

**Az F047013 számú OTKA pályázat zárójelentése**  
**Növényi cirkadián óra-komponensek azonosítása és funkcionális**  
**jellemzése**

**Dr. Kozma-Bognár László**

**MTA SZBK Növénybiológiai Intézet**

## **ELŐZMÉNYEK**

A legkülönbözőbb élő szervezetekben megtalálható cirkadián óra egy olyan autonóm biokémiai mechanizmus, amely képes kb. 24 órás periódushosszú oszcillációk létrehozására és ennek révén különböző (molekuláris, élettani) életfolyamatok működésének ritmikus szabályozására. A cirkadián óra által megjelenített szubjektív idő a külső környezet valós (vagy objektív) idejének egyfajta leképezése, így a cirkadián óra előre jelzi a periódikus környezeti változásokat (pl. a napszakok váltakozását) és az általa szabályozott folyamatok megváltoztatásával mintegy felkészíti a gazdaszervezetet a várhatóan bekövetkező változásokra.

A cirkadián óra molekuláris óra, az oszcillátort különböző gének és azok géntermékei alkotják, amelyek bonyolult visszacsatolós rendszerben szabályozzák önmaguk és egymás kifejeződését/aktivitását. A növényi cirkadián rendszer elemei közül eddig csak néhány komponens sikerült azonosítani, de eddigi ismereteink nyilvánvalóan elégtelenek a rendszer működésének leírásához.

Munkánk célja, hogy a cirkadián regulációban sérült mutánsok azonosítása és jellemzése révén a növényi cirkadián rendszer új elemeit fedezzük fel, majd az egyes elemek közti funkcionális kölcsönhatások megismerésével a rendszer működéséről nyerjünk fontos új információkat. Az elmúlt években végzett genetikai szűrés eredményeként azonosítottunk 12 cirkadián óra mutánst *Arabidopsis thaliana*-ban, amelyek a vad típusú növényekben mérhetőtől eltérő periódushosszú ritmusokat mutattak (5 rövid és 7 hosszú periódusú mutáns). A pályázati támogatást a 12 mutáns részletes jellemzésére, a mutációt hordozó gének azonosítására, izolálására és funkcionális analízisére kértük.

## AZ ELÉRT EREDMÉNYEK

### Új mutáns allélek ismert óragénekben

Három rövid és négy hosszú periódusú mutánsról a genetikai térképezés és jellemzés kezdeti fázisában kiderült, hogy a mutációk már ismert óragéneket érintenek. A 3 rövid periódusú mutáns a *TOC1*, *ELF3* és *GI* gének, míg a 4 hosszú periódusú mutáns a *ZTL* gén új mutáns alléljeit reprezentálja.

A *TOC1* gén esetében a kódoló régió 5' végéhez közeli mutáció korai transláció-terminációt okoz. *TOC1* ellenanyag hiányában nem tudtuk ellenőrizni, hogy a prediktált csonka fehérje kifejeződik-e, de a fenotípus erőssége (aritmiába átmenő rövid periódus) arra utal, hogy az általunk izolált *toc1* allél (*toc1-10*) funkció veszteses mutánsnak tekinthető. A mutáns vonal jelentősége abban áll, hogy lehetőségünk nyílt olyan többszörös cirkadián null mutánsok létrehozására és vizsgálatára, amelyekből többek között a *TOC1* funkció is teljesen hiányzik. Erre korábban nem volt lehetőségünk, mivel az általunk használt *Arabidopsis* ökotípusban (Wassilevskija) még nem izoláltak *toc1* null mutánst.

Az *ELF3* génben azonosított mutáció aminosav cserét okoz a fehérje N terminális részén. Akárcsak az elsőként leírt *elf3* mutáns (*elf* = early flowering), valamennyi eddig ismert *elf3* allél hasonló fenotípusokat mutatott: korai virágzás, aritmia állandó fényben, a hipokotil megnyúlás gátlásának hypo-érzékenysége vörös fényre (az állandó fényben nevelt *elf3* mutáns növények hipokotilja jelentősen hosszabb, mint a vad típusú növényeké). Az általunk izolált *elf3* mutáns ezzel szemben extrém későn virágzik, állandó fényben nem aritmiás, hanem rövid periódushossz fenotípust mutat viszont hipokotil növekedése épp olyan kevésbé érzékeny vörös fényre, mint a korábban ismert *elf3* alléleké. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az *elf3* mutánsok virágzás fenotípusa nem a cirkadián rendszer defektjének következménye (mint az eddig elfogadott volt). A mutáns további részletes vizsgálatát Dr. Seth J. Davis (Max-Planck Institute, Köln) csoportjával együttműködésben végezzük.

