

Ph.D. értekezés tézisei

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

**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

## BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK

A fény kettős szerepet játszik a növények életében: egyrészt a fotoszintézis gépezetét hajtó energiaforrás, másrészt a környezet állapotáról információt hordozó 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 fiziológiai folyamatok a csírázás, a csíranövények fényfüggő fejlődése, az árnyékelkerülés, a fototropizmus, a szintestek mozgása, a gázcserenyílás nyitásának szabályozása és a nappalok hosszának érzékelése.

Bár a fény, mint jel a növény egész életére hatással van, hatása akkor a legfeltűnőbb, ha egy faj két egyforma korú, sötétben vagy fényen nőtt csíranövényének felépítését hasonlítjuk össze. A sötétben nőtt (ún. etiolált) 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 (ún. de-etiolált) 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. 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.

A fény érzékelésének receptorait az érzékelt fény hullámhossza alapján rendszerezzük (1. táblázat).

## 1. táblázat Az *Arabidopsis* fotoreceptorai

Az érzékelt fény hullámhossza/Receptor	Funkció
<b>UV-B:</b> 280-320 nm A receptor(ok) ismeretlen(ek)	génexpresszió kiváltása
<b>UV-A/Kék:</b> 320-470 nm Kriptokrómok: CRY1, CRY2 Fototropinok: PHOT1, PHOT2	de-etioláció, cirkadián óra beállítása, virágzásindukció fototropizmus, kloroplaszt mozgások, gázcsere nyitás szabályozása
<b>Vörös/Távoli-vörös:</b> 620-750 nm Fitokrómok : PHYA PHYB PHYC PHYD PHYE	csírázás, de-etioláció, árnyékelkerülés, virágzásindukció, cirkadián óra beállítása

A fitokrómok (*PHY*) a vörös és távoli-vörös fény érzékeléséért felelős fotoreceptorok. Hozzávetőlegesen 125 kDa-os monomerekből álló homodimerek formájában funkcionálisak, amelyek mindegyikéhez kovalens kötással lineáris tetrapirrol kromofór kötődik. *Arabidopsis*-ban öt fitokróm gén ismert: *PHYA*, *B*, *C*, *D*, *E*, amelyek egymáshoz igen magas fokú homológiát mutatnak. A fény hatására gyorsan lebomló *phyA* az etiolált növények domináns fitokrómja, amely a nagyon alacsony intenzitású vörös és a távoli-vörös fény által kiváltott válaszok közvetítéséért felel. A *phyB*, *C*, *D*, *E* fény-stabil molekulák, amelyek az alacsony és magas intenzitású vörös fény receptorai. A de-etiolált csíranövények és a felnőtt növények domináns fitokrómja a *phyB*.

A fitokrómok az ún. Pr formában szintetizálódnak. Ez az inaktív forma vörös fény hatására Pfr formává alakul, amely a fitokrómok aktív konformerje és a jelátviteli utak kiindulópontja. Távoli-vörös sugárzás a Pfr→Pr konverziót váltja ki. A Pr↔Pfr átalakulás sohasem érinti a rendelkezésre álló fitokróm mennyiség 100%-át: a fennálló fényviszonyok által kialakított Pr/Pfr arány az élettani válasz természetét határozza meg.

Az elmúlt évek kutatásai kiderítették, hogy a fitokrómok sejten belüli lokalizációjának élettani szerepe van: az *Arabidopsis* minden típusú fitokrómja megvilágítás hatására (Pfr formában) a sejtmagba importálódik és a fény hullámhosszától és intenzitásától függő módon

sejtmagi foltokat formál. Valószínű, hogy ezek a mikroszkópban látható foltok molekulakomplexek. A vélemények megoszlanak ezeknek a komplexeknek a funkciójáról. Egyes szerzők szerint a fitokróm lebontás szinterei, de azok a megfigyelések, amelyek szerint a fitokrómok csak Pfr formában formálnak ilyen komplexeket, továbbá a jelátvitelben sérült mutánsok a sejtmagi importjuk ellenére sem tömörülnek komplexekbe, ellentmondanak ennek.

