

(A) Az elért eredmények az eredeti kutatási terv fő célkitűzéseinek megfelelően csoportosítva**A1. A növényi cirkadián oszcillátor komponenseinek a beállító fénypulzusokra adott molekuláris szintű válaszai**

A kísérletek során főként azokat az órakomponenseket (óragéneket) vizsgáltuk a kifejeződés különböző szintjein, amelyek fényindukált transzkripciójuk miatt feltételezhetően kapcsolatban hozhatók a óra beállításával (*CCA1*, *LHY*, *GI*, *PRR9*). Vad típusú és óramutáns *Arabidopsis* növényekben a ritmikusan kifejeződő *CCR2:LUC* marker segítségével vizsgáltuk az óra beállíthatóságát (vörös fény pulzusokra adott fáziscsúszásokat mértünk sötétben tartott növényekben). A *cca1*, *lhy* és *gi* mutánsokban a szubjektív éjszaka során mérhető fáziscsúszások mértéke nőtt, míg a *prp9* mutánsban a szubjektív nappal során mérhető pozitív fáziscsúszások mértéke rendkívüli mértékben csökkent. Az adatok arra utalnak, hogy a *CCA1*, *LHY* és *GI* fehérjék a beállítás negatív faktorai és főképp a szubjektív éjszaka során fejtik ki hatásukat. A *PRR9* a beállítás pozitív szabályozója és elengedhetetlenül fontos a pozitív fáziscsúszások kialakításában. A fenti kísérletekkel párhuzamosan és azokkal egyező körülmények mellett vizsgáltuk a *CCA1*, *LHY*, *GI* és *PRR9* gének indukálhatóságát (mRNS-szintű indukció) vad típusú növényekben. Kimutattuk, hogy a *CCA1*, *LHY* és *GI* gének a szubjektív éjszaka, míg a *PRR9* a szubjektív nappal során indukálható a legnagyobb mértékben vörös fény pulzusokkal. A két kísérlet-sorozat eredménye közvetett módon arra utal, hogy az éjszaka során kiváltható negatív fáziscsúszások kialakulásához a *CCA1*, *LHY* és *GI* gének együttes indukciója szükséges, míg a szubjektív nappal során tapasztalható pozitív fázisváltozás a *PRR9* gén indukcióján keresztül valósulhat meg.

A kutatási tervnek megfelelően létrehoztuk azokat a transzgenikus növényeket, amelyekben a fenti óragéneket a saját promóterük irányítása alatt és a *LUC*, *rLUC* vagy *YFP* riportergénnel fúzióban fejeztettük ki a megfelelő óramutáns háttérben (pl. *CCA1:CCA1-rLUC cca1* mutáns háttérben). Valamennyi óragén esetében sikerült több olyan független transzgenikus vonalat előállítani, amelyekben a kifejeztetett fúziós órafehérjék helyreállították a vad típusú fenotípust. Ezek a vonalakat használtuk fel (ismét a fenti kísérletekkel egyező körülmények között) annak a meghatározására, hogy a fáziscsúszást okozó fénypulzusok milyen hatást gyakorolnak az egyes órafehérjék transzlációjára (LUC fúziók, *in vivo* lumineszcencia-mérés), felhalmozódására/szintjére (rLUC fúziók, *in vitro* enzimaktivitás-mérés) és sejten belüli eloszlására (YFP fúziók, fluoreszcens mikroszkópia). Megállapítottuk, hogy bár az alkalmazott fénypulzus átmeneti emelkedést okoz a vizsgált fehérjék szintézisének sebességében és a fehérjék mennyiségében is, de ezek a változások mindig hűen követik a transzkripció szintjén mért változásokat. Adataink alapján a transzláció emelkedése 1-2 órával, míg a fehérjeszint emelkedése 2-4 órával követi a transzkripció indukcióját. Kimutattuk továbbá, hogy a fénypulzusok nem befolyásolják a vizsgált órafehérjék sejten belüli eloszlását, vagyis a citoplazmában és a magban található fehérjék mennyiségének arányát. A vizsgált órafehérjék az irodalmi adatoknak megfelelően túlnyomórészt a sejtmagban helyezkedtek el, a fénykezelésektől függetlenül. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a növényi óra fény(pulzusok) általi beállításának elsődleges lépése bizonyos órakomponenseket kódoló gének transzkripciójának indukciója.

