

A fitokrómok N-terminális régiójának szerepe a vörös és távoli vörös fény érzékelésében

Doktori (Ph.D.) értekezés

Bindics János

Témavezető: Dr. Nagy Ferenc
Biológia Doktori Iskola
MTA Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet

Szegedi Tudományegyetem TTIK

2014

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	1
Bevezetés.....	2
1 – Szakirodalmi áttekintés.....	5
1.1 – Növényi fotoreceptorok.....	5
1.2 – UV-B érzékelés.....	5
1.3 – UV-A és kék fény érzékelése.....	5
1.4 – A vörös és távoli vörös fény érzékelése.....	6
1.4.1 – A fitokróm kutatás kezdete.....	6
1.4.2 – A fitokrómok molekuláris szerkezete.....	8
1.4.3 – A fitokrómok működésének alapja: a fotokonverzió.....	9
1.4.4 – Az aktív fitokrómok inaktivációja.....	11
1.4.5 – A fitokrómok evolúciós eredete.....	12
1.4.6 – A fitokrómok kináz aktivitása és autofoszforylációja.....	13
1.4.7 – A fitokrómok jelátviteli hálózata.....	14
1.4.7.1 – A fitokróm jelátvitel negatív elemei.....	15
1.4.7.2 – A fitokróm jelátvitel pozitív elemei.....	17
1.4.7.3 – A fitokrómok jelátvitelének modellje.....	19
1.4.8 – A fitokrómok közvetítette válaszreakciók hullámhosszfüggése.....	20
1.4.9 – A fitokrómok közvetítette válaszreakciók.....	22
1.4.10 – A fitokrómok sejten belüli dinamikája.....	24
1.4.10.1 – A sejtmagi import.....	24
1.4.10.2 – A fitokrómok sejtmagi aggregátumai.....	26
2 – Célkitűzések.....	28
3 – Anyagok és módszerek.....	29
3.1 – Kísérleti anyagok és élőlények.....	29
3.1.1 – Táptalajok, tápoldatok, antibiotikumok.....	29
3.1.1.1 – Bakteriális táptalajok.....	29
3.1.1.2 – Élesztő táptalajok.....	29
3.1.1.3 – Növényi táptalajok.....	29
3.1.1.4 – Sterilizálás.....	30
3.1.1.5 – Antibiotikumok.....	30
3.1.2 – Plazmidok leírása.....	30
3.1.2.1 – Bakteriális plazmidok.....	30
3.1.2.2 – Élesztő kétgazdás plazmidok.....	31
3.1.2.3 – Növénybe juttatandó plazmidok.....	31
3.1.2.4 – Felhasznált baktérium és élesztőtörzsek.....	31
3.1.2.5 – Felhasznált növényvonalak	33
3.2 – Molekuláris biológiai és biokémiai módszerek.....	33
3.2.1 – Génebészet.....	33
3.2.2 – Növénybe és élesztőbe transzformált génkonstrukciók	34
3.2.3 – Génkifejeződés vizsgálata.....	36
3.2.4 – Növényi össz-fehérje tisztítása.....	37
3.2.5 – Fehérjeszint specifikus meghatározása Western blot módszerrel.....	37
3.2.6 – In vivo és in vitro spektroszkópia.....	38

3.3 – Baktériumokon alkalmazott eljárások.....	40
3.3.1 – <i>Escherichia coli</i> törzsek transzformációja.....	40
3.3.2 – <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transzformációja.....	40
3.4 – Élesztőn alkalmazott eljárások.....	41
3.4.1 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transzformációja.....	41
3.4.2 – Az InvSc1 élesztő törzsben termeltetett PHYB és PHYB foszfováriáns fehérjék.....	41
3.5 – Növényeken alkalmazott eljárások.....	42
3.5.1 – Növények előkészítése és nevelése	42
3.5.2 – Növénytranszformáció.....	42
3.5.3 – Mikroszkópos kísérletek.....	43
3.5.4 – Fitokróm fúziós fehérjék sejtmagi importjának szemikvantitatív mérése.....	43
3.5.5 – Hipokotil rövidülési válasz.....	44
3.5.6 – A PHYA akcióspektrumának mérése.....	45
4 – A <i>phyA-5</i> allél vizsgálata.....	46
4.1 – A <i>psm</i> fenotípust létrehozó mutáns lókuszt azonosítása.....	46
4.2 – A <i>phyA-5</i> fenotípusa és komplementációja.....	48
4.3 – Kísérleti célok és hipotézisek.....	49
4.4 – A <i>phyA-5</i> mutáció hatása a PHYA mRNS szintjére.....	50
4.5 – A <i>phyA-5</i> mutáció hatása a PHYA fehérjedinamikájára.....	50
4.6 – A PHYA és a PHYA ^{Ala30Val} közvetítette jelátvitel hullámhosszfüggése.....	52
4.7 – A PHYA ^{Ala30Val} fehérje közvetítette VLFR válasz sérült.....	54
4.8 – A PHYA és a PHYA ^{Ala30Val} sejten belüli lokalizációja.....	56
4.9 – A PHYA ^{Ala30Val} fehérje csökkent affinitással kötődik az FHY1 és FHL sejtmagi transzport fehérjékhez.....	57
4.10 – A <i>phyA-5</i> fenotípus komplementációja nukleáris lokalizációs szignál segítségével.....	58
5 – A <i>phyA-5</i> allél jellemzésével kapcsolatos eredmények megvitatása.....	60
5.1 – A <i>phyA-5</i> mutáció okozta Ala30Val aminosavcsere kondicionális, hiposzenzitív fenotípust hoz létre távoli vörös fényben.....	60
5.2 – A <i>phyA-5</i> mutáció nem befolyásolja a PHYA mRNS kifejeződését.....	62
5.3 – A PHYA ^{Ala30Val} fehérje lebomlása távoli vörös fényben sérült, míg vörös fényben a vad típusával megegyező.....	62
5.4 – A <i>phyA-5</i> mutáció megváltoztatja a PHYA sejten belüli eloszlását.....	63
5.5 – A PHYA ^{Ala30Val} molekula kisebb affinitással kötődik az FHY1 és FHL sejtmagi transzport fehérjékhez.....	64
5.6 – A <i>phyA-5</i> növények fenotípusa a sérült sejtmagi importon keresztül valósul meg.....	65
5.7 – A <i>phyA-5</i> fenotípust létrehozó folyamatok modellje.....	65
6 – A PHYB Ser86 foszforilációjával kapcsolatos kísérleti eredmények.....	68
6.1 – A PHYB NTE doménje foszforilált szerin oldalláncokat hordoz.....	68
6.2 – A PHYB foszforilált és defoszforilált formáit imitáló molekulákat kifejező növényvonalak.....	69
6.3 – A PHYB ^{Ser86Asp} fehérjét kifejező növények csökkent vörös fényérzékenységgel rendelkeznek.....	70
6.4 – Kísérleti célok és hipotézisek.....	71

6.5 – A PHYB fehérjestabilitását a Ser86Asp és Ser86Ala aminosav szubsztitúció nem befolyásolja.....	72
6.6 – A PHYB ^{Ser86Asp} fehérje csökkent sejtmagi importtal rendelkezik.....	73
6.7 – A PHYB ^{Ser86Asp} fehérje csökkent sejtmagi komplexképzést mutat.....	74
6.8 – A PHYB ^{Ser86Asp} csökkent PIF3 kötő kapacitással rendelkezik alacsony intenzitású vörös fényben.....	75
6.9 – A PHYB foszfovariánsainak spektrális tulajdonsága és fotokonverziója megegyezik a vad típusú PHYB molekuláéval.....	76
6.10 – A PHYB ^{Ser86Asp} felgyorsult sötét reverziós kinetikával rendelkezik.....	78
7 – A PHYB foszforilációjával kapcsolatos eredmények megvitatása.....	81
7.1 – A PHYB fehérje foszforilált in vivo.....	81
7.2 – A PHYB ^{Ser86Ala} és a PHYB ^{Ser86Asp} fiziológiai hatásai csak alacsony intenzitású vörös fényben érvényesülnek.....	82
7.3 – A PHYB ^{Ser86Asp} sejtmagi komplex-képzése eltér a PHYB ^{Ser86Ala} és PHYB vad típusétól.....	83
7.4 – A PHYB Ser86 foszforilációja feltehetően autofoszforiláció.....	84
8 – Összefoglalás.....	86
9 – Summary.....	88
10 – Idézett közlemények.....	89
11 – Saját közlemények.....	99
12 – Köszönetnyilvánítás.....	100

Rövidítések jegyzéke

<i>PHYA - E</i>	<i>PHYTOCHROME A - E</i> , növényi gének
P_{fr}	A fitokrómok távoli vörös fényt elnyelő, aktív formája
P_r	A fitokrómok vörös fényt elnyelő, inaktív formája
P_{tot}	Összes fitokróm mennyiség
GAF	cGMP specifikus foszfodiészteráz, adenilát ciklázok, FhlA, fehérjedomén
<i>COP1</i>	<i>CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1</i> , növényi gén
<i>CRY1 - 2</i>	<i>CRYPTOCHROME 1 - 2</i> , növényi gének
<i>CUL1, 4</i>	<i>CULLIN 1 és 4</i> , E3 ubikvitin ligázok
<i>DET</i>	<i>DEETIOLATED</i> , növényi gén
<i>DDB1</i>	<i>DNA DAMAGE-BINDING PROTEIN 1</i> , növényi gén
<i>HY5</i>	<i>ELONGATED HYPOCOTYL 5</i> , növényi gén
<i>FHY1</i>	<i>FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL 1</i> , növényi gén
<i>FHL</i>	<i>FHY1 LIKE</i> , növényi gén
PCB	Fikocianobilin, bakteriális kromofór
$P\Phi B$	Fitokromobilin, növényi kromofór
PHY	Fitokrómokra jellemző domén
FMN	Flavin Mono-Nukleotid
FAD	Flavin-Adenin Dinukleotid
<i>FUS</i>	<i>FUSCA</i> , növényi gén
HIR	High Irradiance Response - Magas fénydózissal beindítható PHY válaszok
HYH	HY5 HOMOLOG, növényi gén
<i>LAF1</i>	<i>LONG AFTER FAR-RED 1</i> , növényi gén
<i>HFR1</i>	<i>LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED1</i> , növényi gén
LFR	Low Fluence Response - Alacsony fénydózissal beindítható PHY válaszok
NTE	N-terminális extenzió
NLS	Nuclear Localization Signal, szignálpeptid
NES	Nuclear Exclusion Signal, szignálpeptid
PRD	PAS related domain, 2 PAS régiót tartalmazó PHY régió
PAS	PER-ARNT-SIM, PHY régió
<i>PHOT1 - 2</i>	<i>PHOTOTROPIN1 - 2</i> , növényi gének
<i>PIF</i>	<i>PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR</i> , növényi gén
<i>PKS1</i>	<i>PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1</i> , növényi gén
<i>PRR9</i>	<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9</i> , növényi gén
SRD	septin related domain
<i>SPA1 - 4</i>	<i>SUPPRESSOR OF phyA-105 1 - 4</i> , növényi gének
<i>UVR8</i>	<i>UV-B RESISTANCE LOCUS 8</i> , növényi gén
VLFR	Very Low Fluence Response - Nagyon alacsony fénydózissal beindítható PHY válaszok

Bevezetés

A növények életét alapjaiban meghatározó két körülmény, hogy **i)** helyhez kötött (szesszilis) élőlények és **ii)** a napfény energiáját hasznosítják életfolyamataik fenntartására (fotoautotrófok). Túlélésük záloga a változó környezethez való mind tökéletesebb alkalmazkodás. Evolúciójuk során a környezeti hatásokat érzékelő receptorokról kiinduló jelátviteli láncok összekapcsolt, integráló hálózata alakult ki, mely biztosítja a növényi homeosztázist olyan szélsőséges környezeti viszonyok között is, amit az állatok helyváltoztatásuk révén elkerülnek.

A növények számára a fény nem csak energiatartalma miatt fontos, kiemelt szerepét erősíti, hogy a változó környezetről információt is hordoz. Ennek az információnak a kiaknázhatóságát a fényérzékelésért felelős fotoreceptorok teszik lehetővé. Segítségükkel érzékelik a fény meglétét, vagy hiányát, irányát, periodikus változását, a spektrum bizonyos régióinak (színeinek) reprezentáltságát és azok intenzitásának egymáshoz való viszonyát. A fotoreceptorokról kiinduló jelátvitel bekapcsolja előbb a génkifejeződés, majd az életfolyamatok és a növényi fejlődés szintjein bekövetkező változásokat, melyek biztosítják a növény alkalmazkodását. A fotoreceptorok által befolyásolt fiziológiai változások az alábbi növényélettani folyamatokra hatnak (Sullivan & Deng 2003):

- Csírázás;
- Csíranövények fényfüggő fejlődése;
- Árnyékelkerülés;
- Fototropizmus;
- Színtestek mozgása, gázcserenyílás nyitásának szabályozása;
- A nappalok hosszának érzékelése és a
- Virágzás.

A növényi fejlődés fényfüggő jelenségeivel a fotobiológia foglalkozik. A növényi molekuláris biológia modellorganizmusa a lúdfű, latin nevén *Arabidopsis thaliana*. Fejlődési programja két alapvető szakaszra különül:

- a csírázástól a föld felszínének eléréséig tartó szkotomorfogenezis, amikor a csíranövény sötétben fejlődik,
- az ezt követő közvetlen napfényben történő fotomorfogenezis.

A lúdfű fejlődése a magnyugalom megtörésével kezdődik. Ennek az összetett folyamatnak a során a mag először vizet vesz fel a nedvesebbé váló környezetből, -

megduzzad - majd hideg kezelés és az ezt követő fényindukció hatására beindul a csírázás. Ezzel kezdetét veszi az etiolált csíranövény fejlődése: a skotomorfogenezis. Ennek folyamán a hipokotil megnyúlása a felszín irányába emeli a szikleveleket, amik kicsik, zártak és visszahajlanak, hogy megóvják az általuk közrezárt merisztémát a föld okozta sérülésektől. A csíranövény sejtjeiben érett klorofillt nem tartalmazó szintestek, etioplasztok találhatóak. A felszín és a napfény elérése beindítja a fotomorfogenezisnek nevezett programot, aminek folyamán a hipokotil megnyúlása lelassul, a sziklevelek kinyílnak és növekedni kezdenek. Az etioplasztok érett kloroplasztiszokká fejlődnek – a növény zöldül – és valódi levelek fejlődése indul be. Végül a növény életének végén beindul a reprodukciós program, a növény virágozik, majd magot hoz.

A növények legfontosabb fotoreceptorai a fitokrómok, melyek az összes, előzőleg említett folyamat irányításában kulcsszerepet játszanak. Sokáig úgy gondolták, hogy a fitokrómok jelátviteli hálózata egy sok elemből álló kaszkádrendszer, mely modell egyszerűen magyarázhatta volna azt a sokféle és szerteágazó hatást, melyek nagy részben a fitokrómok irányítása alatt állnak. Azonban az intenzív kutatás ellenére sem akadt nyomára egy sok tagból álló jelátviteli kaszkád-rendszernek. Felvetődött a lehetőség, hogy a fitokróm molekula több jelátviteli út kiindulópontja (Yanovsky és mtsai. 1997; Cerdan és mtsai. 2000). Ezt a hipotézist támogatta a fitokrómok viszonylag nagy móltömege is (~120 kDa). A feltevés igazolásához csonka fitokróm molekulákat fejeztek ki lúdfűben. Az eredmények azt mutatták, hogy a fényérzékelés és a jelátvitel az N-terminális doménjén (a molekula első nagyjából 70 kDa mol tömegű része) történik, míg a C-terminális domén (a molekula végének nagyjából 55 kDa mol tömegű része) a jelátvitel modulációjában játszik szerepet (Matsushita és mtsai. 2003). Ezzel kezdetét vette a fitokróm kutatás egy új korszaka, melynek során mind jobban megismerték a fitokrómok doménjeinek és régióinak a fényérzékelésben és a jelátvitelben játszott szerepét és egyre több, a fitokrómok más-más régiójához kötődő fehérje vált ismertté. Így lassan kirajzolódott a fitokróm jelátvitel jelenlegi modellje. Mai ismereteink szerint a fitokrómok a skotomorfogenezis és a fotomorfogenezis programjait megvalósító két, transzkripciós faktorokból felépülő kaszkádrendszer között helyezkednek el. Fényaktivációjuk révén a skotomorfogenezis rendszerét „le-”, míg a fotomorfogenezis rendszerét „bekapcsolják”. Lúdfűben a fitokrómok egy öt tagból álló géncsaládot alkotnak, melyeket A-tól E-ig betűkkel különböztetünk meg (*PHYTOCHROME A - E*, röviden *PHYA - E*). Sötétben fejlődő növényekben a PHYA, míg fényben fejlődő növényekben a PHYB a legnagyobb mennyiségben előforduló fitokróm

(Sharrock & Clack 2002), továbbá a vörös és távoli vörös fény érzékelésében is e két fitokróm játssza a főszerepet.

A dolgozatomban bemutatásra kerülő eredmények két nagy fejezetre oszthatóak. Az első részben a *phyA-5* mutáns allél jellemzésével kapcsolatos kísérletes munkát mutatom be. A *phyA-5* allél véletlenszerű mutagenézissel előállított *PHYA* géneváltozat. Ennek az új típusú *PHYA* mutánsnak a fiziológiai és molekuláris jellemzésével bizonyítottuk a *PHYA* NTE régiójának szerepét a *PHYA* sejtmagi importjában, mely a *PHYA* receptorról kiinduló jelátvitel egyik korai, esszenciális lépése.

A dolgozat második részében a *PHYB* NTE régiójának szerepét mutatom be a biológiailag aktív *PHYB* molekulák inaktivációjában. A *PHYB* fehérje a 86. pozícióban szerin aminosavat hordoz, mely bizonyos körülmények között foszforilált állapotban van. Munkánk során célzott mutagenézissel a 86. szerin oldalláncot alaninra (*PHYB^{Ser86Ala}*), vagy aszparaginsavra (*PHYB^{Ser86Asp}*) cseréltük. Előbbi fehérje a *PHYB* Ser86 oldallánc defoszforilált, míg utóbbi a Ser86 foszforilált állapotát imitálja. A különböző változatokat kifejező növények fiziológiai jellemzése során bebizonyosodott, hogy a *PHYB^{Ser86Ala}* fehérjét kifejező növények megnövekedett, míg a *PHYB^{Ser86Asp}* fehérét kifejező növények csökkent vörös fényérzékenységgel rendelkeznek a vad típusú *PHYB*-t kifejező növényekhez képest. A molekuláris vizsgálatok megmutatták, hogy a jelenség háttérében a különböző *PHYB* variánsok megváltozott inaktivációs sebessége áll. Az inaktiváció sebessége jelentősen felgyorsul, ha a Ser86 oldallánc foszforilált, míg számottevően lassul, ha a Ser86 oldallánc defoszforilált állapotban van.