Napjainkra az is nyilvánvalóvá vált, hogy a fotoreceptorok bonyolult jelátviteli hálózatok kiindulópontjai, amelyek működése változásokat eredményez bizonyos gének kifejeződési mintázatában. A fotobiológiai kutatások legintenzívebben vizsgált területe a fényspecifikus jelátvitel. Ennek a folyamatnak a bonyolultságát jelzi, hogy a benne közreműködő komponensek listája hónapról-hónapra bővül. Ez a kutatómunka jelenleg két fő szálon fut:

A genetikai alapú megközelítéssel olyan mutánsokat azonosítottak, amelyekben a fitokróm-válaszok sérültek. 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. Azonosítottak egy, a fotomorfogénikus fejlődésre pozitív hatású transzkripciós faktort, a HY5-öt (long hypocotyl 5) is.

**(II)** A mutáns növények másik csoportjába azok tartoznak, amelyek fény hiányában is detiolált fenotípusúak. Ezek a csíranövények tehát úgy néznek ki, mintha állandóan fényben nőnének. A bennük mutációt szenvedett gének olyan fehérjéket kódolnak, amelyek sötétben megakadályozzák a növények fotomorfogénikus fejlődését, így fenntartják a skotomorfogenezist. Az azonosított mutánsok közül a COP1 (constitutive photomorphogenesis 1) 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. Megfigyelték, hogy a COP1 fehérjék közvetlen kölcsönhatása a HY5 fehérjékkel a HY5 molekulák ubiquitinációját eredményezi. Ezen mechanizmus révén történik meg a

fotomorfogenezis egyik központi szerepű pozitív faktorának COP1-függő lebontása sötétben, amely folyamat a szkotomorfogénikus fejlődés döntő fontosságú lépése.

A molekuláris biológiai megközelítések lényege, hogy élesztő két-hibrid rendszer felhasználásával fitokrómokkal kölcsönható fehérjéket keresnek, remélve, hogy így a jelátvitel korai szakaszára derülhet fény. Ezzel a módszerrel azonosították a PIF3 (phytochrome interacting factor 3) nevű, fitokrómmal kölcsönhatásba lépő fehérjét. A PIF3 524 aminosavból áll és kettő jól körülhatárolható régiót tartalmaz. A legerősebb hasonlóságot már ismert fehérjékkel a bHLH (basic helix-loop-helix) motívum 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 szekveneciaelemzések szerint, 162 tagja ismert. A bHLH doménnel átfedésben található egy klasszikus felépítésű, két részből álló (ún. „bipartite”) NLS. Ez a nukleáris lokalizációs szignál a felelős a PIF3 sejtmagba történő importjáért.

A PIF3 protein tulajdonságait *in vitro* kötési kísérletekben és élesztő két-hibrid rendszerben vizsgálták. A PIF3 kölcsönhatásba lép a phyA, és nagyobb erősséggel a phyB molekulákkal, specifikusan kötődve a fitokrómok Pfr formájához. Azt is megfigyelték, hogy a PIF3 a vad típusú fitokrómokkal erősebb kapcsolatot alakít ki, mint funkciójukban sérült mutáns fitokrómokkal. A PIF3 a –legtöbb bHLH típusú transzkripciós faktorhoz hasonlóan – képes a DNS kötésére: specifikusan a fényindukálható gének nagy részének promóterében található G-boxhoz kötődik. Azt is kimutatták, hogy a PIF3 *in vitro* együttesen kötődik a G-boxhoz és a phyB Pfr formájához.

A bHLH domént tartalmazó transzkripciós faktorok dimerek formájában funkcionálisak és heterodimereket formálhatnak más, hasonló szerkezetű faktorokkal. A PIF3 heterodimerek formálására képes a PIF4, HFR1 (long hypocotyl in far-red 1) és PIL1 (PIF3 like 1) bHLH típusú faktorokkal.