A *GI* génben azonosított mutáció a transláció korai terminációját okozza. Mivel a mutáns fenotípusa gyakorlatilag megegyezik a *gi-11* (*gi* null mutáns a Wassilevskija ökotípusból) allél fenotípusával, további jellemzésére nem fordítottunk munkát és időt.

A ZTL fehérje a cirkadián ritmusok periódushosszának fontos regulátora. Molekuláris funkciója a TOC1 fehérje irányított degradációja az E3-ubiquitin ligáz / 26S proteozoma rendszeren keresztül. A fehérje 3 jól elkülöníthető doménből épül fel: PAS domén, a szubsztrát (TOC1) kötésért felelős; F-box domén, az E3 ligáz komplexhez való kapcsolódást teszi lehetővé; Kelch domén, amelynek pontos funkciója még ismeretlen, de valószínűleg fontos szerepet játszik a fehérje aktív térszerkezetének kialakításában és megtartásában. A szakirodalomban közölt *ztl* mutánsok mind a Kelch doménben hordozták a mutációt. Az általunk izolált allélek közül 3 szintén Kelch mutáns, egy viszont az F-box doménben sérült. A *ztl* allélek további vizsgálatát Prof. Andrew J. Millar (University of Edinburgh) csoportjával együttműködve folytatjuk. A Millar laboratórium szintén számos új *ztl* allélt izolált a közelmúltban, köztük egy PAS domén mutációt is. Ezek az allélek először nyújtottak lehetőséget a ZTL fehérje egyes doménjainak funkcionális vizsgálatára. Többek között kimutattuk, hogy a ZTL fehérjének a cirkadián rendszerben, ill. a fotomorfogenezis (fényfüggő egyedfejlődés) szabályozásában betöltött funkciója a fehérje különböző részeihez köthető.

### **Azonosításra váró új óragének**

Az RS24 (rövid periódus) és az RS59 mutációk (hosszú periódus) az V. kromoszóma felső karjára térképeződtek. Az előzetes szekvencia adatok tanúsága szerint a mutánsok nem az itt található PRR7 óragén új alléljeit reprezentálják. A finomtérképezés adatai szerint a mutációk két, egymással nem átfedő, egyenként mintegy 50 kbp (RS24) és 75 kbp (RS59) hosszúságú szakaszon helyezkednek el. Az RS2 (hosszú periódus) mutáció az V. kromoszóma alsó karjának mintegy 55 kbp hosszúságú szakaszára térképeződött. A régió nem tartalmaz ismert óragént. Mindhárom mutáns esetében megkezdtük a kijelölt régiók összehasonlító szekvenálását, amely három új óragén azonosításához vezet reményeink szerint.

A Tc450 mutáns térképezése során olyan problémák merültek fel, amelyek nem sikerült áthidalnunk. Az adatok alapján valószínű, hogy a Tc450 mutáció kölcsönhat az Arabidopsis Wassilevskija (Ws) és Columbia (Col) ökotípusok közti természetes periódushossz különbséget okozó faktorok valamelyikével. Ez pl. azt jelenti, hogy a térképezéshez használt szegregáló populációból (amely a Ws és Col ökotípusok keresztezésével jött létre) kiválasztott hosszú periódusú egyedek nem

mindig homozigóták a Tc450 mutációra. Mindez a térképezés olyan fokú hibáját okozza, hogy a Tc450 mutánssal végzett munkákat bizonytalan időre felfüggesztettük.

