

**Ph.D. értekezés tézisei**

**A FITOKRÓM B FOTORECEPTOR SZEREPE A NÖVÉNYI  
CIRKADIÁN ÓRA ÉS RITMUSOK SZABÁLYOZÁSÁBAN**

**Palágyi Andrea**

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

**Biológia Doktori Iskola, SZTE TTIK  
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**2011**

**Szeged**

**A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI**

Az eukarióta cirkadián órák magját az ún. óragének és az általuk kódolt órafehérjék alkotják, amelyek összekapcsolódó genetikai hálózatokat alkotva szabályozzák önmaguk és egymás kifejeződését. E reguláció eredményeképp alakul ki a kb. 24 h periódussal (cirkadián: *circa dien* = kb. egy nap) rendelkező oszcilláció elsődlegesen az egyes órákomponensek mennyiségében. A ritmikus jel megfelelő átviteli rendszereken keresztül számos életfolyamat számára kölcsönöz napi ritmicitást. Az óra működése révén a különböző folyamatokat arra a napszakra időzíti, mikor azokra a leginkább szükség van. Kísérleti eredmények bizonyítják, hogy az óra által biztosított időbeli szervezettség elromlása jelentősen visszaveti az élőlények, így a növények fejlődését is. A precíz időzítés érdekében az órának a környezettel (külső idő) összhangban kell működnie. A szinkronizációt a napi periodicitást mutató környezeti jelek segítik, amelyek közül a leghatékonyabb a fény (nappalok-éjszakák váltakozása). A fényt speciális fotoreceptorok abszorbeálják, majd a jeleket az órákomponensekhez továbbítják, amelyek megváltoztatása révén az óra beállítása megtörténik.

A növényi (*Arabidopsis thaliana*) cirkadián oszcillátor három, egymással összefüggő, negatív visszacsatoláson alapuló szabályozó körből (hurokból) áll. Az első, ún. központi körben a reggel kifejeződő CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)/LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) transzkripció faktorok gátolják a *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)* gén kifejeződését, míg az este kifejeződő TOC1 pozitívan szabályozza a CCA1/LHY transzkripcióját. A második, ún. esti körben a GIGANTEA (GI) fehérje serkenti a *TOC1* gén kifejeződését a délután és az este folyamán, amíg a TOC1 fehérje gátolja a *GI* gén működését az éjszaka során. A harmadik, ún. reggeli körben a CCA1/LHY fehérje pozitívan szabályozza a *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7/9 (PRR7/9)* gének kifejeződését a reggeli órákban, a PRR7/9 fehérjék viszont gátolják a *CCA1/LHY* gének kifejeződését a nappal folyamán. A három hurok összehangolt működése szükséges a 24 órás alap oszcilláció létrejöttéhez.

Az órát szabályozó fény jeleket a kék fényt elnyelő kriptokróm (CRY) és a vörös/távoli-vörös fényt abszorbeáló fitokróm (PHY) fotoreceptor családok tagjai közvetítik. Az *Arabidopsis* fitokróm fotoreceptor család öt tagból áll (PHYA-E), melyek molekuláris kapcsolóként működnek. Sötétben, a fitokróмок a vörös fény ( $\lambda_{\max} = 660$  nm) megkötésére képes, inaktív  $P_r$  formában vannak jelen a citoplazmában. Miután a receptorhoz kovalensen kötött tetrapirrol kromofór fényt abszorbeál, a fitokróмок átalakulnak a távoli vörös fény megkötésére képes, aktív  $P_{fr}$  konformációjává, amelyek elindítják a jelátvitel kezdeti eseményeit. Az aktív  $P_{fr}$  forma inaktív  $P_r$  formává alakul a távoli vörös fény ( $\lambda_{\max} = 730$  nm) elnyelése után. A  $P_{fr}$  formák a sejtmagba vándorolnak, ahol jellegzetes sejtmagi testeket. A sejtmagi testek valódi felépítése és működése még nem ismert, de valószínűleg egy összetett-fehérje komplexeknek felenek meg, ahol a fitokróмок kölcsönhatásba lépnek olyan transzkripciós faktorokkal és egyéb fehérjékkel, amelyek közvetlenül szabályozzák a fényindukálható gének kifejeződését.

