekedését vörösfény-specifikusan befolyásoló jelátviteli utak negatív regulátora.



5.2 ábra A *poc1* mutáns nem tartalmaz PIF3 fehérjét

Az ábrán 4 napos etiolált növényekből tisztított fehérjekivonatokon, *PIF3* antitesttel végzett Western blot analízis eredménye látható. **1.** sáv: vad típusú növény; **2-6.** sáv: *poc1* mutáns növény. Fénykezelés nélkül: **1., 2.** sáv; 1h vörös fény: **3.** sáv; 2h vörös fény: **4.** sáv; 1h távoli-vörös fény: **5.** sáv; 2h távoli-vörös fény: **6.** sáv. A nyíl a *PIF3* fehérje csíkjára mutat.

5.3 PIF3 túltermelő transzgenikus növények előállítása, fenotípus-vizsgálatok

A PIF3 funkcionális vizsgálatának kiterjesztéséhez az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint olyan transzgenikus növényeket állítottunk elő, amelyek a $(35S)_{2x}$ promóter által konstitutívan és magas szinten fejezik ki a PIF3 fehérjét, illetve a PIF3-GFP fúziós proteint. Ezen fehérjék túltermelésének kimutatása Western blot analízissel az 5.3/A ábrán látható.

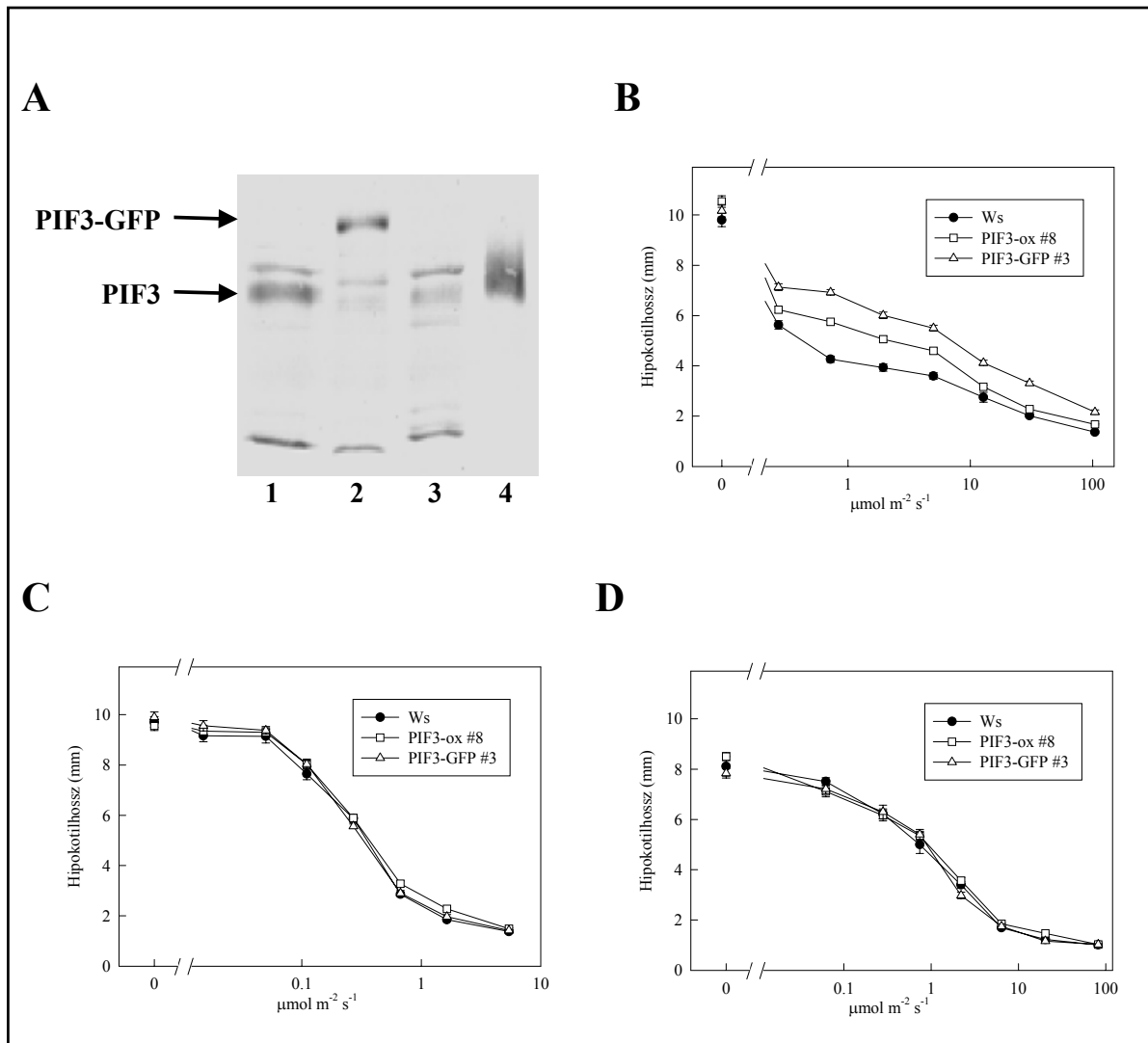
Hipokotilhossz-változás mérésén alapuló vizsgálatunk ezekkel a transzgenikus növényekkel 2 alapvető célt szolgáltak:

(I) Mint azt Irodalmi áttekintésben említettük, az eddig közölt, PIF3 túltermelő növények vizsgálatával nyert fenotípus-adatokat a PIF3 5'-végén csonka változatának felhasználásával nyerték (Ni és mtsai, 1998). Az idézett munkában közölt molekuláris klónozásbeli nehézségek ellenére a teljes hosszúságú PIF3 cDNS klónozása és *Arabidopsis*-ban történő expresszálása laboratóriumunkban sikerrel járt, így lehetőségünk nyílt arra, hogy az eddigieknél precízebb fenotípusvizsgálatokat végezhessünk.

(II) Az epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok megkezdése előtt meg akartunk győződni arról, hogy a PIF3-GFP fúziós fehérje funkcionális-e, ezáltal elvárhatjuk-e azt, hogy a kísérleteink során megfigyelt viselkedése az endogén fehérjéének pontos leképezése legyen.

Vizsgálataink eredményét egy-egy ábrapanelen ábrázoljuk. Az 5.3/B ábrán a csíranövények hipokotilhossz-változása látható különböző intenzitású vörös fényben; az 5.3/C ábrán a távoli-vörös fény; az 5.3/D ábrán a kék fény hatása figyelhető meg. Látható, hogy a PIF3 túltermelésének csak vörös fényben nőtt növények esetén van hatása a csíranövények hipokotilhosszára, ami a PHYB domináns hatására utal. Az 5.3B ábrán az is megfigyelhető, hogy a PIF3 és PIF3-GFP fehérjék túltermelése hasonló fenotípust eredményez, ami arra utal, hogy a PIF3-GFP fúziós fehérje funkcionális molekulaként fejti ki a hatását a növényben.

Vizsgálataink alapján tehát a PIF3 hiányos és a PIF3-mat túltermelő növények fenotípusa egyformán utal a PIF3 hipokotil-megnyúlásban betöltött negatív szerepére, mégpedig az eddig közölt adatokkal ellentétes értelemben.



5.3 ábra A PIF3 túltermelő csíranövények hipokotil-fenotípusa phyB-specifikus

A. A PIF3 túltermelés igazolása PIF3 antitestekkel végzett Western blot analízissel. Az 1. sáv a $(35S)_{2x}$:PIF3 (#8 vonal), a 2. sáv a $(35S)_{2x}$:PIF3-GFP (#3 vonal), a 3. sáv a vad típusú (Ws.), etiolált növényekből készült fehérjekivonatok analízisének az eredményeit mutatja. A 4. sáv PIF3-at termelő *E. coli*-ből izolált fehérjemintát mutat be. A nyilak a PIF3 és PIF3-GFP fehérjék csíkjait jelölik.

B. A 4 napos csíranövények hipokotilhossza vörös fényben.

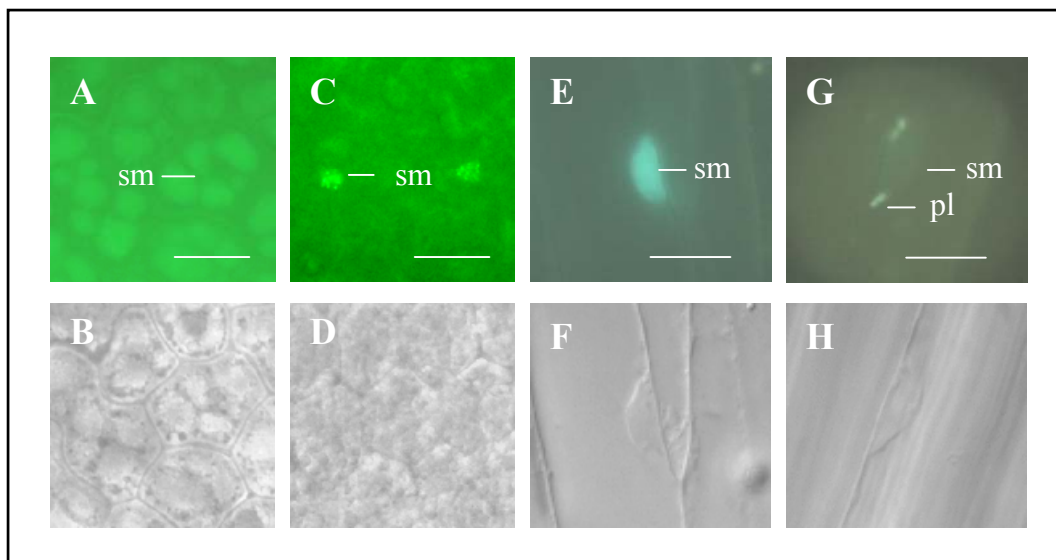
C. A 4 napos csíranövények hipokotilhossza távoli-vörös fényben.

D. A 4 napos csíranövények hipokotilhossza kék fényben.

Minden mérési pontnál ábrázoltuk a standard hiba értékét is, amelynek vonalát az értéket jelölő szimbólum eltakarja.

5.4 A PIF3 fehérje kifejeződése a fejlődési állapottól függ

Epifluoreszcens mikroszkópos megfigyeléseinket a PIF3-GFP fúziós fehérjét a $(35S)_{2x}$ promóter irányítása alatt kifejező etiolált illetve fényben nőtt csíranövényeken kezdtük meg. Első eredményeink összefoglalása az 5.4 ábrán látható. A PIF3-GFP mennyisége az etiolált növényben a kimutathatóság szintjét akkor éri el, amikor a csíranövény gyökere áttöri a maghéjat. Ez hozzávetőlegesen a csírázás kezdetétől számított második napon következik be. Az ennél fiatalabb növényekben a PIF3-GFP nem észlelhető (5.4 ábra, A, B kép). Ezen fejlődési állapot elérése után a PIF3-GFP fúziós fehérje a csírázás kezdetét követő 6. napig (vizsgálataink utolsó mintavételi pontja) minden sejttypusban, hozzávetőlegesen azonos szinten kifejeződve, kizárólag a sejtmagban figyelhető meg (5.4 ábra, C-F kép). Ez a megfigyelés csak az etiolált növényekre igaz, ugyanis sem a fényen nőtt, sem pedig a mikroszkópos vizsgálat előtt megvilágított csíranövényekben nem sikerült PIF3-GFP fehérjét

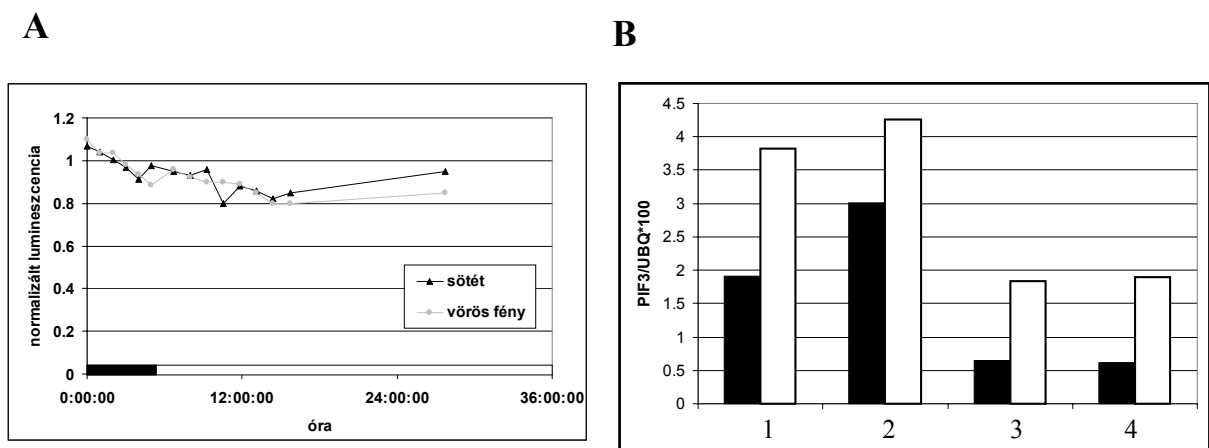


5.4 ábra A $(35S)_{2x}$:PIF3-GFP kifejeződése fejlődésfüggő

$(35S)_{2x}$:PIF3-GFP konstrukciót hordozó transzgenikus *Arabidopsis* növényeket sötétben (A-F) illetve fényben (G, H) csíráztattuk és neveltük. A PIF3-GFP fúziós fehérje sejten belüli elhelyezkedését epifluoreszcens mikroszkópiával követtük (A, C, E, G), kontrollként a látómezőkről fénymikroszkópos képeket is készítettünk (B, D, F, H). A csíranövények a csírázás indukciójától számított 1 (A, B), 2 (C, D) és 6 (E, F) napig nőttek sötétben, vagy 6 napig fényben (G, H). A C, D képek sziklevelelről, az E-H képek hipokotilról készültek. Megjelöltünk néhány sejtmagot (sm), és kloroplasztiszt (pl), a képek jobb alsó sarkában látható vonalak 10 μm -nek felelnek meg.

megfigyelni (5.4 ábra, G-H kép). Ennek a megfigyelésünknek az érdekességét az adja, hogy a fotomorfogenezis központi regulátorának hitt *PIF3* fehérje csak sötétben észlelhető, fényben jelenlétét (ezzel a módszerrel) nem tudjuk kimutatni. Ennek az érdekes jelenségnek alapvetően két oka lehet: (I) a *PIF3* mRNS szintje és/vagy (II) a *PIF3* fehérje stabilitása változik meg. A következőkben ezeket a lehetőségeket vizsgáljuk meg.

Ennek a kérdésnek az eldöntéséhez először arra kerestük a választ, hogy vajon a fény szabályozza-e a *PIF3* transzkripcióját. Első megközelítésben olyan transzgenikus növényeket állítottunk elő, amelyek a *PIF3* promóterének irányításával fejezik ki a luciferáz (LUC) fehérjét. Luciferin szubsztráttal lepermetezett etiolált növényeket helyeztünk fénybe és mértük az általuk kibocsátott lumineszcenciát, amely arányos a promóter pillanatnyi aktivitásával. Az 5.5/A ábrán látható, hogy fénykezelés hatására a *PIF3* promóter aktivitása nem változik jelentősen, fényspecifikus transzkripciós szintű szabályozást nem tapasztaltunk.



5.5 ábra A *PIF3* transzkripcióját és mRNS szintjét a rövid fénykezelés nem befolyásolja

A. *PIF3*:LUC konstrukciót kifejező 6 napos etiolált növények által kibocsátott lumineszcenciát mértünk CCD kamerával és az értéket az adott növények által kibocsátott érték alapszintjére (megvilágítás kezdete előtt mért érték) normáltuk. A csiranövényeket a mérés megkezdése előtt 12 órával permeteztük le luciferinnel. Az ábrán a fényvel nem kezelt és 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ intenzitású vörös fénybe helyezett növényekhez tartozó értékeket ábrázoltuk. A vízszintes tengelyen látható fekete sáv a sötét-, a fehér sáv pedig a fénykezelést szimbolizálja (természetesen csak a fényvel kezelt növények esetén).

B. RNáz protekciós módszerrel mértük meg a *PIF3* és *PIF3-GFP* mRNS szintjét a csírázás kezdetétől számított 1 napos (1), 2 napos (2) és 6 napos (3) etiolált illetve 6 napos, 4 óra 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ vörös fényvel kezelt etiolált (4), $(35S)_{2x}$:*PIF3-GFP* konstrukciót hordozó transzgenikus növényből. A fekete oszlopok az endogén *PIF3*, a fehérek a $(35S)_{2x}$ promóter által szabályozott *PIF3-GFP* mRNS szintjét szimbolizálják a mintához tartozó *UBQ* (ubiquitin) mRNS szintre normalizálva.

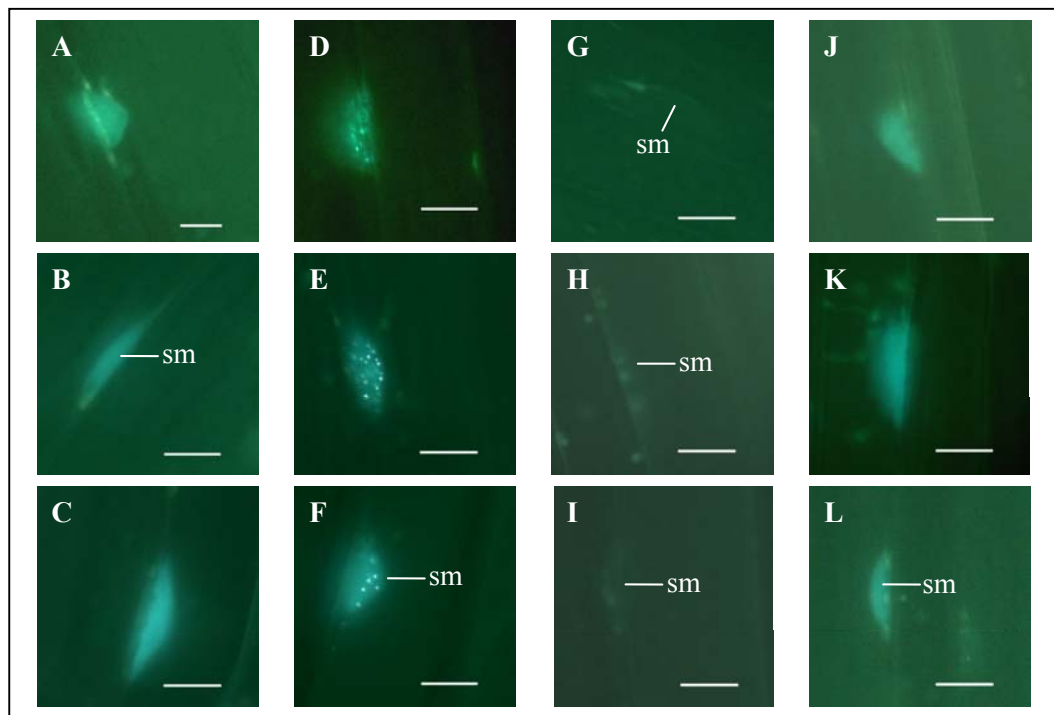
Második megközelítésben RNáz protekciós kísérletet végeztünk, amelyben a különböző korú és különböző fénykezelést kapott csíranövényből készült össz-RNS mintákon vizsgáltuk meg az endogén *PIF3* és a $(35S)_{2x}$ promóter vezérelte *PIF3-GFP* mRNS mennyiségét (5.5/B ábra). Látható, hogy bár mind a *PIF3* mind a *PIF3-GFP* mRNS szintje magasabb a fiatalabb csíranövényben, mint a fejlettebben, egyik mRNS populáció szintje sem változik rövid (néhány órás) fénykezelés hatására. (Ez az eredmény jó korrelációban áll Yamashino és mtsai (2003) nemrégiben közzétett adatával, amely szerint a *PIF3* mRNS mennyisége az etiolált csíranövényeket ért 5 órás fehér fénykezelés hatására nem csökken jelentősen a fényvel nem kezelt kontroll mintához képest.)

Megállapítható tehát, hogy a PIF3 fehérje mennyiségét a fény sem transzkripció, sem mRNS szinten nem szabályozza, szabályozottságot fehérjeszinten kell keresnünk. A következőkben a PIF3-GFP fúziós fehérje sejten belüli viselkedését vizsgáljuk meg különböző hullámhosszú és időtartamú megvilágítás hatására.

