

**KIS GTP-KÖTŐ FEHÉRJE SZEREPE
A NÖVÉNYI CIRKADIÁN ÓRA, STRESSZ-VÁLASZOK
ÉS A FÉNYFÜGGŐ ENDOREDUPLIKÁCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Terecskei Kata

Témavezető: Dr. Kozma-Bognár László

Biológia Doktori Iskola, SZTE TTIK

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

2013

Szeged

BEVEZETÉS

24 órás gyakorisággal ismétlődő folyamatok szinte minden élőlényben megfigyelhetők. Ezek a periodikusan változó folyamatok állandó környezeti körülmények között is fennmaradnak napokig vagy akár hetekig, mivel egy belső ritmusgeneráló rendszer, a cirkadián óra fenntartja őket. A ritmus a környezetünkben tapasztalható nappal/éjjel ciklushoz környezeti jelek segítségével igazodik. A környezet fényviszonyaiban bekövetkező változásokat a növények fotoreceptorok segítségével érzékelik. A vörös/távoli vörös fényt érzékelő fitokrómok (PhyA–PhyE) és a kék fényt érzékelő kriptokrómok (CRY1 és CRY2) szabályozzák a látható fényre adott fiziológiai és fejlődési válaszok nagy részét. Ezek a fotoreceptorok fontos szerepet játszanak a cirkadián óra beállításában illetve a nap folyamán zajló fény/sötét ciklushoz való igazításában (Devlin és Kay, 2000).

Az óra összhangja a külső környezeti idővel adaptív előnyt jelent az élőlények számára, segítségével a metabolikus és fiziológiai folyamataikat megfelelően tudják időzíteni a nap folyamán. *Arabidopsis thaliana* növények esetében a megfelelően beállított cirkadián óra hozzájárul a klorofilltartalom növekedéséhez, a fotoszintetikus szén fixálás hatékonyabbá tételéhez, ezáltal a gyorsabb növekedéshez és nagyobb biomassza termeléséhez is. A vegetatív növekedés során az óra nemcsak a külső fényjelekre, hanem a hőmérsékletváltozásra és a stresszre adott válaszokat is szabályozza. A fény, hormonális és stressz szignalizációs folyamatokban résztvevő gének nagy része cirkadián szabályozás alatt áll (Covington és mtsai, 2008).

A növényi cirkadián óra három egymással összefüggő negatív visszacsatoláson alapuló szabályozó hurokból épül fel (McWatters és Devlin, 2011). A „központi hurkot” a *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*

(*CCA1*)/*LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* és *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)* gének alkotják (Alabadí és mtsai, 2001). A reggel kifejeződő *CCA1/LHY* transzkripciós faktorok gátolják a *TOC1* gén kifejeződését; és fordítva, az este kifejeződő *TOC1* pozitívan szabályozza a *CCA1/LHY* gének transzkripcióját. Az „esti hurkot” a *TOC1* és egy feltételezett *Y* faktor alkotja. Az *Y* funkcióját részben a *GIGANTEA* tölti be (Locke és mtsai, 2005; Zeilinger és mtsai, 2006). Az *Y* pozitívan szabályozza a *TOC1* gén kifejeződését, míg a *TOC1* gátolja az *Y* transzkripcióját, amit a *CCA1/LHY* szintén gátol. A *CCA1/LHY* transzkripciót a *TOC1* egy hipotetikus faktoron (*X*) keresztül serkenti. A „reggeli hurkot” a *CCA/LHY* és *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7/9 (PRR7/9)* építik fel (Makino és mtsai, 2000). A *CCA1/LHY* serkenti a *PRR7/9* gének kifejeződését reggel, a *PRR7/9* gátolja a *CCA1/LHY* kifejeződését a nap további részében.

A cirkadián óra szerepét a növekedés és fejlődés szabályozásában mi sem bizonyítja jobban annál, hogy milyen fontos szerepe van a napszakos változásoknak olyan hosszú távú folyamatokban, mint az egyes szervek fejlődése és a szezonális változások.