Az említett mutációk mindegyike a *PHYA* és a *PHYB* fehérjék NTE régiójában helyezkedik el. Bár sok irodalmi adat áll rendelkezésre e régióknak a fényérzékelésben betöltött szerepével kapcsolatban, sok kérdés még tisztázatlan. A dolgozatomban bemutatott kísérletes munka hozzájárult az NTE régió szerepének megértéséhez mind a *PHYA*, mind a *PHYB* jelátvitelében. Kísérleteink bizonyítják, hogy e régió kiemelkedő szereppel bír a vörös és távoli vörös fény érzékelésében, annak ellenére, hogy a *PHYA* és a *PHYB* közvetítette jelátvitel működése és e két rendszer szerepe a növény fejlődési folyamatainak irányításában drasztikusan eltérő.

1 – SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 – Növényi fotoreceptorok

Jelenlegi ismereteink szerint a növényi fotoreceptorok a földfelszínt elérő napsugárzás három hullámhossz-tartományát képesek érzékelni:

1. UV-B
2. UV-A és kék
3. Vörös és távoli vörös

1.2 – UV-B érzékelés

A spektrum UV-B (280-320 nm) tartománya erős stresszfaktor. A fényfüggő életmód következtében a növények ennek a sugárzásnak szinte állandóan ki vannak téve. Az UV-B sugárzást a nukleinsavak és fehérjék aromás gyűrűi nagy hatékonysággal nyelik el, magas energiataralma miatt pedig jelentős károkat okoz reaktív gyökök képződésén keresztül. Ezért különösen fontos az UV-B sugárzás elleni védekezés, ami főképp fotoprotektív pigmentek felhalmozódásán keresztül valósul meg (Favory és mtsai. 2009). A védekezésben szerepet játszó folyamatok már a stressz kiváltásához elégtelen UV-B dózis hatására aktiválódnak. Az UV-B sugárzást a kromatin remodelling faktorokkal homológiát mutató *UVR8* (*UV-B RESISTANCE LOCUS 8*) UV-B specifikus fotoreceptor érzékeli és a róla kiinduló jelátvitelnek köszönhetően a növények fényfüggő fejlődését jelentősen befolyásolja (Rizzini és mtsai. 2011). Az UVR8 receptor által felfogott és továbbított jel bizonyos gének kifejeződését befolyásolja, kiváltva ezzel olyan specifikus válaszokat, mint a csíranövények hipokotil-megnyúlásának gátlása és bizonyos fotoprotektív pigmentek (pl. antocianin) felhalmozódása (Favory és mtsai. 2009).

1.3 – UV-A és kék fény érzékelése

Az UV-A (320-400 nm) és a kék fény érzékeléséért felelős egyik receptor család tagjai a kriptokrómok (*CRYPTOCHROME 1, 2*). Evolúciósan a fotoliázokkal mutatnak rokonságot, amik kulcsfontosságú szerepet töltenek be az UV-C és UV-B sugárzás hatására létrejövő DNS károsodás, – pirimidin dimerek – eltávolításában és javításában, amihez a szükséges energiát a kék fényből nyerik. A kriptokrómok N-terminális régiójához nem-kovalensen kötődik egy-egy FAD (Flavin-Adenin Dinukleotid) és Dezaflavin/Pterin kromofór. A

C-terminális régió továbbítja az érzékelt fényjelet a *COP1* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1*) molekulával való kölcsönhatás révén, mely utóbbi a fényérzékelés egyik központi integrátora. A kriptokrómok fontos szerepet játszanak a hipokotil megnyúlás, a gázcsere nyílásának szabályozása, a fototropizmus, a virágzási idő szabályozása és a cirkadián óra beállításának folyamataiban (Ahmad & Cashmore 1993; Lin & Shalitin 2003; Liscum és mtsai. 2003).

A mutáns *cry1/cry2* növények kék fény függő fiziológiájának vizsgálata vezetett egy másik receptorcsalád, a fototropinok felfedezéséhez. A fototropinok szintén kék fény receptorok, *Arabidopsis*-ban ez a fotoreceptor család két, egymással nagyfokú homológiát mutató taggal rendelkezik (*PHOT1* és *PHOT2* – *PHOTOTROPIN 1* és *2*). N-terminálisukon két LOV (Light Oxygen Voltage) domén köt receptoronként 2-2 FMN (Flavin Mono-Nukleotid) kromofórt, míg C-terminálisuk szerin/threonin kináz aktivitást mutat. Szerepük, ahogy nevük is mutatja a hajtás fény, míg a gyökércsúcs fényvel ellentétes irányba fordításában van (pozitív és negatív fototropizmus). Szabályozzák továbbá a kloroplasztiszok sejten belüli, fényintenzitástól függő elrendeződése is (Liscum és mtsai. 2003).

1.4 – A vörös és távoli vörös fény érzékelése

1.4.1 – A fitokróm kutatás kezdete

A növények életében a vörös fény kiemelten fontos szerepe annak köszönhető, hogy a fotoszintetikus apparátus a kék mellett a vörös fényt tudja legnagyobb hatékonysággal hasznosítani (Balegh & Biddulph 1970). A növények a vörös (660 nm) fény mennyiségének mérésével információt nyernek a számukra elérhető energiamennyiségről és ennek függvényében optimalizálják életfolyamataikat és fejlődési programjukat. Amikor a napfény áthalad egy levélen, a kék és vörös részét a fotoszintetikus apparátus elnyeli. A zöld fény hasznosul legkevésbé, ez nagy részben visszaverődik, míg a távoli vörös (730 nm) fény nagy része áthatol a levél szövetein (Knapp & Carter 1998). A spektrum vörös és távoli vörös részének és egymáshoz viszonyított arányának mérésével a növény fontos információt nyer a környezetében élő versenytársairól. E folyamatok mögött a fitokróm fotoreceptorok állnak. Jelentőségüket mutatja, hogy minden fényben fejlődő növényben megtalálhatóak, a moháktól egészen a kétszikűekig (Mathews & Sharrock 1997).

A fitokrómok által szabályozott élettani folyamatok hullámhossz-függő volta már az 1950-es években ismertté vált. Saláta magvak csírázását a vörös fény (600-700 nm)

serkentette, míg távoli vörös fény (700-750 nm) gátolta (Borthwick és mtsai. 1952). Ha egymás után felváltva több vörös és távoli vörös impulzusnak tették ki a magokat, mindig az utolsó kezelés hatása érvényesült. Vagyis a fitokrómok fényfüggő módon ki-be „kapcsolhatóak” és a hatásuk megfordítható. Az akcióspektrum meghatározásával derült fény két fontos hullámhosszra:

- a 660 nm leghatékonyabban serkentette, míg
- a 730 nm hullámhosszú fény leghatékonyabban gátolta a csírázást (Borthwick és mtsai. 1952).

Csak jóval később – amikor a molekuláris biológia fejlődése lehetővé tette – derült ki, hogy ez két hullámhossz a fitokrómok két konformerének abszorpciós maximumai. A fitokrómok kb. 120 kDa móltömegű molekulák. Apoproteinjük a citoplazmában szintetizálódik. A lineáris tetrapirrol kromofór, – a fikocianobilin, vagy röviden PΦB – autokatalitikus kötődésével létrejön az érett fitokróm holoprotein (Li & Lagarias 1992). Klasszikus osztályozásuk a stabilitásuk alapján történt. Az I-es típusú fitokrómok sötétben nőtt növényekben magas szinten akkumulálódnak, majd fehér fényben gyors degradáción mennek keresztül, míg a II-es típusú fitokrómok fényben stabilak. A gének későbbi izolálásával vált ismertté, hogy *Arabidopsis thaliana*-ban a fitokrómok egy kis, öttagú géncsaládot alkotnak, melynek tagjait *PHYTOCHROME A, B, C, D, E*-nek hívjuk (röviden *PHYA - PHYE*) (Sharrock & Quail 1989). Sötétben nőtt növényben a *PHYA* fehérje szintje a legmagasabb, mely fény hatására gyorsan elbomlik (I-es típusú) és a fényben stabil *PHYB - PHYE* fehérjék válnak a domináns vörös receptorokká (II-es típusúak) (Sharrock & Clack 2002).

A fitokrómok a növények életében betöltött esszenciális szerepére világít rá az a tanulmány, amelyben fitokrómot nem tartalmazó *Arabidopsis thaliana* fejlődését vizsgálták. A mind az öt fitokróm génjére nézve mutáns növények (*phyA/phyB/phyC/phyD/phyE*) esetében a magnyugalom csak mesterségesen adagolt gibberelinsavval törhető meg (Yamaguchi és mtsai. 1998), enélkül fejlődésük elakadt még a csírázás előtt. Amennyiben gibberelisav segítségével kicsíráznak, vörös fényben is sötétben nőtt növények módjára fejlődnek, vagyis a szkotomorfogenezis fejlődési programja aktív. Ebben az állapotban meg is rekedtek, hacsak kék fényel be nem indították fejlődésük következő szakaszát, – a fotomorfogenezist – a kriptokrómok aktivációján keresztül. Fehér fényben az ötszörös fitokróm mutáns nem reagál a különböző vörös/távoli vörös arányokra, ami bizonyítja, hogy valóban a fitokrómoké az egyetlen fotoreceptor család, ami a vörös és távoli vörös fény

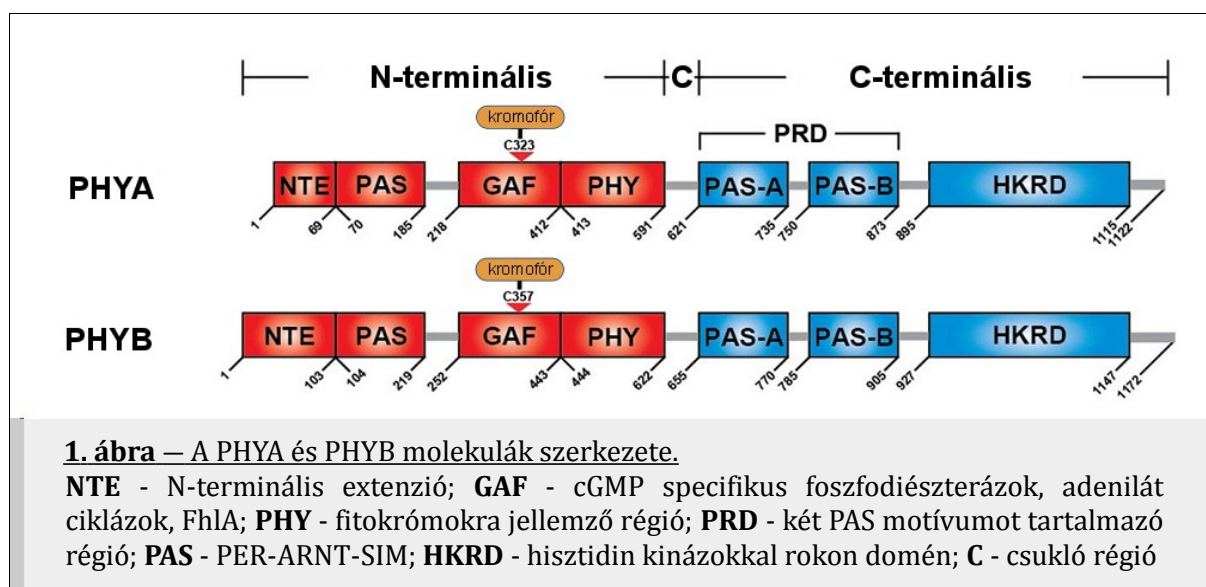
arányát „mérni” tudja (Strasser és mtsai. 2010). Ezeken a megállapításokon túl ez a munka azt is bizonyította, hogy a növényi fejlődés elemi módon függ a fény hordozta információtól, míg az általa hordozott energia csak másodlagos szereppel bír a fejlődési program szabályozásában (Strasser és mtsai. 2010). Egyetlen másik fotoreceptor család kiütése sem okoz hasonlóan komoly zavarokat az *Arabidopsis* egyedfejlődésben és ez bizonyítja a fitokrómok kulcsszerepét a fotomorfogenezis szabályozásában, mely a növény egész életét és túlélését is meghatározza a fényviszonyokhoz való alkalmazkodáson keresztül (Strasser és mtsai. 2010).

1.4.2 – A fitokrómok molekuláris szerkezete

A fitokrómok egy N-terminális (kb. 70 kDa) és egy C-terminális (kb. 55 kDa) doménre tagolhatóak, melyeket a proteolitikusan sérülékeny csukló régió köt össze (1.ábra). Az N-terminális domén további al-doménekre osztható. Az első régió egy szerinben gazdag úgynevezett N-terminális extenzió (NTE), mely csak növényi fitokrómokban fordul elő. Ez a régió a különböző fitokrómok körében nagyfokú változatosságot mutat. Egyre több kísérleti eredmény utal azonban ennek a régiónak a jelátvitel szabályozásában betöltött jelentős szerepére. Az N-terminális régióban találhatóak a PAS (PER-ARNT-SIM), GAF (cGMP specifikus foszfodiészteráz) és PHY (fitokróm specifikus) régiók, melyek minden fitokrómban (növényi és bakteriális) megtalálható és ezek alkotják a fotoszenzoros magot. A fotoszenzoros mag billin liáz aktivitással rendelkezik, melynek köszönhetően autokatalitikus reakcióban a kromofór a GAF aldomén egy evolúciósan konzervált helyzetű cisztein oldallánchoz köti tioészter kötéssel (Lagarias & Lagarias 1989). A molekula ezen része játszik szerepet a fényjel felfogásában és a kromofór fény hullámhosszától függő konformációváltozása kihatással van a fitokróm fehérje harmadlagos szerkezetére. Az egyetlen ismert fitokróm mutáns, mely a fényviszonyoktól függetlenül állandó aktivitást mutat, ebben a régióban hordoz Tyr276His aminosav cserét (Su & Lagarias 2007).

A C-terminális domén PRD (PAS related domain) és HKRD (hisztidin kinázokkal rokon domén) régiói a bakteriális hisztidin kinázokkal mutatnak alacsony szintű homológiát. A PRD régió két PAS domént tartalmaz, ami a fitokrómok dimerizációjában, fényfüggő interdomén kölcsönhatások kialakításában és feltehetően más fehérjékkel való kölcsönhatásban játszik szerepet. A dimerizáció a fitokrómok működéséhez esszenciális (Matsushita és mtsai. 2003). A C-terminális domén bizonyos aminosav-cserével járó pontmutációi a fitokróm válasz teljes hiányával járnak mind a PHYA, mind a PHYB esetében

(Xu és mtsai. 1995; Yanovsky és mtsai. 2002). Ez mutatja ennek a doménnek a fitokróm jelátvitelben betöltött fontos szerepét. Ha azonban az N-terminális domént képessé tesszük a dimerizációra, a mesterséges fúziós fehérjét kifejező növények a vad típusú fehérjét kifejezőknél sokkal nagyobb fényérzékenységet mutatnak (Matsushita és mtsai. 2003). Ezeket az információkat egybevéve valószínűnek tűnik, hogy a dimerképzés mellett a C-terminális domén a jelátvitel szabályozásában (attenuációjában) is fontos szerepet játszik.

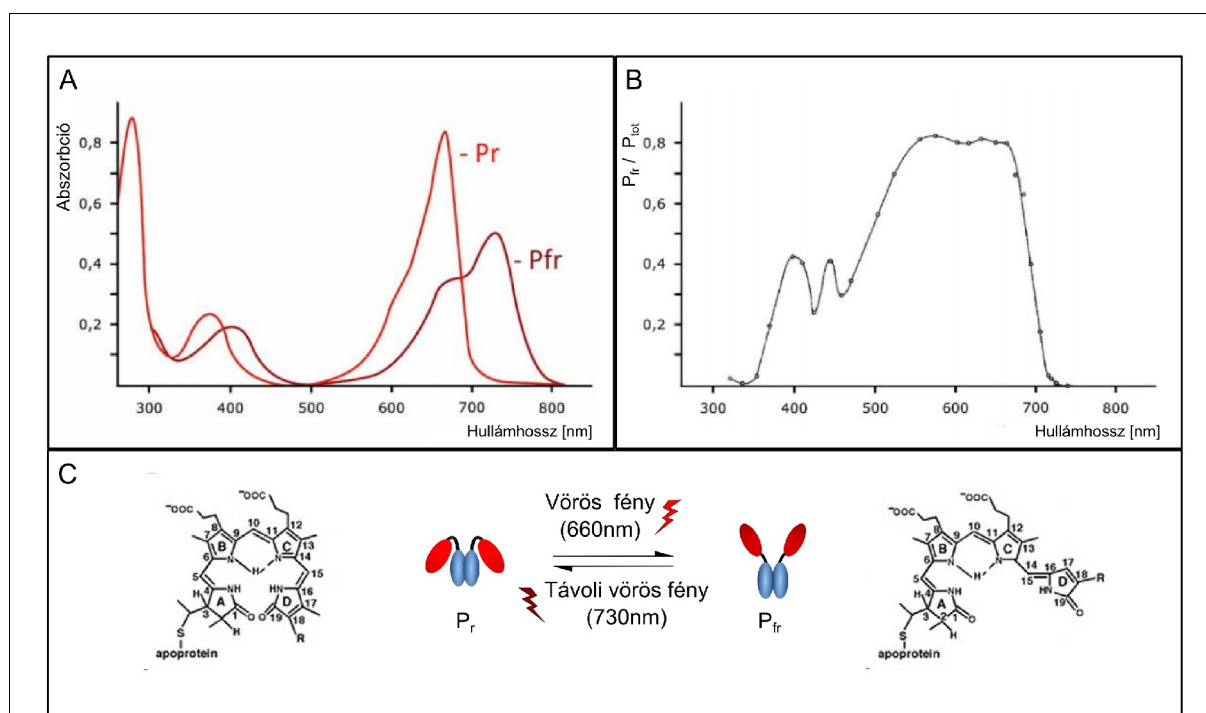


1.4.3 – A fitokrómok működésének alapja: a fotokonverzió

Már az 1960-as években kiderült, hogy a fitokrómok két, spektroszkópiailag eltérő tulajdonságú formában léteznek. A sötétben képződött fitokróm úgynevezett P_r formában van, abszorpciós maximuma vörös tartományba esik ($A_{\max}=660$ nm) és biológiailag inaktív (2. A ábra). Vörös fény hatására a fitokromobilin kromofór izomerizáción megy keresztül, ami egy régebbi tanulmány szerint a kromofór C és D gyűrűje közötti C15 kettős kötés „Z” - „E” átmenetével történik (2. C ábra) (Andel és mtsai. 1996). Egy újabb tanulmány mágneses rezonancia vizsgálatai alapján azonban az izomerizáció a C4-C5 gyűrűk közötti kettős kötetést érinti (Uliasz és mtsai. 2010). A kromofór izomerizációja megváltoztatja a kromofór-apoprotein és protein interdomén kölcsönhatásokat, melynek eredményeképpen jelentős változások mennek végbe a fitokróm harmadlagos szerkezetében. Az így létrejövő konformert P_{fr} formának hívjuk, abszorpciós maximuma távoli vörös tartományban van ($A_{\max}=730$ nm) és biológiailag ez az aktív forma (Li & Lagarias 1992). A P_{fr} forma távoli vörös hullámhossz tartományba eső fotont elnyelve visszaalakul P_r formába, vagyis a $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ átalakulás egyensúlyi reakció. Mivel

a két forma spektrumai átfednek, nincs olyan fénykezelés, amivel csak egyik, vagy másik formát tudnánk létrehozni. A $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ átalakulás folyamatos, amíg a besugárzás tart és a fény hullámhossz-összetételétől függően egy egyensúlyi állapot alakul ki (2. B ábra) (Schafer & Bowler 2002). Bár a fitokróm-szabályozta biológiai folyamatok egy részét távoli vörös fény gátolja (pl.: csírázás) fontos megjegyezni, hogy távoli vörös fényben is létrejön aktív P_{fr} fitokróm, de ez az összes fitokrómnak legfeljebb 2-3%-a. Ezzel szemben intenzív vörös fényben (660 nm) a fitokrómok kb. 85%-a aktív P_{fr} konformációban van (Casal és mtsai. 1998). A két forma részben átfedő abszorpciós spektrumai miatt ez az elérhető legnagyobb P_{fr} / P_{tot} arány. Az, hogy egy fitokróm szabályozta folyamat gátolt vagy aktivált, az adott folyamat P_{fr} küszöbétől függ. (Lásd bővebben: 1.4.9).