Ezt megerősítendő, létrehoztunk egy olyan tranzienst indukciós rendszert, amely segítségével egyedi gének transzkripciója indukálható a természetes fényindukcióhoz hasonló kinetikával. A génexpresszió-indukciós rendszer a kutatási tervben részletezett módon épült fel. Lényege, hogy, hogy távoli-vörös pulzusokkal a *CCA1*, *GI* vagy *PRR9* gének transzkripcióját indukáljuk úgy, hogy mindeközben valamennyi egyéb életfolyamat vagy génműködés "vak" erre a bizonyos fénykezelésre. Bár hosszas optimalizálás után a rendszer segítségével csak mintegy három-öttszörös indukciót tudtunk elérni, szemben a "normális" 15-40-szeres indukcióval, a kísérletek

hasznos és megerősítő adatokat szolgáltatottak. Abban az esetben, ha az óragéneket abban az időszakban indukáltuk, mikor azok vad típusú növényekben a legjobban indukálhatók (*CCA1*, *Gl*: szubjektív éjszaka, *PRR9*: szubjektív nappal) akkor az indukált géntől függően kaptunk negatív (*CCA1*, *Gl*) vagy pozitív fáziscúszást. Megjegyzendő azonban, hogy a fáziscúszások mértéke jelentősen kisebb volt a természetes fénypulzus által okozott fázisváltozásoknál. Ezek az adatok egyértelműen támogatják következtetésünket, mely szerint az óra fény általi beállításának elsődleges mechanizmusa a fényérzékeny óragének transzkripciós aktiválása. A fenti eredményeket bemutató kézirat elkészítéséhez elsősorban azokat a rendkívül komplex és első látásra ellentmondásosnak tűnő eredményeket kell még értelmeznünk, amelyeket akkor kaptunk, mikor az egyes óragéneket olyan időszakban indukáltuk, amikor azok természetes esetben egyébként nem indukálhatók.

A2. Az UV-B fény szerepe a növényi cirkadián óra beállításában.

Elsőként sikerült kimutatnunk, hogy az UV-B fény a látható fényhez hasonlóan hatásos az óra beállításában. Az óra beállíthatóságát megvizsgáltuk olyan UV-B jelátviteli mutánsokban, amelyekben az UV-B válaszok mindegyike (*uvr8*), vagy nagy része (*hy5 hyh*) sérült. Az *uvr8* mutánsban egyetlen gén működése (beleértve a fentebb említett óragéneket is) sem indukálható UV-B-vel. A *hy5 hyh* mutánsban a legtöbb gén elveszítette UV-B érzékenységet, de az óragének (*CCA1*, *LHY*, *Gl*, *PRR9*) a vad típushoz hasonlóan indukálhatók. Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy az óra érzéketlen az UV-B pulzusokkal szemben az *uvr8* mutánsban, de a beállíthatóság nem sérült a *hy5 hyh* mutánsban. Ezek az eredmények igazolják és megerősítik, hogy a növényi óra beállítása (az UV-B fény által is) elsősorban az óragének transzkripciós indukcióján keresztül történik.

Ezen túlmenően kimutattuk, hogy a cirkadián óra ritmikusan gátolja az arra érzékeny gének UV-B indukcióját. A legtöbb általunk vizsgált gén, amelyek termékei az UV-elnyelő védőpigmentek termeléséhez szükségesek, a nappal kezdetén, ill. első felében mutat magas szintű UV-B indukciót, míg a szubjektív éjszaka során szinte érzéketlenek az UV-B pulzusokra. A megfigyelt jelenség az óra élettani jelentőségének egy újabb fontos bizonyítéka: az UV-protektív színanyagok termelődését az óra arra a napszakra időzíti, amikor arra leginkább szükség van.