5.5 A PIF3 sejten belüli eloszlásának fényfüggése és fényindukált lebomlása

Vizsgálatainkat vad típusú (*Col*), *phyB* hiányos (*phyB-9*) és *phyA* hiányos (*phyA-211*) genetikai háttérű növényeken végeztük. A konstitutív expressziót biztosító $(35S)_{2x}$ promóter irányításával kifejezett PIF3-GFP molekulák eloszlását 6 napos etiolált növények hipokotilsejtjeiben vizsgáltuk és a következőket tapasztaltuk. A PIF3-GFP felhalmozódása és eloszlása a fényvel nem kezelt csíranövények sejtmagjában egyenletes, függetlenül attól, hogy tartalmazznak-e *phyA* vagy *phyB* fotoreceptort (5.6 ábra A, B, C kép). Egy 30 másodperces vörös fényimpulzus azonban alapvetően megváltoztatta a PIF3-GFP sejttagon belüli eloszlását: mindhárom háttérben PIF3-GFP tartalmú sejtmagi foltok formálódtak (5.6 ábra D, E, F kép), amelyek szembetűnő hasonlóságot mutattak a csoportunk által már korábban jellemzett fitokróm-tartalmú sejtmagi foltokhoz (Kircher és mtsai, 1999, 2002). Ezek a foltok a fitokrómok által formáltakal ellentétben nem bizonyultak hosszú életűnek: ha a fényimpulzus után a csíranövényeket sötétbe helyeztük, 30 perc elteltével megállapíthattuk, hogy a PIF3-GFP jel a detektálhatósági szint alá csökken (5.6 ábra G, H, I kép). (Ugyanezt tapasztaltuk akkor is, ha folyamatos fényben tartottuk a növényeket.) Hosszabb ideig sötétben tartva a csíranövényeket, 3-4 óra elteltével a PIF3-GFP fehérjék

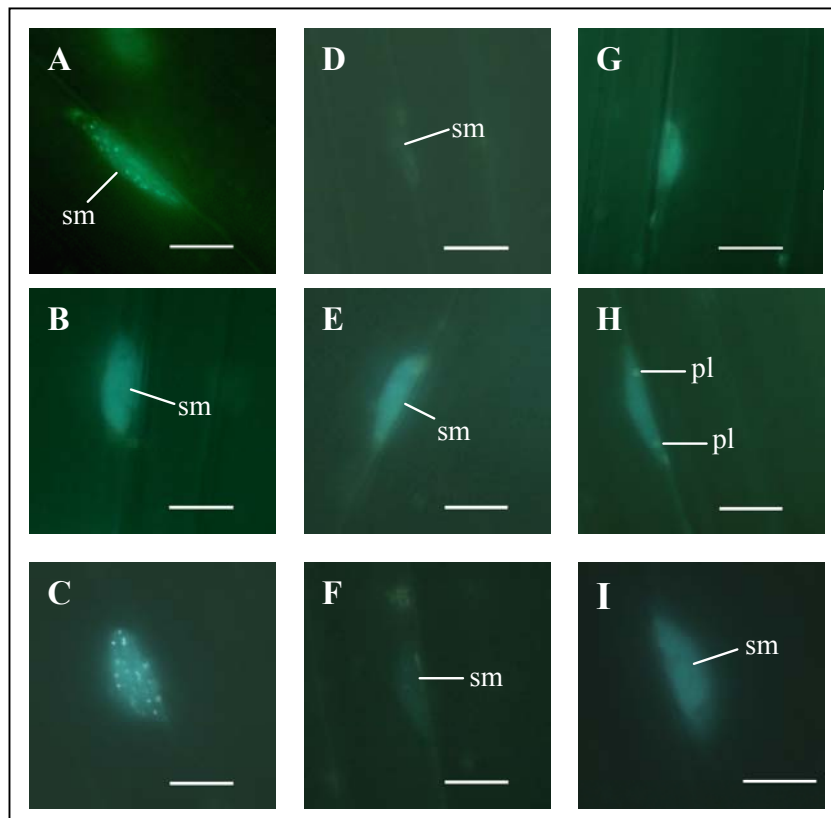
újbbóli, diffúz sejtmagi eloszlású megjelenését tapasztaltuk a genetikai háttértől függetlenül. A jelerősség a maximumát újbb 3-4 óra múlva éri el, és az intenzitás ezután már nem változik. Az 5.6 ábra J, K, L képén ez az állapot látható. Ha a vizsgált mintát ebben az állapotban újbb vörös fényimpulzussal kezeljük, a sejtmagi foltok ismételt gyors formálódása után azok eltűnését, majd ismételt sötét inkubáció után PIF3-GFP-ből származó diffúz sejtmagi festést figyelhetünk meg (az adatok nem kerülnek bemutatásra). Ez a válaszreakció (foltformálás, -eltűnés) megakadályozható, ha a vörös fényimpulzust távoli-vörös követi, de csak azokban a növényekben, amelyek nem tartalmaznak aktív phyA fotoreceptort (az adatok nem kerülnek bemutatásra). Ez azt jelenti, hogy a megfigyelt jelenséget a phyA és valamilyen más fitokróm szabályozza.



5.6 ábra A PIF3-GFP sejten belüli eloszlását a vörös fény szabályozza

A PIF3-GFP fehérjét túltermelő transzgenikus *Arabidopsis* csíranövényeket (vad típus: **A, D, G, J**; *phyA-211*: **B, E, H, K**; *phyB-9*: **C, F, I, L**) sötétben neveltük 6 napig, majd a következő fénykezelésnek vetettük alá őket: **A, B, C**: nincs fénykezelés; **D, E, F**: 30 másodperc vörös fénykezelés; **G, H, I**: 30 másodperc vörös fénykezelés után 30 perc sötét; **J, K, L**: 30 másodperc vörös fénykezelés után 6 óra sötét. A fénykezelések után azonnal készítettük az ábrán bemutatott epifluoreszcens mikroszkópi képeket. Néhány képen bejelöltük a sejtmagokat (sm). A képek jobb alsó sarkában látható vonalak 10 μm -nek felelnek meg.

A következő kísérletben távoli-vörös fényt használtunk vörös helyett, amely csak a phyA fotoreceptorokat alakítja Pfr formájúvá, a többi fitokrómot nem. Az 5.7 ábra A-C képein látható, hogy egy 5 perces távoli-vörös fénykezelés PIF3-GFP tartalmú sejtmagi foltok formálódását idézte elő mind a vad típusú, mind a phyB hiányos háttérben, de nem okozott változást az aktív phyA-t nem tartalmazó növényekben. Ez a fényimpulzus a PIF3-GFP fluoreszcencia gyors eltűnését szintén csak a vad típusú és aktív phyB-t nem tartalmazó növényekben okozta (5.7 ábra D-F kép). 6 órás sötétkezelés a kiindulási erősségű és eloszlású fluoreszcens jelet állította helyre (5.6 ábra A-C kép; 5.7 ábra G-I kép). A phyA hiányos csíranövényekben a PIF3-GFP-specifikus sejtmagi foltok formálódását és a fúziós fehérje



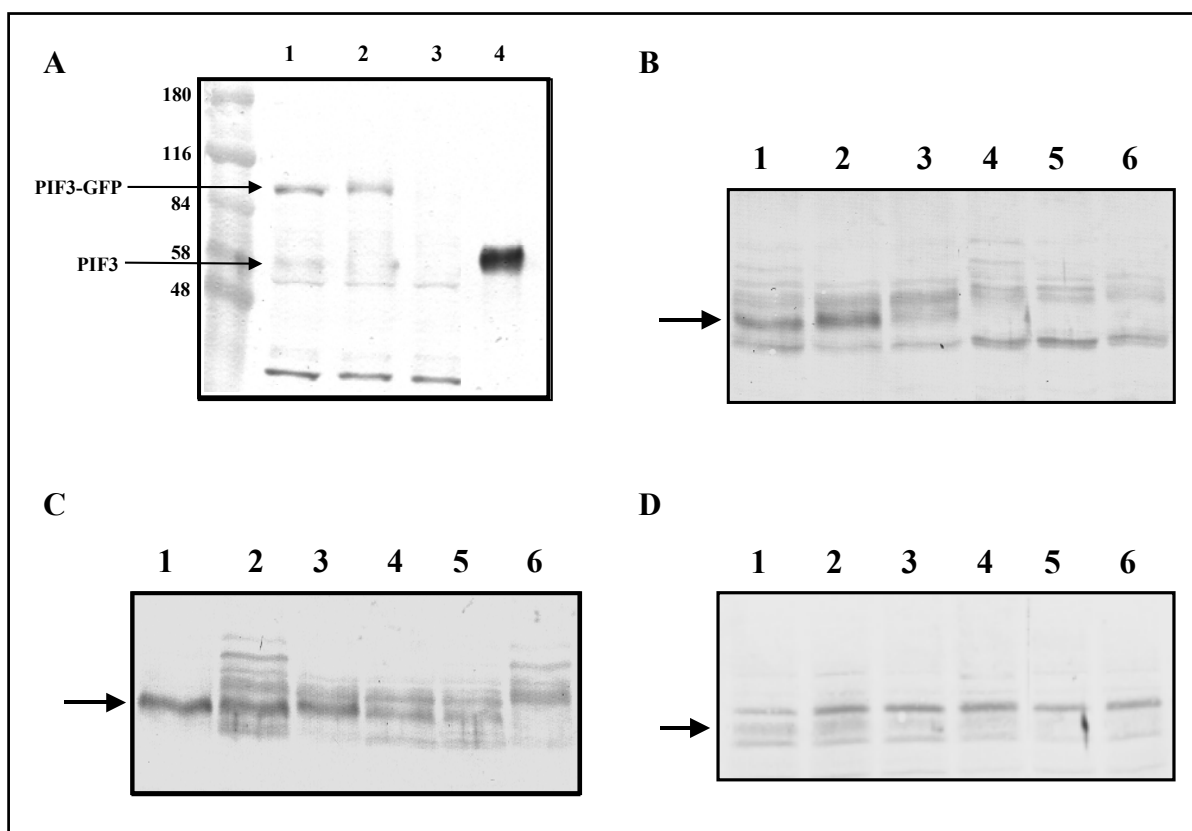
5.7 ábra A PIF3-GFP sejtben belüli eloszlását a távoli-vörös fény is szabályozza

Az epifluoreszcens mikroszkópi felvételek elkészítéséhez az alábbi genetikai háttérű *Arabidopsis* növényeket használtuk: vad típus (Col): **A, D, G**; *phyA-211*: **B, E, H**; *phyB-9*: **C, F, I**. Az etiolált csíranövények 6 naposak voltak, amikor a felvételek elkészítése előtt az alábbi fénykezelést alkalmaztuk. 5 perc távoli-vörös fény: **A, B, C**; 5 perc távoli-vörös fény után 30 perc sötét: **D, E, F**; 5 perc távoli-vörös fény után 6 óra sötét: **G, H, I**. Megjelöltünk néhány sejtmagot (sm), és kloroplasztiszt (pl), képek jobb alsó sarkában látható méretarányvonalak 10 μm -nek felelnek meg.

mennyiségének látható csökkenését nem detektáltuk. Ez a hatás annyira kifejezett, hogy akár 20 órás folyamatos távoli-vörös fényel történő megvilágítás hatására sem történt változás (az adatok nem kerülnek bemutatásra).

Ezekből a megfigyelésekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a PIF3-GFP fehérjemolekulák sejten belüli eloszlását és felhalmozódásának mértékét a vörös és távoli-vörös fény egyaránt szabályozza a phyA és valamely más fitokróm vagy fitokrómok közreműködésével. Ennek a szabályozásnak kulcsfontosságú eleme valószínűleg a PIF3 fényindukált lebomlása, amelynek kiváltásában valószínűleg több fitokróm együttesen játszik szerepet.

Ennek a feltételezésnek az igazolásához Western blot analízist végeztünk. Az 5.8/A ábrán látható, hogy a PIF3 és a PIF3-GFP fehérjék etiolált növényben felhalmozódnak (1. sáv); degradációjuk egy 5 perces vörös fénykezelés hatására megindul (2. sáv); 6 órán át tartó megvilágítás hatására pedig mindkét fehérje mennyisége a detektálhatóság szintje alá csökken (3. sáv). A következő két panel a fényindukált lebomlás finomabb időbeli felbontását szemlélteti. Az 5.8/B ábrán az etiolált növényeket vörös fényel világítottuk meg. A fényel nem kezelt kontrollhoz képest (1. sáv) képest 2 perc fénykezelés nem változtat jelentősen a PIF3 fehérje mennyiségén (2. sáv), míg 10 perc megvilágítás után jól látható a degradáció hatása (3. sáv). Hosszabb idejű fénykezelés (4-6. sáv) hatására a PIF3 mennyisége a detektálhatóság szintje alá csökken. Az 5.8/C ábrán látható, hogy a PIF3 mennyisége távoli-vörös fény hatására szintén csökkenést mutat, de a vörös fényhez képest lassúbb kinetikával: 45 perc után a PIF3 még látható (5. sáv), csak hosszabb fénykezelés hatására csökken a mennyisége a detektálhatóság szintje alá (6. sáv). Az epifluoreszcens mikroszkópiával és a Western blot analízissel kapott eredményeink jól korrelálhatók egymással: a mikroszkópban látható PIF3-GFP-specifikus jel fénykezelések hatására történő eltűnésének és sötétben újra megjelenésének hátterében minden esetben a PIF3 fehérje szintjét érintő változás (lebomlás vagy felhalmozódás) áll.



5.8 ábra A PIF3 fehérje fény hatására degradálódik

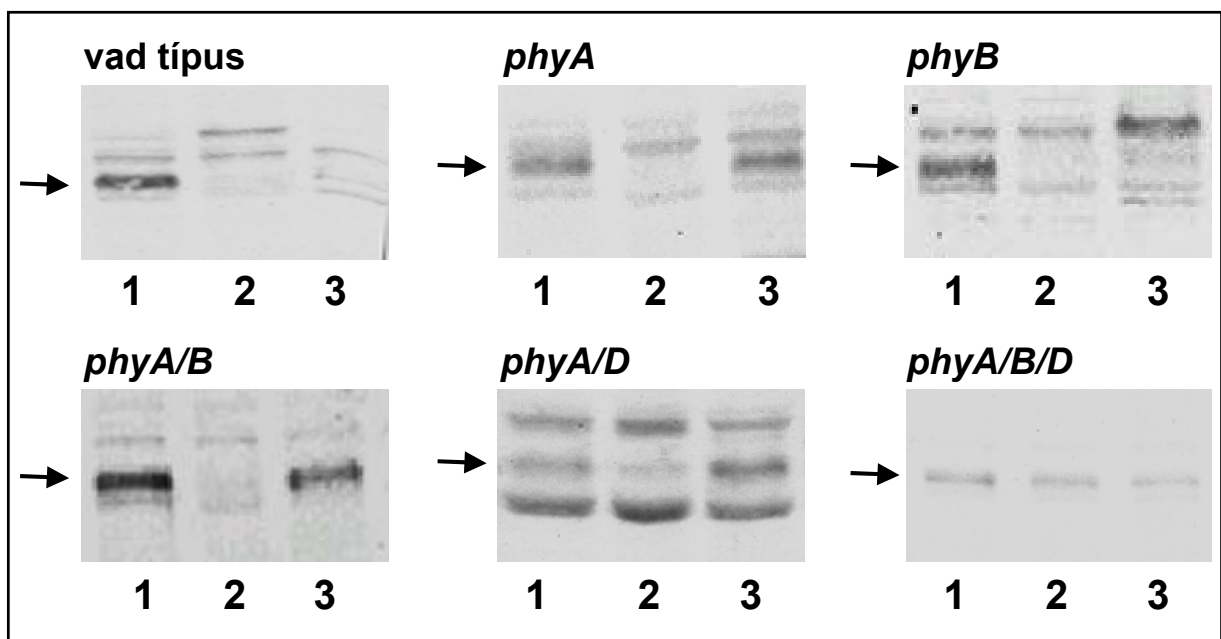
A: Össz-fehérje kivonatot izoláltunk különbözőképpen fénykezelt etiolált PIF3-GFP túltermelő Ws növényekből (1-3. sáv), majd a mintákból 20-20 µg-ot felhasználva Western blot analízist végeztünk PIF3 specifikus antitest segítségével. 1. sáv: 0 perc; 2. sáv: 5 perc; 3. sáv: 6 óra vörös fényel kezelt minta; 4. sáv: 1 µg, *E. coli*-ban expresszált PIF3 fehérje. A panel bal oldalán a molekulásúlymarker csíkjainak megfelelő kDa értékek láthatók. A PIF3 és PIF3-GFP fehérjék csíkjaira nyilak mutatnak.

B: Össz-fehérje kivonatot izoláltunk vörös fényel különbözőképpen kezelt 6 napos etiolált csiranövényből (Ws), majd a mintákból 20-20 µg-ot felhasználva Western blot analízist végeztünk. A fénykezelések a következők voltak: 1. sáv: 0 perc; 2. sáv: 2 perc; 3. sáv: 10 perc; 4. sáv: 30 perc; 5. sáv: 45 perc; 6. sáv: 6 óra vörös fénykezelés. A nyíl a PIF3 fehérje csíkjára mutat.

C: A B panellel megegyező módon felépített kísérleti rendszerben távoli-vörös fény használtunk vörös fény helyett. A fénykezelések a következők voltak: 1. sáv: 0 perc; 2. sáv: 2 perc; 3. sáv: 10 perc; 4. sáv: 30 perc; 5. sáv: 45 perc; 6. sáv: 6 óra távoli-vörös fénykezelés. A nyíl a PIF3 fehérje csíkjára mutat.

D: Össz-fehérje kivonatot izoláltunk kék fényel kezelt 6 napos etiolált *phyA/phyB/phyD* mutáns csiranövényekből, majd a mintákból 20-20 µg-ot felhasználva Western blot analízist végeztünk. A fénykezelések a következők voltak: 1. sáv: 0 perc; 2. sáv: 1 óra; 3. sáv: 2 óra; 4. sáv: 3 óra; 5. sáv: 4 óra; 6. sáv: 6 óra távoli-vörös fénykezelés. A nyíl a PIF3 fehérje csíkjára mutat.

A következő kísérletünk célja a PIF3 fehérje előzőkben bemutatott, vörös és távoli-vörös fény által indukált lebomlásáért felelős fotoreceptor azonosítása. Ehhez a vad típusú etiolált csíranövények mellett különböző fotoreceptor-hiányos mutánsokat tettünk ki 1 órás vörös vagy távoli-vörös fénykezelésnek, és az ezután készült össz-fehérje kivonatokban határoztuk meg a PIF3 mennyiségét. Az 5.9 ábrán megfigyelhető, hogy a fénykezelést nem kapott növényekben a PIF3 egyformán felhalmozódik, függetlenül a fitokrómok hiányától vagy meglététől (1-es számú sávok). Az 1 órás távoli-vörös fénykezelés (3-as számú sávok) csak az aktív phyA-t nem tartalmazó (*phyA*, *phyA/phyB*, *phyA/phyD* és *phyA/phyB/phyD*) mutáns növényekben nem idézte elő a PIF3 degradációját, tehát a PIF3 távoli-vörös fény indukált lebomlását a phyA fotoreceptor szabályozza. Ezzel ellentétben az 1 órás vörös fénykezelés (2-es számú sávok) a *phyA/phyB/phyD* tripla fitokróm-hiányos mutáns kivételével mindegyik növényben a PIF3 degradációját okozta, tehát a PIF3 vörös fény indukált lebomlásáért a phyA, phyB és phyD fotoreceptorok együttesen felelősek.



5.9 ábra A PIF3 vörös és távoli-vörös fény indukálta lebomlásáért a phyA, phyB és phyD fotoreceptorok együttesen felelősek

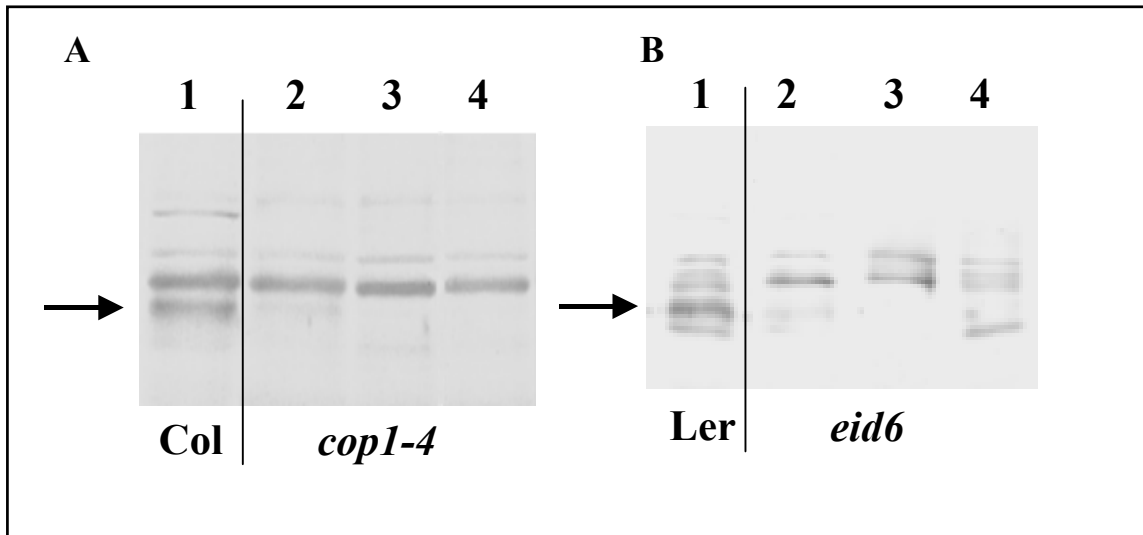
Az ábrán feltüntetett különböző genetikai háttérű csíranövényeket 6 napig növesztettük sötétben, majd fénykezelés nélkül (1 számú sávok); 1 órás vörös fény (2 számú sávok) illetve 1 órás távoli vörös fény (3 számú sávok) kezelés után össz-fehérje kivonatot készítettünk belőlük. Ezekből 20-20 ug-ot, PIF3-specifikus antitestet használva Western blot analízissel vizsgáltunk. A nyilak a PIF3 fehérje csíkjára mutatnak.

Ezen eredmények után azt is meg akartuk határozni, hogy vajon a kék fényt érzékelő receptorok hozzájárulnak-e a PIF3 fényindukált lebomlásához. A kísérletben etiolált *phyA/phyB/phyD* növényeket világítottunk meg kék fényvel és Western blot analízissel határoztuk meg az össz-fehérje kivonatokban a PIF3 protein mennyiségét. Az 5.8/D ábrán látható, hogy a PIF3 degradációját a kék fény e három fitokrómtól függetlenül – a vörös és távoli-vörös fényénél lassúbb ütemben – kiváltja. Ez újabb bizonyíték a fitokrómoktól független, kék fény receptorok (kriptokrómok és/vagy fototropinok) által irányított, a PIF3 fényindukált lebontásában szerepet játszó jelátviteli utak együttműködésére.