Megfelelő mutánsok segítségével igazolták a PHYA, B, D és E receptorok szerepét a vörös fény jelek órához történő továbbításában. A fitokróмок által szabályozott jelátvitel érinti egyes órakomponensek transzkripcióját, mRNS és fehérje stabilitását, de a molekuláris mechanizmus, amelynek révén ezek a változások megváltoztatják az óra működését, még nem ismert. A jelenség oldaláról viszont részletes eredmények bizonyítják, hogy a fitokróмок által közvetített folyamatos vörös fényjelek a fényintenzitás emelkedésével rövidítik az óra periódushosszát (parametrikus beállítás), továbbá, hogy vörös fényimpulzusok az óra és a cirkadián ritmusok fáziseltolódásához vezetnek (nem-parametrikus beállítás). A PHYB szerepét mindkét folyamatban bizonyították. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy valamennyi kísérletben kimeneti gének ritmikus kifejeződését mérték és ebből következettek az óra aktuális periódusára és fázisára. Az óragének szintjén még nem vizsgálták a PHYB-függő beállítás molekuláris történéseit.

A fitokróмок közül a PHYB receptort azonosították elsőként jellegzetes fotomorfogenikus fenotípusú hiánymutánsai segítségével. A *phyB* mutánsokra hosszú

hipokotil, a hipokotil-kampó kiegyenesedésének hiánya és a csökkent sziklevél-expanszió jellemző vörös fényben. A PHYB fotomorfogenikus funkcióját szabályozó fehérjékkel kölcsönhatva látja el.

A PIF1, 3, 4 és 5 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS 1, 3, 4, 5) fehérjék a fitokróмок fényfüggő jelátvitelében fontos szerepet játszó transzkripciós faktor család tagjai. Szerepük a fényindukálható gének gátlása sötétben. A PHYB  $P_{fr}$  formájának fizikai kölcsönhatása a PIF faktorokkal e transzkripciós faktorok gyors lebomlásához így a fényellenőrzött gének de-repressziójához vezet. Egy másik szabályozó fehérje, amely a kölcsönhatásba lép a fitokróмокkal a sejtmagban, a COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1). A COP1 egy E3 ubiquitin ligáz, amely serkenti az ún. "master" transzkripciós faktorok (LONG HYPOCOTYL 5 (HY5), HY5 HOMOLOG (HYH), LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1 (LAF1) és LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1 (HFR1)) sötétben történő lebomlását, ezáltal negatívan szabályozva a fényérzékeny géneket. A PHYB elősegíti a COP1 inaktiválását a sejtmagban, ami a pozitív transzkripciós faktorok akkumulációjához, majd a fényindukálható gének átírásához vezet.

A virágzás kezdete egy összetett fejlődési folyamat *Arabidopsis*ban, mely részben a ritmikusan kifejeződő transzkripciós aktivátor, CONSTANS (CO) fehérje szabályozása alatt áll. Induktív körülmények között, a CO protein képes aktiválni az *FLOWERING LOCUS T (FT)* gént, amely a virágzás folyamatának elindításához vezet. A PHYA és CRY2 által közvetített fényjelek stabilizálják a CO fehérjét az esti időszakban, amikor azok a legmagasabb szinten fejeződnek ki. Ellenben, a PHYB által továbbított fényjelek destabilizálják a CO proteint a reggel folyamán. Ez eredményezi, hogy a *phyB* mutánsokra a korai virágzás jellemző az eddig tesztelt valamennyi fényviszony alkalmazása mellett.

A fitokróмок jellegzetes domén szerkezete és a *phy* mutánsoknál tapasztalható megváltozott fényérzékelő és jelátviteli képességek vizsgálataiból arra következettek, hogy az N-terminális domén felelős a fényelnyelésért, a C-terminális domén pedig a jelátviteli lépések aktiválásában vesz részt. Kimutatták,

hogy a PHYB receptor N-terminális doménjének 651 és 450 aminosavat tartalmazó fragmentjei egy dimerizációs doménnel összekapcsolva egy olyan fúziós fehérjét alkotnak, amely biológiailag aktív volt a fotomorfogenezis szabályozásában. Beszámoltak arról is, hogy a PHYB N-terminálisának 450 aminosavat tartalmazó fragmentje inaktív a virágzás szabályozása szempontjából. Ezzel szemben a PHYB cirkadián funkciójáról rendkívül hiányos ismeretekkel rendelkezünk

## CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk egyik fő érdeklődési területe a növényi cirkadián óra és fitokróm fotoreceptorok által szabályozott jelátviteli láncok kölcsönhatása lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) modell-növényben. A dolgozatban bemutatásra kerülő kísérletek során arról a folyamatról kívántunk új vagy alaposabb ismereteket nyerni, amelynek révén a vörös fényt elnyelő fitokróm B (PHYB) receptor által közvetített fény-jelek befolyásolják a cirkadián óra működését. Munkánk során az alábbi fontosabb célokat tartottuk szem előtt:

1. A luciferáz riporter-rendszer, ill. mRNS szintek mérésével és a *phyB-9* funkcióvesztéses mutáns alkalmazásával meghatározzuk, hogy milyen hatással van a PHYB által szabályozott jelátviteli út az óra működésére (kimeneti ritmusok periódushosszának és fázisának mérése), illetve az órát felépítő óragének kifejeződésének ritmikus paramétereire (periódushossz, fázis) monokromatikus vörös vagy fehér fényben. Ezen kísérletek eredményeképp fontos új információkat nyerünk az óra beállításának molekuláris mechanizmusáról.

2. A PHYB, mint fotoreceptor, az óra beállításán kívül fontos szerepet játszik a fotomorfogenezis és a virágzási idő szabályozásában is. A kísérletek során főként azt teszteljük, hogy ezek a különböző funkciók vajon a PHYB molekula különböző részeihez kapcsolódnak-e, vagy az általános jel a PHYB molekula egy kitüntetett doménjén hagyja el a receptort és későbbi lépések során oszlik több ágra. Ennek

érdekében csonka PHYB változatokat fejeztünk ki a *phyB-9* mutáns háttérben és megvizsgáljuk, hogy ezek mennyiben képesek helyreállítani a mutáns cirkadián, fotomorfogénikus és virágzás-idő fenotípusát.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- *Arabidopsis thaliana* növények nevelése steril és üvegházi körülmények között
- Molekuláris klónozási technikák
- Növényi genomiális DNS tisztítás
- Növényi össz-RNS tisztítás
- kvantitatív valós idejű PCR
- Western-blot analízis
- Transzgenikus növények előállítása
- Fény, fluoreszcens és konfokális mikroszkópia
- *In vivo* luciferáz enzimaktivitás-meghatározás

## AZ ELÉRT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A dolgozatban bemutatott munka fő célja a fitokróm B (PHYB) fotoreceptor cirkadián óra beállításában betöltött szerepének mélyebb megértése volt. A kérdéskört két irányból közelítettük meg. Egyrészt megvizsgáltuk, hogy a PHYB hiánya (a *phyB-9* mutánsban) milyen hatással van az órára, azon belül az órát felépítő szabályozó körök működésére és az egyes óragének ritmikus kifejeződésére különböző fényviszonyok mellett. Másrészt különböző N-terminális csonkolt PHYB fragmentumokat fejeztünk ki a *phyB-9* háttérben, amelyek segítségével kiderítettük, hogy a PHYB receptor mely doménjei hordozzák azt a funkciót, amely szükséges az elnyelt fényjelek továbbításához az óra irányába. A PHYB deléciós sorozat vizsgálata ezen túlmenően fontos új információkat szolgáltatott a receptor fotomorfogenezist és virágzási időt

szabályozó szerepéről is. Fontosabb eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

1. Konstrukciókat készítettünk az óragének promótereinek és a luciferáz (LUC+) riportergén felhasználásával. A konstrukciókat (*CCA1:LUC+*, *TOC1:LUC+*, *GI:LUC+*, *PRR9:LUC+*) vad típusú (Col-0) és *phyB-9* növényekbe juttattuk, majd a transzgenikus növényeket különböző intenzitású folyamatos vörös fényben tartva vizsgáltuk meg ezek kifejeződésének szabadonfutó periódushosszát és cirkadián fázisát. Az óragének általában hosszú periódust mutattak a vizsgált fényintenzitásoknál a *phyB-9* növényekben a vad típusú kontrollhoz képest, de az eredmények precíz elemzése után egyértelművé vált, hogy valójában két csoportra oszthatjuk ezeket a géneket. A *CCA1:LUC+* és a *PRR9:LUC+* valamennyi vizsgált fényintenzitásnál hosszabb periódust (kb. 1 óra különbséget) mutatott a *phyB-9* növények esetében a Col-0 növényekhez viszonyítva. Ellenben, a *TOC1:LUC+* és a *GI:LUC+* esetében kisebb, de szignifikáns különbség (kb. 0.5 óra) mutatkozott a periódushossz változásnál a mutáns és vad típusú növényeket összehasonlítva közepes fényintenzitások mellett. Meglepő módon, ez a két marker a mutáns háttérben nem mutatott jelentős periódusváltozást alacsony vagy magas intenzitású vörös fényben. A *CCA1* és *PRR9* gének az ún. reggeli, míg a *GI* és *TOC1* az ún. esti szabályozó kör komponensei. Adataink alapján a *phyB-9* mutánsban bizonyos fényviszonyok mellett a reggeli és az esti szabályozó kör oszcillációja (amit a körököt alkotó gének kifejeződésének periódushosszával jellemezhetünk) eltérő sebességet mutat. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PHYB különböző minőségű és/vagy erősségű bemeneti jelet továbbítja a növényi cirkadián óra központi oszcillátorának reggeli (*CCA1*, *PRR9*) ill. esti (*TOC1*, *GI*) szabályozó köreihez az alkalmazott fényintenzitásoktól függően, amelyek végső soron a két szabályozó kör szétkapcsolódásához vezethetnek.