A3. A LIP1 fehérje szerepe a növényi óra beállításában

Korábbi kísérleteink során azonosítottuk a *lip1* (*light insensitive period 1*) mutánst, amely a fény általi beállítás nagyon speciális zavarát mutatta. A szubjektív éjszaka során kiváltott fáziskésések mértéke jelentősen megnőtt a *lip1* mutánsokban. A jelenség megértése céljából az A1 pontban ismertetett módon megvizsgáltuk az óragének (*CCA1*, *Gl*, *PRR9*) kifejeződését és az órafehérjék eloszlását a *lip1* mutánsban. Az egyetlen jelentős hatás *Gl* fény általi transzkripciós indukciójának csökkenése volt. Ezek az eredmények egyrészt megerősítik az előző kísérletekből levont következtetéseinket (a *Gl* és annak indukciója a beállítás negatív faktora), másrészt bizonyos szintű magyarázatot ad a LIP1 fehérje beállításban játszott szerepére. Mivel a LIP1 egy kis GTP-kötő fehérje, így közvetlen szerepe a *Gl* transzkripció szabályozásában nem valószínű. Ezért az élesztő két hibrid rendszer segítségével olyan fehérjéket kerestünk, amelyek kölcsönhatnak a LIP1 fehérjével és funkciójuk jobban köthető a génkifejeződés szabályozásához. Többszöri próbálkozás ellenére csak a már szintén korábban felfedezett GEF7 (guanin exchange factor 7) fehérjét azonosítottuk. E fehérje valószínűleg a LIP1 kis GTP-kötő fehérje aktivitását szabályozza a GDP-GTP nukleotid csere serkentése révén. A LIP1-GEF7 kölcsönhatást ko-immunoprecipitációval is alátámasztottuk. Sikerült beszerezniünk egy T-DNS inszerció (null)mutáns vonalat, amelyben a GEF7 gén nem fejeződik ki. A mutáns azonban nem mutatott *lip1*-re jellemző fenotípusokat, amelyek elvárhatók lennének akkor, ha a GEF7 valóban

szabályozná a LIP1 aktivitását. Ez jelentheti azt, hogy a LIP1 ismert funkciói nem igénylik a fehérje GTPáz aktivitását, de az is elképzelhető, hogy a GEF7 nem regulátora, hanem célpontja a LIP1 GTPáznak. Ez utóbbira számos irodalmi adatot találtunk. Mindezek alapján a lip1 mutánsokat újabb és részletesebb jellemzésnek vetettük alá, amely munkánk a LIP1 fehérje újabb érdekes funkcióit tárta fel (lásd B3).

(B) Egyéb, a projekt megvalósítása során elért jelentős eredmények

Az eredeti kutatási tervben vázolt munka során több alkalommal is olyan felfedezések birtokába jutottunk, amelyek kibontása, értelmezése szakmailag indokolt volt. Ezen eredmények közül azokat mutatjuk itt be, amelyek elérésében csoportunknak meghatározó szerepe volt. Hangsúlyozandó, hogy ezek a kutatási irányok teljes mértékben kapcsolódnak a pályázat témájához és az e területen végzett munka nem hátráltatta az eredeti kutatási tervben megfogalmazott célok elérését (amit az előző szekció tartalma is igazol).

B1. A fitokróm A (PHYA) és fitokróm B (PHYB) fotoreceptorok egyes doménjeinek szerepe a fényfüggő beállításban.