5.6 A COP1 szükséges a PIF3 felhalmozódásához sötétben

A COP1 a fotomorfogenezis negatív regulátora. A COP1 protein E3 ubiquitin ligázként működve a HY5-öt és SPA1 fehérje jelenlétében a LAF1 fehérjét a proteozómális lebontás útjára irányítja. Mindezek mellett kimutatták, hogy a HY5 az etiolált *cop1* növények sejtmagjában felhalmozódik, és a konstitutív fotomorfogenikus fenotípus kialakításában vesz részt. Mivel az előzetes kutatási eredmények alapján a PIF3-mat a LAF1-hez és a HY5-höz hasonlóan a fotomorfogenezis pozitív regulátorának gondoltuk, kézenfekvő volt megvizsgálni a PIF3 fehérje fényindukált degradációjának dinamikáját COP1 hiányos növényben. (Természetesen a két fehérje viselkedése között alapvető különbségek vannak, nagyon fontos eltérés az, hogy míg a PIF3 sötétben halmozódik fel a növények sejtmagjában, és fény hatására bomlik le, addig a HY5 éppen ellentétesen viselkedik mind fényben, mind sötétben.) Első kísérletünkben *cop1-4* mutáns növényeket használtunk, amely a COP1 egy közepesen erős, sötétben és fényben egyaránt fotomorfogenikus fenotípust mutató allélje. A Western blot analízisből származó eredményeinket két megállapításban foglalhatjuk össze: (I) a PIF3 fehérje mennyisége az etiolált *cop1-4* növényben jelentősen kisebb, mint a vad típusban (5.10/A ábra 1.-2. sáv); (II) a kisebb mennyiségű PIF3 fehérje vörös vagy távoli vörös fény hatására ugyanúgy degradálódik *cop1-4* növényben, mint vad típusban (5.10/A ábra 3.-4. sáv). Eredményeink megerősítéséhez a nemrégiben leírt (Dieterle és mtsai, 2003) *eid6* mutánsban is megvizsgáltuk a PIF3 akkumuláció szintjét. Az *eid6* fenotípust a *COP1* génben található mutáció okozza. Az etiolált mutáns növény nem különbözik a vad típusútól, de fényben PHYB-függő hiperszenzitív fenotípust mutat. Az 5.10/B ábrán látható, hogy a PIF3 fehérje felhalmozódása a fényvel nem kezelt *eid6* növényekben a vad típusúakhoz képest

csökkent mértékű, viszont a PIF3 fényindukált degradációja ugyanolyan gyors és teljes, mint a vad típusú növényekben megfigyelhető. Mivel a *PIF3* mRNS szint fénykezelés hatására – a vad típusú növényekhez hasonlóan – a *cop1* mutáns növényekben sem változik jelentősen



5.10 ábra A COP1 fehérje szükséges a PIF3 felhalmozódásához

Különböző *cop1* és a hozzá tartozó vad típusú háttérű (A: Col, B: Ler) 6 napos etiolált csiranövényből fénykezelés nélkül (1, 2 számú sávok); 1 órás vörös fény (3 számú sávok) illetve 1 órás távoli vörös fény (4 számú sávok) kezelés után össz-fehérje kivonatokat készítettünk, amelyből 20-20 ug-ot, PIF3-specifikus antitestet használva Western blot analízissel vizsgáltunk. A nyilak a PIF3 fehérje csíkjára mutatnak.

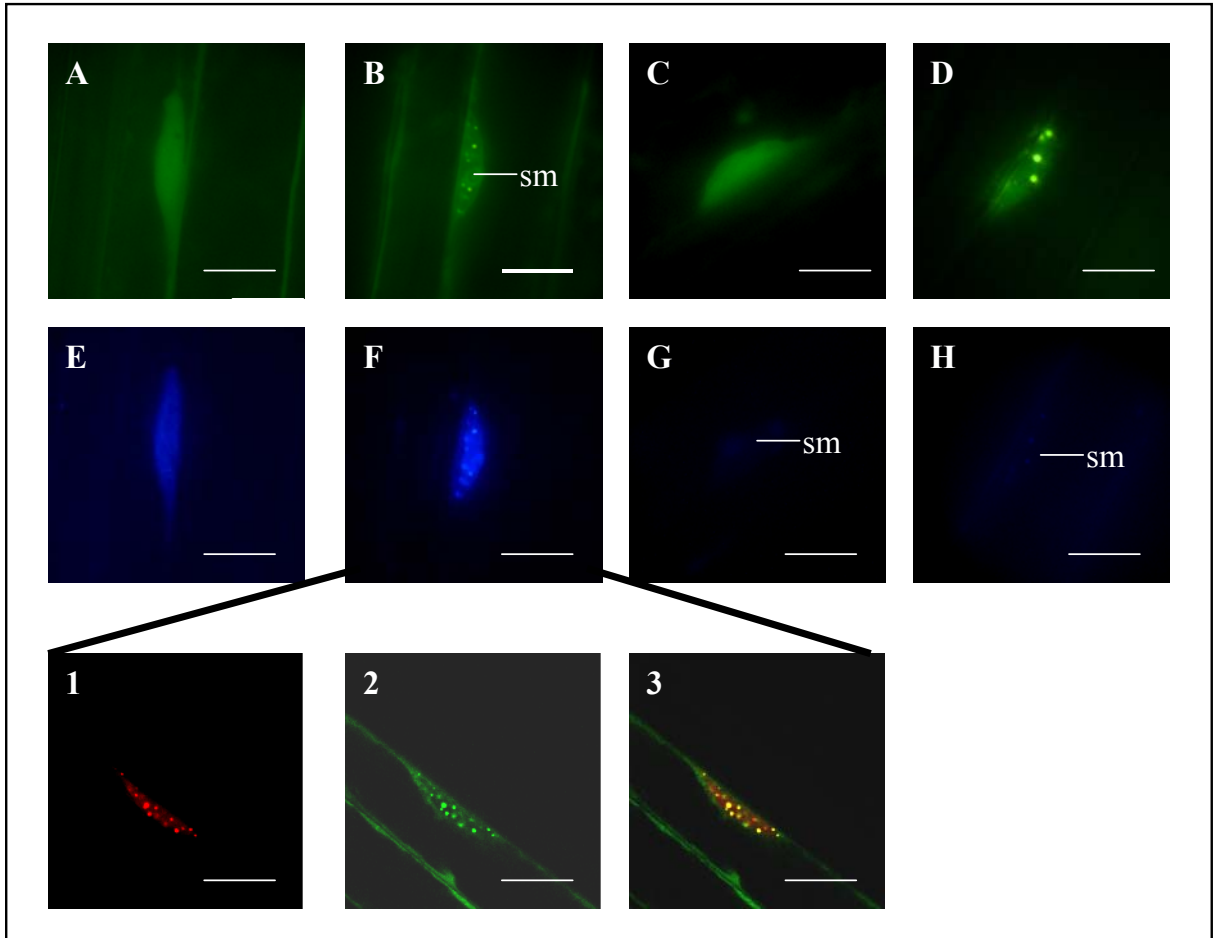
(az adatok nem kerülnek bemutatásra), a Western blot analízis adatai nem transzkripciós szintű változásokat tükröznek a mutánsokban. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy (I) a COP1 fehérje elősegíti a PIF3 felhalmozódását etiolált növényekben, függetlenül a karakterisztikus konstitutív fotomorfogenikus fenotípus megjelenésétől; (II) a COP1 nem befolyásolja a PIF3 fényindukált lebomlását; és (III) a PIF3 nem szükséges a konstitutív fotomorfogenikus fenotípus kialakulásához.

5.7 A PIF3 és fitokróm molekulák *in vivo* ko-lokalizációja

A PIF3-ról kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között közvetlen kölcsönhatásba kerül a phyA és a phyB fotoreceptorokkal. Az említett modell feltételezi azt, hogy a PIF3-fitokróm komplex (esetleg egyéb faktorokkal kiegészülve) stabilan fennmarad, és ez a fitokróm-specifikus jelátvitel működése szempontjából kulcsfontosságú állapot. A fentiekben bemutatott eredményeink azonban azt mutatják, hogy a PIF3 fény hatására igen gyorsan lebomlik, a fehérjemolekula féléletideje az általunk használt vörös fényben körülbelül tíz perc. Ahhoz, hogy megtudjuk, mi történik ezekkel a komplexekkel, egy olyan rendszert terveztünk meg, amelyben *in planta* körülmények között vizsgálhatjuk kialakulásuk és felbomlásuk dinamikáját. Transzgénikus *Arabidopsis* növényeket hoztunk létre, amelyek a konstitutív (35S)_{2x} promóter irányításával fejezik ki a PIF3-CFP és a phyA-E-YFP fehérjéket. A használt fluoreszcens fehérjék eltérő spektrális tulajdonságainak és a specifikusan az észlelésükhöz kifejlesztett mikroszkópos szűrőkészleteknek köszönhetően epifluoreszcens mikroszkópos technikával egymástól függetlenül megfigyelhetők ugyanazon növényi mintában, ugyanabban az időpillanatban. Munkánk megkezdése előtt a fúziós fehérjék kifejeződését Western blot módszerrel ellenőriztük, és biológiai aktivitásukról is meggyőződünk (az adatok nem kerülnek bemutatásra).

Fénnyel nem kezelt, etiolált növények sejtjeiben a PHYB-YFP a vizsgált sejtek többségének sejtmagjában és sejtplazmájában is megfigyelhető, míg a PIF3-CFP csak a sejtmagban mutatott diffúz festődést (5.11 ábra A, E kép). Öt perces vörös fényvel történt megvilágítás hatására mindkét fehérje sejtmagi komplexekbe tömörült (5.11 ábra B, F kép). A CFP- és YFP-specifikus képek egymásra vetítésével láthatóvá válik, hogy majdnem az összes megfigyelt komplex tartalmazza mindkét fehérjét (5.11 ábra 1-3 kép). További megvilágítást alkalmazva 1 óra elteltével látható a PIF3-CFP-specifikus jel drasztikus csökkenése (5.11 ábra G kép), míg a phyB-YFP fluoreszcencia nem változott meg jelentősen. Átalakult azonban a sejttagon belül a phyB molekulák elrendeződése: a sejtmagi komplexek felbomlottak, diffúz festődést figyelhetünk meg, amely a fényvel nem kezelt etiolált növényre emlékeztet (5.11 ábra C kép). További huzamosabb idejű vörös fénykezelés a PIF3-CFP eloszlásán nem változtat, a jel továbbra is az észlelhetőség szintje alatt van (5.11 ábra H kép); a phyB-YFP azonban ismételt sejtmagi foltokat formál (5.11 ábra D kép). Ha a phyB-YFP-t és PIF3-CFP-t kifejező transzgénikus növényeinket vörös helyett távoli-vörös fényvel világítjuk meg, öt perc elteltével csak a PIF3-CFP-specifikus sejtmagi komplexek

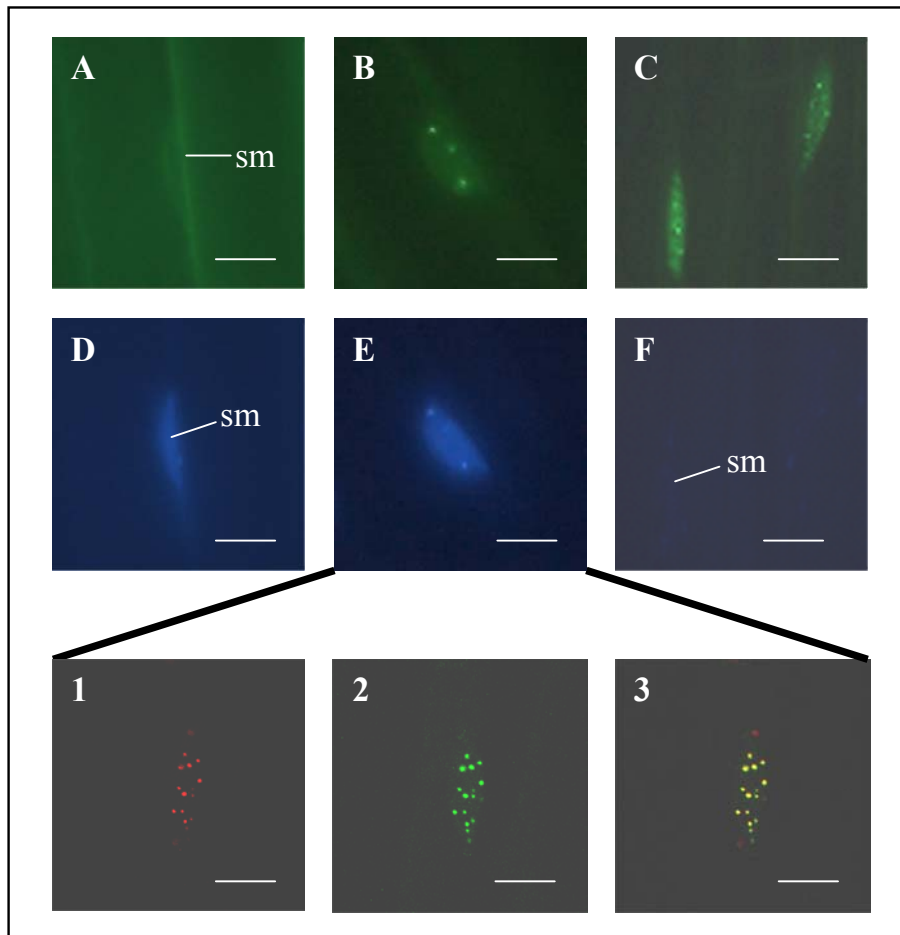
megjelenését figyelhetjük meg, amelyek azonban rövid életűek: egy órás megvilágítás elteltével már nem detektálhatjuk a PIF3-CFP fluoreszcens jelét. (az adatok nem kerülnek bemutatásra).



5.11 ábra: A PIF3-CFP és phyB-YFP sejtmagi komplexek ko-lokalizációja a vörös fényvel megvilágított csíranövények sejtmagjában

phyB-YFP (A-D) és PIF3-CFP (E-H) molekulák sejtben belüli eloszlását epifluoreszcens mikroszkópi képek mutatják különböző időn át vörös fényvel kezelt, 6 napos etiolált növények sejtmagjában. A, E: fénykezelés nélkül; B, F: 2 perc; C, G: 1 óra; D, H: 16 óra vörös fénykezelés. A képkivágat egy 2 perces vörös fényimpulzussal kezelt sejt konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal készült képeit mutatja be, mindkét fúziós fehérjéről. A PIF3-CFP vörös színűnek látszik (1.); a phyB-YFP zöldnek (2.); a két kép egymásra helyezése pedig sárga színűnek látszik (3.). A képeken megjelöltünk néhány sejtmagot (sm). A képek jobb alsó sarkában látható vonalak 10 μm -nek felelnek meg.

Az előzőhöz hasonló kísérletet végeztünk a PIF3 másik bizonyított *in vitro* kölcsönható partnerével, a PHYA-val. Olyan transzgenikus növényeket hoztunk létre, amelyek a PIF3-CFP és a phyA-YFP fúziós fehérjét is expresszálják. Az etiolált csíranövényekben a phyA-YFP fehérje a sejtplazmában, míg a PIF3-CFP fehérje diffúz festődést mutatva a sejtmagban található (5.12 ábra A, D kép). Egy rövid, öt perces



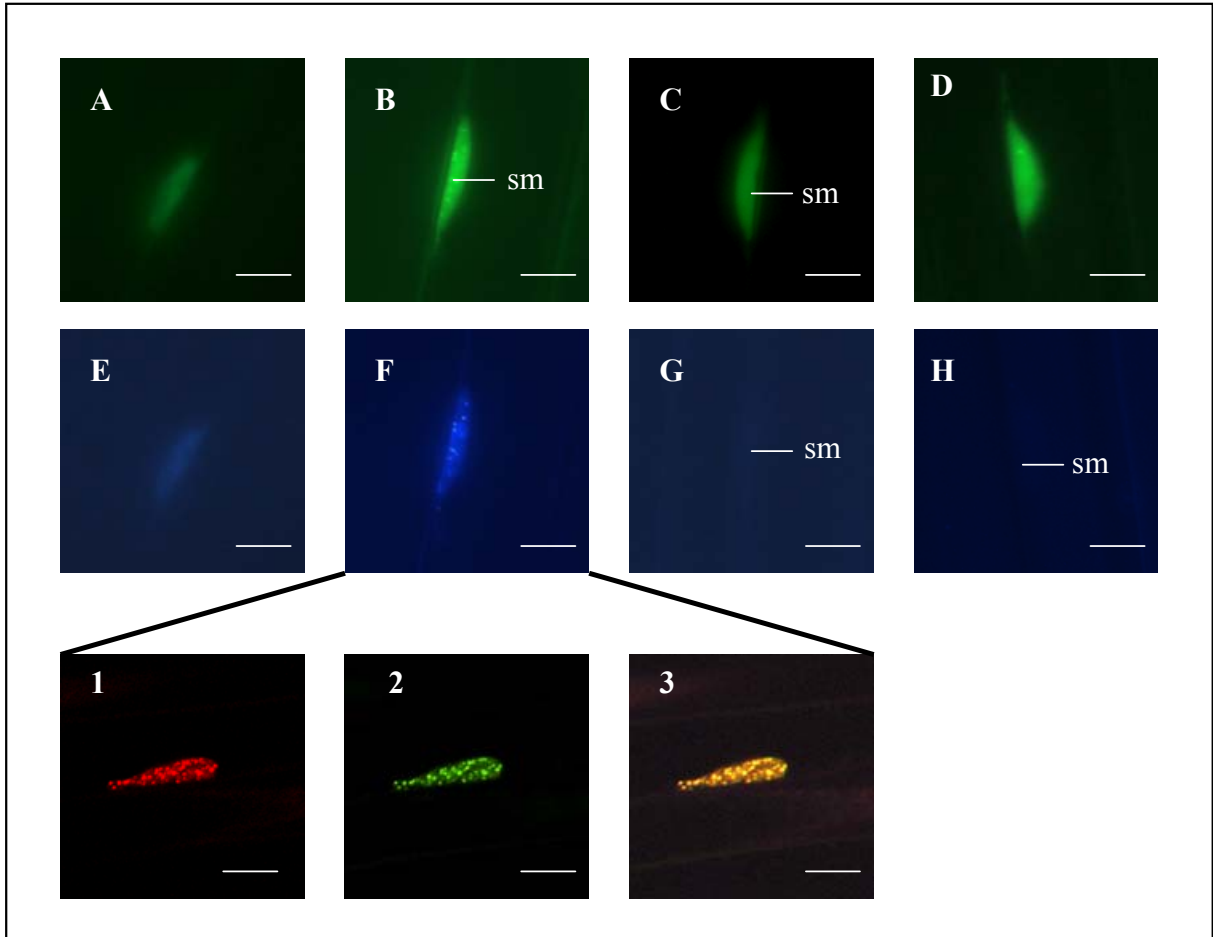
5.12 ábra A PIF3-CFP és phyA-YFP fehérjék ko-lokalizációja a távoli-vörös fénnel kezelt növények sejtmagjában

Epifluoreszcens mikroszkópi képek a phyA-YFP (A-C) és a PIF3-CFP (D-E) molekulák sejten belüli eloszlásáról. A 6 napos etiolált csíranövényeket a mikroszkópi vizsgálat előtt nem világítottuk meg (A, D); 2 perces távoli-vörös fényimpulzussal kezeltük (B, E) vagy 20 órán át távoli-vörös fénnel világítottuk meg (C, F). A képkivágat egy 2 perces távoli-vörös fényimpulzussal kezelt sejt konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal készült képeit mutatja be, mindkét fúziós fehérjéről. A PIF3-CFP vörös színűnek látszik (1.); a phyA-YFP zöldnek (2.); a két kép egymásra helyezése pedig sárga színt eredményez (3.). A képeken megjelöltünk néhány sejtmagot (sm). A képek jobb alsó sarkában látható vonalak 10 μm -nek felelnek meg.

távoli-vörös fényimpulzus kiváltja a PIF3-CFP-specifikus komplexek (foltok) kialakulását és a phyA-YFP sejtmagi importját és komplexekben történő felhalmozódását (5.12 ábra B, E kép). A CFP- és YFP-specifikus pásztázó konfokális lézer mikroszkópos felvételek egymásra vetítésével látható, hogy a sejtmagi komplexek döntő többsége tartalmazza mind a PIF3-CFP, mind a phyA-YFP fehérjét (5.12 ábra 1-3 kép). Huzamosabb idejű megvilágítás hatására a PIF3-CFP-specifikus jel eltűnése mellett a phyA-YFP sejtmagi diffúz festődés illetve sejtmagi foltok formájában továbbra is megfigyelhető marad (5.12 ábra C kép).

Ha távoli-vörös fény helyett vöröset alkalmazunk, a phyA-YFP gyors sejtmagi importja és foltformálása mellett a PIF3-CFP foltformálása is megfigyelhető. Az azonos időpontban készített YFP- és CFP-specifikus képek egymásra vetítésével ezúttal is láthatóvá válik a két vizsgált fehérje ko-lokalizációja. A távoli-vörös kezeléssel ellentétben azonban vörös fény hatására, körülbelül egy óra alatt mind a phyA-YFP-, mind a PIF3-CFP-specifikus sejtmagi festődés teljes eltűnése figyelhető meg, aminek az oka mindkét fehérje esetében a degradáció felgyorsulása (az adatok nem kerülnek bemutatásra).

Következő vizsgálataink során a PHYB esetén fent ismertetett kísérleti beállítást alkalmaztuk a phyC, phyD, phyE és PIF3 *in planta* kölcsönhatásának megfigyelésére. Ezt két okból tettük: egyrészt ezeknek a fitokrómoknak a lehetséges kölcsönhatását PIF3-mal még sohasem vizsgálták meg, másrészt a PHYD kiemelkedik e három fotoreceptor közül, hiszen, mint azt az 5.5 fejezetben láttuk, szerepe van a PIF3 fényindukált lebontásában. Az 5.13 ábra mutatja, hogy a phyD-YFP a kísérleti körülményeink között a sejten belüli eloszlás, és a PIF3-CFP-hez viszonyulás tekintetében a phyB-hez hasonlóan viselkedik. Az itt be nem mutatott phyC-YFP szintén a phyB-hez hasonlóan viselkedik, a phyE viszont a vizsgált megvilágítási viszonyok közt nem formál mikroszkópban jól látható sejtmagi komplexeket, ezért a phyE-YFP – PIF3-CFP fehérjék együttes lokalizációját kísérleti rendszerünkben nem tudtuk kimutatni (az adatok nem kerülnek bemutatásra).