2. A fentiekben említett transzgenikus növények folyamatos fehér fényben történő vizsgálata szintén meglepő eredményeket adott. Fehér fényben a PHYB receptor a vörös komponens elnyelésében vesz részt és az ebből származó

jeleket továbbítja az órához. PHYB hiányában ezek a jelek nem jutnak el az oszcillátorhoz, ezért a vörös fényben kapott eredményekhez hasonlóan azt vártuk, hogy a *phyB-9* növények hosszabb periódust mutatnak a vad típusú kontrollhoz képest. Ezzel szemben a vizsgált gének (pontosabban promoter:LUC+ konstrukciók) többsége egyértelmű rövid periódust mutatott. Az általunk használt fehér fény a vörös mellett jelentős kék komponens is tartalmazott, viszont ismert, hogy a PHYB nem képes a kék fény elnyelésére. Ezért eredményeink legvalószínűbb magyarázata az, hogy a vörös fényvel aktivált PHYB negatív hatással van az órá szabályozó kék fény jelátvitelre. A vörös és kék jelátviteli utak kölcsönhatására már korábbi eredmények is utaltak, de elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a PHYB fontos szerepet játszik ebben.

3. A komplementációs kísérletekhez olyan génkonstrukciókat készítettünk, amelyek a PHYB N-terminális szakaszának 651, 450 vagy 410 aminosav hosszúságú szakaszát, idegen dimerizációs és NLS vagy NES fehérjemotívumokat, valamint az YFP riporterfehérjét kódolták (B651-NLS, B450-NLS és B410-NLS, ill. B651-NES). A BFL konstrukció, amelyet kontrollként alkalmaztunk, a teljes hosszúságú PHYB fehérjét és az YFP proteint kódolta. A fúziós fehérjéket *phyB-9* háttérben fejeztettük ki a magas szintű és konstitutív expressziót biztosító CaMV 35S promoter irányítása alatt. Az elkészült transzgenikus vonalakban meghatároztuk a fúziós fehérjék kifejeződésének szintjét és a további vizsgálatokhoz olyan vonalakat válogattunk, amelyekben a transzgenének kifejeződése hasonló szintű volt. Fluoreszcens mikroszkópiával ellenőriztük a termeltetett fúziós fehérjék sejten belüli elhelyezkedését. Igazoltuk, hogy az NLS motívumot hordozó fehérjék a fényviszonyoktól függetlenül a sejtmagban, míg a NES-kapcsolt változat a citoplazmában fordul elő. A BFL fehérje az elvárt fényfüggő sejtmagi importot mutatta. Mindezek az adatok azt bizonyítják, hogy a további vizsgálatokat megfelelően elkészített transzgenikus növényi anyagon végeztük el.

4. Első lépésben megvizsgáltuk az oszcillátor működését a komplementáló vonalakban közepes intenzitású vörös fényben. Ennek érdekében a *CCA1* és a *TOC1* gének kifejeződésének ritmusát vizsgáltuk mRNS szinten vad típusú, *phyB-9* és különböző komplementáló vonalakban. Kimutattuk, hogy a BFL, B651-NLS és B450-NLS változatok helyreállították a vad típusnak megfelelő periódust, míg a B651-NES és B410-NLS növények a *phyB-9* mutánsokra jellemző hosszú periódust mutatták. Eredményeink arra utalnak, hogy a PHYB receptor N-terminális 450 aminosavat tartalmazó szakasza minden olyan funkciót hordoz, amely a vörös fényjelek továbbításához szükséges. Másrészt bizonyítottuk, hogy a PHYB cirkadián funkciója a receptor sejtmagi lokalizációját igényli.