A cirkadián órának rendkívül fontos szerepe van a stressz-válaszok időbeli szervezésében. A fény ugyan elsődlegesen energiaforrás a növények számára, de a túl sok fény káros lehet a fényelnyelő rendszerekre és a DNS-re is. A fény által okozott károk csökkentése érdekében a növényekben már a napfelkelte előtt megkezdődik a fényvédő molekulák (fenilpropanoidok) képződéséért felelős enzimek génjeinek kifejeződése (Harmer és mtsai, 2000). Nappal a sok fény mellett a magas hőmérséklet és a szárazság, valamint a talajvízben oldott anyagok koncentrációja miatt a só és az ozmotikus stressz okozhat problémát. A gázcsere nyitódását, valamint ioncsatornák és pumpák génjeinek

kifejeződését is időzíti az óra ilyenkor. Éjszaka a hideg jelenti a legnagyobb gondot. Erre felkészülendő a növényekben a deszaturázok szintje kezd emelkedni már naplemente előtt, a membránok fagyállóképességét növelve. A növények a cirkadián óra kapuzási folyamata miatt nem azonos mértékben érzékenyek a hidegre és a melegre a nap során: kimutatták például, hogy a gyapot növény a hidegre a nap elején érzékenyebb, a melegre pedig a nap végén (Rikin és mtsai, 1993).

Az óra szerepe egy folyamaton belül is többszintű lehet. Kiváló példája ennek a virágzás fotoperiodikus szabályozása. Az óra szerepe a stressz válaszok és az anyagcsere szabályozásában, a csírázási képesség befolyásolásában, a növekedés és virágzás szabályozásában sokkal fontosabb lehet, mint korábban gondoltuk. Az óra által szabályozott folyamatok modellje egyre bonyolultabbá és komplexebbé válik, amint összegezni próbáljuk a külső környezeti jelekre adott párhuzamos válaszokat.

Munkánk során egy kis GTP-kötő fehérjét, a LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1-et (LIP1) vizsgáltuk. A LIP1 szerepet játszik a cirkadián óra és a fotomorfogenikus folyamatok szabályozásában, az endoreduplikáció befolyásolásában és bizonyos stressz folyamatokban is. A LIP1 negatív szerepet tölt be a cirkadián óra periódusának szabályozásában és fényintenzitás függő módon képes szabályozni azt. A mutánsban a kék és vörös fényre adott fotomorfogenikus válaszok is megváltoznak. A LIP1 szerepet játszik a vörös és kék fény általi hipokotil megnyúlás gátlásában, azonban a távoli-vörös fény által szabályozott folyamatban nincs szerepe. A *lip1* mutáns növények szik alatti szára rövidebb, mint a vad típusé olyan nagy intenzitású vörös és kék fényben is, ahol a cirkadián fenotípus már nem figyelhető meg. A LIP1 nagyfokú hasonlóságot mutat a kis GTP-kötő fehérjékkel (Vernoud és mtsai,

2003). A LIP1 fehérjében több olyan motívum is található, ami a klasszikus kis GTP-kötő fehérjékre nem jellemző és több konzervált aminosavban is eltéréseket mutat. A LIP1 a növényi kis GTP-ázok egy új és még nem teljesen jellemzett alcsaládjába tartozik. Jelenleg az egyetlen kis GTP-kötő fehérje, ami funkcionálisan kapcsolatba hozható a cirkadián óra szabályozásával. A cirkadián óra részletes tanulmányozása során egyre több órakomponensről és óra kapcsolt elemről derül ki, hogy pleiotróp funkciókkal rendelkeznek, és fontos szerepük van a sejtek legkülönbözőbb folyamatainak szabályozásában.

CÉLKITŰZÉSEK

A laboratóriumunkban azonosított LIP1 fehérje

- az első kis GTP-áz, ami kapcsolatba hozható a cirkadián órával,
- részt vesz a fotomorfogenikus folyamatok szabályozásában,
- valamint megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt.

A közelmúltban végzett vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a *lip1* mutáns növények érzékenyek só stresszre, valamint hogy sziklevelük bőrszöveti sejtjei rendellenes morfológiát mutatnak.

Munkánk során az alábbi kérdések megválaszolásához végeztünk kísérleteket,

- mely órakomponenseken keresztül szabályozza a LIP1 a cirkadián óra működését,
- mely fotoreceptorokon keresztül vesz részt a fotomorfogenezisben,
- mi a szerepe a stressz-válaszok kialakításában,
- mi okozza a bőrszöveti sejtek morfológiájának elváltozását, továbbá hogy