5.13 ábra: A PIF3-CFP és phyD-YFP sejtmagi komplexek ko-lokalizációja a vörös fényel megvilágított csíranövények sejtmagjában

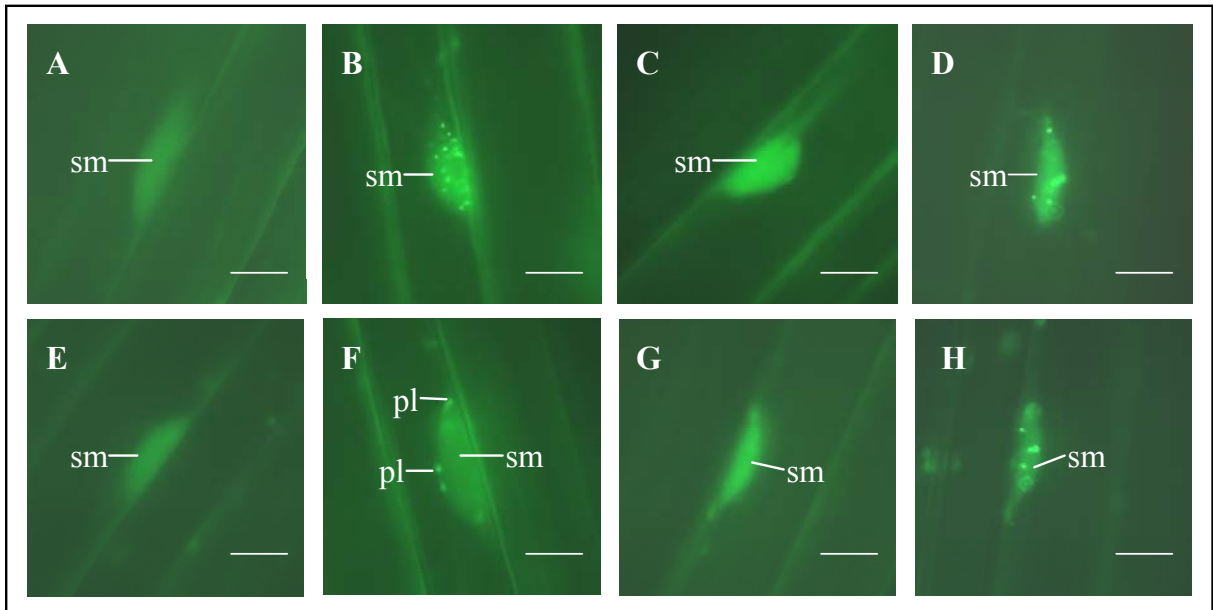
phyD-YFP (A-D) és PIF3-CFP (E-H) molekulák sejten belüli eloszlását epifluoreszcens mikroszkópi képek mutatják különböző időn át vörös fényel kezelt, 6 napos etiolált növények sejtmagjában. A, E: fénykezelés nélkül; B, F: 2 perc; C, G: 6 óra; D, H: 14 óra vörös fénykezelés. A képkivágat egy 2 perces vörös fényimpulzussal kezelt sejt konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal készült képeit mutatja be, mindkét fúziós fehérjéről. A PIF3-CFP vörös színűnek látszik (1.); a phyD-YFP zöldnek (2.); a két kép egymásra helyezése pedig sárga színűnek látszik (3.). A képeken megjelöltünk néhány sejtmagot (sm). A képek jobb alsó sarkában látható vonalak 10 μm -nek felelnek meg

5.8 A PIF3 szerepe a PHYB “korai” és “késői” sejtmagi foltformálásában

Előző kísérleteink eredményei a fitokrómok és a PIF3 együttes lokalizációjának első *in planta* bizonyításán túl egy másik, igen érdekes jelenségre is rávilágítottak: a fitokrómok megvilágítás hatására két alapvetően eltérő karakterisztikájú sejtmagi komplexet formálnak. A rövid fényimpulzus elegendő a “korai”-nak elnevezett komplexek kialakulásához, ezek azonban rövid életűek, és huzamosabb megvilágítás hatására felbomlanak, helyüket az ekkor formálódó “késői”-nek elnevezett komplexeknek adják át. Az 5.11-13 ábrákat figyelve nyilvánvaló különbség a “korai” és “késői” sejtmagi foltok között az is, hogy a “korai”-ak tartalmaznak PIF3-mat, a “késői”-ek nem vagy csak sokkal kisebb mennyiségben. Ennek oka az, hogy olyan hosszúságú fénykezelés hatására, amely a “késői” foltok formálódásához szükséges, a PIF3 lebomlik. A jelenség megfigyelésekor felmerült bennünk az a kérdés, hogy a “korai” foltok PIF3 tartalma esszenciális komponense-e a foltoknak, azaz PIF3 hiányában kialakulnak-e “korai” foltok. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához phyB-GFP (Kircher és mtsai, 2002) transzgenikus fehérjét expresszáló *poc1* (PIF3 hiányos) növényeket állítottunk elő. Ezután Western blot analízissel olyan növényi vonalakat választottunk ki, amelyek azonos szinten fejezik ki a phyB-GFP proteint vad típusú illetve *poc1* genetikai háttérben (az adatok nem kerülnek bemutatásra). Az 5.14 ábrán látható, hogy a PIF3-CFP fehérjét expresszáló vonalakban korábban megfigyelt phyB-YFP “korai” foltokhoz hasonló “korai” foltokat formál a phyB-GFP fehérje is vad típusú háttérben. (B kép). Ebből a megfigyelésből arra következtethetünk, hogy a “korai” foltok formálódásának nem oka (I) a phyB-YFP és phyB-GFP fehérjék közti esetleges expressziószint különbség; (II) a fluoreszcens fehérjék különbözősége és a (III) PIF3-CFP fehérje túltermelése.

A vad típusú háttérrel ellentétben azonban nem sikerült kimutatni phyB-GFP “korai” foltokat *poc1* háttérben, amely nem rendelkezik kimutatható mennyiségű PIF3-mal (5.14 ábra F kép). Ezzel a megfigyeléssel párhuzamosan azt is észleltük, hogy a “késői” phyB-GFP foltok megjelenése a vizsgált transzgenikus növények között egyáltalán nem különbözött (5.14 ábra D, H kép).

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a PIF3 fehérje jelenléte elengedhetetlenül fontos a phyB-GFP által formált “korai” sejtmagi foltok létrejöttében, azonban nem feltétlenül szükséges a “késői” komplexek kialakításához.



5.14 ábra A phyB-GFP nem formál “korai” foltokat *poc1* csíranövényekben

Az epifluoreszcens mikroszkópos képeket 6 napos etiolált Ws (A-D) és *poc1* (E-H) csíranövények hipokotilsejtjeiről készítettük. A mikroszkópos felvételek készítése előtt a növényeket nem kezeltük fénnel (A, E) vagy 2 perc (B, F); 1 óra (C, G); 6 óra (D, H) hosszan világítottuk meg vörös fénnel. A képeken megjelöltük a sejtmagokat (sm) és néhány kloroplasztiszt (pl). A képek jobb alsó sarkában látható vonalak 10 μ m-nek felelnek meg.

5.10 A PIF3 lebomlásának követése luciferáz riportergén segítségével

A PIF3 fehérje előzőkben tárgyalt fényindukált lebomlásának részletesebb vizsgálata céljából olyan transzgenikus növényeket készítettünk, amelyek a konstitutív (35S)_{2x} virális promóter által szabályozva fejezik ki a PIF3-LUC fúziós fehérjét. A luciferáz (LUC) enzim viszonylag stabil fehérje, amely oxigén és ATP jelenlétében a luciferin szubsztrátot oxiluciferinné alakítja. Ez a reakció jellegzetes hullámhosszúságú (560 nm) foton kibocsátásával és a luciferáz enzim aktivitásának azonnali elvesztésével jár, de a fehérje stabilitását nem érinti (Millar és mtsai, 1992a, 1992b). Mivel *in vivo* méréseinknél a szubsztrátot nagy feleslegben alkalmazzuk, valamint az oxigén és ATP normális esetben szintén feleslegben van jelen az élő növényekben, ezért az érzékelt lumineszcencia intenzitása csak az aktív luciferáz enzim mennyiségétől függ. Gondosan megválasztott kísérleti körülmények esetén

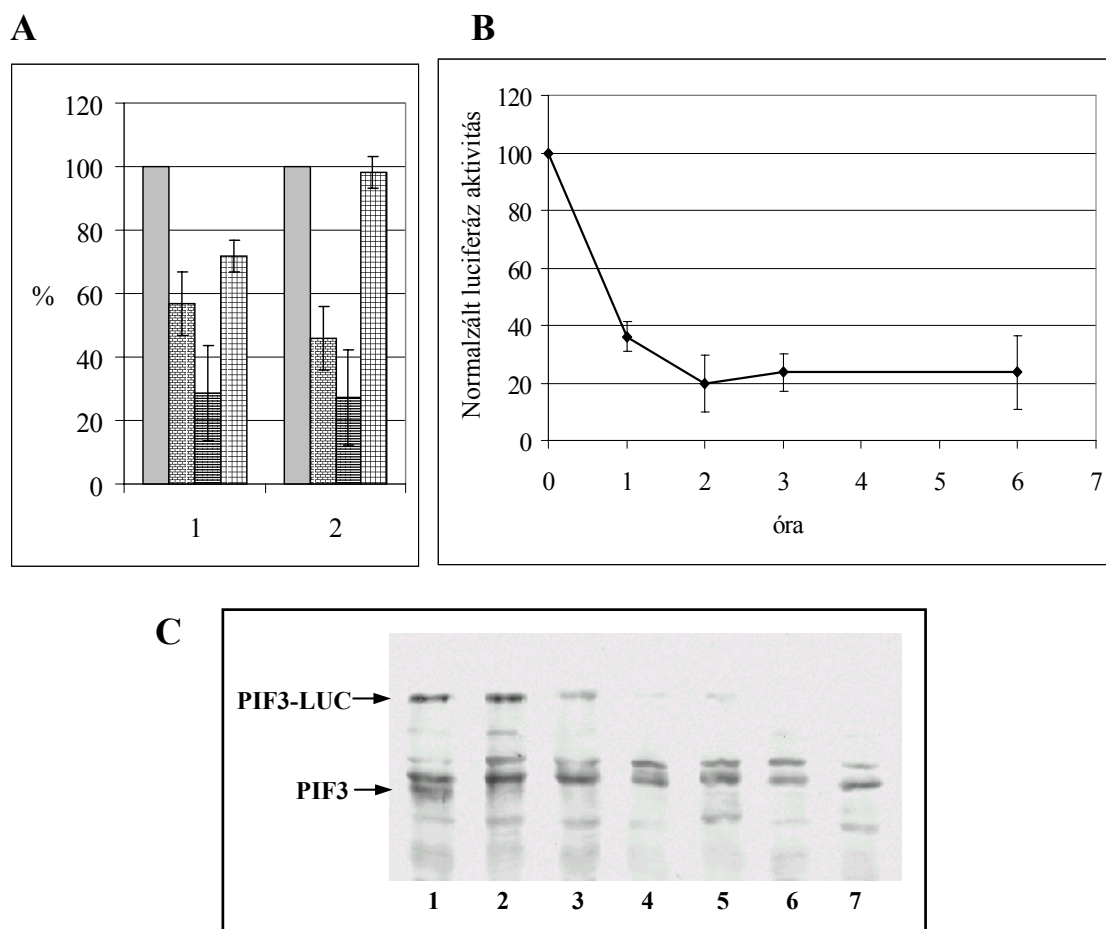
rendszerünk alkalmas a PIF3 fehérje mennyiségében bekövetkező változások – akár egyedi csíranövény szintjén történő – figyelemmel követésére.

(35S)_{2x}:PIF3-LUC konstrukciót hordozó csíranövényeket négy napig sötétben neveltünk, ezután kezdtük el a vizsgálatainkat. Alapvetően két különböző mérési stratégiát alkalmazhatunk:

- (I) *“Prespray”* módszer: a csíranövényeket luciferin oldattal lepermetezzük, majd a fénykezelést és az azt követő lumineszcencia-mérést akkor kezdjük el, amikor a növények által kibocsátott lumineszcens jel *“lecsengett”*, elérte az alapszintet; azaz a növényben felhalmozódott luciferáz már inaktiválódott. (Ez az alapszint akkor alakul ki, amikor az aktív luciferáz keletkezésének és inaktivációjának egyensúlyi állapota létrejön.) Az ezzel a módszerrel mért jelet a transzkripció sebessége, az mRNS stabilitása és a vizsgált fehérje termelődésének, valamint lebomlásának sebessége, esetünkben a PIF3-LUC szintézisének és degradációjának együttes hatása alakítja ki.
- (II) *“Flash”* módszer: mintánkra a luciferin szubsztrátot a fénykezelés végén, közvetlenül a lumineszcencia-mérés előtt permetezzük. Ekkor a mért lumineszcencia értéke az aktív luciferáz molekulák mennyiségére utal, ami az adott pillanatban a növényben levő PIF3-LUC fehérjék mennyiségével arányos. Ebben az esetben tehát a méréskor a lumineszcenciát kibocsátó aktív luciferáz mennyisége pontosan megegyezik a szintézis és lebomlás sebessége által kialakított PIF3-LUC fehérje mennyiségével.

Méréseink során a *“flash”* módszert használtuk, mert csak a PIF3-LUC fehérje mennyiségét akartuk detektálni, és ezzel a módszerrel kiküszöböltük az egyéb tényezőket.

Első lumineszcencia-méréseink adatai szerint (5.15/A ábra) egy órás vörös fénykezelés a lumineszcenciát a kiindulási érték 40-50%-ára (fehér oszlopok), míg három órás a 25-30%-ára (fekete oszlopok) csökkenti. A PIF3 lebomlását a távoli-vörös fény a vöröshöz képest kisebb mértékben segíti elő (rácsózott ill. fehér oszlopok). A távoli-vörös fényre specifikus degradáció phyA fotoreceptortól való függése is látszik az ábrán: a távoli vörös fényt nem érzékelő phyA hiányos mutánsban (2. minta) az egy órás fénykezelés alig okoz lumineszcencia változást, míg a vad típusú növényben (1. minta) a csökkenés jól látható (rácsózott oszlopok). Mint azt az előzőekben már láttuk, a vörös fény által okozott PIF3 lebomlást a phyA hiánya nem akadályozza meg. Elvégeztük a PIF3-LUC-specifikus lumineszcencia követését vad típusú háttérben vörös fényvel történt hat órás megvilágítás alatt. Az 5.15/B ábrán látható, hogy a luciferáz aktivitás értéke a minimumát körülbelül két óra alatt éri el (a kiindulási érték hozzávetőlegesen 20%-a), és a kísérlet végéig ez az érték



5.15 ábra A PIF3 fehérje fényindukált lebomlásának detektálása lumineszcencia segítségével

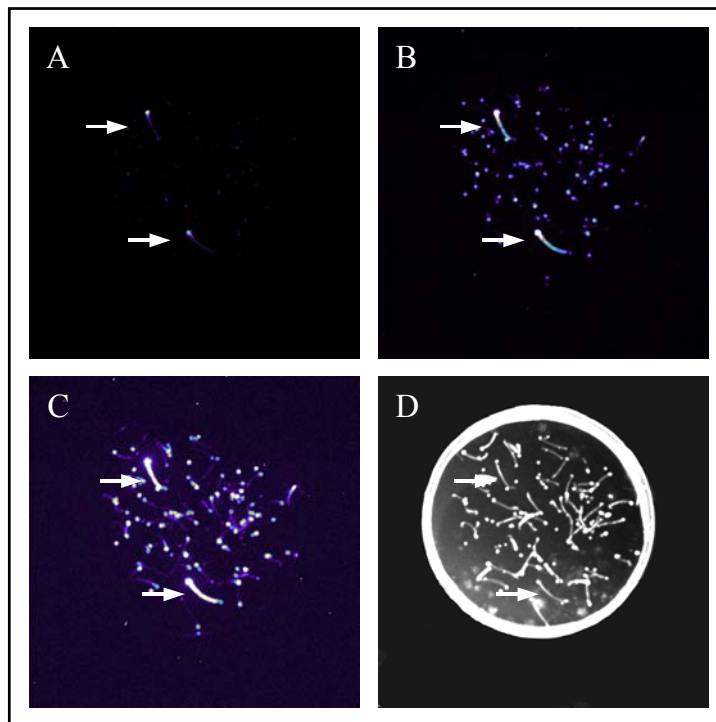
A. A különböző genetikai háttérű (vad típus (Col): **1**; *phyA-211*: **2**), PIF3-LUC fúziós fehérjét a (35S)_{2x} promóter irányításával kifejező, etiolált csíranövényeket csomókban (40-50 db/csomó) növesztettük cukormentes MS lemezen. A különböző fénykezelések után luciferin szubsztráttal permeteztük le a mintákat, majd megmértük az általuk kibocsátott lumineszcenciát („Flash” módszer; bővebben l. a szövegben), amit a fényvel nem kezelt sötét kontroll (szürke oszlopok) %-ában ábrázoltunk. Téglal mintájú oszlopok: 1 óra vörös fény; csíkozott oszlopok: 3 óra vörös fény; rácsozott oszlopok: 1 óra távoli vörös fény. A CCD kamerával 25 perces expozíciót alkalmaztunk. a hibásávok 3-3 csíranövény-csomó mért lumineszcenciájának standard hibáját jelentik.

B. A fenti módszerrel 4 napos etiolált Col növényekben mértük a PIF3-LUC fehérjék vörös fény (30 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$) hatására bekövetkező lebomlását az általuk kibocsátott lumineszcencia segítségével. Az X tengelyen a megvilágítás időtartama látható. Minden feltüntetett értéket 3 különböző mérés átlagolásával kaptunk meg, és a megfelelő standard hiba értékeivel ábrázoltuk.

C. Western blot analízissel határoztuk meg egy PIF3-LUC fúziós fehérjét kifejező reprezentatív Col vonalunkban a PIF3 és PIF3-LUC fehérjék fény általi lebomlását (20-20 μg össz-fehérje kivonat mintánként, PIF3 specifikus antitest). **1**: 0 perc; **2**: 10 perc; **3**: 30 perc; **4**: 45 perc; **5**: 60 perc; **6**: 2 óra; **7**: 6 óra 30 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ vörös fénykezelés. A nyilak a PIF3 és PIF3-LUC fehérjék csíkjaira mutatnak.

jelentősen nem változik. A PIF3-LUC fehérje fény által kiváltott lebomlását Western blot analízissel is követni tudjuk (5.15/C ábra). Ez a módszer az 5.15/B ábrán alkalmazottnál finomabb időbeni felbontást tesz lehetővé, mert a mintaszedés pillanatszerű, így kiküszöbölhetjük a kamerás expozíció idejének különbség mérséklő hatását. Látható, hogy a fúziós fehérje degradációja jól követi az endogén proteinét.

A fenti adatok birtokában megállapíthatjuk, hogy kezünkben van egy olyan kísérleti rendszer, amelyben egyszerűen és gyorsan, nagy számú csíranövényben tudjuk megvizsgálni a PIF3-LUC fehérje lebomlásának sebességét. A PIF3-LUC fehérjét kifejező növényekben véletlen mutációk generálása után ez a módszer felhasználható olyan mutációt hordozó növények izolálására, amelyekben a PIF3 fényindukált lebomlása sérült, lassabban vagy egyáltalán nem következik be. Az 5.16 ábra egy ilyen “teszt-screen”-t mutat be, amelynek



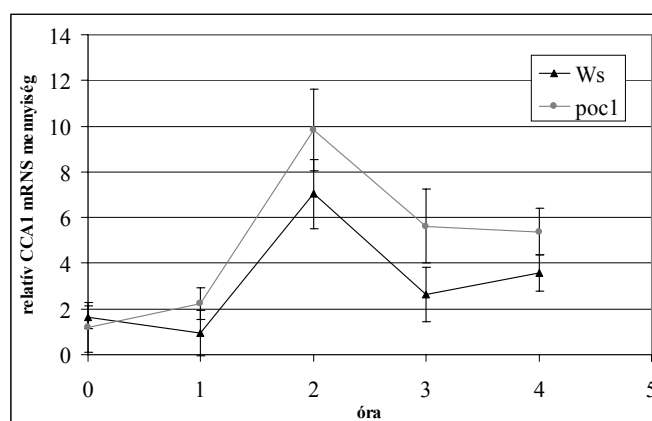
5.16 ábra Szimulált módszer a PIF3 fényindukált lebomlásában sérült mutánsok azonosítására

4 napos etiolált, (35S)_{2x}:PIF3-LUC konstrukciót hordozó transzgenikus *Arabidopsis* (Col) növényeket 3 órára vörös (30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fénybe helyeztünk, majd 2 db fényel nem kezelt csíranövényt helyeztünk közéjük. A csíranövényeket tartalmazó Petri-csészéről ezután a luciferáz által kibocsátott lumineszcenciára érzékeny kamerával 25 perces expozíciós idővel készítettünk felvételt, melynek különböző fényesség küszöbértékre beállított változatait az A-C képek mutatják be. A látható fényben készült D jelű képen az összes csíranövény között láthatók a lumineszcens képeken beazonosított „mutánsok”, melyeket minden képen nyilak jelölnek. További magyarázatot l. a szövegben.

lényege a következő: a csíranövényeket sötétben neveljük négy napig, majd vörös fénybe helyezzük őket. Ekkor megindul a PIF3-LUC molekulák lebomlása, ami bizonyos mutánsokban a várakozásunk szerint sérülni fog. Ezekben a növényekben a PIF3-LUC molekulák száma fényben a kontrollhoz képest nem vagy lassúbb ütemben csökken, tehát amikor a fénykezelés végén luciferinnel permetezzük le a csíranövényeket, ezek a mutáns növények a többinél erősebben fognak lumineszkálni: ezeket kell a mutáció jellemzése céljából a többi közül kiemelnünk. Az ábrán a megvilágított PIF3-LUC fehérjét expresszáló csíranövények közé fényel nem kezelteteket helyeztünk és ezeket, a mutánsokat mimikáló növényeket nyíllal jelöltük meg. A három hamis színes felvétel (5.16/A-C ábra) azt mutatja be, hogy az elkészült lumineszcens kép fény-küszöb értékeit változtatva hogyan azonosíthatók a többinél erősebb lumineszcenciát mutató egyedek. A Petri-csésze elmozdítása nélkül készített, látható fényel megvilágított referencia felvételen (5.16/D ábra) ezek a növények könnyen azonosíthatók és kiemelhetők a többi közül.