### **Azonosított új óragén: LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1 (LIP1)**

A legjelentősebb előrelépés a B6 munkanevű rövid periódusú mutáns jellemzése és a mutáció térképezése terén történt. A B6 mutáció a vizsgált cirkadián ritmusok (CAB2::LUC+, CCR2::LUC+, levélmozgás) periódushosszának rövidülését okozza mind folyamatos sötétben, mind folyamatos fényben. A folyamatos fény hullámhossza (kék, vörös, távoli vörös) nem befolyásolja a fenotípus erősségét, de magas intenzitású fényben a mutáns fenotípus nem figyelhető meg. A fény kettős szerepet játszik a cirkadián óra működésének szabályozásában. Egyrészt, a periodikusan ismétlődő fény/sötét ciklusok beállítják az oszcillátor fázisát, valamint szinkronizálják a különböző sejtekben működő oszcillátorokat. Másrészt, szabadon futó körülmények között a fény intenzitása hatással van a kialakuló periódushosszra. Növények esetében: minél magasabb intenzitású a besugárzó fény, annál rövidebb a szabadon futó periódushossz. Ha a különböző fényerősség mellett mért periódushossz értékeket ábrázoljuk a fényintenzitás logaritmusának függvényében az ún. "fluence rate curve"-t kapjuk (FRC). Az FRC lefutása a fény-bemeneti elemek megfelelő működésétől függ, így a jelenség lehetőséget nyújt az input és a központi oszcillátor-mutánsok megkülönböztetésére. Ha a mutáció központi elemet érint, a mutáns periódushossz minden fényintenzitás mellett azonos mértékben különbözik a vad típusútól (párhuzamos FRC-k). Ha a mutáció fény-bemeneti elemet érint a mutáns és a vad típusú FRC-k nem párhuzamosak, szöveget zárnak be.

Ha egy fény-bemeneti mutáns esetében a periódushossz fényintenzitás-függését monokromatikus fényben vesszük fel, meghatározhatjuk, hogy mely fotoreceptortól kiinduló jelátviteli út sérült specifikusan (vörös: PHYB,D,E, távoli-vörös: PHYA, kék: CRY).

A B6 mutáns részletes FRC analízise kimutatta, hogy a mutánsban valójában a cirkadián óra periódushossza egy alacsonyabb értéken rögzült (rövid periódus) és érzéketlenné vált a fényintenzitás változásaira. Ezért kapta a mutáns a *lip1* (*light insensitive period 1*) nevet. A mutáns periódushossza minden fényintenzitáción szinte egyforma és megegyezik a vad típusú növények erős fényben mérhető periódusával. Alacsony intenzitású fényben viszont a vad típusú növények periódusa jelentősen hosszabbodik, ami a rövid periódus fenotípus megjelenéséhez vezet a mutánsban. Ezt

megfigyelhetjük vörös, távoli-vörös és kék fényben is, ami az előzőekkel együtt értékelve arra utal, hogy a LIP1 fehérje a fény bemeneti oldal egy olyan negatív hatású eleme, amely a különböző fotoreceptoroktól érkező jelátviteli utak összefonódása után játszik szerepet a periódushossz fényfüggésének kialakításában. Ezek az eredmények azt is jelzik, hogy a LIP1 fehérjére valószínűleg nincs szükség erős fényben a korrekt periódushossz kialakításához..

A mutáció nem érinti az óra hőmérsékletkompenzációs képességét, a mutáns növények periódushossza minden vizsgált hőmérsékleten kb. 2 órával rövidebb a vad típusú növényekénél.

A különböző ismert óragének kifejeződésének vizsgálata a *lip1* mutánsban arra utalt, hogy a LIP1 fehérje a *GI (GIGANTEA)* gén kifejeződésének fontos pozitív regulátora. A *GI* gén fényindukálható, ezért a növényi óra jelenlegi modellje alapján a *GI* lehet az egyik órakomponens, amely révén a fény modulálhatja az oszcillátor sebességét (periódushosszt). Ugyanakkor a *lip1* fenotípusa nem magyarázható teljesen a *GI* csökkent szintű kifejeződésével, ezért további vizsgálatokra van szükség annak kiderítésére, hogy a jelenleg ismert óramechanizmus milyen egyéb pontjaihoz kapcsolható a LIP1 funkciója.

A mutáció fényfüggő egyedfejlődési folyamatokat (pl. sziklevel expanzió, antocián felhalmozódás) is befolyásol: a mutáns növények kevésbé érzékenyek a vörös fényre, mint a vad típusú növények. A LIP1 fehérje tehát kettős szerepet tölt be: résztvesz a cirkadián óra által irányított ritmusok periódushosszának kialakításában és a fotomorfogenezis szabályzásában.

A genetikai térképezés eredményeként a mutáció pozícióját egy 40 kbp hosszúságú szakaszra szűkítettük az 5. kromoszóma alsó karján. A szakasz összehasonlító szekvenálása során egy kb. 2 kbp hosszúságú deléciót fedeztünk fel a mutánsból származó DNS mintákban. A deléció egyetlen prediktált gént érint, amely egy atipikus kis GTP-kötő fehérjét kódol. A vad típusú gén genomikai klónját homozigóta *lip1* mutáns növényekben fejeztettük ki, ami sikeresen menekítette a recesszív *lip1* fenotípust. Ezáltal igazoltuk, hogy valóban a mutáns fenotípusért felelős gént azonosítottuk a térképezés során.