Mivel ez a munka a fitokrómok NTE doménjének a jelátvitelben betöltött szerepével foglalkozik, fontos megemlékeznünk az NTE domén $P_r \rightarrow P_{fr}$ átmenetet követő konformációs



2. ábra – A fitokrómok hullámhossz-függő viselkedése.

A) A fitokrómok két konformerének, – P_r és P_{fr} – abszorpciós spektrumai (Kami és mtsai. 2010). **B)** A különböző hullámhosszúságú fénykezelés hatására kialakuló $P_{fr} - P_{tot}$ egyensúly (Hanke és mtsai. 1969) **C)** A P_r - P_{fr} egyensúly sémája és a fitokromobilin kromofór izomerizációja. A vörös ovális az N-terminális, a kék ovális a C-terminális domént reprezentálja. A fitokrómok fényfüggő konformációváltozását vörös fény (660nm) erősen P_{fr} képződés, távoli vörös fény erősen P_r képződés irányába tolja. A panel szélén a fitokromobilin kromofór konformációja látható P_r (bal oldal) és P_{fr} állapotban (jobb oldal) (Andel és mtsai. 1996).

változásairól. Az NTE domén csak növényi fitokrómokban fordul elő, móltömege kb. 6 kDa. P_r állapotban random helikális másodlagos szerkezetet mutat, mely a P_{fr} átalakulás után α -helikális szerkezetbe rendeződik. Feltehetően kölcsönhatásban áll a kromofórral és a molekula egyéb doménjeivel is (Vierstra és mtsai. 1987; Singh & Song 1989; Deforce és mtsai. 1994). Számos szerin aminosav oldallánc található ebben a régióban, melyek minden bizonnyal foszforiláltak (Stockhaus és mtsai. 1992). Deléciók és szubsztitúciós változatait kifejező növényekkel végzett kísérletek arra utalnak, hogy az NTE régió szerepet játszik a fehérje és a P_{fr} forma stabilizálásában, valamint fontos a jelátvitel modulációjában (Cherry és mtsai. 1992; Trupkin és mtsai. 2007).

A fitokrómok fizikai tulajdonságai és fiziológiai hatásai között fennálló összefüggéseket viszonylag gyorsan feltárták. Azonban a fényérzékelést és a fiziológiai választ összekötő jelátviteli folyamatokról nagyon kevés adat állt rendelkezésre és még ma is számos nyitott kérdéssel állunk szemben.

1.4.4 – Az aktív fitokrómok inaktivációja

A receptorok működésének célja a környezeti tényezők változásainak folyamatos követése. Az általuk felfogott és továbbított jel fontos szerepet játszik az életfolyamatok szabályozásában és ezen keresztül a belső egyensúly, – a homeosztázis – fenntartásában. A folyamatosan változó környezet és a receptorok közvetítette információ szinkronizálásában kiemelkedően fontos az aktivált receptorok inaktivációja. E nélkül a folyamat nélkül az aktív receptorok felhalmozódnak, ami a jelátviteli lánc folyamatos aktiválását vonja maga után. Ezzel az életfolyamatok szabályozása a környezet változásától függetlenné válik, ami fitness csökkenését, szélsőséges esetben az élőlény kimerülését, akár pusztulását is okozhatja.

Sötétben csírázó, etiolált csíranövényekben a PHYA fehérje a domináns, fényérzékelésért felelős receptor. A P_r formában szintetizálódó PHYA fehérje felhalmozódik, ami biztosítja a PHYA rendszer kiemelkedő fényérzékenységét. Ilyen körülmények között a PHYA az összes fitokrómtartalom 85%-át teszi ki (Sharrock & Clack 2002). Fény hatására a PHYA P_{fr} formába alakul és ezzel aktiválódik a PHYA jelátviteli hálózata, ami egy sor drámai változást indít el génkifejeződés szabályozásában (Peschke & Kretsch 2011). Ezek a változások biztosítják a növény túlélését és fejlődését napfényben. Ezzel a folyamattal párhuzamosan megindul aktivált PHYA fehérjemolekulák gyors degradációja, ami eltávolítja az aktivált P_{fr} PHYA receptormolekulákat a rendszerből (Sharrock & Clack 2002). Mesterségesen adagolt proteozóma gátlószerek lassítják a P_{fr} PHYA degradációját, ami az E3 ubikvitin ligázok és a

26S proteoszóma szerepét bizonyítják a PHYA degradációjában. A *COP1* E3 ubikvitin ligáz az egyik fehérje, melynek központi szerepe bizonyított a fényaktivált PHYA degradációjában (Seo és mtsai. 2004). Az eddigi kutatások alapján úgy tűnik, hogy több fehérje-komplex is szerepet játszik a PHYA lebontásában: *cul1* (*cullin 1*) mutáns növényekben a PHYA megnövekedett stabilitást mutat (Quint és mtsai. 2005), továbbá a *COP1* részt vesz a *CUL4* (*CULLIN 4*) alkotta E3 ubikvitin ligáz komplexek felépítésében is (Zhang és mtsai. 2008). A P_{fr} PHYA degradációjának sebessége a sejten belüli elhelyezkedésétől is függ: a citoplazmában lassabb, míg a sejtmagban számottevően gyorsabb a lebomlása (Debrieux & Fankhauser 2010).

Fehér fényben nőtt növényekben a PHYB az összes fitokrómtartalom 40%-át teszi ki. A PHYB a PHYA-tól eltérően fényben stabil fehérje és a fényben fejlődő növény fő fotoreceptora (Sharrock & Clack 2004). Az aktív, P_{fr} PHYB fotoreceptorok inaktivációja a spontán relaxáción keresztül valósul meg, melynek következtében inaktív P_r formába alakulnak vissza (Eichenberg és mtsai. 1999). A jelenséget sötét reverzió névvel illeti a szakirodalom. Ez a név félrevezető, mivel a sötét reverzió fénykörülményektől függetlenül zajlik. Hajtóereje a P_{fr} PHYB kisebb termodinamikai stabilitása, aminek következtében a PHYB P_{fr} formája bizonyos idő után visszaalakul inaktív P_r formába (K. Eichenberg és mtsai. 2000). Ennek a relaxációs folyamatnak a féléletideje kb. 60 perc (lásd: eredmények). Ez a relaxációs folyamat is befolyásolja a kialakuló egyensúlyi PHYB P_{fr} mennyiséget azzal, hogy aktív PHYB P_{fr} molekulákat von ki a rendszerből. Mivel a fotokonverzió vörösben gazdag és intenzív fényben sokkal gyorsabb folyamat, a sötét reverzió hatása elsősorban alacsony fényintenzitáson és a fényperiódust követő sötét időszakban (pl.: napnyugta után) érvényesül.

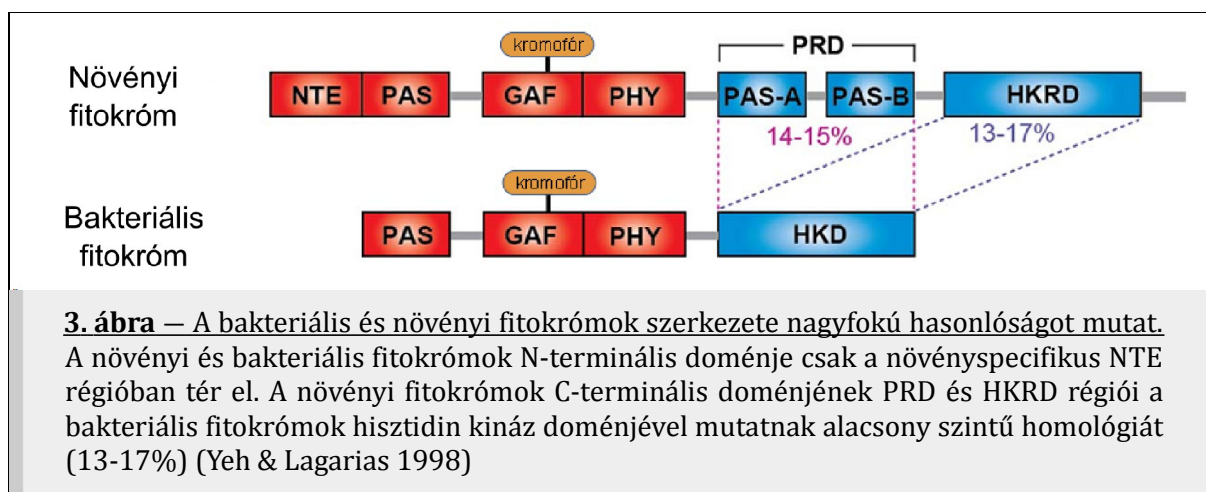
1.4.5 – A fitokrómok evolúciós eredete

Úgy tűnt, hogy a növényi fitokrómok jelátvitelének megértéséhez a különböző organizmusokból származó, egyre szaporodó génszekvenciák analízise vezet majd el. Az izolált fitokrómokat kódoló gének analízise feltárta a fitokrómok evolúciós eredetét és fényt derített arra, hogy a bakteriális fitokrómok jól karakterizált bakteriális kétkomponensű rendszerként működnek (Yeh és mtsai. 1997).

A cianobaktériumokban előforduló bakteriális fitokrómok fény hatására bekövetkező konformáció-változása során a molekula egy evolúciósan konzervált helyzetű hisztidin oldallánca autofoszforylálódik, majd ez a foszfát csoport tovább adódik a válaszregulátorra,

ami gének kifejeződését indítja be. Ezt a folyamatot távoli vörös fény serkenti, míg a vörös fény gátolja (ellentétben a növényi fitokrómokkal, melyeket a vörös fény aktivál) (Yeh és mtsai. 1997). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a bakteriális fitokrómok jelátvitelében a foszforiláció egy fontos, korai eseménye a bakteriális fitokrómok közvetítette fényérzékelésnek. A növényi és bakteriális fitokrómok rendkívül hasonló szerkezete és funkciója alapján valószínűnek tűnt, hogy növényi fitokróm jelátvitel a bakteriális rendszerhez hasonlóan foszforilációs reakciókon keresztül valósul meg (Yeh & Lagarias 1998). A kísérletek azonban megmutatták, bár a növényi fitokrómok mutatnak *in vitro* szerin/treonin kináz aktivitást, a baktériumokban esszenciális szerepet játszó konzervált aminosavak növényi homológjainak mutációja nem okozott számottevő változást a növényi fitokrómok jelátvitelében (Quail 1997; Yeh & Lagarias 1998).

Ezidáig mindössze a zab (*Avena sativa*) *phyA*-ról bizonyított *in vivo*, hogy rendelkezik kináz aktivitással (Shen és mtsai. 2009). *In vitro* kísérleti rendszerben a növényi fitokrómok szerin/treonin kináz aktivitást mutatnak. Ezekhez az információkhoz hozzáadva a tényt, hogy a növényi fitokrómok bakteriális homológjaiktól eltérően két szerin gazdag régióval is rendelkeznek (NTE, PRD) arra utal, hogy a növényi fitokrómok feltehetően bakteriális hisztidin kináz eredetű szerin/treonin kinázok (Yeh & Lagarias 1998; Phee és mtsai. 2008). A növényi és bakteriális fitokrómok hasonló szerkezetét a 3. ábra mutatja be.



1.4.6 – A fitokrómok kináz aktivitása és autofoszforilációja

A fitokrómok eredete és sok *in vitro* eredmény utal arra, hogy a fitokrómok jelátvitelében a fitokrómok kináz aktivitása fontos szerepet játszhat (Wong és mtsai. 1986). Sajnos az ezzel kapcsolatos eddigi eredmények nem teljesen egybehangzóak, így nem tömöríthetők egyetlen modellben.

A fitokrómok kináz aktivitásával kapcsolatban felmerülő kérdések közül az egyik

legfontosabb, hogy a P_r , vagy a P_{fr} forma rendelkezik-e nagyobb aktivitással. Az elmúlt évek során számos fehérjét fedeztek fel, melyeket a fitokrómok P_{fr} formájukban foszforilálnak *in vitro* rendszerben. Ilyenek a kriptokrómok (CRY1, CRY2), a PKS1 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1) és a PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3) transzkripciós faktor (Ahmad és mtsai. 1998; Fankhauser és mtsai. 1999; Al-Sady és mtsai. 2006). Találtak azonban olyan kölcsönható partnereket is, melyeket a P_r és a P_{fr} forma egyformán képes foszforilálni. Ide tartoznak az AUX/IAA fehérjék valamint az FHY1 (FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL 1) fehérjék (Colon-Carmona és mtsai. 2000; Shen és mtsai. 2009).

A fitokrómok kináz aktivitásával kapcsolatos másik fontos kérdés, hogy képesek-e autofoszforilációra és ez milyen szerepet játszik jelátvitelükben. Sajnos ezzel a kérdéssel kapcsolatban is csak *in vitro* eredményekre támaszkodhatunk. Zab (*Avena sativa*) PHYA fehérjéről bebizonyosodott, hogy *in vitro* képes két szerin oldalláncot autofoszforilálni a fehérje NTE régiójában. Ezt a két szerin aminosavat alaninra cserélve és mutáns fehérjét (PHYA^{Ser8,12Ala/Ser18Ala}) *Arabidopsis phyA* null mutánsban (*phyA-201*) a kifejezve a növények megnövekedett fényérzékenységet mutattak. A jelenség hátterében feltehetően a PHYA^{Ser8,12Ala/Ser18Ala} fehérje számottevően csökkent degradációja áll (Han és mtsai. 2010). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a PHYA autofoszforilációja egyfajta deszenzitizációs mechanizmus része lehet.

A PHYB esetében mindössze egy tanulmányban utalnak a PHYB fehérje autofoszforilációs képességére. *In vitro* a PHYB távoli vörös fényben (P_r formában) és vörös fényben (P_{fr} formában) is egyforma szintű autofoszforilációra képes. A PHYB NTE régióját nem tartalmazó PHYB($\Delta 100$) fehérje azonban nem volt képes autofoszforilációra (Phee és mtsai. 2008). Bár ezek az eredmények *in vitro* rendszerben születtek és a szerzők nem vizsgálták esetleges *in vivo* hatását, kísérleteik egy nagyon hasonló mechanizmust vázolnak fel, mint amit a zab fitokróm esetében Han és munkatársai találtak.

1.4.7 – A fitokrómok jelátviteli hálózata

Sajnos a növényi fitokrómok evolúciós eredetének feltárása nem vezetett el a jelátviteli láncuk megismeréséhez. Ezért a fitokróm kutatás következő szakaszában mutagenizált magpopulációk fenotipizálása és a sérült fotomorfogenezis hátterében álló mutáns gének térképezésével, fiziológiai jellemzésével és reverz-genetikai módszerek segítségével próbálták e jelátviteli lánc elemeit megtalálni. Az így felfedezett géneket szerepük alapján

két főkategóriába sorolhatjuk: amelyek **i)** negatívan és amelyek **ii)** pozitívan befolyásolják a fitokrómok jelátvitelét.

A jelátvitel **negatív elemei** közé tartozó faktorok funkciójának sérülése, vagy elvesztése a fotomorfogenezis programjának fényviszonyoktól független aktivitásával jár (akár állandó sötétben fejlődve is fényben nőtt növényekre hasonlítanak). Ebbe a csoportba tartoznak a szkotomorfogenezis programjának megvalósításában kulcsszerepet játszó PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) transzkripció faktorok, valamint a fotomorfogenezis kialakításáért felelős transzkripció faktorok degradációját elindító E3 ubikvitin ligáz komplexeket felépítő fehérjék: COP1, DET (DEETIOLATED), FUS (FUSCA).

A jelátvitel **pozitív elemei** közé tartozó gének funkciójának sérülése, vagy elvesztése a növény csökkent fényérzékenységéhez vezetnek. Ide soroljuk azokat a fitokróm allélokat, melyek csökkent jelátviteli képességgel rendelkeznek, valamint a fotomorfogenezis kialakításáért felelős gének kifejeződését aktiváló transzkripció faktorok: HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5), HYH (HY5 HOMOLOG), LAF1 (LONG AFTER FAR-RED 1), HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1) stb.