Ezek az adatok gyökeresen megváltoztatták elképzeléseinket a fitokrómoktól kiinduló jelátviteli utak felépítéséről. A fény-jel a fény által szabályzott gén promóterét nem egy hosszú sokkomponensű jelátviteli lánc végén, hanem egyetlen lépésben éri el: az élettanilag aktív formájú fitokróm kölcsönhatásba kerül a PIF3 transzkripciós faktoral, ez a komplex a gének promóterében található G-boxhoz kapcsolódva megváltoztatja a transzkripciójukat. A PIF3-phyB komplex specificitását a PIF3 heterodimerizációja más bHLH faktorokkal módosíthatja, lehetővé téve a rendszer finomhangolását.

Az *in vitro* adatokat alátámasztották a megváltozott *PIF3* mRNS szintű növények vizsgálatával nyert fenotípus adatok: a *PIF3*-mat a fényindukált hipokotilhossz megnyúlás gátlásának pozitív hatású faktoraként jellemezték. A *poc1* (photocurrent 1) T-DNS inszerciós mutáns, amely emelt *PIF3* mRNS szinttel rendelkezik, vizsgálata is alátámasztotta ezt a megállapítást. Bizonyított, hogy vannak olyan, a promóterükben G-box motívumot tartalmazó gének, amelyek fényindukált kifejeződéséhez szükséges a *PIF3*. Kiemelkedik közülük a *CCA1* (circadian clock associated 1) és az *LHY* (late elongated hypocotyl), melyek a növényi cirkadián óra működésében játszanak szerepet. A cirkadián óra az élő szervezetek endogén és autonóm molekuláris időmérő mechanizmusa. A központi oszcillátor negatív visszacsatoló körök segítségével hozzávetőlegesen 24 órás ritmust generál, így szabályozva az óra kimeneti oldalát. A rendszer bemeneti oldalán keresztül a cirkadián óra fénnel történő beállítása a fotoreceptorok közreműködésével történik meg. Mivel a *CCA1*-et és az *LHY*-t a központi oszcillátor részének tekintik, a *PIF3*-phyB komplex kapcsolódása a promóterükhöz a cirkadián óra fény inputjának kulcsfontosságú eleme lehet.

## CÉLKITŰZÉSEK

Mivel munkánk megkezdéséig a *PIF3*-ról közölt adatok döntő többségéhez *in vitro* kísérletek révén jutottak hozzá, ezért vizsgálatainkat *in vivo* rendszerben akartuk elvégezni. Az alábbi főbb célokat tűztük magunk elé:

1. A teljes hosszúságú *PIF3* fehérje és a *PIF3*-GFP fúziós fehérje kifejeztetése transzgénikus 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.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Molekuláris klónozási technikák,
- Transzgénikus *Arabidopsis thaliana* növények előállítása és nevelése steril és üvegházi körülmények között,
- Növényi össz-RNS tisztítás,
- RNáz protekciós analízis,
- Növényi össz-fehérje tisztítás és Western blot analízis,
- Fénykezelések különböző hullámhosszú és intenzitású fényvel és hipokotilhossz mérés,
- Fény, fluoreszcens és konfokális mikroszkópia,
- *In vivo* luciferáz enzimaktivitás meghatározás CCD kamerával és automatizált luminométerrel

## EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

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 létrehozunk, amelyek a (35S)<sub>2x</sub> 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)<sub>2x</sub> 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 transzgenikus 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 fényvel 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) megismételtethető. 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* allélok vizsgálata arra enged következtetni, hogy a COP1 szerepe a PIF3 felhalmozódásában független a konstitutív fotomorfofenikus 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)<sub>2x</sub> 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.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozathoz felhasznált publikációt aláhúzás jelöli.

Bauer, D.,<sup>#</sup> Viczián, A.<sup>#</sup>, 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*)

<sup>#</sup> 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., Schäfer, 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.