A PHYA és PHYB fotoreceptorok különböző deléciós variánsait fejztettük ki *phyA* és *phyB* mutánsokban, majd a komplementáló vonalakban vizsgáltuk az óra fény általi beállíthatóságát. Kimutattuk, hogy a PHYA C-terminális része alapvetően szükséges a fényjelek továbbításához, míg a molekula N-terminális része (PHYA-N) a receptor fényindukált sejtmagi importjához elengedhetetlen. Adataink alapján a PHYA-N egy biológiai funkció nélküli, de fény-szabályozott sejtmagi belépésre képes fehérjének tekinthető. Ezt a PHYA variánst használtuk fel az új indukálható génextpressziós rendszer építéséhez (A1). A PHYB receptor N-terminális szakaszán azonosítottuk azt a mindössze 40 aminosavból álló szakaszt, amely a vörös fényjeleknek az óra irányába történő továbbításához szükséges. A PHYB C-terminális szakasza a receptor fényfüggő sejtmagi importjához szükséges. Kimutattuk továbbá, hogy a vörös fényt elnyelő PHYB receptor aktív formája képes gátolni a kriptokróm fotoreceptoroktól kiinduló és az órát szabályozó kék fény jelátvitelt. A két különböző fény jelátviteli rendszer funkcionális kölcsönhatásához a PHYB C-terminális doménje szükséges.

B2. Szintetikus biológiai óra építése élesztőben

Prof. Andrew Millar csoportjával (University of Edinburgh) együttműködve megkezdtek egy olyan mesterséges genetikai oszcillátor építését élesztőben, amelynek fázisa külső jelekkel (fény) befolyásolható. A mesterséges oszcillátor olyan szintetikus gének működésén alapul, amelyek géntermékei kölcsönösen (pozitívan vagy negatívan) szabályozzák egymás génjeinek kifejeződését az eukarióta cirkadián oszcillátorok működési alapelveinek megfelelően. A beállító fényjeleket egy, a növényi fitokróm A fotoreceptoron alapuló fény-szenzor közvetíti a két szintetikus gén transzkripciójának szintjére. A projekt közvetlenül kapcsolódik kutatási tervünkhöz, mivel egy mesterséges rendszerben vizsgálhatjuk, hogy milyen hatása van az egyes oszcillátor-komponensek transzkripció indukciójának az oszcilláció fázisára. Első lépésben a fény-szenzor modulját készítettük el élesztőben. A fény-szenzor valójában egy olyan transzkripciót szabályozó fény-kapcsolóként működik élesztőben, amelyet vörös vagy távoli vörös fényvel lehet be-, ill. kikapcsolni. Ezek alapján a rendszer a projekt specifikus céljai mellett számos egyéb alkalmazást tesz lehetővé az élesztősejtekben zajló génkifejeződés fény általi manipulálását illetően. A szintetikus rendszer elemeit csoportunk készítette el, míg a rendszer matematikai modellezése az Edinburgh-i csoport feladata. A rendszer fénybemeneti modulja már működőképes, az oszcillátor modul finomhangolása jelenleg zajlik.

B3. A LIP1 fehérje újabb, pleiotróp funkcióinak azonosítása

Kimutattuk, hogy a LIP1 fehérje fontos szerepet játszik a só-tolerancia kialakításában. A *lip1* mutáns magvak nem, vagy nagyon rosszul csíráznak olyan só-koncentráció mellett, ahol a vad típusú növények még megfelelően fejlődnek. Az ozmotikus stressz-válasz kialakításában kulcsszerepet játszó gének vizsgálatával kimutattuk, hogy a LIP1 nem ezek transzkripcióján keresztül fejt ki hatását.

Kimutattuk, hogy a fényen nőtt *lip1* mutáns növények átlagos plodia-száma magasabb a vad típusú növényekénél, míg sötétben nevelt növényeknél nem találtunk ilyen különbséget. Közismert, hogy bizonyos növényi sejtekben működik a sejtciklus egy bizonyos variánsa, az ún. endoreplikáció. E folyamat révén a sejt DNS tartalma precízen duplázódik, de mivel sejtosztódás nem történik, a folyamat magasabb ploidia szintek (32C, 64C) kialakulásához vezet. Az endoreplikáció folyamatát a fény gátolja, ezért a fényben nőtt növények ploidia-szintje alacsonyabb, mint az etiolált növényeké. A *lip1 phyb* duplamutáns létrehozásával és vizsgálatával igazoltuk, hogy a LIP1 annak a jelátviteli útnak az egyik komponense, amelynek révén a PHYB fotoreceptortól származó fényjelek gátolják az endoreplikáció folyamatát.