5. Kimutattuk viszont, hogy egyik csonka PHYB verzió sem képes a *phyB-9* rövid periódusú fenotípusának helyreállítására folyamatos fehér fényben. Mivel a teljes hosszúságú BFL sikeresen komplementálta ezt a fenotípust, adataink arra utalnak, hogy a PHYB C-terminális szakasza szükséges ahhoz, hogy a vörös fényvel aktivált PHYB receptor hatással legyen az órát szabályozó kémiai jelátvitelre.

6. A *phyB-9* mutáns növények jellegzetes fenotípusokat mutatnak a fotomorfogenezis (hosszú hipokotil) és a virágzás (korai virágzás) szabályozását illetően is. Megvizsgáltuk, hogy az általunk készített csonka N-terminális PHYB verziók képesek-e helyreállítani ezeket a fenotípusokat. Kimutattuk, hogy a PHYB N-terminális 450 aminosavat tartalmazó szakasza elegendő ahhoz, hogy a receptor közvetítse a vörös fény gátló hatását a hipokotil megnyúlás tekintetében. Ezzel szemben a B450-NLS nem komplementálta a *phyB-9* mutánsok korai virágzását, míg a B651-NLS hatásos volt ebben a vonatkozásban. Ez arra utal, hogy a PHYB receptor 450. és 651. aminosav pozíciók közötti szakasza elengedhetetlen a virágzás szabályozásában. Mivel a B651-NES verzió nem mutatott hatást a vizsgált fenotípusokat illetően, megállapítottuk, hogy a cirkadián óra

szabályozásához hasonlóan a PHYB fotomorfogenezisben és a virágzás szabályozásában betöltött szerepe is a receptor sejtmagi lokalizációját igényli.

A B651-NES verzióhoz hasonlóan a B410-NLS is funkcionálisan inaktív volt valamennyi vizsgáltunk során. Igazoltuk, hogy míg a B651-NES inaktivitásának oka a fehérje kizárása a sejtmagból, addig a B410-NLS esetében a kromofór csoport nem kapcsolódik a csonka PHYB apoproteinhez, így az nem képes fény elnyelésére. Fényabszorpció hiányában nem alakul ki a fitokrómok biológiailag aktív  $P_{fr}$  konformációja, amely a további jelátvitel alapvető feltétele.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### A dolgozat anyagából megjelent publikáció:

**Palágyi, A.**, Terecskei, K., Ádám, É., Kevei, É., Kircher, S., Mérai, Zs., Schäfer, E., Nagy, F., Kozma-Bognár, L. (2010) Functional analysis of amino-terminal domains of the photoreceptor phytochrome B. *Plant Physiology* 153, 1834-1845

### Egyéb publikációk:

1. Palágyi, A., **Palágyi, A(ndrea)** (2007) GK Impala: új őszi zab fajta - 40 év után. *AgroNapló* 11. kötet, 10-11, 16
2. **Palágyi, A.**, Tóth, B., Mesterházy, Á. (2002) Examination of resistance of wheat cultivars against *Fusarium* infection. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 49, 418-419
3. Tóth, B., Téren, J., **Palágyi, A.**, Varga, J., Mesterházy, Á. (2002) Examination of the molecular variability of *Fusarium culmorum* isolates. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 49, 388-389
4. Varga, J., Kevei, É., **Palágyi, A.**, Tóth, B., Kozakiewicz, Z. (2000) Analysis of genetic variability within the *Petromyces* genus. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 83- 89
5. Téren, J., **Palágyi, A.**, Kevei, É., Varga, J. (1997) Isolation of variants of *Petromyces albertensis* with altered ochratoxin production. *Cereal Res. Commun.* 25, 305-306
6. Téren, J., **Palágyi, A.**, Varga, J. (1997) Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. *Cereal Res. Commun.* 25, 303-304
7. Varga, J., Kevei, É., **Palágyi, A.**, Téren, J. (1997) Genetic variability within the toxigenic *Petromyces* genus. *Cereal Res. Commun.* 25, 285-289

## Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, meghatározó szerepét a tézisekben foglalt tudományos eredményekhez elismerem, az eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Szeged, 2011. március 18.

**Terecskei Kata** .....

**Dr. Ádám Éva** .....

**Dr. Kevei Éva** .....

**Dr. Mérai Zsuzsanna** .....

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

**Dr. Kozma-Bognár László** .....