1.4.7.1 — A fitokróm jelátvitel negatív elemei

A PIF3 fehérjét élesztő két hibrid rendszer segítségével azonosították, mint a PHYB közvetlen kölcsönható partnere (Ni és mtsai. 1998). DNS szekvenciájuk homológiája alapján azonosították a család többi, összesen 15 tagját (Ni és mtsai. 1998; Leivar & Quail 2011). Mindegyikük a basic helix-loop-helix (bHLH) transzkripció faktorok csoportjába tartozik, ennek megfelelően dimerként funkcionálnak és képesek bizonyos DNS szakaszok, az úgynevezett G-box (CACGTG) kötésére (Castillon és mtsai. 2007; Leivar & Quail 2011). A PIF-ek N-terminálisa tartalmaz egy konzervált motívumot, amit Active Phytocrome B-binding-nak (APB) neveznek. Ez a régió felelős a PHYB P_{fr} formájával való kölcsönhatás kialakításáért. A PIF1 és a PIF3 fehérjék tartalmaznak egy másik nem konzervált motívumot is, amit Active Phytocrome A-binding-nak (APA) hívnak, mely a PHYA P_{fr} formájával való kölcsönhatást teszi lehetővé (Khanna és mtsai. 2004; Duek & Fankhauser 2005). A legtöbb PIF a fitokrómokkal való kölcsönhatás következtében foszforilálódik, amit ubikvitinációjuk és a 26S proteoszóma rendszeren keresztül történő lebontásuk követ (Al-Sady és mtsai. 2006). A PIF géncsalád ezen tagjainak aktív fitokróm (P_{fr}) függő degradációját a következő egyszerű kísérlet is bizonyítja. Fényben nőtt növényekben a PIF-ek fehérjeszintje nagyon alacsony a magas aktív (P_{fr}) fitokróm szintnek köszönhetően. Ha

ezeket a növényeket sötét kezelésnek vetjük alá, a fitokrómok P_{fr} szintje a sötét reverzió (PHYB) és a degradáció (PHYA P_{fr}) következtében csökken, ami a PIF-ek felhalmozódását vonja maga után. Fénybe visszahelyezve a növényeket az aktív fitokrómok (P_{fr}) újbóli felhalmozódásával a PIF-ek is gyors degradáción mennek keresztül és így a PIF-ek fehérjeszintje ismét lecsökken (Leivar & Quail 2011). A PIF-ek fitokróm P_{fr} forma függő degradációjának további bizonyítékául szolgált azoknak a PIF1 és PIF3 mutáns molekuláknak vizsgálata, amelyeknek APB és APA régióit elrontották. Ezek a verziók, – vad típusú verzióikkal ellentétben – nem mutatnak fényfüggő foszforilációt és degradációt (Al-Sady és mtsai. 2006; Shen és mtsai. 2008). A PIF-eknek a fitokrómok jelátvitelében és a szkotomorfogenezis programjának megvalósításában játszott központi szerepére világít rá egy nemrégiben közölt tanulmány, amiben a négy mutáns *pif* gént hordozó növények (*pif1/pif3/pif4/pif5* – quadruple *pif*, vagy *pifq*) fejlődését vizsgálták. Ezekben a növényekben a fényviszonyoktól függetlenül a fotomorfogenezis fejlődési programja aktív. Ez alapján nem meglepő, hogy a *pifq* növényekben a génkifejeződés szabályozása is függetlenné vált a fényviszonyoktól: a sötétben nőtt *pifq* növények a vörös fényben fejlődő, vad típusú növényekére jellemző génkifejeződési mintázatot mutatnak (Shin és mtsai. 2009). Feltehetően a *pifq* és a vörösben nőtt növényekben egyaránt kifejeződő gének azok, amelyeket a PIF-ek közvetlenül szabályoznak. A PIF-ek sötétben feltehetően gátolják ezeknek a géneknek a kifejeződését, melyek között feltűnően nagy számban fordulnak elő transzkripciós faktorok (Leivar & Quail 2011). Ezen információk alapján nagyon valószínű, hogy a PIF transzkripciós faktorok fő szabályozó elemei a szkotomorfogenezis kialakításáért felelős transzkripciós faktorokból álló kaszkád rendszernek.

A fitokróm jelátvitelben kiemelkedő szerepet játszó gének következő csoportjába tartoznak a *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)*, *DEETIOLATED (DET)* és a *FUSCA (FUS)*. Mindannyiukra jellemző, hogy mutáns alléljaikat hordozó növények a *pifq* növényekéhez hasonlóan fényviszonyoktól függetlenül, a fényben fejlődő növényre jellemző fejlődési mintázatot mutatnak (Sullivan és mtsai. 2003; Yi & Deng 2005). Az említett három gén által kódolt fehérjék három fehérjekomplex felépítésében játszanak szerepet: a COP1/SPA (*SUPPRESSOR OF phyA-105*) komplex; a COP9 szignálszóma (CSN); és a COP10, DDB1 (DNA DAMAGE-BINDING PROTEIN 1) és a DET alkotta CDD komplex (Zhu és mtsai. 2008; Serino & Deng 2003; Yanagawa és mtsai. 2004). Mindhárom komplex az E3 ubikvitin ligázok körébe tartozik és mindannyian a fotomorfogenezis programjának megvalósításában kulcsszerepet játszó transzkripciós faktorokat ubikvitinálják, amivel a

26S proteoszóma általi lebontásukat idézik elő (Saijo és mtsai. 2003; Yi & Deng 2005).

A COP1 fehérje mindhárom említett E3 ligáz komplexben megtalálható. N-terminálisán konzervált RING finger motívumot, C-terminálisán WD40 ismétlődést tartalmaz, amiket csavart-csavar (coiled-coil) motívum köt össze (Yi & Deng 2005). A WD40 domén kiemelten fontos a COP1 működésében, mivel ennek a régiónak köszönhetően hat kölcsön HY5 és a HYH transzkripciós faktorokkal (Holm és mtsai. 2001), és több aktivált fotoreceptorral is (pl.: CRY1/CRY2, UVR8) (Yang és mtsai. 2001; Rizzini és mtsai. 2011).

A COP1 szerepe a következő transzkripciós faktorok ubiquitinációjában és lebontásában bizonyított: ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) (Osterlund és mtsai. 2000), HY5 HOMOLOG (HYH) (Holm és mtsai. 2002), LONG AFTER FAR-RED 1 (LAF1) (Seo és mtsai. 2003), LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED1 (HFR1) (Duek és mtsai. 2004). Ezen transzkripciós faktorok közös vonása, hogy mindannyian a fotomorfogenezis programjának kialakításáért felelős gének szabályozásában vesznek részt (lásd később). A COP1 komplexei a fitokrómok ubiquitinációjában és lebontásában is szerepet játszanak (Seo és mtsai. 2004). A COP1 növényi fejlődési programjának szabályozásában betöltött központi szerepét mutatja az is, hogy null mutáns allélja embrió-letális (McNellis és mtsai. 1994). Ezért a funkciójával kapcsolatos kutatási eredmények nagy része működésükben csökkent, mutáns allélok vizsgálatával születtek (pl.: *cop1-4*, aminek hiányzik a WD40 doménje, ezért aktivitása sérült) (Holm és mtsai. 2002).

A SPA1 fehérjét a *phyA-105*, - egy működésében sérült *phyA* mutáns - szupresszoraként azonosították (Hoecker és mtsai. 1998). *Arabidopsis*-ban négy homológjuk létezik (*SPA1* - *SPA4*), melyek részben átfedő funkcióval rendelkeznek a fotomorfogenezis szabályozásában (Laubinger & Hoecker 2003). Biokémiai vizsgálatuk során kiderült, hogy egymással és a COP1 fehérjével komplexekeket alkotnak. Azok a növények, amelyeknek nincs működőképes SPA génjük (*spa1/spa2/spa3/spa4* mutáns), erős *cop1* mutáns fenotípust mutatnak (Laubinger és mtsai. 2004). Ezek eredmények bizonyítják, hogy a COP1 és SPA fehérjék ugyanannak, vagy ugyanazoknak a komplexeknek a felépítésében vesznek részt és mindkettő szükséges e komplex működéséhez.

1.4.7.2 — A fitokróm jelátvitel pozitív elemei

A HY5 és HYH fehérjék bZIP transzkripciós faktorok. A *hy5* és/vagy *hyh* mutáns allélját hordozó növények minden fénykezelés esetében (távoli vörös, vörös, kék, UV-B) a vad típushoz képest csökkent válaszreakciót mutatnak (M. Koornneef 1980; Oyama és mtsai.

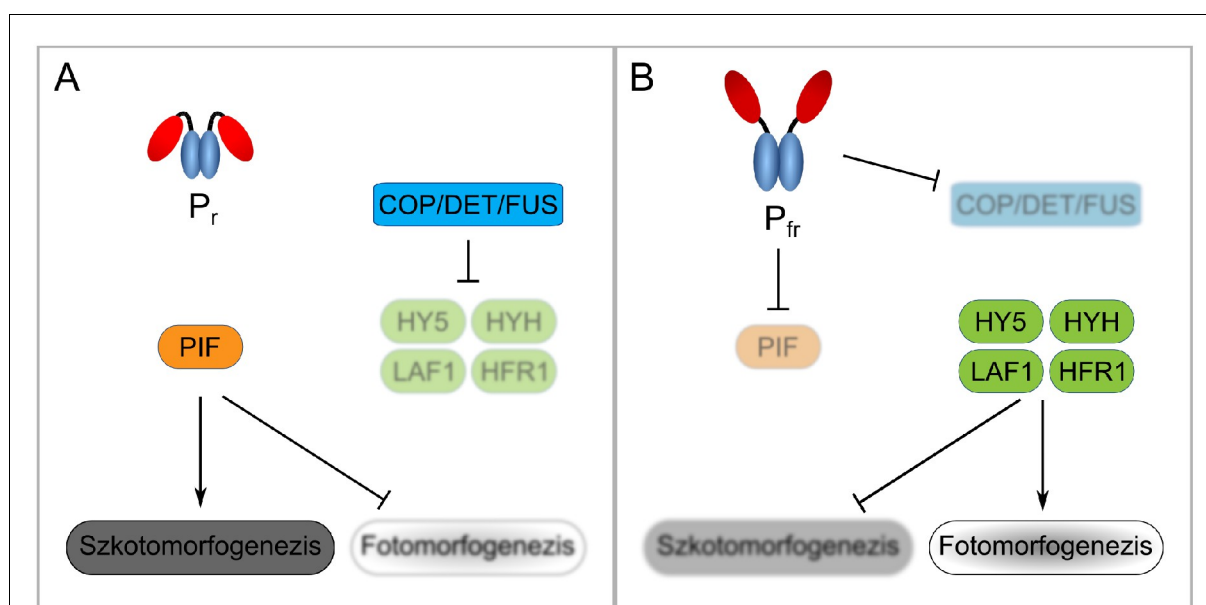
1997; Ulm és mtsai. 2004). A fénykezelés által kiváltott válaszreakció arányos a HY5 fehérje mennyiségével (Osterlund és mtsai. 2000). Kromatin immuno-precipitációs vizsgálatok alapján a HY5 transzkripció faktor nagyszámú gén promoteréhez kötődik és a fényfüggő aktivitást mutató gének kb. 20%-ának kifejeződését befolyásolja (Ma és mtsai. 2002). Ezen adatok alapján úgy tűnik, hogy a HY5 is egy transzkripció faktorokból felépülő kaszkárendszer fő szabályozó eleme (Lee és mtsai. 2007).

A HFR1 egy atipikus szerkezetű bHLH transzkripció faktor, amit a PHYA jelátvitel pozitív elemeként azonosítottak (Fairchild és mtsai. 2000; Fankhauser & Chory 2000; Soh és mtsai. 2000). Doménszerkezeti vizsgálata alapján a HFR1 valószínűleg nem képes DNS kötésre. Homodimerje (HFR1/HFR1) a fitokrómokkal nem képes közvetlen kölcsönhatásba lépni. (Fairchild és mtsai. 2000; Heim és mtsai. 2003). A HFR1 fehérje képes azonban más transzkripció faktorokkal heterodimereket képezni, – mint pl. a HFR1/PIF3 – mely már képes a PHYA és a PHYB P_{fr} formájával kölcsönhatásra (Fairchild és mtsai. 2000). Más transzkripció faktorokkal, mint pl.: a PIF4 és PIF5 fehérjékkel képzett heterodimerjei DNS kötésre képtelenek, ezzel a HFR1 gátolja az árnyékkerülés kialakításában szerepet játszó markergének kifejeződését (Sessa és mtsai. 2005; Hornitschek és mtsai. 2009; Galstyan és mtsai. 2011). Egy degradációjában sérült *hfr1* mutáns a *pifq* (*pif1/pif3/pif4/pif5*) mutánséhoz nagyon hasonló állandó fotomorfoenezist mutató fenotípust eredményez. Ezeket az adatokat összefoglalva, úgy tűnik, hogy a HFR1 funkciója a PIF transzkripció faktorok működésének szabályozása, nem funkcionális PIF/HFR1 heterodimerek képzésén keresztül (Yang és mtsai. 2003; Leivar és mtsai. 2008; Shin és mtsai. 2009).

A LAF1 az R2R3 MYB transzkripció faktorok családjába tartozik és a PHYA jelátvitel egyik pozitív elemeként azonosították. Ezidáig nem sikerült kimutatni közvetlen génaktivitást befolyásoló hatását (Ballesteros és mtsai. 2001). A *hfr1/laf1* dupla mutáns növények additív fenotípusa a PHYA jelátvitelben betöltött különböző szerepükre utal (Jang és mtsai. 2007). A LAF1 és a HFR1 transzkripció faktorok homodimerei képesek a COP1 E3 ubikvitin ligázzal kölcsönhatni, ami ubikvitinációjukat és degradációjukat vonja maga után (Seo és mtsai. 2004; Jang és mtsai. 2005; Jang és mtsai. 2007). Ezzel ellentétben a LAF1/HFR1 heterodimer nem képes a COP1-el kölcsönhatásba lépni, ami a HFR1 és a LAF1 fehérjék stabilizációját vonja maga után (Jang és mtsai. 2007).

1.4.7.3 – A fitokrómok jelátvitelének modellje

Ahogy azt már korábban említettem, az *Arabidopsis* fejlődési programja két fő szakaszra különíthető: a csírázás után sötétben zajló szkotomorfogenezisre és a fény hatására beinduló fotomorfogenezisre. Úgy tűnik, hogy ennek a két fejlődési programnak a génkifejeződés szintjén való megvalósulásáért két, transzkripciós faktorokból felépülő kaszkádrendszer felelős (Lee és mtsai. 2007; Shin és mtsai. 2009). A szkotomorfogenezist létrehozó jelátviteli hálózat központi elemei a PIF transzkripciós faktorok (Shin és mtsai. 2009; Leivar & Quail 2011), míg a fotomorfogenezist létrehozó rendszerben a HY5, HYH, LAF1, HFR transzkripciós faktorok játszanak kulcsszerepet (Lee és mtsai. 2007; Yang és mtsai. 2005; Jang és mtsai. 2007). Egyszerre mindig csak az egyik rendszer aktív és a közöttük való átkapcsolást a fényben aktivált fitokrómok (P_{fr}) végzik. Jelenlegi ismereteink szerint a fitokrómok jelátvitelére, – az előbbieken már említett pozitív és negatív elemekből felépülő – két ágra osztható (4. ábra).



4.ábra – A fitokrómok jelátvitelének vázlatos modellje.

A fitokróm jelátvitel elemei: a fitokróm fotoreceptorok, a COP/DET/FUS alkotta E3 ubikvitin ligáz komplexek, valamint a PIF és HY5, HYH, LAF1, HFR1 transzkripciós faktorok.

A) Sötétben: a PIF transzkripciós faktorok aktívak, míg a HY5, HYH, LAF1, HFR1 transzkripciós faktorokat a COP/DET/FUS fehérjék alkotta E3 ubikvitin ligáz komplexek folyamatosan ubikvitinálják, alacsonyan tartva ezzel fehérjeszintjüket.

B) Fényben: az aktív fitokrómok kölcsönhatnak a PIF-ekkel, ami foszforilációjukat és ezen keresztül gyors lebomlásukat idézi elő. Az aktív fitokrómok a COP1-el is kölcsönhatva megváltoztatják ezeknek az E3 ubikvitin ligáz komplexeknek a szubsztrát-specifitását, így stabilizálva a HY5, HYH, LAF1, HFR1 (stb.) transzkripciós faktorokat. (Részletes tárgyalást lásd a szövegben.)

Sötétben a negatív elemek aktívak: az E3 ubikvitin ligáz komplexek (COP, DET, FUS) működésének következtében a fotomorfogenezis programját megvalósító transzkripciós faktorok – a jelátvitel pozitív elemei – folyamatosan ubikvitinálódnak, emiatt fehérjeszintjük alacsony marad, működésük pedig gátolt (Ang és mtsai. 1998; Holm és mtsai. 2002). A PIF transzkripciós faktorok magas szinten halmozódnak fel a sejtben és aktiválják a szkotomorfogenezis programjának megvalósítását végző géneket (Leivar & Quail 2011). Ezzel egy időben a PIF-ek gátolják a fotomorfogenezis megvalósításában szerepet játszó gének kifejeződését is, ellensúlyozva az alacsony szinten azért jelen levő pozitív elemek hatását (Shen és mtsai. 2009) (4. ábra A panel).

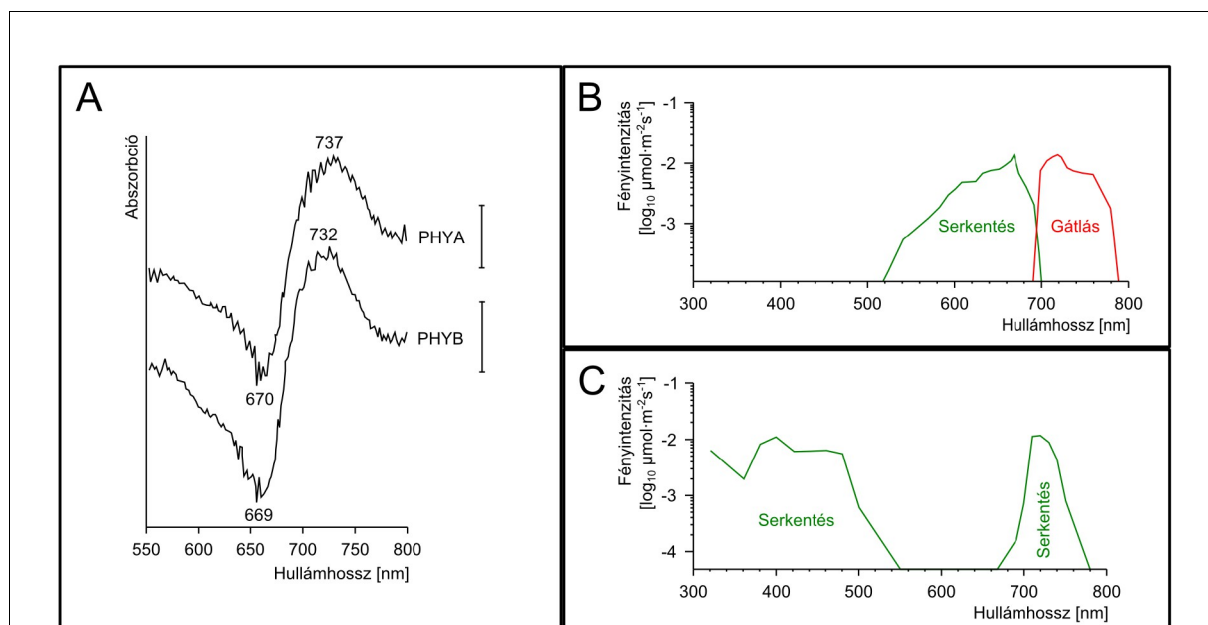
Fényben a pozitív elemek válnak aktívvá, miután a fény aktiválja a fitokrómokat. A fitokrómok P_{fr} formája kölcsönhatásba lép a PIF transzkripciós faktorokkal és a COP1 E3 ubikvitin ligázzal. E kölcsönhatás a PIF-ek foszforilációját és degradációját vonja maga után (Bauer és mtsai. 2004; Shen és mtsai. 2009), a COP1 felépítette E3 ubikvitin ligáz komplexeknek pedig megváltozik a szubsztrátspecifitásuk és a sejtben belüli lokalizációjuk (von Arnim & Deng 1994; Osterlund és mtsai. 2000). Ennek következtében az eddig (sötétben) lebontott HY5, HYH, LAF1 és HFR transzkripciós faktorok stabilizálódnak, felhalmozódásuk következtében pedig aktiválják a fotomorfogenezis programját megvalósító géneket (Lee és mtsai. 2007). Ezzel egy időben gátolják a szkotomorfogenezis megvalósítását végző gének kifejeződését, ellensúlyozva az alacsony szinten azért még jelen levő PIF-ek hatását (4. ábra B panel) (Lau & Deng 2010).