A feltételezett biokémiai funkció igazolására a LIP1 fehérjét bakteriális rendszerben kifejeztettük, majd *in vitro* enzimaktivitás meghatározás révén kimutattuk, hogy a predikciónak megfelelően képes GTP kötésére és hidrolízisére. A fehérjét „csaliként” alkalmazva egy élesztő két-hibrid screen-ben, sikerült olyan fehérjéket azonosítani,

amelyek kölcsönhatásba lépnek a LIP1-gyel. Ezek egyike egy olyan ismert GEF (guanine exchange factor) típusú fehérje, amely egy másik kis GTP-kötő fehérjéhez is kapcsolódik és a GDP/GTP cserét (regeneráció) segíti. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a LIP1 fehérje valóban kis GTP-kötő fehérjeként működhet a növényi sejtekben.

A *LIP1* gén konstitutívan fejeződik ki (promoter aktivitás, mRNS felhalmozódás), a napszaktól vagy a fényviszonyoktól függetlenül. A fehérje szintjének mérésére és sejten belüli lokalizációjának meghatározására transzgenikus növényeket állítottunk elő, amelyekben a LIP1-YFP (yellow fluorescent protein) fúziós fehérjét fejeztettük ki. Kimutattuk, hogy a LIP1 fehérje mennyisége sem mutat időbeli vagy fényfüggő változásokat. A LIP1-YFP fehérje a sejtmagban és a citoplazmában is detektálható volt fluoreszcens mikroszkópiával. Ez az eloszlás nem mutatott jelentős idő- vagy fényintenzitás-függést. A *lip1* mutáns jellegzetes fenotípusa arra utalt, hogy a LIP1 fehérje nem funkcionál erős fényben. A fenti adatok tanúsága szerint ez nem a LIP1 kifejeződésének, a LIP1 fehérje degradációjának vagy sejten belüli eloszlásának a változásával magyarázható.

Az eddig leírt növényi óraféhrjék strukturálisan és funkciójukat tekintve is igen sokfélék: MYB-domént hordozó transzkripciós faktorok, fehérje degradációban résztvevő „F-box” fehérje, „response-regulator” fehérjék, fény receptor fehérjék. A LIP1 az elsőként azonosított növényi GTP-kötő fehérje, amely szerepet játszik a fényfüggő jelátviteli folyamatokban és a cirkadián óra működésében.

### **Egyéb eredmények**

Az eredeti munkatervben szereplő feladatok MELLETT egy további projekt megvalósítására is felhasználtuk a 2005 évi támogatást. A PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) transzkripciós faktornak fontos szerepet tulajdonítottak a növényi cirkadián rendszer működésében más kutatócsoportok korábbi eredményei alapján. Ezek az eredmények PIF3 antiszenz (csökkentett PIF3 mRNS szint), ill. egy csonka PIF3 fehérjét túltermelő transzgenikus vonal analíziséből származtak. Kimutatták, hogy a fény-aktivált fitokróm B fotoreceptorral kölcsönható PIF3 fehérje kapcsolódik a CCA1 óragén promoteréhez és serkenti annak működését, így szerepet játszhat az ún. fény input folyamatokban. Kimutatták továbbá, hogy a PIF3 kölcsönhat a TOC1 óraféhrjével, amely fénytől függetlenül pozitívan szabályozza a CCA1 gén működését, így a PIF3 fontos lehet a központi oszcillátor

működésében is. Ezzel szemben csoportunk eredményei, amelyek egy PIF3 nullmutáns és a teljes hosszúságú PIF3 fehérjét túltermelő transzgenikus vonalak vizsgálatából származnak, igazolták, hogy a PIF3 nem játszik szerepet a növényi cirkadián rendszerben. Kimutattuk, hogy a PIF3 valójában nincs hatással a CCA1 gén kifejeződésére. Ennek megfelelnek funkcionális tesztjeink eredményei, amelyek szerint a PIF3 hiánya vagy túltermelése nem változtatja meg a óra fényérzékenységét (fény input), amit a cirkadián óra fázisának beállíthatóságával mértünk. Több különböző, cirkadián szabályozott gén (CAB2, CCR2, CCA1) kifejeződését megvizsgálva megállapítottuk, hogy a PIF3 hiánya vagy túltermelése nincs hatással a ritmusok periódushosszára, vagyis a központi oszcillátor működésére.