5.11 A PIF3 szerepe a növényi cirkadián óra működésében

Mint azt az Irodalmi áttekintésben említettem, a PIF3 szerepét a növényi cirkadián óra működésében jelenleg csupán egy modell valószínűsíti. Mivel a PIF3 *in vitro* rendszerben kötődik a *CCA1* promóterben található G-boxhoz, és a *PIF3* antiszensz növényekben a *CCA1* mRNS szintű akut válasza csökken (Martínez-García és mtsai, 2000), feltételezték, hogy a fény a PIF3-phyB komplex révén, közvetlenül a molekuláris óra központi elemének tartott *CCA1* transzkripcióján keresztül szabályozza annak működését. E modell kísérletes vizsgálatára nyílt lehetőségünk akkor, amikor *bona fide* PIF3 hiányos mutáns növényekkel kezdhettünk el dolgozni. Első kísérletünkben Martínez-García és mtsai (2000) kísérletét ismételtük meg, antiszensz növények helyett a kimutatható mennyiségű PIF3-mal nem rendelkező *poc1* mutánst használva. Etiolált csíranövényeket vörös fénybe helyeztünk és óránként mintát szedve meghatároztuk a *CCA1* mRNS szintjét. Az 5.17 ábrán látható, hogy a *CCA1* vörös fénykezelés által kiváltott akut válasza PIF3 deficiens mutánsban – az eddigi adatokkal ellentétben – nem mutat jelentős csökkenést, sőt a kontrollhoz képest enyhe emelkedést tapasztaltunk. Ennek a kis különbségnek a jelentőségét nehéz megítélni, ezért továbbra is megválaszolatlan maradt az a kérdés, hogy a PIF3 a *CCA1* transzkripció befolyásolásával szerepet játszik-e a cirkadián óra működésében.

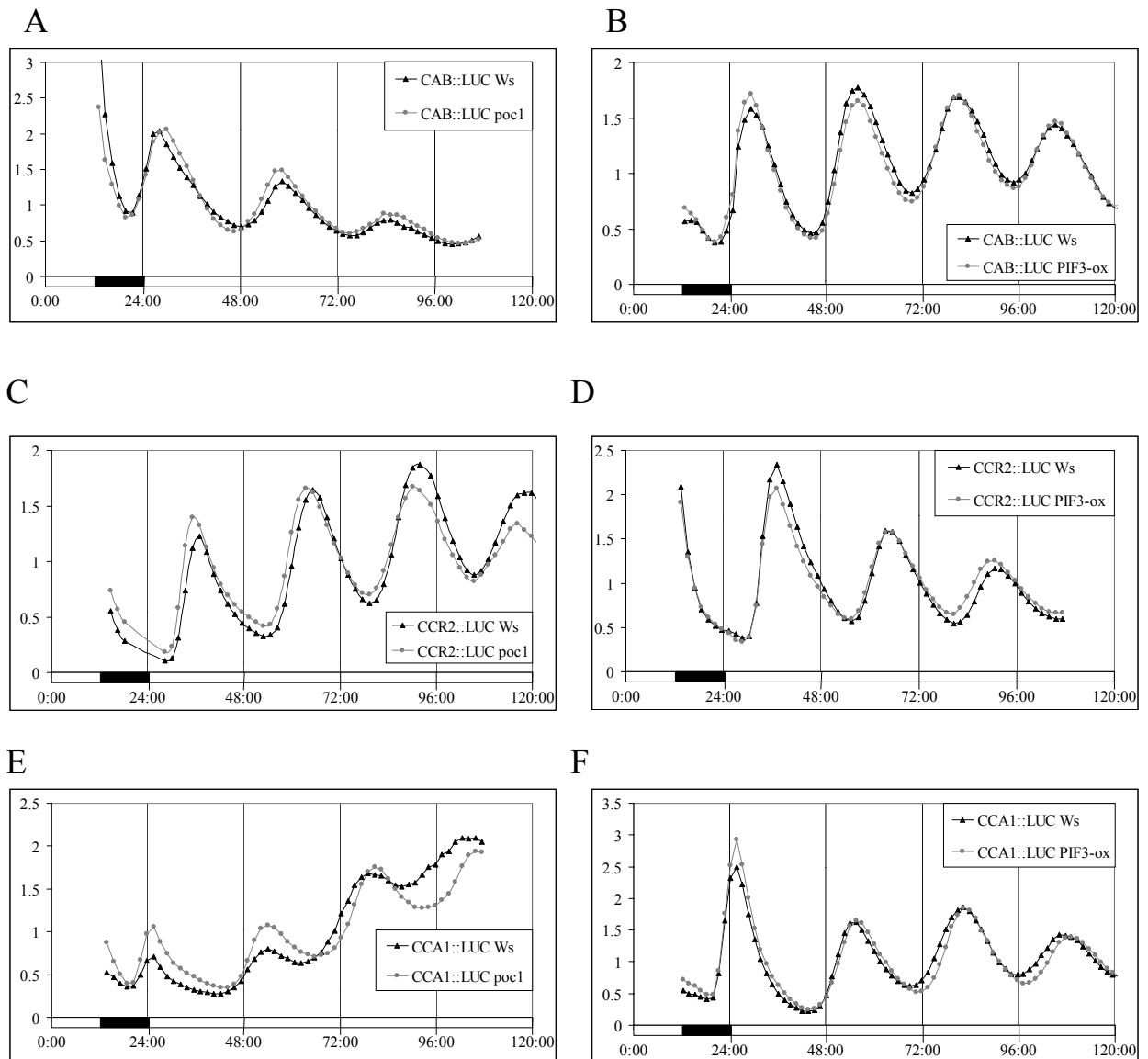


5.17 ábra A PIF3 hiányának hatása a *CCA1* gén akut fényindukciójára

4 napos etiolált csíranövényeket $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ intenzitású vörös fényvel világítottunk meg, majd a mintákból össz-RNS-t izoláltunk. A *CCA1* mRNS mennyiségét RNáz protekcióval határoztuk meg. A mintákban az ubiquitin10 mRNS mennyiségét is meghatároztuk és adatainkat erre a konstitutív kontrollra normáltuk. Ezt az értéket ábráztuk (Y tengely) a fénykezelés időtartamának függvényében (X tengely, óra). A hibásávok 3 független kísérlet eredményeiből számított standard hiba értékek.

A választ két megközelítéssel kerestük: (I) megvizsgáltuk a kimenetekként (output) működő *CCR2* és a *CAB* promóterek kifejeződését luciferáz riportergén segítségével; (II) szintén a *LUC* riportergént alkalmaztuk a *CCA1* gén promóteraktivitásának jellemzésére, figyelemmel követve így a központi oszcillátor egyik komponensének kifejeződését. Kísérleteinket olyan, mára már klasszikussá vált vizsgálati körülmények között végeztük, amelyeket a cirkadián óra vizsgálatára fejlesztettek ki (Millar és mtsai, 1992a, 1992b): a promóter:luciferáz konstrukciót kifejező növényeket állandó hőmérsékleten, a nappalok és éjszakák (12-12 óra) szabályos váltakozása közt neveljük, majd állandó fényviszonyok közé (állandó sötét: DD vagy állandó fény: LL) helyezve őket a lumineszcencia követésével az adott promóter szabadon futó ritmusát vizsgáljuk.

Első kísérletsorozatunk eredményeit az 5.18 ábra foglalja össze. A különböző promóter:luciferáz konstrukciót hordozó csíranövények a mérés kezdetén folyamatos vörös fénybe kerültek. A kiindulási modell szerint (2.8 ábra) a PIF3-nak ekkor van szerepe a cirkadián óra fitokróm-specifikus fény-inputjában. Az ábrákon (5.18/A-D ábra) látható, hogy egyik általunk vizsgált output elem (*CAB*, *CCR2*) ritmusát (periódushossz, amplitúdó) sem



5.18 ábra Megváltozott PIF3 szintű transzgenikus növények vizsgálata folyamatos fényben

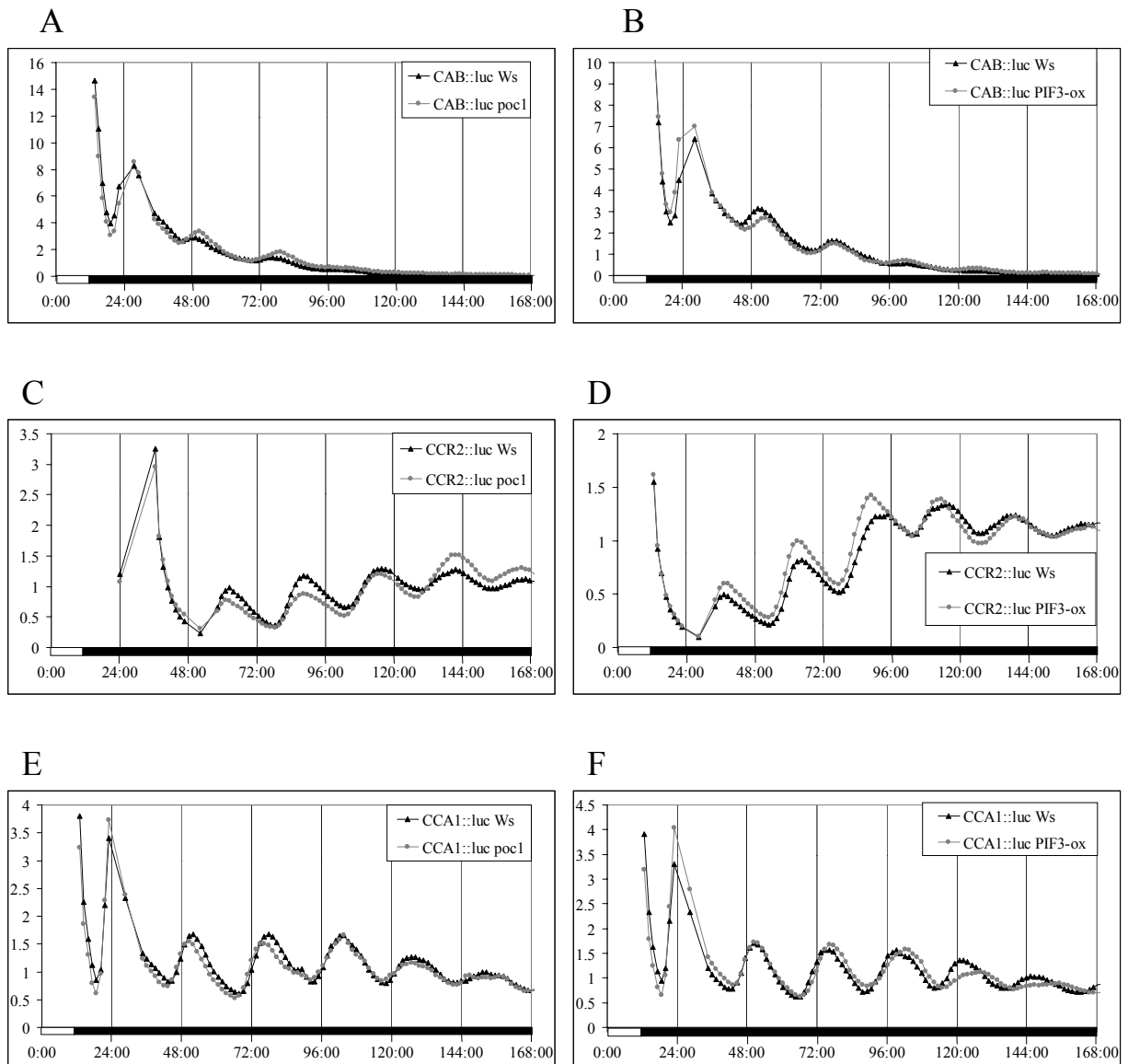
CAB:LUC (A, B panel), CCR2:LUC (C, D panel), CCA1:LUC (E, F panel) transzgéneket hordozó, megváltozott PIF3 szintű (*poc1*: A, C, E; PIF3 túltermelő: B, D, F panelek) *Arabidopsis* csiránövényeket neveltünk 6 napig, 12 h fény/12 h sötét fotoperióduson. Ezt követően a csiránövényeket az utolsó sötét/fény átmenet után állandó fénybe helyeztük és az általuk kibocsátott lumineszcenciát automatizált luminométerben detektáltuk. A mért lumineszcenciaértékeket a mért adatok átlagára normáltuk (Y tengely) és a ZT függvényében (X tengely) ábráztuk (Bővebben I. Anyagok és módszerek fejezet).

Az idő-tengely alatti sávok az adott időpontban uralkodó fényviszonyokat szimbolizálják (fehér = fény, fekete = sötét).

érintette sem a PIF3 hiánya, sem a túltermelése. Hasonló eredményt kaptunk a *CCA1:LUC* konstrukciót hordozó transzgénikus növények által kibocsátott lumineszcenciát követve (5.18/E, F ábra).

Második kísérletsorozatunk eredménye az 5.19 ábrán látható. Ugyanezen riportergéneket hordozó transzgénikus csíranövények által kibocsátott lumineszcenciát mértük folyamatos sötétben. Megfigyelhető, hogy a vizsgált gének kifejeződésének szabadon futó ritmusát ilyen körülmények között sem befolyásolja jelentősen a PIF3 hiánya vagy túltermelése.

A promóter:luciferáz konstrukciót hordozó csíranövények vizsgálatával nyert adatok alátámasztják azt a korábbi eredményünket, hogy a PIF3 szerepe a *CCA1* transzkripció szabályozásában kis mértékű (5.17 ábra), így hiánya vagy túltermelése a cirkadián óra működésére sincs dramatikus hatással.



5.19 ábra Megváltozott PIF3 szintű transzgénikus növények vizsgálata folyamatos sötétben

CAB:LUC (A, B panel), CCR2:LUC (C, D panel), CCA1:LUC (E, F panel) transzgéneket hordozó, megváltozott PIF3 szintű (*poc1*: A, C, E; PIF3 túltermelő: B, D, F panelek) *Arabidopsis* csíranövényeket neveltünk 6 napig, 12 h fény/12 h sötét fotoperióduson. Ezt követően a csíranövényeket az utolsó fény/sötét átmenet után állandó sötétbe helyeztük és az általuk kibocsátott lumineszcenciát automatizált luminométerben detektáltuk. A mért lumineszcenciaértékeket a mért adatok átlagára normáltuk (Y tengely) és a ZT függvényében (X tengely) ábrázoltuk (Bővebben I. Anyagok és módszerek fejezet).

Az időtengely alatti sávok az adott időpontban uralkodó fényviszonyokat szimbolizálják (fehér = fény, fekete = sötét).

6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

6.1 A PIF3 a fotomorfogenezisnek nem pozitív, hanem negatív regulátora

A fitokróm-specifikus jelátvitel kutatásának új színtere tárult fel akkor, amikor felfedezték, hogy a fitokrómok aktív formájukban sejtmagi transzlokációra képesek (Sakamoto és Nagatani, (1996); Kircher és mtsai, 1999). Ezzel bizonyítottá vált az a lépés, amelynek valamilyen formában történő bekövetkezése várható volt, hiszen a fény szabályozta jelátvitel különböző gének expressziójának megváltozásával valósul meg. Az az érdekes tény, hogy a fényjelet maguk a fitokrómok továbbítják a sejtmagba, új típusú jelátviteli partnerek lehetséges szerepére hívta fel a figyelmet. Éppen ezért keltett a szokottnál nagyobb figyelmet egy közlemény 1998-ban (Ni és mtsai, 1998), amely beszámol egy újonnan azonosított bHLH típusú transzkripciós faktorról, a PIF3-ról, amely a fitokrómokhoz és a fényszabályozott gének egy közös promotereleméhez (G-box) egyidejűleg kapcsolódik, a fitokróm-specifikus jelátviteli láncot ezáltal a feltételezettnél valószínűleg sokkal rövidebbé téve. Tovább erősítette ezt az elképzelést az a megfigyelés, amely szerint a PIF3 fény-specifikus jelátviteli utak pozitív regulátorának bizonyult. Ugyanennek a munkacsoportnak későbbi publikációi (Halliday és mtsai, (1999); Martinez-Garcia és mtsai, (2000)) több oldalról is alátámasztották ezt a megállapítást. Annak ellenére, hogy az említett publikációk igen rangos tudományos szakfolyóiratokban jelentek meg, néhány alapvető kísérleti eszköz nem állt még a kutatók rendelkezésére: (I) PIF3 hiányos mutáns, (II) teljes hosszúságú PIF3 fehérjét kifejező túltermelő vonal és (III) PIF3 fehérjét felismerő antitest. Laboratóriumunkban mindhárom hiányzó "láncszem" rendelkezésünkre állt ahhoz, hogy újraértékeljük a PIF3 fehérje tényleges szerepét. A teljes hosszúságú PIF3 fehérjét magas szinten túltermelő, valamint a fehérjét kimutatható szinten nem tartalmazó növényi vonalak hipokotilmegnyúlás-gátlásának vizsgálata egyaránt arra mutatott rá, hogy a PIF3 az eddigi eredményekkel ellentétben a fotomorfogenezisnek nem pozitív, hanem negatív regulátora: a túltermelő növények vörös fényben hiposzenzitívnek, míg a PIF3 hiányos mutánsok hiperszenzitívnek mutatkoztak. Hangsúlyozandó, hogy ez a fenotípus csak vörös fényben nőtt csíranövények esetében figyelhető meg, távoli-vörös és kék fényben nőtteknél nem. (Eredményeinkhez hasonló fenotípus-méréseket végeztek nemrégiben Kim és mtsai (2003).) Ez azt jelenti, hogy a PIF3 nem játszik jelentős szerepet a azokban a jelátviteli folyamatokban, amelyek a távoli-vörös és

kék fény által vezérelt hipokotilhossz-változásokért felelősek. Fontos szerepe van azonban azokban a vörös fényre specifikus szignálátviteli utakban, amelyek a vörös fényben nőtt növényekben a legabundánsabb fitokróm, a phyB irányítása alatt állnak. Legfrissebb eredményeink és a *poc1* mutáns vizsgálatáról korábban közölt adatok (Halliday és mtsai, (1999)) esetében is ellentmondást tapasztaltunk. Ez a T-DNS inszerciót hordozó mutáns növényvonal emelt *PIF3* mRNS szinttel rendelkezik, és hipokotilmegnyúlásának gátlása fényben hiperszenzitivitást mutat. PIF3-specifikus ellenanyaggal bizonyítottuk, hogy a közölt mRNS adatokkal ellentétben a *poc1* növények nem tartalmaznak kimutatható mennyiségű PIF3 fehérjét, tehát *bona fide* PIF3 hiányos mutánsok. Így már érthetővé vált, hogy a *poc1* mutáns esetében tapasztalt hipokotilhossz-fenotípus megegyezik az általunk jellemzett *pif3* növényekével.

Virágzásiidő-meghatározásaink eredménye azt támasztja alá, hogy a PIF3 hiánya ezt a fontos késői egyedfejlődési lépést nem befolyásolja.

Ez az új eredmény, amely szerint a PIF3 negatív elem a fitokróm indukált jelátvitelben, többet jelent egy apró tévedés korrigálásánál. E tények ismeretében nehéz feloldani azt az ellentmondást, amely a PIF3 élettani hatása és a között az *in vitro* eredmény között feszül, hogy a PIF3 a fitokrómok Pfr formájához és a G-boxhoz egyidejűleg kötődik. A jelenleg “érvényes” modellek és ezen adataink szerint tehát úgy tűnik, mintha a Pfr formájú fitokróm a fotomorfozenikus fejlődést a PIF3 segítségével gátolná. Mivel a kutatások eddigi eredményei nem támasztják alá a Pfr forma fotomorfozenikus fejlődésben játszott semmiféle gátló szerepét, ezért a jövőben valószínűleg át kell értékelnünk a PIF3 funkcionális modelljét.