1.4.8 – A fitokrómok közvetítette válaszreakciók hullámhosszfüggése

A fényfüggő fiziológiai folyamatok hullámhosszfüggését az akcióspektrummal jellemezzük. Mivel a fotoreceptorok fotokémiai reakciók útján aktiválódnak, az általuk szabályozott fiziológiai válaszok hullámhossz függését alapvetően meghatározza abszorpciós spektrumuk. A fitokrómok esetében már régóta ismert tény, hogy két eltérő konformációban léteznek, melyek aránya a az őket érő fény hullámhossz összetételétől függ (2. ábra A és B panel).

A PHYA és a PHYB fehérjék nagyon hasonló, mégsem azonos abszorpciós spektrumokkal rendelkeznek (5. ábra), ami arra enged következtetni, hogy a kromofór fényelnyelése nem teljesen független a fehérjeszekvenciától (K Eichenberg és mtsai. 2000). A PHYA és a PHYB által szabályozott fiziológiai folyamatok merőben eltérő hullámhosszfüggése azonban nem magyarázható a két molekula abszorpciós spektrumainak csekély eltéréseivel.

A PHYB esetében a fiziológiai folyamatokat az aktív P_{fr} forma létrejöttét kiváltó vörös fény serkenti, míg az inaktív P_r forma létrejöttét kiváltó távoli vörös fény gátolja (Shinomura és mtsai. 1996). Vagyis a PHYB szabályozta folyamatok erős korrelációt mutatnak a molekula abszorpciós spektrumával: vörös fény erősen serkentő, míg távoli vörös fény erősen gátló hatású (5 ábra A és B panel). Ezzel ellentétben a PHYA szabályozta folyamatokat legjobban a 720 nm hullámhosszúságú fény serkenti, ahol a PHYB jelátvitele gátolt. (Shinomura és mtsai. 2000). Ez a jelenség látszólagos ellentmondásban áll a PHYA fotoreceptor abszorpciós tulajdonságaival is, hiszen 720 nm-es fénykezelés hatására az összes PHYA-nak mindössze 2-3%-a alakul P_{fr} formába. A PHYA mégis itt a legaktívabb a fiziológiai folyamatok szabályozásában. A jelenség hátterében a PHYA fehérjeszintjének és sejtmagi importjának összetett szabályozása áll. Etiolált növényekben a PHYA a legnagyobb



5. ábra – A PHYA és PHYB fehérjék differenciál spektrumai hasonlóak, míg akcióspektrumaik erősen eltérőek

A – Az élesztőben kifejezett és fikokromobilin kromofórt tartalmazó PHYA és a PHYB fehérjék differenciál spektrumai. A két fehérje P_r és P_{fr} formái kissé eltérő abszorpciós maximumokkal rendelkeznek. A jobb oldali sávok 0,003 abszorpció különbséget jelölnek (K Eichenberg és mtsai. 2000).

B – A PHYB szabályozta csírázás akcióspektruma *phyA* mutáns háttérben. A P_{fr} formát létrehozó vörös fény serkenti, míg a P_r formát létrehozó távoli vörös fény gátolja az *Arabidopsis* magok csírázását (Shinomura és mtsai. 1996).

C – A PHYA szabályozta hipokotil megnyúlás akcióspektruma *phyB* mutáns háttérben. A PHYB-vel ellentétben a P_{fr} formát létrehozó vörös fény gátló, míg a P_r formát létrehozó távoli vörös fény serkentő hatású az *Arabidopsis* csíranövények hipokotil megnyúlásának szabályozásában. A 300-500 nm közötti tartományban a főszerepet a CRY1/CRY2 fotoreceptorok játsszák. (Shinomura és mtsai. 2000).

mennyiségben jelenlevő fitokróm. Fény hatására azonban az aktivált PHYA P_{fr} molekulák gyors degradáción mennek keresztül, aminek sebességét az elérhető PHYA P_{fr} mennyiség határozza meg. Így vörös fényben, ahol magas P_{fr} arány jön létre a PHYA gyorsan lebomlik ezzel átadva a domináns szerepet a PHYB-nek a fiziológiai folyamatok szabályozásában (Sharrock & Clack 2002). Így a PHYA jelátvitelében van egy szűk hullámhossz és fényintenzitás tartomány ahol aktivitását kifejtheti: ebben a tartományban sejtmagi importja nagyon hatékony, degradációja pedig kellően lassú ahhoz, hogy kritikus szint alá süllyedjen koncentrációja a sejtben. Ennek a kritikus PHYA P_{fr} szintnek a létrehozására pedig 720 nm hullámhosszúságú fény a legalkalmasabb (Shinomura és mtsai. 2000; Rausenberger és mtsai. 2011).

1.4.9 – A fitokrómok közvetítette válaszreakciók

A fitokróm kutatás kezdetén a fitokrómok által befolyásolt válaszreakciókat a kiváltásukhoz szükséges fény dózisa alapján kategorizálták. Így a fitokrómok hatását három kategóriába sorolták: **i)** nagyon alacsony fénydózist (very low fluence response - VLFR), **ii)** közepes fénydózist (low fluence response - LFR), **iii)** és magas fénydózist (high irradiance response - HIR) igénylő élettani folyamatokra (6. ábra) (Schafer & Bowler 2002).

A VLFR válaszra jellemző, hogy olyan extrém alacsony fényintenzitás képes kiváltani, amelyre semmilyen más fotoreceptor nem reagálna (Hennig és mtsai. 1999; K. Eichenberg és mtsai. 2000). A folyamat hátterében a PHYA fehérje kimagasló fényérzékenysége áll. Mivel a PHYA fény hatására gyorsan elbomlik, a VLFR válasz jellemzően a növény korai életszakaszához kötődik. Ide tartozik a csírázás indukciója, a szkotomorfogenezis - fotomorfogenezis programjai közötti átkapcsolás. Amikor a növényke eléri a felszínt, PHYA fényaktivációjának következményeként a hipokotil kampó kiegyenesedik, a sziklevelek pedig kinyílnak (Casal és mtsai. 1998). Ezeknek az élettani folyamatok szintjén megfigyelhető változásoknak a hátterében komoly, a gének kifejeződésében bekövetkező változások állnak. Beindul az érett kloroplasztiszok létrejöttéhez szükséges fehérjéket kódoló gének kifejeződése és a fény indukálja a cirkadián óra beállításához esszenciális géneket (pl.: a *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9 - PRR9*) (Khanna és mtsai. 2004). Ezek a folyamatok mind részei a szkotomorfogenezis és a fotomorfogenezis programjai közötti átkapcsolásnak, vagy más néven a de-etiolációnak. A VLFR válasz távoli vörös fény kezeléssel nem fordítható vissza, mivel a VLFR reakciók beindítása olyan alacsony P_{fr}/P_{tot}

szintekhez kötött, amit a távoli vörös fény által létrehozott P_{fr} arány (~2-3%) többszörösen felülmúl. A VLFR válaszra nem igaz a reciprocitás törvénye, ami azt jelenti, hogy a fénykezelés dózisa és a kiváltott VLFR válasz erőssége között nem-lineáris összefüggés áll fenn (Casal és mtsai. 1998).

Az LFR válaszok közé a legkorábban felfedezett fitokrómok szabályozta élettani folyamatokat soroljuk. Melyek pl. a már említett saláta magvak csírázási indukciója, vagy a PHYB sejtmagi komplex képzése *Arabidopsis*-ban (Adam és mtsai. 2011). Az LFR reakciók kiváltásában a fényben stabil fitokrómok vesznek részt, melyek *Arabidopsis*-ban a PHYB, C, D és E fehérjék. Az LFR reakciók hátterében elsősorban a PHYB fehérje áll. Az ide tartozó válaszok határozott hullámhosszfüggést mutatnak: vörös fény serkenti, míg távoli vörös fény gátolja őket (a válaszreakció megfordítható). Az LFR reakciókra érvényes a reciprocitás törvénye, vagyis a válasz erőssége a fénykezelés dóziséval egyenes arányban áll (Casal és mtsai. 1998).

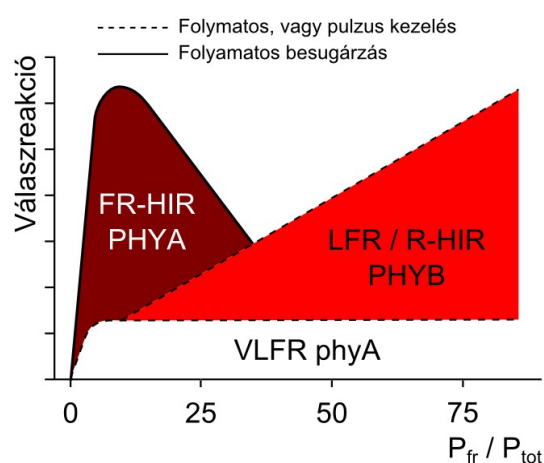
A HIR válasz kiváltásához nagy intenzitású, folyamatos fénykezelés szükséges. A fénykezelésbe beiktatott rövid megszakítások is a válasz drasztikus csökkenéséhez vezetnek (Buche és mtsai. 2000). Ide tartozó válaszreakció a csíranövények hipokotil megnyúlásának fényfüggő gátlása. Mind a PHYA, mind a PHYB képes HIR választ kiváltani, így HIR választ két altípusba soroljuk: **i)** a távoli vörös fényvel (far red - FR) kiváltható FR-HIR és **ii)** a vörös fényvel (red - R) kiváltható R-HIR. Az FR-HIR válasz kiváltásában szerepet játszó PHYA szintje csak távoli vörös fényben (700-730 nm) csírázó növényekben elég

6. ábra – A fitokrómok válaszreakcióinak függése a P_{fr}/P_{tot} aránytól

VLFR: etiolált csíranövényekre jellemző, bármilyen színű fény képes kiváltására, nem visszafordítható és nem igaz rá a reciprocitás törvénye.

LFR: ezek a reakciók visszafordíthatóak: vörös fény serkenti, távoli vörös fény gátolja őket, a fénydózissal arányos a válasz erőssége (igaz a reciprocitás törvénye).

HIR: ez a válasz nem visszafordítható, kiváltásához folyamatos besugárzásra van szükség. Vörös fényben a PHYB, távoli vörös fényben a PHYA játsza a főszerepet szabályozásában. Nem igaz rá a reciprocitás törvénye. (Casal és mtsai. 1998)



magas a válasz szabályozásához (Casal és mtsai. 1998). Ha a növényeket rövidebb hullámhosszúságú fénykezelésnek (<700 nm) tesszük ki, a PHYA szintje gyorsan és drasztikusan csökken, ami a FR-HIR válasz erősségének csökkenését vonja maga után. Ahogy a PHYA fehérje szintje csökken a rövidebb hullámhosszú fénykezelés következtében, úgy nő az aktív PHYB P_{fr} szintje és ezzel a fényérzékelésben a domináns szerepet a PHYB veszi át (Sharrock & Clack 2002). A FR-HIR és a R-HIR válaszok P_{fr} küszöbszintje nagyban eltér: a FR-HIR 2-3% P_{fr}/P_{tot} PHYA szinteknél a legaktívabb, míg a R-HIR kiváltásához nagyon magas PHYB P_{fr} szintek szükségesek. A HIR válasz nem reverzibilis és nem érvényes rá a reciprocitás törvénye sem (Casal és mtsai. 1998).

A HIR válasz laboratóriumi jelenség, hiszen a természetben nem fordul elő, hogy csak vörös, vagy csak távoli vörös fény érne egy csíranövényt. Ennek ellenére a HIR válasz tanulmányozása hasznos információkkal szolgált a vörös és távoli vörös fényt érzékelő rendszerek (PHYA és PHYB) kölcsönhatásáról és a de-etioláció során lezajló eseményekről. A fitokrómok válaszreakcióit a 6. ábra foglalja össze.

1.4.10 – A fitokrómok sejten belüli dinamikája

Korai biokémiai adatok alapján úgy tűnt, hogy a fitokrómok a citoplazmában elhelyezkedő és működő fotoreceptorok (Nagy & Schafer 2000). Az elmúlt évtized kutatásai során azonban bebizonyosodott, hogy a fitokrómok csak akkor működőképesek, ha a sejtmagban lokalizáltak (Matsushita és mtsai. 2003). Mivel a szintézisük a citoplazmában történik és méretüknél fogva nem képesek a magpórusokon átjutni, sejtmagi transzportjuk más fehérjékkel való kölcsönhatáson keresztül megvalósuló aktív transzport (Hiltbrunner és mtsai. 2006; Pfeiffer és mtsai. 2012). Ezt a modellt erősíti, hogy a fitokrómok fehérjeszekvenciája nem tartalmaz kanonikus NLS szekvenciát (nuclear localization signal).

1.4.10.1 – A sejtmagi import

A PHYA és a PHYB sejtmagi importjának dinamikája erősen eltérő. A PHYA sejtmagi importja meglehetősen gyors folyamat, amit vörös, távoli vörös és kék fény is képes indukálni (Hisada és mtsai. 2000; Kim és mtsai. 2000; Kircher és mtsai. 2002). A PHYA sötétben szigorúan a citoplazmában található, azonban már egy rövid, néhány perces fényimpulzus hatására a sejtmagba kerül (Kim és mtsai. 2000). Mivel vörös fényben a PHYA gyorsan elbomlik és csak távoli vörös fényben stabil, hosszú távon csak a távoli vörös fény képes kiváltani és fenntartani a PHYA sejtmagi importját. Ezek alapján elmondható, hogy a

PHYA sejtmagi importja a VLFR és a FR-HIR válaszok körébe sorolható folyamatok (Kim és mtsai. 2000).

A PHYA sejtmagi importja két növény-specifikus fehérjétől függ: az FHY1 (FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL 1) és az FHL (FHY1 LIKE), amiket mutánsanalízis során fedeztek fel (Whitelam és mtsai. 1993). Ezek a gének két viszonylag kis méretű fehérjét kódolnak (kb. 200 aminosav), melyek mind egyszikűekben, mind kétszikűekben előfordulnak. Mindkettő tartalmaz NLS (nuclear localization signal) és NES (nuclear exclusion signal) fehérjemotívumot az N-terminálisukon, valamint egy szeptinekkel rokon domént (SRD - septin related domain) a C-terminálisukon (Desnos és mtsai. 2001; Zhou és mtsai. 2005). Ez utóbbi a PHYA P_{fr} formájának specifikus kötésében játszik esszenciális szerepet. A későbbi kísérletek során kiderült, hogy az FHY1 és FHL működése szempontjából az NLS és a SRD motívumok a legfontosabbak: vírus eredetű NLS szekvencia és az SRD domén fúziójával egy működőképes, mesterséges „FHY1” molekulát hozhatunk létre (Genoud és mtsai. 2008). Az FHY1 és FHL molekulák esszenciálisak a PHYA jelátvitelében, hiányukban a PHYA jelátvitel nem működik, a növények „vakok” távoli vörös fényre (Hiltbrunner és mtsai. 2006).

A PHYB-GFP fúziós fehérje vizsgálata során derült fény a PHYB fényfüggő intracelluláris dinamikájára (Kircher és mtsai. 1999). Sötétben nőtt növényekben a PHYB fehérje nagyrészt a citoplazmában található, azonban a sejtmag is tartalmaz jól detektálható mennyiségű PHYB fehérjét. Folyamatos fénykezelés hatására a PHYB sejtmagi szintje számottevően megemelkedik. Leghatékonyabban a vörös, kismértékben a kék fény is elősegíti ezt a folyamatot (Gil és mtsai. 2000). A PHYA-val ellentétben a PHYB sejtmagi importja lassú, legalább 1 órás fénykezelést igénylő folyamat (lásd: eredmények). További különbség, hogy távoli vörös fénykezelés nem képes a PHYB sejtmagi importját indukálni. A PHYB sejtmagi felhalmozódása az LFR reakciókra jellemző viselkedést mutat. Vörös fényvel előkezelt növények esetében a távoli vörös fénykezelés a sejtmagi PHYB szintjének csökkenését idézi elő (Kircher és mtsai. 1999). Különböző csonka PHYB variánsok funkcionális vizsgálata tárta fel a PHYB C-terminális doménjének esszenciális szerepét a sejtmagi importban. A PHYB(1-651)-GFP (a PHYB 1-651 aminosavát tartalmazó fúziós fehérje) a citoplazmában, míg a PHYB(625-1172)-GFP fúziós fehérje a sejtmagban lokalizált (Matsushita és mtsai. 2003). A C-terminális domén további analízise során kiderült, hogy a sejtmagi importban a C-terminális domén PRD régiója (PHYB(594-917)) játssza a főszerepet. Ez a régió két PAS motívumot tartalmaz, mely fehérje-fehérje kölcsönhatások

kialakításáért felelős. A PRD régió az N-terminális doménnel is kölcsönhat P_{fr} függő módon. Ami arra enged következtetni, hogy a PRD régió a sejtmagi import mellett, intramolekuláris kölcsönhatásokon keresztül a $P_r \rightarrow P_{fr}$ átalakulás követte fehérjekonformációs változásokban is fontos szerepet játszik (Chen és mtsai. 2005), valamint feltehetően a P_{fr} formát stabilizálja. Ezidáig az egyetlen, a PHYB molekula sejtmagi transzportjában bizonyítottan szerepet játszó fehérje a PIF3 transzkripció faktor. Izolált *Acetabularia* sejtmagokba a tisztított PHYB önmagában nem képes belépni. Ha ehhez a rendszerhez tisztított PIF3 fehérjét is adtak, a PHYB képes volt a sejtmagba jutni a fényviszonyoktól függetlenül. A tisztított PHYB(1-450) N-terminális csak PIF3 jelenlétében, szigorúan P_{fr} függő (vörös fény függő) módon képes csak az *Acetabularia* sejtmagokba bejutni. Bizonyították továbbá, hogy a *pifq* (*pif1/pif3/pif4/pif5*) mutáns növényekben a PHYB-YFP fúziós fehérje vörös fény indukálta sejtmagi transzportja sérült (Pfeiffer és mtsai. 2012). Ezeket az eredményeket összefoglalva valószínűnek tűnik, hogy a PHYB sejtmagi importja NLS-t tartalmazó molekulákkal való kölcsönhatáson keresztül valósul meg. Ezek a molekulák feltehetően a PHYB P_r és a P_{fr} formáival is kölcsönhatnak. Fontos megjegyezni, hogy a P_r formával való kölcsönhatás feltehetően csak a sejtmagi importban játszik szerepet, jelátviteli szempontból inaktív. Ez a modell magyarázattal szolgálhat mind a sötétben nőtt növények sejtmagi PHYB szintjére, mind a vörös fénykezelés hatására megemelkedő sejtmagi PHYB szintekre.