- a LIP1 sejten belüli elhelyezkedésének van-e szerepe ezen funkciók ellátásában.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Molekuláris klónozási technikák
- *Arabidopsis thaliana* növények nevelése steril és üvegházi körülmények között
- Transzgenikus növények előállítása
- *In vivo* luciferáz enzimaktivitás-meghatározás csíranövényekben
- Cirkadián ritmusok periódushossz-mérése BRASS szoftver alkalmazásával
- Növényi genomiális DNS tisztítás
- Növényi össz-RNS tisztítás
- Kvantitatív valós idejű PCR
- Növényi össz fehérje tisztítás, Westernblot analízis
- Áramlási citometria
- Fény, fluoreszcens, konfokális lézer, és pásztázó elektronmikroszkópia

AZ ELÉRT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A *lip1* mutáns növényekben csíranövény stádiumban fényfüggő módon megváltozik a bőrszöveti sejtek alakja és mérete. A fényen nevelt *lip1-1* és *lip1-2* mutáns csíranövények bőrszöveti sejtjeinek alakja jellegzetes módon eltér a vad típusétól, nem alakul ki a vad típusra jellemző, karéjos sejtalak. Etiolált növények esetében különbség nem figyelhető meg. A *lip1* mutáns csíranövények sziklelevelében a kromatintartalom megnő fehér, vörös és kék fényben, sötétben azonban nem. Ez arra utal, hogy az endoreduplikáció fény által szabályozott formája szenved zavart a *lip1* mutánsban. Kifejlett *lip1* mutáns növényben a sejtalak és a ploidia fenotípus nem figyelhető meg. Hipokotil és teljes növény tartalmú mintákat is vizsgáltunk az örökítőanyag mennyiségét tekintve. A ploidia mintázat ezekben a mintákban nagyon hasonlított a sziklelevél esetében tapasztaltra, ami arra utal, hogy a LIP1 által okozott endoreduplikációs változás nem szövet specifikus.

lip1 és fotoreceptor többszörös mutánsokat hoztunk létre és mértük a DNS tartalmat a csíranövényekben. A vörös és kék fény által szabályozott ploidia mintázat genetikai analízise a *fitokróm B* és a *kriptokróm 1-2* episztatikus hatását mutatta ki a *LIP1* felett. Ezek szerint a LIP1 a fitokróm B és a kriptokróm 1-2 által szabályozott útvonalakon keresztül vesz részt az endoreduplikáció vörös és kék fény-általi gátlásában.

lip1-1 mutáns növényekben a hipokotil hossza vörös és kék fényben megváltozik, a távoli vörös fény függő jelátviteli út azonban érintetlen. A *lip1* és fotoreceptor többszörös mutánsokat vizsgálva kimutattuk, hogy a *lip1* mutáns vörös fényben tapasztalható fotomorfogenikus fenotípusa részben a fitokróm B-től, valamint kék fényben a kriptokróm fotoreceptoroktól függ.

A magasabb ploidia szinttel rendelkező sejtek általában nagyobbak vagy megnyúltabbak a normál kromatin mennyiséggel rendelkező sejtekhez képest. Ezért az endoreduplikációnak feltehetőleg szerepe van a szik alatti szár megnyúlásában. A *lip1* mutánsok szik alatti szára rövidebb, mint a vad típusé folyamatos vörös, illetve kék fényben. Ez arra utal, hogy a fotomorfogenikus fenotípust nem az endoreduplikáció gátlásának megszűnése okozza. Mindkét fenotípus megfigyelhető vörös és kék fényben, de távoli vörösben nem, valamint mindkét fenotípus függ a fitokróm B-től és a kriptokróm 1-2-től egyaránt. Ebből arra következtethetünk, hogy a LIP1 a fitokróm B és kriptokróm 1-2 által szabályozott jelátviteli útvonal egy olyan közös pontján helyezkedik el, ahol még a hipokotil megnyúlásáért és az endoreduplikációért felelős útvonalak nem váltak szét.

A *lip1* mutáns növények rosszabbul fejlődnek magas NaCl tartalmú táptalajon, mint a vad típusú növények. A csírázási képesség és a gyökér növekedése is zavart szenved. A csírázási képességet vizsgáltuk fény/sötét cikluson és folyamatos sötétben nevelt növényekben is. A *lip1-2* mutánsok mindkét esetben érzékenyebbek voltak a vad típusnál a tápközeg magas sókoncentrációjára, utalva ezzel arra, hogy a sóérzékenység nem egy fényfüggő zavar következménye (mint például a ploidia szint változásáé).