6.2 A PIF3 fehérje fényindukált lebomlása a fotomorfozenesis szabályozó lépése

Munkánk során kimutattuk, hogy a vizsgált növények sejtmagjában a PIF3 fehérje sötétben felhalmozódik, fényben azonban lebomlik. Adatainkból az is látszik, hogy a rövid fénykezelés sem a *PIF3* promóter aktivitását, sem a *PIF3* mRNS szintet nem változtatja meg, ezért valószínű, hogy az általunk tapasztalt fehérjeszint-csökkenés a fokozott PIF3-specifikus degradáció eredménye. Ezt a degradációt a vörös és távoli-vörös tartományban a phyA, phyB és phyD fotoreceptorok irányítják. A sebességére jellemző, hogy a PIF3 fehérje féléletideje becsléseink szerint vörös fényben mindössze 10 perc, és ilyen körülmények között 30-40 perc alatt mennyisége a maximumról a detektálhatóság szintje alá csökken. Különösen érdekessé

válí az a felfedezés akkor, ha tisztában vagyunk azzal, hogy az eddigi adatok alapján a PIF3-nak központi szerepet tulajdonítottak a fitokróm-specifikus jelátvitel szabályozásában (Martinez-Garcia és mtsai, 2000; Tepperman és mtsai, 2001; Quail, 2002). Hogyan hathat a fény-specifikus szignálátvitelben egy olyan protein, amely fény hatására gyorsan lebomlik? Álláspontunk szerint a PIF3 szerepe a sötét-fény átmenetekkor történő fiziológiai változások szabályozásában lehet, míg folyamatos megvilágítás esetén más faktorok játszanak szerepet a jelátvitelben. A PIF3 sötétben felhalmozódik, ez valószínűleg egyfajta “felkészülés” a növény részéről az elkövetkező megvilágításra, amelynek bekövetkeztekor a PIF3 – közreműködve a jelátvitel-inicializációban – gyorsan lebomlik, más, fényben stabil faktoroknak adva át a helyét.

A PIF3 most feltárt, fitokróm-specifikus fényindukált lebontása új visszacsatoló típusú szabályozásra enged következtetni: amikor a növény sötétből fényre kerül, a fitokróm fotoreceptorok érzékelik a fényt, a phyA és phyB aktív Pfr konformációjává alakul át, és képessé válik arra, hogy a PIF3-mal közvetlen kapcsolatba lépjen. Ez a mozzanat a fitokróm-specifikus jelátviteli utak fontos kezdeti lépése lehet, viszont a fitokrómok Pfr formájának a megjelenése elindítja a PIF3 azonnali, gyors ütemű lebontását is. A visszacsatolás lehetséges finombeállítási mechanizmusaira utalnak az alábbi eredményeink:

(I) A PIF3 a phyB-hez hasonlóan a phyA fotoreceptor aktív formájával is képes közvetlen kölcsönhatásba lépni, bár ennek a kölcsönhatásnak az erőssége gyengébb. Ha a növényeket távoli-vörös fényben neveljük, a phyA-specifikus hipokotilhossz-rövidülés független a PIF3 fehérje jelenlététől. Azokban a vizsgált mutánsokban, amelyekben távoli-vörös fényben phyA-specifikus hipokotilhossz-fenotípus megfigyelhető (*eid1*, *spa1*, *fhy3*), a PIF3 távoli-vörös indukálta (tehát phyA-specifikus) lebomlása változatlan (az adatok nem kerülnek bemutatásra), tehát a phyA a PIF3 távoli-vörös fény által indukált lebontását és a csíranövények növekedését más jelátviteli folyamatok révén vezényli. A PIF3 phyA vezérelt távoli-vörösben történő lebontásának újabb érdekes aspektusa az, hogy ezzel a mechanizmussal egy olyan fehérje lebontása történik meg, amely más fotoreceptorok által vezérelt jelátvitelben is szerepet játszik, így a phyA modulálni tudja például a phyB-specifikus jelátvitelt.

(II) Miután bebizonyítottuk, hogy a *phyA/phyB/phyD* mutáns növényben a PIF3 szintjét sem vörös, sem a távoli-vörös fény nem befolyásolja, ezeket a növényeket kék fényvel világítottuk meg, ami a PIF3 lebomlását okozta. Tehát az ebben a mutánsban meglévő, kék fény érzékeléséért felelős fotoreceptorok (*cry1*, *cry2*, *phot1*, *phot2*) közül egy, vagy esetleg több is

felelős lehet a PIF3 lebontásáért. A kék és vörös fényspecifikus jelátviteli utak kölcsönhatása az eddig közölt eredmények alapján valószínűleg több szinten valósul meg. Az a tény, hogy a kék fotoreceptorok olyan kaszkád-utak kiindulópontjai, amelyek egy fitokróm-specifikus faktor lebontását regulálják, rámutat a fitokrómok és kék fényreceptorok által irányított jelátviteli utak egy eddig még nem ismert “cross-talk”-jára is.

6.3 A PIF3 speciális sejtmagi fehérjekomplexek felépítésében vesz részt

Munkánk során bemutattuk, hogy a PIF3-GFP fehérje a két naposnál idősebb etiolált csíranövények sejtmagjában felhalmozódik és diffúz eloszlást mutat. Fény hatására sejtmagi foltokat formál, amelyek mérete, nagysága, és elrendeződése emlékeztet a fitokrómok által alkotott sejtmagi fehérjekomplexekére. Bemutattuk azt is, hogy a fény hatására létrejövő komplexekben a PIF3 ko-lokalizációt mutat a fitokrómokkal: vörös fény hatására a phyA-, phyB-, phyC-, phyD-vel, távoli-vörös fény hatására pedig a phyA-val. Azt is megfigyeltük, hogy huzamosabb idejű megvilágítás hatására ezek a komplexek – valószínűleg a PIF3 lebomlása miatt – felbomlanak és a fitokrómok az előzőektől eltérő számú és méretű új komplexet formálnak, amelyek nem tartalmaznak PIF3-mat. Az előbbi komplexeket “korai”-nak, az utóbbiakat “késői”-nek neveztük el. Eredményeinkből az is látható, hogy a fitokrómok alkotta “korai” komplexek PIF3 hiányában nem jönnek létre.

A fitokrómokat tartalmazó sejtmagi komplexek funkciójáról megoszlanak a vélemények, mert eddig egyetlen kísérleti eredmény sem adott egyértelmű választ erre. A PIF3 *in vitro* vizsgálata során kialakult – az előzőekben részletesen ismertetett – modell szerint fény hatására a fitokrómok Pfr formába kerülnek és a sejtmagba importálódnak. Ekkor a PIF3 képes egyidejűleg közvetlenül kapcsolódni ezekhez a konformerekhez és a fényszabályozott promóterek G-boxához, így a fényjel rövid idő alatt, néhány lépésben eljut közvetlenül transzkripciós komplexhez (Martínez-García és mtsai, 2000). Ezt a modellt támasztják alá azok az adatok, amelyek szerint csak a Pfr formában levő fitokrómok hoznak létre mikroszkópon megfigyelhető, karakteres sejtmagi foltokat, azok a phyB mutánsok pedig, amelyek kölcsönhatása sérült a PIF3-mal (Ni és mtsai, 1999), semmilyen körülmények között sem képesek ilyen sejtmagi komplexeket formálni (Kircher és mtsai, 2002). Ezt az eredményt erősíti meg az a beszámoló is, amely szerint az aktivitásukban sérült mutáns fitokróm molekulák sejtmagi foltalkotása is eltér a vad típusúakétól (Yanovsky és mtsai, 2002). Több

jel utal arra, hogy ez a modell valószínűleg több részletében hibás. A sejtmagi foltalkotásban sérült phyB mutánsok nem veszítették el teljes biológiai aktivitásukat, sőt egy új tanulmány szerint a fitokróm-specifikus foltalkotás nem szükséges feltétele a biológiai aktivitásnak (Matsushita és mtsai, 2003). Nem szabad tehát elvetnünk azt az elképzelést, hogy a megfigyelt komplexek az inaktívvá vált fitokrómok gyűjtőhelyei (Vierstra, 1994). Természetesen ezt az elméletet is gyengítik a részben már említett adatok: miért csak akkor látunk ilyen komplexeket, amikor a fitokrómok Pfr formában vannak, illetve miért nem alkotnak ilyeneket a funkciójukban sérült PHY pontmutánsok? Valószínű, hogy a valóság ezeknél az egyoldalú elképzeléseknél árnyaltabb: a fitokrómok aktívak lehetnek a jól körülhatárolható sejtmagi komplexekben és azokon kívül is. Ezekben az eltérő állapotokban valószínűleg eltérő jelátviteli mechanizmusokban vesznek részt. Ezt a feltevést igazolják egy nemrégiben megjelent tanulmány (Chen és mtsai, 2003) eredményei, amely szerint a phyB által létrehozott sejtmagi fehérjekomplexek morfológiája és dinamikája az aktuális Pr/Pfr hányadostól függ. Eredményeink is ezt az elképzelést támasztják alá, hiszen az általunk megfigyelt fitokróm-specifikus nukleáris komplexek dinamikájára és morfológiájára a PIF3 hatással van. Eredményeink segíthetik a komplexek funkciójának megértését, amelyre jelenleg több szálon futó kutatások irányulnak (komplexizolálás, az összetevők meghatározása (Panigrahi és mtsai, nem közölt eredmény); komplexformálásban mutáns növények azonosítása (Chen és mtsai, 2003)). Közelebb visz a kérdés megválaszolásához az is, ha sikerül összefüggést találni a PIF3 hiánya által okozott fenotípus és a fitokrómok sérült sejtmagi foltalkotása között.

6.4 A COP1 fehérje kettős funkciója

Míg a fény indukálta jelátviteli utak kulcsfontosságú lépése egyes proteinek degradációja, addig a fitokróm-specifikus szignálátvitel esetében eddig kevés adat utal a fényregulált proteolízis meglétére. (Egyetlen említésre méltó kivétel talán az EID1 (Büche és mtsai, 2000; Dieterle és mtsai, 2001), amely egy F-box fehérje és a phyA-specifikus jelátvitelben játszik szerepet, valószínűleg proteoszóma-kapcsolt jelátvitel révén.) A PIF3 fehérje fény általi degradációja és újbóli felhalmozódása sötétben valószínűsíti, hogy a PIF3 inaktivációjában a proteolízis játszik szerepet. Ennél talán még érdekesebb, hogy a PIF3 vörös és távoli-vörös fény által kiváltott degradációjában három fitokróm, a phyA, phyB és

phyD játszik szerepet. Valószínű, hogy a PIF3 degradációja a HY5 transzkripciós faktoréhoz hasonlóan a fényindukált transzkripció egyik fontos lépése. Van azonban egy lényeges különbség e két transzkripciós regulátor hatásmechanizmusa közt: míg a HY5 sötétben lebomlik, és fényben a sejtmagban felhalmozódik, addig a PIF3 éppen fordítva: sötétben halmozódik fel és fényben bomlik le. A HY5-öt a COP1 fehérje ubiquitinálja és a COP9 szignálszóma vesz részt a proteolízisében. A cry1 és cry2 kék fényreceptorok a COP1 proteinnel közvetlenül összekapcsolódnak a sejtmagban, így a kék fény érzékelése során a COP1 inaktiválása azonnal megtörténhet, a HY5 felhalmozódása pedig megindulhat. Ezzel szemben eredményeink azt mutatják, hogy a COP1 fehérje, amely a HY5 degradációjában részt vesz, a PIF3 transzkripciós faktort viszont sötétben megvédi a lebomlástól. Ez valószínűleg indirekt módon történik: a COP1 fehérje szükséges a szkotomorfogenezis során (sötétben) egy ma még nem ismert faktor lebomlásához, amely viszont a PIF3 degradációjáért felelős. A COP1 működését sötétben tehát a következőképpen lehetne összefoglalni: a COP1, mint a fotomorfogenezis negatív regulátora, sötétben úgy tartja fenn a szkotomorfogenikus fejlődést, hogy a fotomorfogenikus fejlődéshez szükséges későbbi faktorok (HY5) szelektív degradációját vezényli, de elősegíti olyan jelátvitelben szerepet játszó molekulák (PIF3) felhalmozódását, amelyekre a sötét-fény átmenetkor lesz szükség. Megállapíthatjuk azt is, hogy a PIF3 felhalmozódása nem szükséges a *cop1-4* mutánsban ahhoz, hogy a konstitutív fotomorfogenikus fenotípus kialakuljon. Fontos azt is megjegyeznünk, hogy különböző COP1 mutánsokban csak a PIF3 sötétben történő felhalmozódása sérült, a fény hatására bekövetkező lebomlása nem, tehát a COP1 szerepe a PIF3 felhalmozódásában a megvilágítás kezdetekor valószínűleg megszűnik. Az a megfigyelésünk, hogy a COP1 két különböző fotomorfogenikus fenotípusú mutánsában (*cop1-4*, *eid6*) a PIF3 fehérje sötétben bekövetkező felhalmozódása egyaránt gátolt, arra utal, hogy a COP1 PIF3 felhalmozódását elősegítő funkciója független e fenotípusok kialakulásától.

6.5 A PIF3 szerepe a növényi cirkadián óra működésében újraértékelésre vár

Méréseink során az *Arabidopsis* cirkadián óra vizsgálatában általánosan használt két output gén (*CAB*, *CCR2*) és a központi oszcillátor részének tartott *CCA1* gén (amelynek promóteréhez a PIF3 *in vitro* kötődni képes) ún. szabadon futó ritmikus kifejeződését állandó sötétben ill. fényben vizsgáltuk. Eredményeinkből megállapítható, hogy ezeknek a

ritmusoknak sem az amplitúdóját, sem a periódushosszát nem befolyásolta sem a PIF3 hiánya, sem a fehérje magasabb szintje. Mindezek mellett – a várakozásokkal ellentétben – a PIF3 hiányos mutáns növényben a *CCA1* mRNS szint fényfüggő átmeneti emelkedése sem változik jelentősen.

Ezek az eredmények az eddigi jórészt *in vitro* vizsgálatokon alapuló modellt nem támasztják alá: ha a PIF3 a fény-input központi eleme, akkor várható, hogy a fehérje szintjének drasztikus megváltoztatása a központi oszcillátor működését és/vagy a cirkadián óra kimeneteit érinteni fogja. Annak, hogy ez nem így történt, több oka lehet:

- (I) A PIF3 *in vitro* kötődése a *CCA1* promóterének G-boxához *in vivo* nem bír funkcionális jelentőséggel, így a PIF3 nem játszik szerepet a cirkadián óra működésében. (Az eddig közölt egyetlen *in vivo* adatot, amely a *CCA1* csökkent mértékű fény általi indukálhatóságáról számol be, olyan PIF3 antiszensz növények vizsgálatával nyerték, amelyekben a hipokotilmegnyúlás fényspecifikus gátlása a PIF3 hiányos mutánsban tapasztalattal ellentétes irányú.)
- (II) A cirkadián óra általunk is használt, leggyakrabban vizsgált output markergénjeinek működését nem érinti a PIF3 megváltozott expressziós szintje. Előfordulhat hogy más, általunk nem vizsgált, az óra működésének zavarára utaló fenotipikus jegy árulkodik a PIF3 és a cirkadián óra funkcionális kapcsolatáról.
- (III) A PIF3 egy nagy géncsalád tagja, s arról is vannak ismereteink, hogy képes más, hasonló szerkezetű transzkripciós faktorokkal heterodimereket képezni. Előfordulhat, hogy a megemelt PIF3 fehérjeszint nem okozza ezen dimerek funkciójának a sérülését, PIF3 hiányában pedig valamely hozzá hasonló faktor veszi át a szerepét. Az így kialakult fenotípus annyira enyhe lehet, hogy módszereinkkel nem tudjuk kimutatni.
- (IV) Az eddig élesztő két-hibrid rendszerben igazolt PIF3-TOC1 kölcsönhatásnak funkcionális jelentősége megkérdőjelezhető. Hamarosan rendelkezésünkre állnak a *pif3/toc1* dupla mutáns növények, amelyek vizsgálatával remélhetőleg választ kapunk majd erre a kérdésre.

Eredményeink értékelése azért nehéz, mert általunk az eddig felállított, sok oldalról alátámasztott modell érvényessége válik kérdésessé. Mindenképpen fontosnak tartjuk hangsúlyozni, hogy eredményeink *in vivo*, növényi rendszer vizsgálatával keletkeztek, míg az Irodalmi áttekintésben említett modell felépítéséhez heterológ rendszerből származó adatokat,

nehezen magyarázható fenotípusú növényi vonalak vizsgálati adatait és jó adag spekulációt is felhasználtak. Eredményeink nem elegendőek arra, hogy alternatív változatokat adjunk a PIF3-nak a cirkadián óra működésében betöltött szerepére, több kérdés továbbra is nyitott maradt. Ezek megválaszolásához a PIF3 hiányos mutáns növényen elvégzett cirkadián gén-chip analízis nyújthat segítséget a jövőben.

6.6 Egy új mutánskeresési módszer alapjai

Munkánk során létrehoztunk olyan transzgenikus növényeket, amelyek a PIF3-LUC fúziós fehérjét a konstitutívan magas szinten expresszáló (35S)_{2x} virális promóter irányítása alatt fejezik ki. Kísérleteink alapján nyilvánvaló, hogy a PIF3-LUC fúziós fehérje lebomlása hasonló karakterisztikát mutat az endogén PIF3 lebomlásához, így körültekintően megválasztott kísérleti rendszerben a növényekből származó lumineszcencia mérésével követni tudjuk a PIF3 fényindukált lebomlását. A rendszer egy újfajta mutánskeresési eljárást tesz lehetővé, amelyet kipróbáltunk. A PIF3-LUC fehérjét kifejező növényeket sötétben növesztettük négy napos korukig, majd vörös fénybe helyeztük őket, ami megindította a fúziós fehérje degradációját. 3 órás megvilágítás után a növényeink közé velük megegyező korú, fényrel nem kezelt növényeket helyeztünk, ezek szimbolizálták azokat a mutáns növényeket, amelyekben a PIF3 lebomlása sérült. Ezután luciferin szubsztráttal permeteztük le a csíranövényeket és a luciferáz lumineszcenciájára érzékeny kamerával felvételt készítettünk róluk. A képen jól láthatók a “vad típusú” háttérből fényességük révén kiemelkedő “mutáns” növények, amelyek az etiolált növényekre jellemző változatlan intenzitású fényt bocsátják ki. Ebben a kísérleti rendszerben olyan mutánsok izolálását várhatjuk, amelyekben (I) a PIF3 lebomlásához vezető jelátviteli út valamely komponense sérült vagy (II) magában a PIF3 molekulában alakult ki olyan mutáció, amely a lebontással szemben ellenállóvá teszi.

Így tehát a kezünkben van egy olyan mutánskeresési módszer, amely újdonsága mellett gyorsan, nagy számú csíranövény átvizsgálását teszi lehetővé egy viszonylag egyszerű fenotípus követésével. A mutánskeresés gyakorlati megvalósítását laboratóriumunkban megkezdtük.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A PIF3 transzkripciós faktorról izolálása óta igen sok adat összegyűlt. Ezek a publikációk azonban jórészt heterológ és *in vitro* rendszerekből származó adatokat közöltek. Munkánk célja az volt, hogy a PIF3-mat főként transzgénikus *Arabidopsis* növényeket felhasználva, *in planta* vizsgáljuk.

Kísérleti eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Egy T-DNS inszerciós növényi vonalat vizsgálva bebizonyítottuk, hogy az *pif3* nullmutáns, tehát nem tartalmaz kimutatható mennyiségű PIF3 fehérjét. Ugyanezt kimutattuk a korábban PIF3 túltermelőként leírt *poc1* vonalról is. Mindezek mellett a korábban a szakirodalomban közölt technikai nehézségek ellenére sikerült olyan transzgénikus *Arabidopsis* növényeket létrehoznunk, amelyek a (35S)_{2x} promóter irányítása alatt fejezik ki a teljes hosszúságú PIF3 fehérjét. A túltermelés tényét Western blot analízissel igazoltuk. A PIF3 hiányos mutáns és a PIF3-mat túltermelő vonalak hipokotilhossz-fenotípusának vizsgálatával igazoltuk, hogy a PIF3 a vizsgált fenotipikus jelleg tekintetében a fitokróm-B-specifikus jelátviteli utaknak a korábban gondolttal ellentétben nem pozitív, hanem negatív regulátora.
2. Olyan transzgénikus *Arabidopsis* növényeket hoztunk létre, amelyek a (35S)_{2x} promóter irányítása alatt fejezik ki a teljes hosszúságú PIF3-GFP fúziós fehérjét, amit Western blot analízissel bizonyítottuk. A PIF3-GFP fehérjét és a PIF3-mat túltermelő növények fenotípus jegyei hasonlóak, ami arra utal, hogy a fúziós fehérjék funkcionális PIF3 molekulaként viselkednek. Ez a tény valószínűsíti, hogy sejten belüli eloszlásuk is hasonló az endogénekéhez. Kimutattuk, hogy a PIF3-GFP fúziós fehérje a transzgénikus növények sejtmagjában található, de a detektálásához a növényeknek egy bizonyos kort (körülbelül a csírázás kezdetétől számított két nap) el kell érniük. Az epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során a PIF3-GFP fehérjét az etiolált növények minden vizsgált szövetében észleltük, míg a fényen nőttékben vagy fénnel kezeltékben nem.
3. Megfigyeltük, hogy a PIF3-GFP molekulák eloszlása az etiolált növények sejtmagjában egyenletes; rövid vörös vagy távoli-vörös fényimpulzussal történő megvilágítás hatására azonban jellegzetes sejtmagi foltokba koncentrálnak. Ezek hasonlítanak a korábban jellemzett, fitokrómok által létrehozott sejtmagi foltokéhoz, amelyek nagy valószínűséggel multiprotein-komplexek megjelenési formái. A PIF3-GFP-specifikus jel a

fényimpulzus után hozzávetőlegesen 30 perccel már nem észlelhető, függetlenül attól, hogy a növényeket fényben vagy sötétben tartottuk. Ismételt sötét-inkubáció (körülbelül hat óra) a PIF3-GFP molekulák újbóli sejtmagi megjelenését eredményezi az etiolált növényekre jellemző diffúz eloszlással. Egy újabb fényimpulzussal ez a folyamat (sejtmagi foltformálás – GFP-specifikus jel eltűnése – PIF3-GFP újra felhalmozódása sötétben) megismételhető. Kimutattuk azt is, hogy ezt a jelenséget a fitokróm-A és más fitokrómok szabályozzák vörös és távoli-vörös fényben.