1.4.10.2 — A fitokrómok sejtmagi aggregátumai

A sötétben fejlődő növényt érő fénykezelés hatására a sejtmagi importtal párhuzamosan beindul a PHYA és a PHYB sejtmagi komplex-képződése is. Ezeket a sejtmagi fehérjeaggregátumokat „speckle”, „nuclear bodies” vagy „photobodies” nevekkkel illeti a szakirodalom, melyek dinamikája függ a fénykezelés intenzitásától, hullámhosszától és időtartamától. Sötétben nőtt növényekben vörös fénykezelés hatására percekben belül számos apró „korai” fehérjeaggregátum keletkezik a sejtmagban, melyek aztán rövidesen el is tűnnek (Bauer és mtsai. 2004; Kevei és mtsai. 2007). Ha a növényeket hosszabb idejű fénykezelésnek vetjük alá, néhány óra elteltével újabb, „kései” fehérjeaggregátumok jelennek meg a sejtmagban (Nagatani 2004; Kevei és mtsai. 2007). Ezeknek a mérete sokkal nagyobb, számuk pedig alacsonyabb, mint a korai aggregátumoké. Ezeknek a sejtmagi komplexeknek a funkciója hosszú és intenzív vita tárgyát képezi a fotobiológusok körében (Chen 2008).

Kimutatták, hogy a korai sejtmagi aggregátumokban a PHYA, a PHYB és a PIF3 transzkripció faktor is megtalálható (Bauer és mtsai. 2004). A PIF3 azonban csak sötétben stabil, fényben az aktív fitokrómokkal (P_{fr}) való kölcsönhatás következtében foszforilálódik és kb. 30 perc alatt koncentrációja a detektálhatósági szint alá csökken (Park és mtsai. 2004; Al-Sady és mtsai. 2006). Ezzel párhuzamosan a PHYA és a PHYB korai aggregátumai is eltűnnek (Kevei és mtsai. 2007). A PIF3 fehérjének a korai aggregátumok képződésében betöltött központi szerepét mutatja, hogy a *pif3* null mutáns növényekben ezek az aggregátumok ki sem alakulnak (Chen 2008). A PIF3 a fitokróm jelátvitel egyik központi eleme és degradációja a szkotomorfogenezis - fotomorfogenezis programjai közötti átkapcsolás egyik kulcslépése. Feltehetően ennek a degradációs folyamatnak a fizikai szinterei a PHYA-val és PHYB-vel képzett korai sejtmagi aggregátumok (Chen 2008).

A kései aggregátumok funkcióját ezidáig sajnos nem sikerült tisztázni. Az intenzív kutatás eredményeként több fehérjét azonosítottak, melyek kölcsönhatnak, és a együtt fordulnak elő a fitokrómokkal a kései aggregátumban. A PHYA esetében ilyenek a PHYA sejtmagi transzporterei, az FHY1 és az FHL molekulák (Hiltbrunner és mtsai. 2006; Genoud és mtsai. 2008). A PHYB sérült sejtmagi aggregátum-képzése alapján azonosították a HEMERA (HMR) fehérjét. A *hmr* mutáns növényekben sérült a PHYA, PIF1 és PIF3 fehérjék fényfüggő degradációja. Ez alapján a HMR fehérje feltehetően a fitokróm jelátvitel egyik korai eleme, ami strukturális hasonlóságot mutat a RAD23 poli-ubikvitin kötő fehérjével (Chen és mtsai. 2010). Sajnos a jelenség mélyebb, molekuláris mechanizmusát ezidáig nem sikerült feltárni. A sejtmagi fitokróm aggregátumok jelátvitelben betöltött szerepének megértését tovább nehezíti, hogy a PHYB(1-651)-GFP-DD-NLS (DD - dimerizációs domén) fúziós fehérjét kifejező a *phyB* null mutáns növények, PHYB túltermelő növényekéhez nagyon hasonló fenotípust mutatnak. Vagyis jelátvitelük jól működik annak ellenére, hogy a PHYB(1-651)-GFP-DD-NLS fúziós fehérje nem képes sem korai, sem kései sejtmagi aggregátumokat képezni (Palágyi és mtsai. 2010).

2 – Célkitűzések

E munka célja a PHYA és PHYB fehérjék közvetítette jelátviteli folyamatokban az említett molekulák N-terminálisán elhelyezkedő növény-specifikus NTE régió szerepének vizsgálata volt. A fitokrómok kutatásában a fényérzékelésükben sérült mutánsok fiziológiai karakterizálása, a fenotípus hátterében álló gének térképezése, majd működésük molekuláris vizsgálata központi módszerekké váltak. Felmerülő kérdéseinket véletlenszerű és célzott mutagenézissel létrehozott mutáns növények fiziológiai és molekuláris vizsgálatain keresztül választottuk meg, melyeket a következő, doktori munkám során megvalósított pontokban foglalhatunk össze:

- *phyA-5* mutáns fiziológiai jellemzése
- A *phyA-5* génről kifejeződő PHYA^{Ala30Val} mutáns fehérje sejten belüli dinamikájának feltérképezése.
- a *phyA-5* mutáció okozta fiziológiai jegyek hátterében álló molekuláris mechanizmus megismerése.
- PHYB 86. szerin oldalláncának foszforilált és defoszforilált formáit utánzó fehérjét kifejező növények fiziológiai karakterizálása.
- Az említett PHYB verziók sejten belüli dinamikájának feltárása.
- A fiziológiai jegyek és sejten belüli dinamika létrejöttéért felelős molekuláris mechanizmus megismerése.

3 – Anyagok és módszerek

3.1 – Kísérleti anyagok és élőlények

3.1.1 – Táptalajok, tápoldatok, antibiotikumok

3.1.1.1 – Bakteriális táptalajok

LB (Lisogeny Broth Medium) (pH=7,0):

1% tripton (Reanal), 0,5% élesztő kivonat (Reanal), 1% NaCl (Reanal); táptalajhoz: 1,5% Bacto[®]-agar (Difco). Autoklávozással sterilizáltuk.

YEB (pH=7,0):

0,5% marhahús-kivonat (Difco), 0,1% élesztő kivonat (Reanal), 0,5% Bacto[®]-pepton (Difco), 0,5% szacharóz (Reanal), 2 mM MgSO₄ (csíramentesre szűrve, autoklávozás után hozzáadva, Sigma); táptalajhoz: 1,5% Bacto[®]-agar (Difco). Autoklávozással sterilizáltuk.

3.1.1.2 – Élesztő táptalajok

YPAD (pH=7,0):

1% élesztő kivonat, 2% Bacto[®]-pepton, 2% glükóz, 0,01% adenin hemiszulfát (Sigma); táptalajhoz: 1,5% Bacto[®]-agar. Autoklávozással sterilizáltuk.

YPG (pH=7,0):

1% élesztő kivonat, 2% Bacto[®]-pepton, 2% glicerin. Autoklávozással sterilizáltuk.

SD (Synthetic Drop Out Medium) (pH=7,0):

2% glükóz, 0,67% élesztő nitrogén forrás (yeast nitrogen base), aminosavak nélkül (Difco), 0,64 g/l Leu⁻/Trp⁻ CSM (Qbiogene) vagy 0,63 g/l His⁻/Leu⁻/Trp⁻ CSM (Qbiogene); vagy 0,77 g Ura⁻ CSM (Qbiogene), táptalajhoz: 1,5% Bacto[®]-agar. A táptalaj pH értékét 1 N NaOH oldattal állítottuk be 5.6 értékre, majd autoklávozással sterilizáltuk.

3.1.1.3 – Növényi táptalajok

AM (Arabidopsis Medium) (pH=5,6±0,1):

2,16 g/l MS (Murashige-Skoog) sókeverék, 1% szacharóz, 0,4% phytagel (Sigma). A táptalaj pH értékét 1 N KOH oldattal állítottuk be, majd autoklávozással sterilizáltuk.

½MS táptalaj (pH=5,6±0,1):

2,16 g/l MS (Murashige-Skoog) sókeverék, 0,4% phytagel (Sigma). A táptalaj pH értékét

1 N KOH oldattal állítottuk be, majd autoklávozással sterilizáltuk.

3.1.1.4 – Sterilizálás

Az bakteriális, élesztő és növényi táptalajokat felhasználás előtt autoklávozással sterilizáltuk (15 min, 121 °C, 2 Bar).

3.1.1.5 – Antibiotikumok

Munkánk során az alábbi antibiotikumokat használtuk. Törzsoldataik elkészítéséhez megfelelő oldószerben feloldottuk, majd nitro-cellulóz membránon sterilre szűrtük őket. Ebből az oldatból a sterilizált tápoldathoz adagoltunk a végkoncentráció eléréséhez szükséges mennyiséget (1. táblázat).

1. táblázat – Felhasznált antibiotikumok és koncentrációik

Amire hat	Antibiotikum	Végkoncentráció
<i>Escherichia coli</i>	Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
	Tetraciklin (Tet)	100 µg/ml
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Kloramfenikol (Cm)	170 µg/ml
	Karbenicillin (Cb)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
	Rifampicin (Rif)	25 µg/ml
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Higromicin (Hyg)	15 µg/ml
	BASTA®*	20 000×
	Klaforán (Cf)**	200 µg/ml

*A BASTA® nem antibiotikum, hanem gyomirtó. Az AgrEvo (Bad Soden, Németország) cég által forgalmazott oldatot csíramentesre szűrve a fenti hígításban használtuk AM táptalajban.

** A klaforán széles spektrumú antibiotikum. AM és MS3 táptalajokhoz nem szelekció céljából adagoltuk, hanem hogy a bakteriális, elsősorban a magháj alatt túlélő *Agrobacterium* okozta fertőzés esélyét csökkentsük.

3.1.2 – Plazmidok leírása

3.1.2.1 – Bakteriális plazmidok

A mesterségesen létrehozott génkonstrukciók építéséhez növényből származó DNS darabokat először pBlueScript II SK+ (Stratagene) vektorba klónoztuk. Ezután meghatároztuk a klónozott DNS darab szekvenciáját és a genomadatbázissal (TAIR - <http://arabidopsis.org>) való megfelelő egyezés esetén használtuk az adott klónt további

munkánk során.

3.1.2.2 – Élesztő kétgazdás plazmidok

Az PHYB és foszfováriánsainak fehérjefúzióit élesztőben a pYES2 (Invitrogene) vektor segítségével fejeztük ki, mely törzseket aztán az *in vitro* spektroszkópiai és a differenciálspektrum mérésekhez használtunk. Ez a vektor *Amp^r* bakteriális rezisztencia gént (β -laktamáz) hordoz ami lehetővé teszi *E. coli*-ban való szelekcióját a klónozás során. Élesztőben való szelekciója az általa hordozott *URA3* gén segítségével történik, mely lehetővé teszi a plazmidot tartalmazó transzformált, uracil deficiens élesztő törzsek szelekcióját. A vektor tartalmazza a *GAL1* gén promóterét, mely erősen indukálható a tápfolyadékhoz adagolt galaktóz segítségével, míg a táptalajban található glükóz gátolja a promóter aktivitását. Így a *GAL1* promóter mögé épített mesterséges gén kifejeződését hozzáadott galaktóz segítségével indítottuk be.

Az élesztő két hibrid kísérletekhez a pD153 (Shimizu-Sato és mtsai. 2002) és a pGADT7 (Hiltbrunner és mtsai. 2006) vektorokat használtuk.

3.1.2.3 – Növénybe juttatandó plazmidok

A transzgenikus növényvonalak létrehozásához a pPCV (Plant Cloning Vector) vektort használtuk, melyet Dr. Kontz Csaba épített. A vektor tartalmazza az Agrobaktérium mediálta transzformációhoz szükséges határ (border) szekvenciákat. Ezek között helyezkedik el a bakteriális Ampicillin / Karbenicillin rezisztenciát biztosító gén (β -laktamáz), a replikációs origó (*ORI_{ColE1}*), a mesterséges gének építését lehetővé tevő klónozó régió (Multiple Cloning Site - MCS). Itt található továbbá a nopalinn szintáz gén transzkripció terminátora és a transzgenikus növények rezisztenciáját kialakító gén a nopalinn szintáz gén promóter és terminátor régióinak szekvenciái között. A vektornak ez utóbbi szempontból két változata van:

1. pPCV-H változat: hygromicin rezisztenciát létrehozó hipoxantin-guanin foszforibozil-transzferázt hordoz.
2. pPCV-B változat: BASTA rezisztenciát létrehozó foszfinotricin-acetiltranszferáz gént hordoz.

3.1.2.4 – Felhasznált baktérium és élesztőtörzsek

Munkánk során a mesterséges génkonstrukciók létrehozásához az XL-1 Blue *Escherichia coli* törzset használtuk. A növénytranszformációt *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

törzsének segítségével végeztük. Az agrobaktérium transzformációját *Escherichia coli* S17-1 törzsének segítségével, biparental maiting során végeztük. Élesztő kéthibrid kísérletekhez *Saccharomyces cerevisiae* a Y189 és AH109 törzseit használtuk. A PHYB fehérje és foszfovariánsainak heterológ expressziójához az InvSC1 (invitrogen®) élesztő törzset használtuk. A felhasznált élesztő- és baktériumtörzsek genotípusai 2. táblázatban találhatóak.

2. táblázat – A felhasznált élesztő és baktériumtörzsek

Faj	Törzs	Genetikai jellemzők
<i>Escherichia coli</i>	XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk⁻,mk⁺) supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>
	S17-1	F ⁻ <i>recA pro hsdR RP4-2 Tcr::Mu Tnr::Tn7 (Tmp^R, Spc^R, Str^R)</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101	<i>rpoH⁺ hrcA⁺ pMP90RK (Gm^R, Km^R, Rif^R)</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y187	MATα, <i>ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>
	AH109	MATa <i>trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δgal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>
	InvSC1	MATa <i>his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>

3.1.2.5 – Felhasznált növényvonalak

A dolgozatban szereplő kísérletek során a következő növényvonalakat használtuk fel (3. táblázat)

3. táblázat – A dolgozatban felhasznált növényvonalak

Faj	Háttér	Genetikai jellemzők	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0 (Col-0)	-	
	vad típus	Landsberg erecta (Ler)	-
		Wassilevkaya (Ws)	-
	mutánsok	Columbia-0	<i>phyB-9</i> (null) ¹
		Columbia-0	<i>phyB-211</i> (null) ²
		Landsberg erecta	<i>phyA-201</i> (null) ³
		Wassilevkaya	<i>phyA-5</i> (jelátvitel mutáns) ⁴
		Landsberg erecta, <i>phyA-201</i>	<i>PHYA_{prom}-PHYA-YFP</i>
		Landsberg erecta, <i>phyA-201</i>	<i>PHYA_{prom}-phyA-5-YFP</i>
		Landsberg erecta, <i>phyA-201</i>	<i>PHYA_{prom}-PHYA-YFP-NLS</i>
		Landsberg erecta, <i>phyA-201</i>	<i>PHYA_{prom}-phyA-5-YFP-NLS</i>
	transzgénikus vonalak	Columbia-0, <i>phyB-9</i>	<i>35S_{prom}-PHYB-GFP</i>
		Columbia-0, <i>phyB-9</i>	<i>35S_{prom}-phyB^{Ser86Asp}-YFP</i>
		Columbia-0, <i>phyB-9</i>	<i>35S_{prom}-phyB^{Ser86Ala}-YFP</i>
		Columbia-0, <i>phyB-9/phyB-211</i>	<i>35S_{prom}-PHYB-GFP</i>
Columbia-0, <i>phyB-9/phyB-211</i>		<i>35S_{prom}-phyB^{Ser86Asp}-YFP</i>	
	Columbia-0, <i>phyB-9/phyB-211</i>	<i>35S_{prom}-phyB^{Ser86Ala}-YFP</i>	

¹ (Reed és mtsai. 1993)

^{2,3} (Nagatani és mtsai. 1993)

⁴ Prof. Garry Whitelam ajándékeként került a laboratóriumunkba.

3.2 – Molekuláris biológiai és biokémiai módszerek

3.2.1 – Génebézészet

A mesterséges génkonstrukciók építéséhez felhasznált növényi promóter és kódoló régiókat PCR segítségével szaporítottuk fel. Templátként növényi genomi DNS kivonatot, vagy össz-RNS kivonatról készített cDNS-t használtunk.

A növényi DNS kivonatot CTAB módszerrel nyertük. Ennek során friss, zöld levelet gyűjtöttünk (kb. 1 cm²) 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és 2-3 db 3 mm átmérőjű acél golyót helyeztünk rá. A mintát folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd az Eppendorf cső

intenzív rázásával a levél szöveteit porrá őröltük (Retsch MM301 gép segítségével). Ezután 500 µl 2x CTAB puffert (2% CTAB, 100 mM Tris-HCL pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% PVP-40, 0,5% β-merkaptoetanol) mértünk a homogenizált szövetre és a csövet megforgatva összekevertük annak tartalmát. 30 percig 65°C-on inkubáltuk a szuszpenziót, az oldhatatlan részeket centrifugálással üleptítettük (13000·g, 30 s) és a tiszta felülúszót új 1,5 ml-es reakciócsőbe pipettáztuk. A fehérjéket azonos térfogatú fenol-kloroform 1:1 arányú keverékével extraháltuk, a fázisokat centrifugálással (13000·g, 5 min) különítettük el, majd a felülúszót (vizes fázis) új csőbe pipettáztuk. A DNS-t 0,1 térfogat 3 M Na-acetát (pH 5,2) és 0,75 térfogat 2-propanol hozzáadásával kicsaptuk és centrifugálással üleptítettünk (13000·g 5 min). A felülúszó elöntése után a csapadékot 70%-os, majd abszolút etanollal mostuk és vákuum alatt szárítottuk. A DNS-t 100 µl ultra-tiszta vízben (Millipore MQ) oldottuk vissza és 2 µl-t használtunk PCR reakciók templátjaként.

PCR (Polymerase Chain Reaction). A növényi gének DNS szakaszait specifikus primerek felhasználásával PCR reakció során szaporítottuk fel. Kisebb DNS szakaszok felszaporításához és genotipizálási munkákhoz a Taq hőstabil polimerázt használtuk (Fermentas), míg hosszú DNS darabok szaporításához a Pfu Ultra II HS (Stratagene) enzimet használtuk a gyártók előírásainak megfelelően.

Az enzimatis DNS módosításokhoz a Fermentas cég által forgalmazott enzimeket használtuk, a gyártó által javasolt körülmények biztosításával, a hozzájuk ajánlott és szállított pufferekben.

A PCR fragmenteket, linearizált plazmidokat és egyéb restriktációs endonukleázzal kezelt DNS molekulákat méretük alapján agaróz gélelektroforézis segítségével választottuk el (SeaKem® LE, Cambrex)

A baktériumban szaporított plazmidokat alkáli lízis segítségével tisztítottuk ki (Birnboim & Doly 1979). A klónozáshoz és szekvenáláshoz használt plazmidokat tovább tisztítottuk 20 U RNase A enzim (Fermentas) hozzáadásával (15 perc 37 °C), fenol-kloroform 1:1 elegyével extraháltuk, majd a DNS-t kicsapás (0,1 térfogat 3 M NaOAc pH 5,2, 2 térfogat 100% etanol), centrifugálás (13000·g, 5 perc), etanolos mosás és szárítás után ultra-tiszta vízben (Milli-Q, Millipore) feloldottuk.