Az ozmotikus stressz korai stresszválasz gének indukciójához vezet, ilyenek az *RD29A* (*RESPONSIVE TO DESICCATION 29A*), *RD29B* és a *RAB18* (*RESPONSIVE TO ABA 18*). Az ionikus stressz (emelkedett Na^+ koncentráció a sejten belül) pedig az *SOS2* (*SALT OVERLY SENSITIVE 2*) indukcióját idézi elő, ami egy Na^+/H^+ antiporter, az *SOS1* aktivátora (Batelli és mtsai, 2007). A *lip1* mutánsban ozmotikus stressz hatására az ABA függő és független gének indukciós kinetikája a vad típuséhoz hasonló, ez alapján

feltételezhető, hogy a LIP1 hiányában nem a stressz érzékelése, a szignalizációs kaszkád vagy a jelátviteli utak transzkripciójának aktiválása sérül. A *lip1* mutáns növények fokozott érzékenységet mutatnak további ionikus (Cs^{2+} , K^+ , Li^{2+}) és ozmotikus stresszre, valamint a hőmérséklet stresszre is.

A sóérzékeny fenotípus nem hozható kapcsolatba az endoreduplikációban bekövetkező változásokkal, mivel a mutáns növények olyan körülmények között is érzékenyek sóra (folyamatos sötétben), ahol a ploidia fenotípus nem érvényesül. A só stressz nem befolyásolta a cirkadián óra LIP1 hiányában tapasztalható megváltozott működését sem.

A cirkadián óra nem megfelelő működése, vagyis a periódus rövidülése sötétben nevelt *lip1* mutáns növényekben is megfigyelhető (Kevei és mtsai, 2007). Ilyen körülmények között a ploidia szint nem különbözik *lip1* és vad típusú növényekben. Továbbá, a sóérzékenység, a fotomorfogenikus fenotípus és a ploidia számbeli változás olyan körülmények között is megfigyelhető, ahol a mutánsnak nincs cirkadián fenotípusa (például erős fehér fényben) (Kevei és mtsai, 2007). Ezek a tények arra utalnak, hogy a *lip1* mutánsokban a cirkadián óra megváltozott működése nem a stressz, a ploidia vagy a fotomorfogenikus fenotípus következménye.

A LIP1 fehérje a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt jelen van. Felmerült a kérdés, hogy a fent említett pleiotróp fenotípusok köthetőek-e a fehérje sejten belüli elhelyezkedéshez, ezért olyan növényeket állítottunk elő, amelyek a *lip1-2* mutáns háttérben YFP–LIP1 fúziós fehérjét fejeznek ki nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) illetve nukleáris export szignállal (NES) ellátva. A cirkadián fenotípus helyreállítható LIP1-YFP és LIP1-YFP-NLS fúziós fehérjékkel, azonban LIP1-YFP-NES fúziós fehérjével nem, ami

arra utal, hogy a cirkadián funkció betöltéséhez a LIP1 fehérjének a sejtmagban egy kritikus mennyiség felett kell jelen lennie.

A többi fenotípus (sejtalak, ploidia, hipokotil, stressz) egyaránt komplementálható volt mindhárom fúziós fehérjével. Ezekben az esetekben nem jelenthető ki egyértelműen, hogy mely sejtalkotóhoz köthető a funkció.

A LIP1 fontos szerepet tölt be kedvezőtlen körülmények között a csírázás szabályozásában, alacsony fényintenzitás mellett a cirkadián óra beállításában, valamint a fiatal csíranövények morfológiájának kialakításában. Mindezek alapján a LIP1 a csíranövények fejlődésének fontos regulátora. Azonban kizárt, hogy a LIP1 összes funkciója a csíranövény állapotra korlátozódna, mivel kifejeződése a legtöbb szervben kimutatható idősebb növényben is. Kifejlett *lip1* mutáns növényben a sejtalak és a ploidia fenotípus nem figyelhető meg, ami vagy a fejlődés során eltérő módon szabályozott és funkcionálisan a LIP1-gyel redundáns fehérjék jelenlétével magyarázható, vagy pedig a fejlődés különböző stádiumaiban jelenlevő eltérő kölcsönható partnerekkel. Azoknak a LIP1-gyel konformáció-függő módon kölcsönható fehérjéknek az azonosítása, melyek a LIP1 aktivitását szabályozzák, vagy éppen a LIP1 által szabályozódnak, kulcsfontosságú lehet a LIP1 különböző szignalizációs utakban betöltött szerepének a megismeréséhez.