Igazoltuk továbbá, hogy a LIP1 cirkadián funkciója független a só-tűrésben vagy az endoreplikáció szabályozásban betöltött funkciójától.

Az eredményeket bemutató kéziratot a Plant Physiology folyóirathoz küldtük, ahol kedvező bírálatokat kapott. Jelenleg a kézirat revíziója folyik. Ezzel kapcsolatban szeretnénk kérni azt a lehetőséget, *"hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket"*.

A kézirat címlapja és absztraktja a beszámoló utolsó oldalán látható.

Eredményeinket két nemzetközi és három hazai konferencián mutattuk be négy szóbeli és öt poszter-prezentáció formájában.

Az eredményekből született, referált nemzetközi folyóiratokban megjelent cikkek listája az on-line felületen került rögzítésre.

The circadian clock-associated small GTPase LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1 affects light-controlled endoreplication and is required for tolerance to salt stress in Arabidopsis¹

Kata Terecskei², Réka Tóth², Péter Gyula, Éva Kevei³, János Bindics, Erzsébet Fejes, George Coupland, Ferenc Nagy and László Kozma-Bognár*

Institute of Plant Biology, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, H-6726 Szeged, Hungary (K.T., P.G., É.K., J.B., E.F., F.N., L.K.-B.)

Department of Plant Developmental Biology, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, D-50829, Cologne, Germany (R.T., G.C.)

School of Biological Sciences, University of Edinburgh, EH9 3JR Edinburgh, United Kingdom (F.N.)

Keywords: circadian clock, endoreplication, salt stress, photomorphogenesis, small GTPase

ABSTRACT

Circadian clocks are biochemical timers regulating many physiological and molecular processes according to the day/night cycles. To achieve this, the autonomous, self-sustaining basic oscillation produced by mutual cross-regulation of the clock components must be synchronized to the real time. The small GTPase LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1 (LIP1) is a circadian clock-associated protein that regulates light input to the clock. In the absence of LIP1, the effect of light on free-running period length is much reduced. Here we show that in addition to negatively regulating red and blue light-mediated photomorphogenesis, LIP1 is also required for light-controlled inhibition of endoreplication and tolerance to salt stress. We demonstrate that LIP1 acts downstream of the red light photoreceptor phytochrome B in regulating endoreplication and photomorphogenesis. Manipulation of the subcellular distribution of LIP1 revealed that the circadian function of LIP1 requires nuclear localization of the protein. Our data collectively suggest that LIP1 is a component of several signaling cascades and that its role in the entrainment of the circadian clock is independent from the other pleiotropic functions. Since these functions of LIP1 are important for the early stages of development or under conditions normally experienced by germinating seedlings, we suggest that LIP1 is a significant regulator of seedling establishment.

¹ Work in Szeged, Hungary was supported by grants from the Hungarian Scientific Research Fund to L.K.-B. (OTKA-73362) and to F.N. (OTKA-81399) and by the New Hungary Development Plan project (TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0007) to F.N. Work in Cologne, Germany was supported by EC-funded Agro-nomics, the DFG DIP programme and Chemical Genomics Centre of the Max Planck. Work in Edinburgh, UK was supported by a Research Chair Award to F.N. from the Scottish Universities Life Science Alliance (SULSA). L.K.-B. was supported by the János Bolyai Research Scholarship from the Hungarian Academy of Sciences.

² These authors contributed equally to this work

³ Present address: Cluster of Excellence: Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD) Cologne at the Institute for Genetics, University of Cologne, D-50674 Cologne, Germany

* Corresponding author; e-mail: kozmab@brc.hu; fax: +36-62-433-434