3.2.2 – Növénybe és élesztőbe transzformált génkonstrukciók

A phyA gén teljes genomi kópiáját, mely tartalmazta a gén promóterének 1555 bp hosszú szakaszát a phyA_prom_F és phyA_CDS_R primerek segítségével került

felszaporításra, *Ws* és *phyA-5* növényekből származó genomi templát DNS-ről. A kapott fragmenteket *XhoI* és *SmaI* emésztés után pBluescript SK II+ vektorba ligáltuk. Az így kapott fragmenteket MCS-YFP pPCV-B és MCS-YFP-NLS pPCV-B bináris vektorokba klónoztuk, melynek eredményeképp előálltak a: *PHYA_{prom}-PHYA-YFP*, *PHYA_{prom}-PHYA-5-YFP*, *PHYA_{prom}-PHYA-YFP-NLS* és *PHYA_{prom}-PHYA-5-YFP-NLS* génfúziókat hordozó növénytranszformáláshoz használt bináris vektorok.

A *35S_{prom}-PHYB-YFP* konstrukció építéséhez a *PHYB* kódoló régióját cDNS-ről specifikus primerekkel szaporítottuk és *XbaI* - *StuI* fragmentként illesztettük a *35S_{prom}-MCS-YFP* pPCV-B bináris vektor multiklónozó (MCS) régiójának *XbaI* - *SmaI* helyei közé. Ebbe a konstrukcióba vittük be a Ser86Asp és a Ser 86Ala szubsztitúciókhoz szükséges mutációkat a QuikChange II helyspecifikus mutagenézis kit (Stratagene) segítségével. A Ser86Asp szubsztitúciót a *PHYB(Ser86Asp)_F* és a *PHYB(Ser86Asp)_R*, míg Ser86Ala szubsztitúciót a *PHYB(Ser86Ala)_F* és a *PHYB(Ser86Ala)_R* primerek felhasználásával hoztuk létre.

Az élesztő kéthibrid kísérletekhez a korábban leírt *PIF3-pGAD424*, *PHYA* pD153 (Shimizu-Sato és mtsai. 2002), *PHYA(1-406)* pD153, *FHY1* pGADT7 és *FHL* pGADT7 (Hiltbrunner és mtsai. 2006) vektorokat használtuk. A *PHYA-5(1-406)* pD153 vektor elkészítéséhez *phyA-5* fragmentet a *PHYA_F* és a *PHYA-5(406)_R* primerek segítségével PCR reakcióban szaporítottuk, *phyA-5* gén genomi kódoló régióját tartalmazó pBluescript SK II+ vektort használva templátként. Az így kapott fragmentet *BamHI* - *HindIII* fragmentként ligáltuk a pD153 vektor *BamHI* - *HindIII* helyei közé.

A *PHYB(1-651)*, *PHYB^{Ser86Asp}(1-651)*, *PHYB^{Ser86Ala}(1-651)* fragmenteket a *PHYB_F* és a *phyB(1-651)_R* primerek segítségével PCR reakciókban szaporítottuk fel, majd *XbaI* - *SmaI* fragmentként klónoztuk pD153 vektor *XbaI* - *SmaI* helyei közé.

A *PHYB-YFP*, *phyB^{Ser86Ala}-YFP* és a *phyB^{Ser86Asp}-YFP* génfúziókat a *PHYB_CDS_F* és a *YFP_R* primerek segítségével PCR reakciókban szaporítottuk a génfúziókat tartalmazó pPCV-B vektorokat használva templátként. Ezután a fragmenteket *XbaI* enzimmént ligáltuk a pYES2 élesztő expressziós vektorba.

Az elkészült vektorok és klónok DNS szekvenciáit automatizált szekvenálással ellenőriztük. A felhasznált oligonukleotidok szekvenciáit az 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat – A mesterséges génkonstrukciók előállításához használt oligonukleotidok.

oligonukleotid neve	5' → 3' szekvenciája
PHYA_prom._F	AAACTCGAGGAGAAGAAGAAAGAGATAAC
PHYA_CDS_R	CCCGGGCTTGTGGCTGCAGCGAGTTCCG
PHYB(Ser86Asp)_F	CGACTACTCACAAGATCTTAAGACGACGACGTACG
PHYB(Ser86Asp)_R	CGACTACTCACAAGATCTTAAGACGACGACGTACG
PHYB(Ser86Ala)_F	CGTACGTCGTCGCTTAAGTGCTTGAGTAGTCCG
PHYB(Ser86Ala)_R	CGACTACTCACAAGCACTTAAGACGACGACGTACG
PHYA_F	TTTGGATCCATATGTCAGGCTCTAGGCCGAC
PHYA(406)_R	TTTCCCGGGGTGTTATCGAGTTCCACCTCC
PHYB_F	AAATCTAGAGA AACAATGGTTTCCGGAGTCGGG
PHYB(1-651)_R	GAGCCCGGGTGCACCTAACTCATCAATCCC
PHYB_CDS_F	AAATCTAGAATGGTTTCCGGAGTCGGGGTAG
YFP_R	AAATCTAGATTACTTGTACAGCTCGT

3.2.3 – Génkifejeződés vizsgálata

A növényi gének kifejeződésének mérését reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív PCR (RT-qPCR) segítségével végeztük.

Növényi össz-RNS kivonását a Plant RNeasy Mini Kit (Qiagene) segítségével végeztük. Az így kapott RNS-ből random hexamer primerek segítségével, a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-tel (Fermentas) szintetizáltunk cDNS-t. Az RT-qPCR reakciók összeállításához a Power SYBR® Green PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) használtuk. A cDNS-ek kópiaszámának mérését ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) Real Time PCR rendszerének segítségével végeztük. A kísérletek során a *PHYA*, *PHYA-5* és a *PRR9* mRNS-ek szintjeit *TUBULIN 2/3* mRNS-hez, mint belső kontrollhoz képest határoztuk meg, a cDNS-sel komplementer primerek felhasználásával. A génindukciót a kezeletlen és a kezelt minta *PRR9* / *TUB2/3* mRNS-ek arányainak hányadosából képeztük. A felhasznált oligonukleotidok szekvenciáit a 5 táblázat tartalmazza.

5. táblázat – A RT-qPCR kísérletekhez használt oligonukleotidok.

oligonukleotid neve	5' → 3' szekvenciája
PHYA-RT-F	ATCTAGAGATCAGGTTAACGCA
PHYA-RT-R	CCTTCTTCTGACACATCTTCC
TUB2/3-R	CCAGCTTTCGGAGGTCAGAG
TUB2/3-F	CCAGCTTTGGTGATTTGAAC
TUB2/3-R	CCAGCTTTCGGAGGTCAGAG

3.2.4 – Növényi össz-fehérje tisztítása

50-100 mg növényi mintát 1,5 ml-es centrifuga csőbe tettünk, majd folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk. A fagyott mintát homogenizáltuk, majd 5 térfogat fehérje kivonó puffert (65 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 M urea, 5% (m/v) SDS, 14 mM β-merkaptoetanol, 15% (v/v) glicerin, 0,05% (m/v) brómfenolkék) mértünk rá. A homogenizált szövetet 95 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd az oldhatatlan részeket centrifugálással ülepítettük (10 min, 13000·g). A tiszta felülúszót új centrifugacsőbe szívtuk át. A protein koncentrációt amidoblack módszer segítségével határoztuk meg BSA kalibráció ellenében (Schaffner & Weissmann 1973).

3.2.5 – Fehérjeszint specifikus meghatározása Western blot módszerrel

A fitokrómok és fúziós fehérjék mennyiségi meghatározásához mintánként 20 µg össz-fehérjét tartalmazó kivonatot futtattunk meg, 8%-os denaturáló, SDS-poliakrilamid gélen, Tris-glicin-SDS futtatópufferben (2,5 mM Tris, 192 mM glicin, 0,01% (m/v) SDS). Az elválasztott fehérjéket elektroblot készülékkel (Bio-Rad) vittük át Immobilon®-P PVDF membránra (Millipore), a gyártók utasításainak megfelelően.

A membránt ezután blokkoltuk 2,5% (m/v) tejpör oldatával, blokkoló pufferben (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 0,05% (m/v) Tween 20), kettévágtuk, hogy a nagyobb moltömegű PHYA vagy PHYB és kisebb moltömegű belső kontrollként választott ACTIN fehérjéket ki tudjuk mutatni. Ezt követően a membránokat 10 percig mostuk mosó pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20).

A PHYA kimutatásához α-PHYA antitest (nyúlban termelt, poliklonális antitest, Dr. Eberhard Schäfer ajándéka), mosó pufferben 1000-szeresére hígított oldatát használtuk. Ezeknek a kísérleteknek a belső referenciáját az aktin fehérje mennyisége adta, aminek kimutatásához α-ACTIN (egérben termelt monoklonális, Sigma) 1000-szeresére hígított elsődleges ellenanyagot használtunk. 1 órás szobahőn való inkubáció után az antitestek feleslegét három egymást követő, 10 perces mosó pufferes mosással eltávolítottuk. A membránokat ezután mosó pufferrel 5000-szeresére hígított alkalikus-foszfátáz kapcsolt másodlagos antitestek (PHYA esetében: nyúl IgG ellenanyag, Bio-Rad; ACTIN esetében: egér IgG ellenanyag, Sigma) oldatában inkubáltuk 1 órán át, szobahőn. A másodlagos antitestek maradványait 3 egymást követő, 10 perces mosó pufferes mosással távolítottuk el. Ezután a membránokat előhívó pufferben (100 mM Tris-HCl pH 9,7, 100 mM NaCl, 0,05 mM MgCl₂)

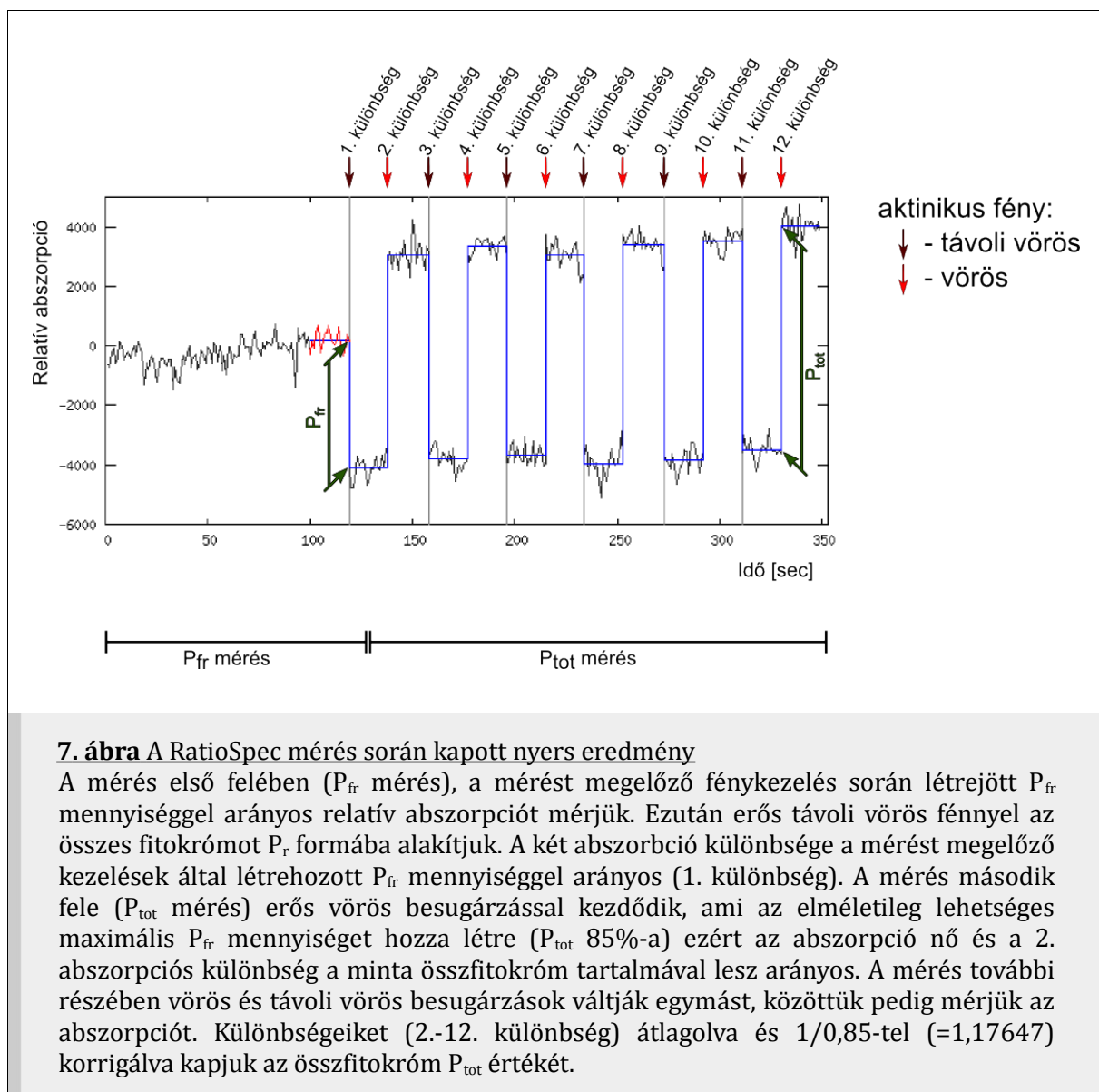
mostuk, majd a membránokat 0,0075%^(m/v) NBT és 0,005%^(m/v) BCIP tartalmú előhívó pufferben inkubáltuk, amíg a jel jól láthatóvá nem vált. A membránokat ezután megszártottuk és beszkeneltük.

A PHYB-YFP és PHYB-GFP kimutatásához torma peroxidázhoz kötött α -GPF antitest (egérben termelt, monoklonális, Milteny Biotech) 10000-szeresre hígított oldatát használtuk (1 h, szobahő), majd háromszori 10 perces mosó pufferes mosást követően az ECL kit (GE Health Care) és fényérzékeny film segítségével tettük láthatóvá a jelet. Ezeknek a kísérleteknek a belső kontrollját az ACTIN fehérje adta, melyet α -ACTIN elsődleges antitest (egérben termelt monoklonális, Sigma) és torma peroxidázhoz kötött α -IgG másodlagos antitest (egér IgG ellen, Sigma) és ECL kit (GE Health Care) segítségével tettünk láthatóvá a már leírt módon.

3.2.6 – *In vivo és in vitro spektroszkópia*

A fitokrómok mennyiségének, valamint P_r és P_{fr} arányának meghatározása a fitokróm molekula spektrális tulajdonságain keresztül lehetséges élő növényben vagy élesztő sejtekben. A 2. ábra A) paneljén látható a fitokrómok P_r és P_{fr} konformereinek abszorpciós spektruma, melyek között a legnagyobb különbség 660 nm és 730 nm hullámhosszokon van. Egy külön erre a célra épített spektrofotométerben (RatioSpec) 730 nm hullámhosszon mértük a minta abszorpcióját, aminek értéke a minta P_{fr} konformációjú fitokróm tartalmával arányos. Referenciapontként a 800 nm hullámhosszon mért abszorpciót használtuk, mert itt a P_r és P_{fr} formák abszorpciója azonos. A mérés alapvetően két részre tagolható:

1. Az első részben a különböző fény kezeléseken átesett minta abszorpcióját mértük, ami a kezelés hatására kialakuló P_{fr} mennyiséggel arányos abszorpciós értéket eredményez.
2. A második szakaszban intenzív távoli vörös ($E_{max}=730$ nm) és vörös ($E_{max}=660$ nm) pulzusokkal kezeltük a mintát (aktinikus fény) és minden fénykezelést követően mértük 730 nm-en a minta abszorpciójában bekövetkező változást. Ebben a szakaszban a az elérhető legmagasabb P_r és P_{fr} mennyiségeket állítottuk elő. Abszorpciójuk különbsége megadja az össz-fitokróm, vagy ahogy általában hivatkozok rá, a P_{tot} értékét. Ezt a második szakaszt legalább négyszer ismételtük és részeredményeit átlagoltuk.



A méréshez használt növényi minta tömegének mérésével nem csak a P_{fr} mennyiség összfitokrómhoz (P_{tot}) való viszonya határozható meg, hanem a növény egységnyi tömegre vonatkoztatott fitokrómtartalma is, ami lehetővé teszi az fitokróm mennyiség időbeli változásának mérését (pl.: degradációs kinetika). A módszerrel nyert nyers adatokat és azok értelmezését az 7. ábra mutatja be.

Az *in vitro* differenciál spektroszkópai méréseket az Ocean Optics cég (USA, Dunedin) HR4000 lineáris CCD detektorral felszerelt nagy felbontású, ultragyors spektrofotométerének segítségével végeztük. A méréshez használt fényforrás szintén az Ocean Optics cég DT2-MINI-GS kvarc halogén és deutérium lámpákkal felszerelt kombinált fényforrását használtuk. A mérő fényt és a mintán áthaladó fényt száloptika vezette a

mintához és a spektrofotométerbe. A mérés során a PHYB-t és foszfovariánsait aktinikus fény segítségével alakítottuk P_{fr} vagy P_r formába, melyhez a fényt egy szintén száloptikás kimenetű 150 W-os kvarc halogén lámpa szolgált fényforrásként. A lámpa fényéből interferenciafilterek (Schott) segítségével állítottuk elő a vörös (P_{fr} forma, $T_{max}=660$ nm, $6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) és a távoli vörös (P_r forma, $T_{max}=715$ nm, $6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) aktinikus fényt.

3.3 – Baktériumokon alkalmazott eljárások

3.3.1 – *Escherichia coli* törzsek transzformációja

A klónozások során használt XL-1 Blue és az *Agrobacterium tumefaciens* transzformáláshoz használt S17-1 *E. coli* törzseket Inoue és munkatársai által leírt módon tettük alkalmassá a plazmidok felvételére (Inoue és mtsai. 1990). Az így készített sejtszuszpenziók adagjait -80 °C-on tároltuk a transzformálás megkezdéséig. Ehhez a sejtszuszpenziót először felolvasztottuk (15 min, jégen), majd hozzá adtuk a transzformáláshoz használt plazmidot (~ 1 μg DNS), vagy a ligálási reakcióelegyét és pipettával egyszer felszívva alaposan összekevertük. A sejtszuszpenziót jégen inkubáltuk (30 min), majd hősokknak vetettük alá (42 °C, 2 min). A sejteket ezután jégre visszatettük (30 min), majd 1 ml LB tápoldatban rázattuk (37 °C, 1 h), hogy az antibiotikum-rezisztencia gének kifejeződése beindulhasson. A sejteket megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB táplemezre szélesztettük és 37 °C-on éjszakán át növesztettük.