4. A PIF3-GFP-specifikus mikroszkópos jel eltűnésének hátterét Western blot analízissel vizsgáltuk. PIF3-specifikus antitesteket használva megállapítottuk, hogy a PIF3-GFP által kibocsátott fluoreszcens jel eltűnésével párhuzamosan a PIF3 (és PIF3-GFP) fehérje mennyisége is a detektálhatóság szintje alá esik, miközben sem a *PIF3* promóter aktivitása, sem a *PIF3* mRNS szintje nem változik. Adataink elárulják, hogy a PIF3 vörös és távoli-vörös fény indukálta lebomlásáért a phyA, phyB és phyD fotoreceptorok együttesen felelősek. Megállapíthatjuk, hogy a fitokrómok így egy olyan faktor degradációjának indukciójában vesznek részt, amely fitokróm-specifikus válaszok közvetítésében működik közre, tehát ezeknek a jelátviteli utaknak egy új szintű szabályozását figyeltük meg. A fitokróm-függő szignálátvitel szabályozásának új aspektusára utal az a megfigyelésünk, hogy a PIF3 lebontásában – eddig még meg nem határozott módon – a kék fényre specifikus fotoreceptorok által vezérelt jelátvitel is közreműködik.
5. Mikroszkópos vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a PIF3 *in planta* ko-lokalizációt mutat a phyA, phyB, phyC és phyD fotoreceptorokkal. Ez a kölcsönhatás fény hatására gyorsan kialakul, a létrejött jól körülhatárolható sejtmagi fehérjekomplexek azonban rövid életűek, valószínűleg a PIF3 degradációja miatt felbomlanak. Huzamosabb idejű megvilágítás hatására a fitokrómok újra sejtmagi komplexeket formálnak, ezek azonban az előbb említettől eltérő morfológiájúak és összetételűek. Az előbbieket “korai”, az utóbbiakat “késői” komplexeknek neveztük el. Azt is megállapítottuk, hogy a phyB esetében a “korai” foltok kialakulásához a PIF3 jelenléte elengedhetetlenül szükséges.
6. Megállapítottuk, hogy *cop1* mutáns növényekben a PIF3 fehérje sötétben nem halmozódik fel, fényindukált lebomlása azonban megtörténik. Eredményünk azért érdekes, mert bár a COP1 fehérje E3 típusú ubiquitin ligázként különböző faktorok lebontásában játszik szerepet, itt – úgy tűnik – egy protein felhalmozódásáért felelős. Ez a hatás valószínűleg közvetett: a COP1 egy olyan fehérje degradációjában vehet részt, amelynek szerepe van a

PIF3 lebontásában. Így a COP1 hiányos mutáns növényben ez az ismeretlen faktor felhalmozódhat, ezzel alacsony PIF3 fehérjeszintet eredményezve. Különböző *cop1* allélek vizsgálata arra enged következtetni, hogy a COP1 szerepe a PIF3 felhalmozódásában független a konstitutív fotomorfozenikus fenotípus kialakulásától. Eredményeink arra is rávilágítanak, hogy a *cop1* fenotípus kialakulásához PIF3-ra nincs szükség.

7. Úgy találtuk, hogy a PIF3 nem játszik jelentős szerepet a *CCA1* gén fényindukált akut válaszában kialakításában. Mindezek mellett a PIF3 fehérje túltermelése vagy hiánya nem okozza a cirkadián óra működésének jelentős zavarát; tehát az a modell, amely szerint a PIF3 a cirkadián óra fény-inputjának központi eleme, átértékelésre, finomításra szorul.
8. Létrehoztunk egy olyan rendszert, amely alkalmas a PIF3 degradációját érintő jelátviteli utak vizsgálatára. A PIF3-LUC fúziós fehérjét a konstitutív (35S)_{2x} promóter irányítása alatt kifejező transzgenikus növényekből származó lumineszcenciát megfelelő módon mérve a fehérje mennyiségével arányos jelet kapunk. Ha ezekben a növényekben spontán pontmutációkat hozunk létre, gyorsan és egyszerűen meg tudjuk találni azokat az egyedeket, amelyekben a PIF3 fényindukált lebomlásáért felelős jelátviteli utak sérültek. Ezekben a növényekben ugyanis huzamosabb megvilágítás hatására sem fog csökkenni a kibocsátott PIF3-LUC-specifikus lumineszcencia, utalva ezzel a le nem bomlott fehérje jelenlétére.

8. SUMMARY

8.1 Introduction

Light plays a crucial role in the life of the vast majority of higher plants. On the one hand it provides an energy source for photosynthesis and, on the other hand it is an important environmental signal with impact on a wide variety of different physiological and developmental processes from germination to flowering. The effect of light on the development of plants is probably most strikingly demonstrated by a comparison of seedlings grown in light or dark. A dark-grown seedling has a long hypocotyl, ending in a hypocotyl hook, its cotyledons are small and closed, its etioplasts contains no chlorophyll: this way of development is called skotomorphogenesis or etiolation. In contrast, light-grown seedlings have short hypocotyls, no hypocotyl hook, opened cotyledons containing fully developed, green chloroplasts: this way of development is called photomorphogenesis or de-etiolation. Plants can sense the presence or absence, the wavelength, the intensity, the direction, the duration and the diurnal rhythm of light. To monitor the light environment, plants have evolved a series of photoreceptors characterised by the wavelength of light they perceive. Photoreceptors of the widely used model plant *Arabidopsis thaliana* are listed in Table 8.1.

Table 8.1. Photoreceptors and their functions in higher plants

Wavelength of absorbed light/Receptors	Function
UV-B region: 280-320 nm Receptor unknown	Induction of gene expression
Blue/UV-A region: 320-470 nm Cryptochromes: CRY1, CRY2 Phototropins: PHOT1, PHOT2	De-etiolation, resetting the circadian clock, induction of flowering Phototropism, chloroplast movement, regulation of stoma opening
Red/Far-red region: 620-750 nm Phytochromes: PHYA PHYB PHYC PHYD PHYE	Seed germination, de-etiolation, shade avoidance, regulation of flowering time, resetting the circadian clock

Plant cryptochromes are chromoproteins with a molecular mass of 70-80 kDa showing significant homology to bacterial DNA photolyases but lacking photolyase activity. They carry pterin and FAD (flavin adenin dinucleotid) chromophores and absorb the blue range of the spectrum (Lin, 2000). Upon illumination with blue light the cry2 protein shows rapid degradation whereas the level of cry1 does not change, suggesting that cry2 mediates responses to higher and cry1, to lower fluences of blue light.

Phototropins possess two LOV (light oxygen voltage) domains, each of which binds a FMN (flavin mononucleotid) chromophore (Christie et al., 1999). The function of the two phototropins of *Arabidopsis* is redundant in stoma opening and phototropism; PHOT2 however plays a dominant role at lower blue light intensities and this photoreceptor also seems to be responsible for the chloroplast relocation triggered by blue light (Kagawa et al, 2001; Fankhauser and Staiger, 2002).

Phytochromes (PHY) are photoreceptors that perceive red and far-red light. They are functional in homodimers of two ~125 kDa monomers with a covalently attached linear tetrapyrrole chromophore per molecule. There are five different phytochrome genes in *Arabidopsis*, named *PHYA*, *B*, *C*, *D*, *E* (Clack et al., 1994) with high structural similarity. phyA degrades quickly upon exposure to light. It is the dominant phytochrome of etiolated seedlings and mediates responses to very low red fluences and far-red light. phyB, C, D, E are photo-stable molecules that mediate responses to low and high fluences of red light (Furuya and Schäfer, 1996). phyB proved to be the dominant phytochrome in green seedlings and adult plants (Sharrock and Clack, 2002).

Phytochromes are synthesised in Pr form. This inactive form can be “switched” by a pulse of red light to Pfr form, which is the active conformer of phytochromes and the starting point of signal transduction cascades. The Pfr form can be reverted to Pr form by far-red light illumination. This is the phytochrome photocycle. The Pfr form spontaneously converts to Pr form in darkness: this process is called dark reversion. In case of phyA, the Pfr form is more unstable than the Pr form, it is therefore subject of degradation: this is the third way of removing Pfr forms from the system. The Pr \leftrightarrow Pfr conversion of phytochromes never involves 100% of the available phytochrome pool. Under the effect of the actual light conditions a certain Pr/Pfr ratio of each PHY species is established, which determines the properties of the developing physiological response.

During the past several years it turned out that the subcellular localisation of phytochromes has a functional role: all *Arabidopsis* phytochromes translocate to the nucleus

during light illumination (in Pfr form) and forms nuclear speckles in the nuclei with different kinetics, depending on the wavelength and the intensity of light (Kircher et al., 2002). It is probable that these speckles are multiprotein-complexes. The function of these complexes is a matter of debate in the scientific community. Some authors think that the speckles are the scene of phytochrome degradation (Vierstra, 1994), but these speckles are formed only when phytochromes are in the active (Pfr) form; furthermore, mutant phytochromes defective in light signalling cannot form speckles (but are imported to the nucleus in light) (Kircher et al., 2002).

Examination of light-induced signal transduction cascades is the most extensively investigated area of phytochrome research. Genetical and molecular biological approaches have proved to be the most effective ways of this investigation. Finding and characterizing mutants that defective in phytochrome-specific responses is the main objective of genetic approaches. The used genetic screens implemented have helped to isolate mutants that can be divided into two main groups:

(I) Those, which behave as if grown in dark despite the fact that they grew in light. In these plants positive elements of photomorphogenesis are damaged. Mutants with functionally damaged photoreceptors and damaged chromophore synthesis pathways were isolated. In one of the first screens a mutant was isolated with functional photoreceptors but an etiolated phenotype in light, which was called *hy5* (long hypocotyls 5) (Koorneef et al., 1980). It turned out that the mutation affects a bZIP-type transcription factor in these plants. This protein can bind to a special element (called G-box) of the promoters of light-responsive genes and maintain photomorphogenic development.

(II) Those mutant plants, which show a de-etiolated phenotype even in light, are classified to the second group. In these plants one of the genes which prevent photomorphogenesis is mutated. One set of these mutants is called COP (constitutive photomorphogenesis). Of these, the function of the COP1 protein is the best known: it was shown that COP1 is a protein that confers specificity to an E3 ligase complex thus participates in the ubiquitination of the positive components of photomorphogenic development (Hardtke and Deng, 2000). HY5 is one of the COP1 targets: COP1 ubiquitinates HY5 in dark, preventing photomorphogenic development, whereas in the nuclei of *cop1* mutant seedlings HY5 molecules accumulate, releasing photomorphogenic development independently of the presence of light.

The goal of molecular biological approaches is to find early signalling partners of phytochromes by using them as bait in the yeast two-hybrid system. PIF3 (phytochrome

interacting factor 3), one of the factors physically interacting with phytochromes was found using this method (Ni et al., 1998). PIF3 contains a sequence of 524 amino acids which forms (i) a nuclear localisation signal (NLS), directing the protein to the nucleus, and (ii) a conserved motif called basic helix-loop-helix (bHLH) which is responsible for the DNA-binding and the dimerisation of the molecule. Thus, PIF3 belongs to the bHLH family of transcription factors (Bailey et al., 2003).

Molecular properties of PIF3 were examined in the yeast two-hybrid system and *in vitro* binding assays. PIF3 directly interacts with phyA and, with higher affinity, with phyB molecules: the connection is stronger with the Pfr than the Pr forms. The interaction between PIF3 and mutant phytochromes with damaged function is much weaker than that with wild-type forms (Ni et al., 1998; Zhu et al., 2000). PIF3, like most members of the *Arabidopsis* bHLH transcription factor family can bind DNA (Toledo-Ortiz et al., 2003): it binds with high specificity to the G-box, a characteristic sequence motif of light-inducible promoters. In addition it was shown that PIF3 can simultaneously bind to the Pfr form of phyB and to a G-box *in vitro* (Martinez-Garcia et al., 2000).

bHLH transcription factors are functional in dimers and can heterodimerize with other bHLH factors. PIF3 can form heterodimers with HFR1 (long hypocotyls in far-red 1) (Fairchild et al., 2000), PIF4 (phytochrome interacting factor 4) (Toledo-Ortiz et al., 2003) and PIL1 (PIF3 like 1).

These data radically change our view about PHY-specific signalling. The light signal reaches the light-responsive promoter not at the end of a long signal transduction cascade but in one step: the physiologically active phytochrome interacts with PIF3, enabling this complex to bind to the G-box of the promoter of light responsive genes, modifying the activity of their transcription. The specificity of the PIF3-phyB complex can be modified by the heterodimerisation of PIF3 with other bHLH factors, conferring additional fine tuning capability to the system (Fig 2.6).

The *in vitro* data were supported by the phenotype caused by changed *PIF3* mRNA levels in transgenic *Arabidopsis* plants. PIF3 seemed to act as a positive factor of light induced inhibition of hypocotyl elongation (Ni et al., 1998). These data were further supported by the results of the examination of the *poc1* (photocurrent 1) T-DNA insertion mutant that shows an increased *PIF3* mRNA level (Halliday et al., 1999). The regulation of some genes, which contain G-boxes in their promoters, requires PIF3 for their proper-light induction. Of these *CCA1* (circadian clock associated 1) and *LHY* (late elongated hypocotyl)

are of special interest because of their special role in maintaining the plant circadian clock. The circadian clock is an endogenous and autonomous molecular timekeeping mechanism of living organisms. A central oscillator generates oscillations with an approximately 24 h period length, based on negative feedback loops, regulating the expression of the output side of the clock. On the other side of the system, a light signal can entrain the clock via photoreceptor-dependent pathways. This fine-tuning can synchronize the rhythm generated by the central oscillator to the changes in the length of daytime and night. CCA1 and LHY are thought to be the components of the central oscillator, thus, according to the published model, the binding of the PIF3-phyB complex to their promoter could be the key element of light input to the central oscillator of the circadian clock.

8.2 Research objectives

At the beginning of our work most of the data on PIF3 had been obtained from *in vitro* systems therefore one of our main aims was to obtain more details on the function of PIF3 by using *in vivo* approaches. The main aims were:

1. To express full-length PIF3 and PIF3-GFP proteins in transgenic plants and examine their biological activity.
2. To examine the phenotype of plants with altered PIF3 levels.
3. To examine the localisation of PIF3-GFP molecules under different light regimes.
4. To prove the co-localisation of PIF3 and PHY molecules *in planta*.
5. To examine the role of PIF3 in the light input of the circadian clock.

8.3 Methods

- Molecular cloning techniques.
- Creating transgenic *Arabidopsis thaliana* plants and maintaining them under sterile and greenhouse conditions.
- Plant total RNA extraction.
- RNase protection assay.
- Total plant protein isolation, Western blotting.

- Performing different light treatments and hypocotyl measurement of seedlings.
- Light, fluorescence and confocal microscopy.
- *In vivo* luciferase enzyme activity measurements in intact seedlings.

8.4 Results and discussion

1. We confirmed a T-DNA-tagged PIF3 mutant line as a null mutant by detecting PIF3 with specific antibody. The light-induced inhibition of hypocotyl elongation was stronger in the *pif3* mutant than in the wild-type seedlings and this effect was observed only during red light treatment but not in far-red or blue light. We could produce real PIF3 overexpressor plants despite the published cloning difficulties (Ni et al, 1998). Red light specific inhibition of hypocotyl elongation was weaker in the overexpressor plants compared to the wild-type controls. This conclusion was further supported by one of our surprising results: we prove that the *poc1* mutant does not contain detectable amounts of PIF3 protein, despite the high *PIF3* mRNA level previously shown in this mutant (Halliday et al, 1999). Our coherent data on a *bona fide pif3* null mutant and on confirmed PIF3 overexpressor plants contradict the published data and suggest that PIF3 is a negative rather than a positive component of phyB-specific photomorphogenic pathways. Our data lead to a contradiction in the proposed model of PIF3 action: a negative factor interacts with the Pfr form of phytochromes and the G-box, therefore it seems that the Pfr form represses photomorphogenic development. Since this function of the Pfr form is not supported by any previous results, the function of PIF3 must be fully revised.

2. We produced transgenic *Arabidopsis* plants expressing PIF3-GFP fusion proteins under the control of constitutive 35S promoter and proved the presence of the fusion proteins by Western-analysis. We observed that these fusion proteins function as biologically active PIF3, thus the regulation of the intracellular partitioning of these fusion proteins is very likely to reflect the functional properties of endogenous PIF3.

3. Using epifluorescent microscopic techniques we have shown that PIF3-GFP molecules are localised in the nuclei of cells after plants have reached a certain age (2 days from the

beginning of germination). The presence of the fusion protein was detected in every examined tissue type in etiolated but not in light-grown or light-treated seedlings.

We have observed that the distribution of PIF3-GFP molecules in the nuclei of etiolated seedlings is diffuse; after a short red or far-red pulse, however they form nuclear speckles reminiscent of those formed by phytochromes after light-treatment. The PIF3-GFP-specific signal disappears after a 30-min light pulse. This phenomenon is independent of the applied light or dark treatment after the first pulse. The PIF3-GFP-specific signal reappears if the illuminated plants are incubated in the dark for approximately six hours. By applying a new light pulse, this process (speckle formation – disappearance of the GFP signal – reappearance in the dark) can be repeated.

4. By using Western blotting analysis we proved that the reason of the disappearance of the PIF3-GFP signal is always the disappearance of the PIF3-GFP protein, whose turnover is similar to that of endogenous PIF3. Our results suggest that light induces faster degradation of PIF3 and this degradation is controlled partly by phytochromes. phyA, phyB and phyD photoreceptors are responsible for the red and far-red light-induced degradation of PIF3 and blue light receptor(s) take part in the induction of blue light-specific degradation. Light-induced degradation of PIF3 could represent a new level of regulation of light-specific signal transduction pathways: the appearance of the Pfr forms of phytochromes initiates signal transduction pathways and induces the degradation of a protein that they specifically interact with. The blue and far-red light-induced degradation of PIF3 represents a new possible regulatory mechanism of phyB-specific signalling.

5. We have observed co-localisation between PIF3 and phyA, phyB, phyC, phyD but not phyE photoreceptors *in planta*. This interaction takes place after light illumination in nuclear speckles, but these protein complexes rapidly disintegrate, possibly because of the degradation of PIF3. Continued irradiation again induces speckle formation of phytochromes, but these speckles do not contain PIF3. We termed the former “early” and the latter, “late” speckles and observed that the presence of PIF3 is essential for phyB “early” speckle formation, whereas it is not necessary for the formation of “late” speckles.

6. We have observed that the presence of functional COP1 protein is essential for the accumulation of PIF3 in dark but not necessary for its light-induced degradation. Our results

also indicate that COP1, a negative regulator of photomorphogenesis, regulates proteolysis of two key transcription factors involved in light signalling, namely PIF3 and HY5, in an apparently antagonistic fashion. COP1, physically interacting with HY5, directs this protein to the proteasome but inhibits, most likely indirectly, degradation of PIF3 in dark. We provided evidence that PIF3 degradation is light-induced, thus we postulate that COP1 is required to degrade one of the components of this yet unknown pathway in the nucleus during skotomorphogenesis. Independent of the molecular mechanism, COP1 action promoting PIF3 accumulation in the nucleus in the dark can be interpreted as follows: COP1 as a negative regulator of photomorphogenesis maintains skotomorphogenic development by inducing selective degradation of signalling components required at later stages of photomorphogenesis (HY5) but promotes accumulation of signalling molecules utilised early at the dark to light transition (PIF3), thus prepares the etiolated seedling for adapting to a new environment.

7. We found that the role of PIF3 in the light induction of *CCA1* transcription is minor and the altered PIF3 levels do not disturb significantly the function of the central oscillator of the circadian clock. Thus, the previously suggested role of PIF3 in the light input of the circadian clock must be revised.

8. We designed and tested a system for the examination of light-induced degradation pathways of PIF3. Measuring the luminescence emitted by transgenic seedlings expressing the PIF3-LUC fusion protein under the control of the 35S promoter, we can follow changes in the protein level without damaging the plants. After generating mutations in these transgenic plants, we can screen for mutants with damaged light-induced PIF3 degradation pathways: the emitted luminescence of these seedlings will not decrease after light irradiation, indicating an unchanged PIF3-LUC protein level.

8.5 Conclusions

Isolation and functional examination of PIF3 radically changed our view about phytochrome-controlled signalling. According to the new model, PIF3 specifically interacts with the Pfr form of phyB and binds to the G-box of light-responsive promoters, conveying the light signal to the transcriptional complex in one step. We have found that the effect of PIF3 on the photomorphogenic development of seedlings is negative rather than positive as shown previously. Functional PIF3-GFP stays in the nucleus of etiolated and dark-adapted seedlings, forms nuclear speckles rapidly after light illumination and co-localises with phytochromes. PIF3 degrades quickly after light-induced speckle formation. This degradation is controlled mainly by different phytochromes and seems to be an important regulation step in light signalling. Our results basically contradict the previously published model of PIF3 action and invalidate the previous and widely accepted hypothesis on the function of PIF3. Our observation regarding the importance of the COP1 protein in the dark accumulation of PIF3 could be the starting point of further functional analysis of PIF3.

9. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozathoz felhasznált publikációt aláhúzás jelöli.

Bauer, D.,[#] Viczián, A.[#], Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K.,
Ádám, É., Fejes, E., Schäfer, E., Nagy, F. (2004) COP1 and multiple photoreceptors control
degradation of PIF3, a transcription factor, required for light signalling in *Arabidopsis*.
(közlésre elküldve: Plant Cell)

[#] Ezek a szerzők a munkához egyenlő mértékben járultak hozzá.

Casal, J.J., Davis, S.J., Kirchenbauer, D., **Viczián, A.**, Yanovsky, M.J., Clough, R.C.,
Kircher, S., Jordan-Beebe, E.T., Schafer, E., Nagy F., Vierstra, R.D. (2002): The serine-rich
N-terminal domain of oat phytochrome A helps regulate light responses and subnuclear
localization of the photoreceptor. Plant Physiology, 129:1127-1137.