RNS szinten a *CCA1* és *TOC1* esetében a maximális kifejeződésében csökkenést tapasztaltunk fény/sötét cikluson nevelt növényekben. A kifejeződés mintázata nem változott számottevően a *GI* és a *PRR9* gének esetében a mutánsban a vad típushoz képest. A *lip1* mutáció a fentiek alapján negatív hatással lehet a *TOC1* transzkripciójára, ami viszont a *CCA1* transzkripciót serkentené, ez magyarázza, hogy a *lip1-2* mutánsban mindkettő csökkent kifejeződést mutat.

Az óragének mutációját (*CCA1*, *GI*, *TOC1*, *PRR9*, *PRR5*) a *lip1* mutációval kombinálva sikerült kimutatnunk, hogy a LIP1 és a cirkadián óra között az összekötő elem a GI órakomponens. A GI episztatikus hatása nemcsak a cirkadián fenotípus esetében érvényesül, megfigyelhető a sóérzékeny és a fotomorfofenikus fenotípusok esetében is.

A GI-ról nemrégiben mutatták ki, hogy szerepet játszik a sóstressz-tolerancia kialakításában (Kim és mtsai, 2013). A vizsgált *gi-1* allélt hordozó mutáns toleránsnak bizonyult sóval szemben. A GI képes komplexet képezni az SOS2-vel, ami az SOS útvonal egyik komponense, és nélkülözhetetlen a citoplazma megfelelő ion-koncentrációinak fenntartásához és a sóstressz tolerálásához (Zhu, 2002). A komplex gátolja az SOS2 aktivitását stresszmentes körülmények között, azonban sóstressz hatására az SOS2 felszabadul és aktiválja az SOS1 Na^+/H^+ antiportert (Kim és mtsai, 2013). Eredményeik alapján érdemes lenne megvizsgálni, hogy fehérje szinten a LIP1-nek van-e hatása az SOS rendszer komponenseire, esetleg befolyásolja-e a GI-SOS2 komplex kialakulását. Mi az *SOS2*-t transzkripciós szinten vizsgáltuk *lip1* mutánsban és nem tapasztaltunk változást LIP1 hiányában.

A LIP1 nem transzkripció szintjén van hatással a *GI*-re. A GI pozitívan szabályozza a *TOC1* transzkripcióját, ami szintén pozitív hatással van a *CCA1* transzkripcióra. Ezért feltételezhető, hogy a *lip1* mutánsban tapasztalt *CCA1* és *TOC1* mRNS szint csökkenés a LIP1 és GI kölcsönhatásának következménye. A *cca1* és a *toc1* mutánsok egyaránt rövid periódust mutatnak (Alabadí és mtsai, 2002; Somers és mtsai, 1998). Ezek alapján a *lip1* mutánsban tapasztalt rövid periódus lehetséges, hogy a csökkent *CCA1* és *TOC1* szint következménye, bár ennek ellentmond a *CCA1* és *LIP1* vagy *TOC1* és *LIP1* gének közti episztatikus kölcsönhatás hiánya.

PULIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat anyagából megjelent publikáció:

Terecskei K, Tóth R, Gyula P, Kevei É, Bindics J, Coupland G, Nagy F, Kozma-Bognár L. 2013. The Circadian Clock-Associated Small GTPase LIGHT INSENSITIVE PERIOD1 Suppresses Light-Controlled Endoreplication and Affects Tolerance to Salt Stress in Arabidopsis. *Plant Physiol* 161(1):278-90.

Egyéb publikációk:

Kircher S, **Terecskei K**, Wolf I, Sipos M, Ádám É. 2011. Phytochrome A-specific signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 6(11):1714-9.

Kredics L, **Terecskei K**, Antal Z, Szekeres A, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C. 2008. Purification and preliminary characterization of a cold-adapted extracellular proteinase from *Trichoderma atroviride*. *Acta Biol Hung* 59(2):259-68.

Palágyi A, **Terecskei K**, Ádám É, Kevei É, Kircher S, Mérai Z, Schaefer E, Nagy F, Kozma-Bognár L. 2010. Functional analysis of amino-terminal domains of the photoreceptor phytochrome B. *Plant Physiol* 153(4):1834-45.

Sorokina O, Kapus A, **Terecskei K**, Dixon LE, Kozma-Bognár L, Nagy F, Millar AJ. 2009. A switchable light-input, light-output system modelled and constructed in yeast. *J Biol Eng* 3:15.