Viczián, A., Máté, Z., Nagy, F., Vass I., (2000): UV-B induced differential transcription of
psbD genes encoding the D2 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis*
6803. Photosynthesis Research, 64:257-266.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Ádám, É., Széll, M., Szekeres, M., Schäfer, E., Nagy, F. (1994) The developmental and tissue-specific expression of tobacco phytochrome A genes. *Plant J.*, 6:283-293.
- Ahmad, M. Cashmore, A.R. (1993) HY4 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366:162-166.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O., Cashmore, A.R. (1998) The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A *in vitro*. *Mol. Cell*, 1:939-948.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., Kay, S.A. (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 293:880-883.
- Ang, L.-H., Chattopadhyay, N.W., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., Deng, X.-W. (1998) Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol. Cell. Biol.*, 1:213-222.
- The **Arabidopsis Genome Initiative**. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796–815.
- von Arnim, A.G. (2003) On again – off again: COP9 signalosome turns the key on protein degradation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:520-529.
- Aukerman, M.J., Hirschfeld, M., Wester, L., Weaver, M., Clack, T., Amasino, R.M., Sharrock, R.A. (1997) A deletion in the PHYD gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell*. 9: 1317-1326.

- Bailey, P.C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P.H. Huq, E., Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Weisshaar. B.** (2003) Update on the basic Helix-Loop-Helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 15:2497-2502.
- Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., Parker, M.W., Toole, E.H., Toole, V.K.** (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 38:662–666.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H., Chua, N.-H.** (1994a) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, 77:73-81.
- Bowler, C., Yamagata, H., Neuhaus, G., Chua, N.-H.** (1994b) Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev.*, 8:2188-2202.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Briggs, W.R., Beck, C.F., Cashmore, A.R., Christie, J.M., Hughes, J., Jarillo, J.A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rudiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M., Watson, J.C.** (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* 13:993–997.
- Brosché, M., Strid, A.**, (2003) Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum*, 117: 1, 1-10.
- Büche, C., Poppe, C., Schäfer, E., Kretsch T.** (2000) *eid1*: A new *Arabidopsis* mutant hypersensitive in phytochrome A-dependent high-irradiance responses. *The Plant Cell*, 12, 547-558.
- Carpenter, C.D., Kreps, J.A., Simon, A.E.** (1994) Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.*, 104:1015-1025.

- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.-J., Liu, D.** (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284:760-765.
- Chen, M., Schwab, R., Chory, J.** (2003) Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100:14493-14498.
- Choi, G., Yi, H., Lee, J., Kwon, Y.-K., Soh, M.S., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T.-R. Song, P.-S.** (1999) Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature*, 401:610–613.
- Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., Ausubel, F.** (1989) *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell*, 58: 991–999.
- Chory, J., Nagpal, P., Peto, C.A.** (1991) Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 3: 445–459.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., Briggs, W.R.** (1998) *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, 282:1698-1701.
- Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., Briggs, W.R.** (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:8779-8783.
- Clack, T., Mathews, S., Sharrock, R.A.** (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes – the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.*, 25:413-427.
- Clough, S.J., Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16:735-43

- Colón-Carmona, A., Chen, D.L., Yeh, K.-C., Abel, S.** (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. *Plant Physiol.*, 124:1728–1738.
- Darwin, C.**, (1881) *The power of Movement in Plants* (Da Capo Press Reprint Ed., 1996) Da Capo, New York, USA
- Deng, X.-W., Caspar, T., Quail, P.H.** (1991) Cop1: a regulatory locus involved in light controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 5:1172-1182,
- Devlin, P.F., Robson, P.R.H., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A., Whitelam, G.C.** (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation and flowering time. *Plant Phys.*, 119:909–915.
- Devlin, P.F., Kay, S.A.** (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell*, 12:2499-2510.
- Dieterle, M., Zhou, Y.C., Schäfer, E., Funk, M., Kretsch, T.** (2001) EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signalling. *Genes Dev.*, 15:939-944.
- Dieterle, M , Büche, C., Schäfer, E., Kretsch, T.** (2003) Characterization of a novel non-constitutive photomorphogenic *cop1* allele. *Plant Phys.*, 133:1–8.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L.** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19:11-15.
- Doyle, M.R., Davis, S.J., Bastow, R.M., G. McWatters, H.G., Kozma-Bognár, L., Nagy, F., Millar, A.J., Amasino, R.M.** (2002) The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 419:74-77.
- Fankhauser, C., Yeh, K.-C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D., Chory, J.** (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science*, 284:1539-1541.

- Fankhauser, C.** (2001) The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J.B.C.*, 276:11453–11456.
- Fankhauser, C., Staiger, D.** (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta*, 216: 1–16
- Flint, L.H.** (1936) The action of radiation of specific wave-lengths in relation to the germination of light-sensitive lettuce seed. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.*, 8:1-4.
- Furuya, M.** (1989) Molecular properties and biogenesis of phytochrome I and II. *Adv. Biophys.* 25:133-167.
- Furuya, M., Schäfer, E.** (1996) Photoperception and signaling of induction reactions by different phytochromes. *Trends. Plant Sci.*, 1:301- 307.
- Genick, U.K., Chory, J.** (2000) Red light sensing in plants. *Curr. Biol.*, 10:R651-654.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., Lin, C.** (1998) Regulation of .flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279:1360-1363.
- Gyula, P., Schäfer, E., Nagy, F.** (2003) Light perception and signalling in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:446–452.
- Halliday, K.J., Hudson, M., Ni, M., Qin, M., Quail, P.H.** (1999) *pocl*: an *Arabidopsis* mutant perturbed in phytochrome signalling because of a T-DNA insertion in the promoter of PIF3, a gene encoding a phytochrome-interacting bHLH protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5832-5837.
- Hardtke, C.C., Deng, X.-W.** (2000) The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol.*, 124:1548-1557.

- Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M.T., Oyama, T., Okada, K., Deng, X.-W.** (2000) HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J.*, 19:4997-5006.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A.** (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, 290:2110-2113.
- Harper, R.M., Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M.K., Yamamoto, K., Liscum, E.** (2000) The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell*, 12:757-770.
- Harter, K., Talke-Messerer, C., Barz, W., Schäfer, E.** (1993) Light- and sucrose-dependent gene expression in photomixotrophic cell suspension cultures and protoplasts of rape (*Brassica napus* L.). *Plant J.*, 4:507-516.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., Bailey, P.C.** (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* 20:735–747.
- Hennig, L., Buche, C., Eichenberg, K., Schafer, E.** (1999a) Dynamic properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, 121(2):571-577.
- Hennig, L., Funk, M., Whitelam, G.C., Schafer, E.** (1999b) Functional interaction of cryptochrome 1 and phytochrome D. *Plant J.*, 20: 289–294.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., Schäfer, E.** (2002) Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 128:194-200.

- Hoffman, P.D, Batschauer, A., Hays, J.B.** (1996) PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol. Gen. Genet.*, 253:259-265.
- Holm, M., Ma, L.-G., Qu, L.-J., Deng, X.-W.** (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 16:1247-1259.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., Briggs, W.R.** (1997) *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, 278:2120-2123.
- Huq, E. Quail, P.H.** (2002) PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, 21:2441–2450.
- Jansen, M.A.K., Gaba, V., Greenberg, B.M.** (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant. Sci.*, 3:243-243.
- Jansen, M.A.K.** (2002) Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiologia Plantarum* 116:423-429.
- Jarillo, J.A., Ahmad, M., Cashmore, A.R.** (1998). NPL1 A second member of the NPH serine/threonine kinase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117:719.
- Jarillo, J.A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Cashmore, A.R.** (2001a). Phototropin-related NPL1 controls blue light-induced chloroplast relocation. *Nature*, 410:952-954.
- Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.-H., Yang, H.-Q., Alonso, J.M., Ecker, J.R. Cashmore, A.R.** (2001b) An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature*, 410, 487–490.

- Jenkins, G.I.** (1997) UV and blue light signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 20(6):773-778.
- Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., Wada, M.** (2001) *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science*, 291:2138-2141.
- Kendrick, R.E., Kronenberg, G.** (1994) Photomorphogenesis in plants. Martinus Nijho., Dordrecht, Netherlands
- Kevei, É., Nagy, F.** (2003) Phytochrome controlling signalling cascades in higher plants. *Phys. Plant.*, 117:305-313.
- Kim, B.C., Tennessen, D.J., Last, R.L.** (1998) UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 15:667-674.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P.-S., Choi, G.** (2003) Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell*, 15:2399–2407.
- Kircher, S., Kozma-Bognár, L., Kim, L., Ádám, É., Harter, K., Schafer, E., Nagy, F.** (1999) Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell*, 11:1445-1456.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognár, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Ádám, É., Schafer, E., Nagy, F.** (2002) Nucleo-cytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D and E is differentially regulated by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* 25:1222-1232.
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J.** (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In *Plant Molecular Biology Manual*, Gelvin, B.S., Schilperroot, R.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-22.

- Koornneef, M., Rolff, E., Spruit, C.P.J.** (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. Pflanzenphysiol.*, 100:147-160.
- Laemmler, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lin, C., Ahmad, M., Cashmore, A.R.** (1996a) *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J.*, 10:893-902.
- Lin, C., Ahmad, M., Cashmore, A.R.** (1996b) CRY2, a second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family. *Plant Physiol.*, 110:107.
- Lin, C.** (2000) Plant blue-light receptors. *Trends. Plant. Sci.*, 5:337-342.
- Lin, C.** (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*, Supplement 2002:S207-S225.
- Lin, C., Shalitin, D.** (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54:469–96.
- Lin, C.T., Yang, H.Y., Guo, H.W., Mockler, T., Chen, J., Cashmore, A.R.** (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:2686-2690.
- Liscum, E., Briggs, W.R.** (1995) Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell*, 7:473-485.
- Liu, X.L., Covington, M.F., Fankhauser, C., Chory, J., Wagner, D.R.** (2001) *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* *PHYB* signal transduction pathway. *Plant Cell*, 13:293–1304.

- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., Deng, X.-W.** (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell*, 13:2589–2607.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2002) The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol.*, 43(1):58-69.
- Mancinelli, A.L.** (1994) The physiology of phytochrome action. In Kendrick, R.E., Kronenberg, G.H.M. (eds) *Photomorphogenesis in Plants* 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 211-269.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., Quail, P.H.** (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, 288:859-863
- Más, P., Devlin, P.F., Panda, S., Kay, S.A.** (2000) Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature*, 408: 207-211.
- Más, P., Alabadí, D., Yanovsky, M.J., Oyama, T., Kay, S.A.** (2003) Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:223-236.
- Massari, M.E., Murre, C.** (2000) Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20: 429–440.
- Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M., Mizuno, T.** (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudoresponse regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol.*, 41:1002–1012.
- Matsushita, T., Mochizuki, N., Nagatani, A.** (2003) Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature*, 424: 571-574.

- McKenzie, R.L., Bjorn, L.O., Bais, A., Ilyasad, M.** (2003) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci.*, 2:5-15.
- McNellis, T.W., von Arnim, A.G., Araki, T., Komeda, Y., Misera, S., Deng, X.-W.** (1994) Genetic and molecular analysis of an allelic series of *cop1* mutants suggest functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell*, 6:487–500.
- Millar, A.J., Short, S.R., Chua, N.H. Kay, S.A.** (1992a) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell*, 4:1075-1087.
- Millar, A.J., Short, S.R., Hiratsuka, K., Chua, N.-H., Kay, S.A.** (1992b) Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, 10:324-337.
- Millar, A.J., Straume, M., Chory, J., Chua, N.H., Kay, S.A.** (1995) The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science*, 267:1163-1166.
- Moller, G.S., Kim, Y.S., Kunkel, T., Chua, N.H.** (2003) PP7 is a positive regulator of blue light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:1111-1119.
- Motchoulski, A., Liscum, E.** (1999) *Arabidopsis* NPH3: a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science*, 286:961-964.
- Mouradov, A., Cremer, F., Coupland, G.** (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, Supplement 2002:S111–S130.
- Nagatani, A., Reed, J.W., Chory, J.** (1993) Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiol.*, 102: 269-277.
- Nagy, F., Schäfer, E.** (2000) Control of nuclear import and phytochromes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3:450–454.
- Nagy, F., Kircher, S., Schäfer, E.** (2001) Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *J. Cell Sci.*, 114:475-480.

Nakasako, M., Wada, M., Tokutomi, S., Yamamoto, K.T., Sakai, J., Kataoka, M., Tokunaga, F., Furuya, M. (1990) Quaternary structure of pea phytochrome I dimer studied with small-angle X-ray scattering and rotary-shadowing electron microscopy. *Photochem. Photobiol.*, 52:3-12.

Neff, M.M., Fankhauser, C., Chory, J. (2000) Light: an indicator of time and place. *Genes. Dev.*, 14:257-271.

Neuhaus, G., Bowler, C., Kern, R., Chua, N.-H. (1993) Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell*, 73:937-952.

Neuhaus, G., Bowler, C., Hiratsuka, K., Yamagata, H., N.-H. Chua, N.-H. (1997) Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO. J.*, 16:2554-2564.

Ni, M., Tepperman, J.M., Quail, P.H. (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95:657-667.

Ni, M., Tepperman, J.M., Quail, P.H. (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, 400:781-784.

Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., Deng, X.-W. (2000a) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, 405:462-466.

Osterlund, M.T., Wei, N., Deng, X.-W. (2000b) The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol.*, 124:1520-1524.

Oyama, T., Shimura, Y., Okada, K. (1997) The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.*, 11:2983-2995.

- Parkinson, J.S., Kofoid, E.C.** (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 26:71-112.
- Parks, B.M., Quail, P.H.** (1991) Phytochrome-deficient hy1 and hy2 long hypocotyl mutants of *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell*, 3:1177-1186.
- Parks, B.M., Quail, P.H.** (1993) *hy8* a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell*, 5:39-48.
- Pratt, L.H.** (1994) Distribution and localization of phytochrome within the plant. In Kendrick, R.E., Kronenberg, G.H.M. (eds) *Photomorphogenesis in Plants* 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 163-185.
- Quail, P.H., Schäfer, E., Marme, D.** (1973) Turnover of phytochrome in pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.*, 52:128-131.
- Quail, P.H., Briggs, W.R., Chory, J., Hangarter, R.P., Harberd, N.P., Kendrick, R.E., Koornneef, M., Parks, B., Sharrock, R.A., Schafer, E., Thompson, W.F., Whitelam, G.C.** (1994) Spotlight on phytochrome nomenclature *Plant Cell*, 6:468-471.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., Wagner, D.** (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science*, 268:675-680.
- Quail, P.H.** (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: news paradigms? *Curr Opin in Cell Biol.*, 14:180-188.
- Racusen, R.H., Galston, A.W.** (1983) Developmental significance of light-mediated electrical responses in plant tissue. In Shropshire, W., H. Mohr, H. (eds) *Photomorphogenesis*, edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp.687-703.

- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., Chory, J.** (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 5:147–157.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M., Chory, J.** (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* 104: 1139-1149.
- Sakai, T., Wada, T., Ishiguro, S., Okada, K.** (2000) RPT2. A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12:225-236.
- Sakamoto, K., Nagatani, A.** (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J.*, 10:859-868.
- Sambrook, J., Fritsch, F.E., Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Schäfer, E., Marchal, B., Marme, D.** (1972) In vivo measurements of phytochrome photostationary state in far-red light. *Photochem. Photobiol.*, 15:457-464.
- Schäfer, E., Bowler, C.** (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO reports*, 3:1042–1048.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I. A., Coupland, G.** (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*, 93:1219-1229.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V.V., Larson, M., Wisman, E.** (2001) Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13:113-123.

- Schneider-Poetsch, H.A.W., Braun, B., Marx, S., Schaumburg, A.** (1991) Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. *FEBS Lett.*, 281:245-249.
- Seo, H. S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballasteros, M.L., Chua, N.-H.** (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*, 424: 995-999.
- Sharrock, R.A., Quail, P.H.** (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes. Dev.*, 3:1745-1757.
- Sharrock, R.A., Clack, T.** (2002) Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant Physiol*, 130:442-456.
- Shimizu-Sato, S., Huq, E., Tepperman, J.M., Quail, P.H.** (2002) A light-switchable promoter system. *Nat. Biotechnol.*, 20:1041-1044.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., Furuya, M.** (1996) Action spectra for phytochrome A and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8129-8133.
- Somers, D.E., Devlin, P.F., Kay, S.A.** (1998) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 282:1488-1490
- Somers, D.E.** (1999) The physiology and molecular bases of the plant circadian clock plant *Plant Phys.*, 121:9–19.
- Song, P-S.** (1999) Inter-Domain Signal Transmission within the Phytochromes. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 32:215-225.
- Stapleton, A.E.** (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell*, 4: 1353-1358.

- Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R., Liscum, E.** (2001) The enhancement of phototropin-induced phototropic curvature in *Arabidopsis* occurs via a photoreversible phytochrome A-dependent modulation of auxin responsiveness. *Plant Physiol.* 126:826–834.
- Suesslin, C., Frohnmeyer, H.** (2003) An *Arabidopsis* mutant defective in UV-B light-mediated responses. *Plant J.*, 33:591-601.
- Sullivan, J.A., Deng, X.-W.,** (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev. Biol.*, 260:289-297.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Bäurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schäfer, E. Harter, K.** (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, 294, 1108–1111.
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X. Quail, P.H.** (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 9437–9442.
- Thain, S.C., Murtas, G., Lynn, J.R., McGrath, R.B., Millar, A.J.** (2002) The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant Physiol*, 130: 102-110.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Quail, P.H.** (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*, 15:1749–1770.
- Tóth, R., Kevei, É., Hall, A., Millar, A., Nagy, F., Kozma-Bognár, L.** (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 127:1607-1616.
- Ulm, R., Baumann, A., Oravec, A., Máté, Z., Ádám, É., Oakeley, E.J., Schäfer, E., Nagy, F.,** (2004) Genome-wide analysis of gene expression changes in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (In press)

- Vierstra, R.D.** (1994) Phytochrome degradation. In Kendrick, R.E., Kronenberg, G.H.M. (eds) *Photomorphogenesis in Plants* 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 141-162.
- Wagner, D., Fairchild, C.D., Kuhn, R.M., Quail, P.H.** (1996) Chromophore-bearing NH₂-terminal domains of phytochrome A and B determine their photosensory specificity and differential light lability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4011-4015.
- Wang, H., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y., Deng, X.-W.** (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 294:154–158.
- Wang H., Deng X.-W.** (2003) Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci.*, 8:172-178.
- Wang, Z.Y., Tobin, E.M.** (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, 93:1207-1217.
- Wei, N., Deng, X.-W.** (1996) The role of COP/DET/FUS genes in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol.*, 112:871-878.
- Wester, L., Somers, D.E., Clack, T., Sharrock, R.A.** (1994) Transgenic complementation of the *hy3* phytochrome B mutation and response to PHYB gene copy number in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 5:261-272.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S., Harberd, N.P.**, (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell*, 5: 757–768.
- Williams, J.A., Sehgal, A.** (2001) Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. *Annu. Rev. Physiol.*, 63:729-755.

- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S.A., Nagatani, A.** (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome B–GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol.*, 145:437-445.
- Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimori, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Takeshi Mizuno, T.** (2003) A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Phys.*, 44:619-629.
- Yang, H.Q., Wu, Y.J., Tang, R.H., Liu, D., Liu, Y., Cashmore, A.R.** (2000) The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell*, 103:815-827.
- Yang, H.Q., Tang, R.H., Cashmore, A.R.** (2001) The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell*, 13:2573–2587.
- Yanovsky, M.J., Luppi, J.P., Kirchenbauer, D., Ogorodnikova, O.B., Sineshchekov, V.A., Adam, E., Kircher, S., Staneloni, R.J., Schafer, E., Nagy, F., Casal, J.J.** (2002) Missense mutation in the PAS2 domain of phytochrome A impairs subnuclear localization and a subset of responses. *Plant Cell*, 14:1591-1603.
- Yeh, K.-C., Wu, S.-H., Murphy, J.T., Lagarias, J.C.** (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*, 277:1505-1508.
- Yeh, K.-C., Lagarias, J.C.** (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13976-13981.
- Young, M.W., Kay, S.A.** (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.*, 2:702–715.
- Zhu, Y., Tepperman, J.M., Fairchild, C.D., Quail, P.H.** (2000) Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:134196-13424.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban bemutatott kísérletek nagy részét a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetében, a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjaként végeztem el. Köszönettel tartozom téma- és csoportvezetőmnek, Dr. Nagy Ferencnek jelentős anyagi és szellemi támogatásáért, amellyel mindvégig segítette munkámat. Köszönöm Dr. Dudits Dénes főigazgató és Dr. Vass Imre igazgató uraknak, hogy munkámat lehetővé tették.

Köszönöm továbbá Dr. Eberhard Schäfernek (Universität Freiburg, Németország), hogy kísérleteim egy részét laboratóriumában végezhettem. Ebben Dr. Stefan Kircher és Diana Bauer nyújtott pótolhatatlan segítséget.

Köszönettel tartozom a Foto- és Kronobiológiai csoport minden tagjának a munkám során nyújtott minden segítségért. Külön köszönöm Dr. Kozma-Bognár Lászlónak a tartalmas megbeszéléseket és dolgozatom megírását segítő tanácsait. Köszönöm Dr. Ádám Évának, Dr. Fejes Erzsébetnek, Kevei Évának és Gyula Péternek a doktori értekezésem írásakor adott építő jellegű és kritikus megjegyzéseket, Dr. Hideg Évának, hogy megismertetett a Sigmaplot nevű szoftver használatával. Köszönet illeti továbbá laboratóriumunk asszisztenseit, Sándor Györgyit, Jószai Katalint és Nagy Rózsát a kísérletek előkészületeiben nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek és családomnak a munkámat végig kísérő türelmet és a biztatást.