3.3.2 – *Agrobacterium tumefaciens* transzformációja

Agrobacterium transzformációjához *Escherichia coli* S17-1 módosított törzsét használtuk, mely kromozómájára integráltan hordozza az eredetileg az F' plazmidon kódolt pilus képzéshez és a plazmidok átviteléhez szükséges géneket. A növényekbe juttatandó mesterséges génkonstrukciót hordozó bináris vektort (pPCV-B) először *E. coli* S17-1 törzsébe transzformáltuk, majd a transzformáns telepek egyikét szelektív LB tápoldatba leoltottunk. Ezzel egy időben *A. tumefaciens* GV3101 törzsét is leoltottuk a Rifampicin, Gentamicin, Kanamicin tartalmú YEB tápoldatba és éjszakán át növesztettük a sejteket. Másnap a két kultúra 200-200 μl -ét egy steril 1,5 ml-es centrifugacsőbe pipettáztuk és centrifugálással ($3000 \times g$, 1 perc) üleptítettük a sejteket. A felülúszót leöntöttük és a maradék folyadékban pipettával felszuszpendáltuk a sejteket. A keveréket nem szelektív YEB táplemezre cseppentettük és éjszakán át hagytuk nőni, hogy a plazmid

átvitele megtörténjen. A következő nap a baktérium kultúrát Rifampicin, Gentamicin, Karbenicillin tartalmú szelektív YEB táplemezre szélesztettük. Három nap múlva passzáltuk, amiből ekkorra már kihaltak az *E. coli* S17-1 sejtek. Az így előállított a vonalakat használtuk a növények transzformáláshoz

3.4 – Élesztőn alkalmazott eljárások

3.4.1 – *Saccharomyces cerevisiae* transzformációja

A kísérletek során használt élesztő törzsekből 5 ml-es starter kultúrát indítottunk YPAD tápoldatban és éjszakán át, rázatva növesztettük a sejteket (160 rpm, 30 °C). Másnap a starter kultúra 2 ml-ét átoltottuk 50 ml YPAD tápoldatba és addig növesztettük a sejteket, amíg a kultúra OD₆₀₀ értéke 0,4-0,6 értékek közé nem került (kb. 4 h). Ezután a sejteket centrifugálással üleptítettük (3000·g, 5 perc) és kétszer egymás után megmostuk 25 ml steril, desztillált vízben. A sejteket ezután 1 ml steril desztillált vízben felszuszpendáltuk és 100 µl-es adagjait 1,5 ml-e Eppendorf csőbe mértük. Az adaghoz a következő transzformációt elősegítő anyagokat adtuk: 240 µl 50%-os PEG 3350, 36 µl 1 M LiOAc, 50 µl 2 mg/ml forralt ssDNA, 34 µl víz a plazmiddal, vagy plazmidokkal. A sejteket és a hozzáadott anyagokat vortexszel összekevertük, majd 1 óráig 42°C-on inkubáltuk őket. A sejteket ezután centrifugában üleptítettük, a felülúszót leszívtuk, a sejteket pedig 1 ml steril desztillált vízben felszuszpendáltuk. A szuszpenzió 10 és 100 µl-ét megfelelő szelektív táptalajra szélesztettük és 2 napig 30 °C-on inkubáltuk (Gietz & Schiestl 2007).

3.4.2 – Az InvSc1 élesztő törzsben termeltetett PHYB és PHYB foszfovariáns fehérjék

A PHYB-YFP, vagy valamelyik PHYB foszfovariánsát kifejező élesztő vonalból starter kultúrát indítottunk 100 ml SD /Ura⁻ tápoldatban. A kultúrát éjszakán át rázatva növesztettük (160 rpm, 30 °C), majd 4°C-on tároltuk. A starterkultúrát 1000 ml YPG tápoldatba leoltottuk és 15 órán át rázatva növesztettük (160 rpm, 30 °C). A YPG tápoldatban lévő glicerint nehezen hasznosítható szénforrás az élesztő sejteknek ezért a 15 óra elteltével még nem jutottak túl növekedésük logaritmusos fázisán. Az élesztőkultúrákban a fúziós fehérjék kifejeződését 20 g (~2%) D-galaktóz por hozzáadásával indukáltuk, majd a kultúrákat további 4 órán át rázatva növesztettük (160 rpm, 30 °C). Ezt követően a sejteket centrifugában üleptítettük (1500·g, 15 perc) és

kétszer mostuk 80 ml PBS pufferben (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄ pH 7,4). A megmosott sejteket 10 ml, PBS pufferben oldott, 30%-os DMSO (dimetil-szulfoxid) oldatban szuszpendáltuk fel. Az ezt követő lépéseket zöld biztonsági fény alatt kiviteleztük. A sejtuszpenzióhoz 2 µl 5 mM-os PCB kromofórt adtunk és 20 percen keresztül inkubáltuk. A DMSO lehetővé tette a PCB élesztő sejtekbe jutását, ahol a PHYB apoprotein autokatalitikus billin liáz aktivitásának köszönhetően létrejött az érett PHYB fehérje. A fölös PCB-t és a DMSO-t két egymást követő, 40 ml PBS pufferrel való mosással távolítottuk el. Végül a sejteket 10 ml PBS pufferben szuszpendáltuk fel és ezt használtuk a további kísérletekhez.

3.5 – Növényeken alkalmazott eljárások

3.5.1 – Növények előkészítése és nevelése

A kísérletek során használt növények magjait beáztattuk, majd 2 napig 4 °C-on hidegkezeltük. Ezután a magok felszínét 30%-osra hígított *Domestos* (Unilever) oldattal 15 percig sterilizáltuk. A NaOCl és a detergens maradványokat 3 egymást követő steril vizes mosással távolítottuk el. Transzformálás után a magokat 16 cm átmérőjű szelektív AM táptalajra szélesztettük. A biokémiai vizsgálatokhoz és *in vivo* spektroszkópiához nevelt növényeket ½MS táptalajra szélesztettük. A táptalaj felszínét 1 réteg steril szűrőpapírral takartuk, a könnyebb mintaszedés érdekében. A hipokotil rövidülés méréséhez a magokat egyesével szélesztettük, olyan ½MS táptalajt tartalmazó Perti-csészére melynek felszínét 4 réteg szűrőpapír takarta. Ezután a magokat 12 órás fehér fénykezelésnek vetettük alá, mely beindította a csírázást.

3.5.2 – Növénytranszformáció

A transzformáláshoz használt növényeket 3 hétig rövid nappalon (8 h fény/16 h sötét), ezt követően hosszú nappalon (16 h fény/8 h sötét) üvegházban neveltük. A virágzás beindulását követően a virágzatokat a növényekbe juttatandó mesterséges génkonstrukciót hordozó *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzsét tartalmazó szuszpenzióba mártottuk. A szuszpenzió előállításához az *Agrobacterium*-ot szelektív YEB tápoldatban növesztettük. A starter kultúrát 2 ml YEB tápoldatban éjszakán át növesztettük, amit a második nap 50 ml, majd a harmadik nap 300 ml szelektív YEB tápoldatba (Rifampicin, Kanamicin,

Karbenicillin) oldottunk át. A negyedik nap a szuszpenziót lecentrifugáltuk (5000·g, 15 perc) majd 5%-os szacharóz oldatban felszuszpendáltuk. Ehhez az oldathoz 70 µl Silvet-77 (Lehle seeds) tapadásfokozó szert (erős detergens) adagoltunk, ami elősegítette a szuszpenzió beszívódását a növény szöveibe. A transzformálandó növények virágzatát a szuszpenzióba mártottuk. Az első transzformációt akkor végeztük, amikor a virágzati tengely kb. 10 cm magas volt, a második transzformációt 6 nappal később (Clough & Bent 1998).

3.5.3 – Mikroszkópos kísérletek

A YFP és GFP (Yellow/Green Fluorescent Protein) fúziós fehérjék lokalizációját a növényi sejtekben Axioplan II (Zeiss, Németország) mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A gerjesztőfényt HBO 100 (Osram) higanygőzlámpa szolgáltatta. A gerjesztő fényt és a YFP/GFP kibocsátotta epifluoreszcens fényt specifikus szűrő készletekkel választottuk el (AHF Analysetechnik, Tübingen):

- YFP filter szett:
gerjesztőfény szűrője: HQ 500/20, nyalábosztó: Q 515/LP, fluoreszcens fény szűrője: HQ 636/30
- GFP filter szett:
gerjesztőfény szűrője D436/20, nyalábosztó: 455DCLP, fluoreszcens fény szűrője: HQ 485 LP

A vizsgálatok során Plan-APOCHROMAT 63-szoros nagyítású olaj immerziós objektívet használtunk (Zeiss, Oberkochen).

3.5.4 – Fitokróm fúziós fehérjék sejtmagi importjának szemikvantitatív mérése

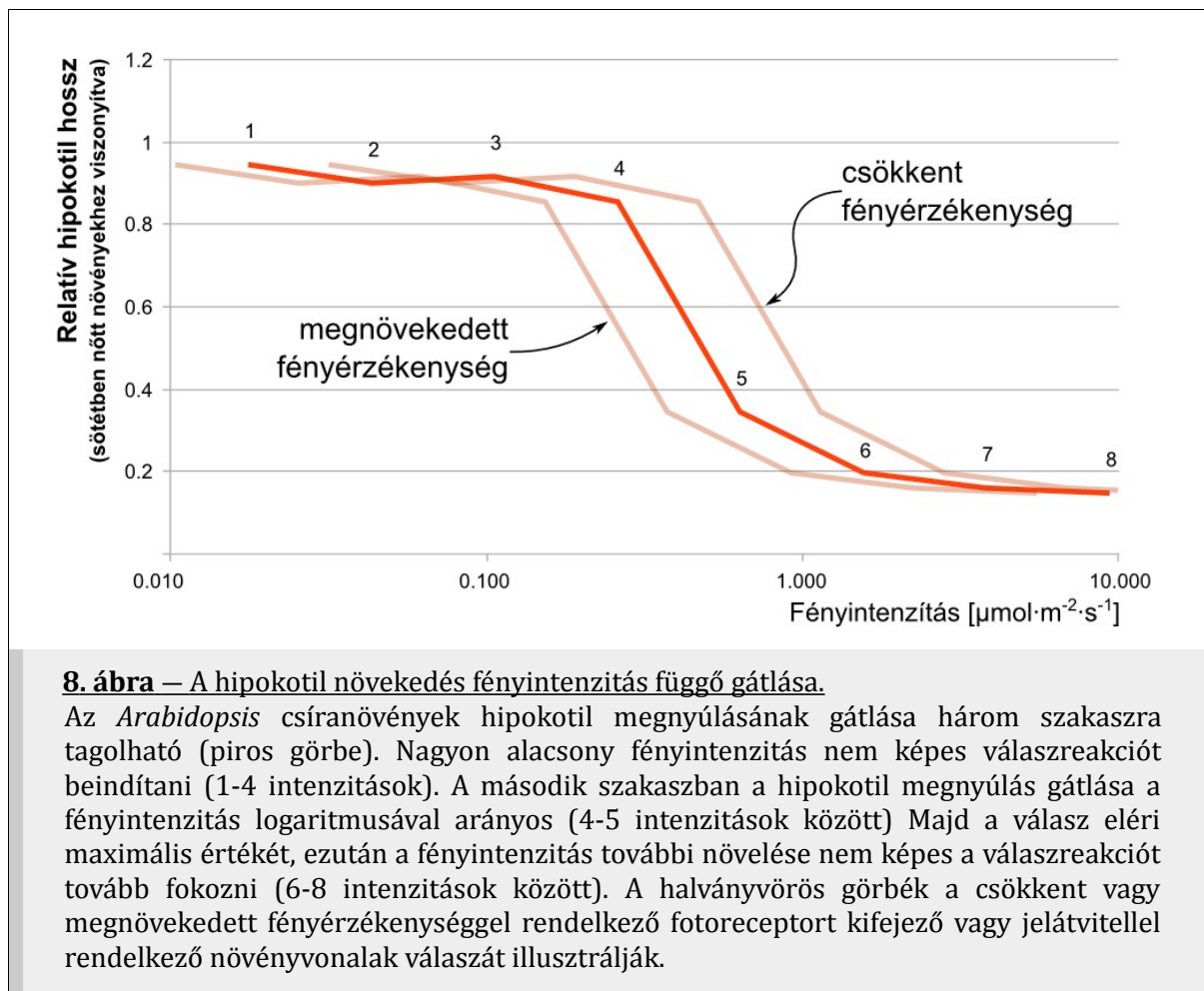
A sejtmagi import szemikvantitatív mikroszkópos mérésének során 4 napos sötétben nőtt, a vizsgált fitokróm YFP, vagy GFP fúzióját kifejező *Arabidopsis* csíranövényeket használtunk. Hogy a nagy intenzitású gerjesztő fény hatását minimalizáljuk, a kezelt és kezeletlen növények hipokotiljának felső harmadában elhelyezkedő epidermisz sejtek sejtmagját DIC (Differential Inteference Contrast) segítségével kerestük meg zöld biztonsági fényben (525 nm, mivel a fitokrómok fényérzékenysége itt minimális). Ezután készítettük el a fluoreszcens képeket, minden minta esetében legalább 40 kép készült. PHYA-YFP esetében csíranövényenként egy, PHYB-YFP és PHYB-GFP esetében csíranövényenként

maximum két kép készült, hogy minimalizáljuk a gerjesztőfény sejtmagi importra gyakorolt befolyását. Az ezt követő képfeldolgozás során a nukleáris fluoreszcencia intenzitását ImageJ (National Institute of Health) program segítségével határoztuk meg a fluoreszcens képeken, mint Average Gray Value. Majd ebből az értékből kivontuk az adott sejtmaghoz tartozó vakuoláris régió fluoreszcenciáját (Average Gray Value) ami háttér-fluoreszcenciát reprezentálta. Az így kapott fluoreszcencia értékeket átlagoltuk és a sötétben nevelt kontroll növények sejtmagi fluoreszcenciájára normalizáltuk.

3.5.5 – Hipokotil rövidülési válasz

A csíranövények életének egyik jól jellemzett folyamata a hipokotil megnyúlás. A folyamat jól karakterizált és szigorú, elsősorban a fénykörülményektől függő szabályozás alatt áll. A fénykezelés hatására kialakuló hipokotil hossz mérésével fontos információkat nyerhetünk a fotoreceptorok és azok jelátviteli láncainak működéséről. A kísérletekben használt növényvonalak magjait olyan $\frac{1}{2}$ MS táptalajt tartalmazó Petri-csészére szélesztettük, melynek felszínét 4 réteg szűrőpapírral takartuk. Ezután a Petri csészékből 9 csészét tartalmazó tornyot építettünk és fekete kartonpapír csőbe helyeztünk. Ezt az építményt a kísérletek során felülről világítottunk meg és a csészéken levő szűrőpapír takarásnak köszönhetően a fény szóródáson és visszaverődésen ment keresztül. Így a fényintenzitás Petri-csészéről Petri-csészére csökkent. Az egyes csészéken növekedő növényeket érő fényintenzitás kalibráció után (X1-1 típusú fényintenzitás mérővel, Gigahertz Optik, Németország) a felső csészét érő fény intenzitásából és a csésze helyzetéből kiszámítható.

Különböző intenzitású fénykezelésnek kitett csíranövény populációk átlagos, a sötétben fejlődött csíranövényekéhez viszonyított hipokotilhosszát a fényintenzitás függvényeként, lineáris-logaritmikus skálán ábrázoltuk. Az így nyert görbe lefutása a vizsgált fotoreceptor és jelátviteli láncának működésére jellemző. A görbe eltolódása kisebb, vagy nagyobb fényintenzitás irányába a fotoreceptor működésében, vagy jelátvitelében bekövetkezett változás karakteres jellemzője. Egy példát a 8. ábra mutat be.



3.5.6 – A PHYA akcióspektrumának mérése

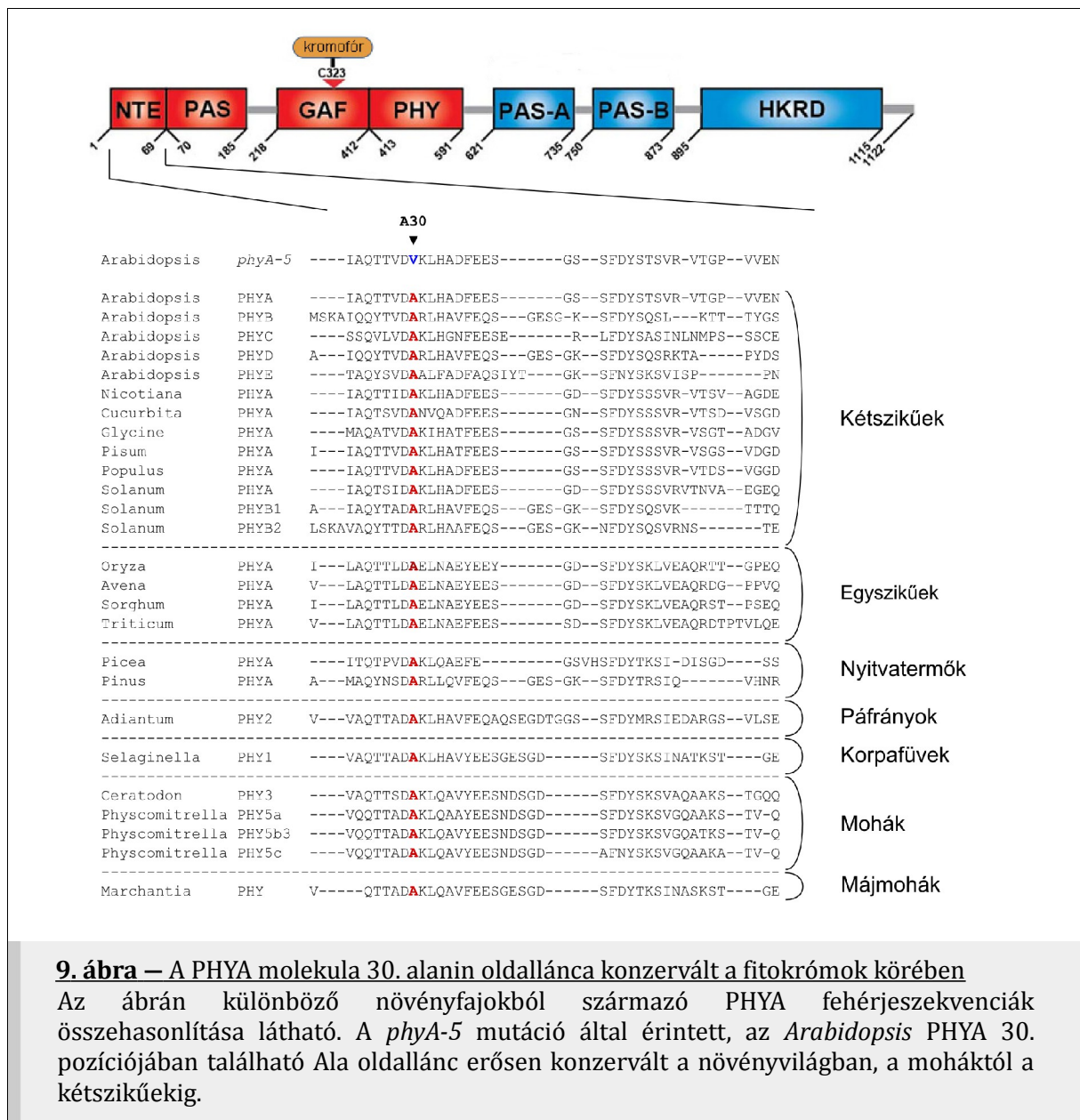
A PHYA fiziológiai hatásának hullámhosszfüggését a hipokotil megnyúlás gátlásán keresztül követtük. 4 napig különböző hullámhosszúságú és intenzitású távoli vörös fény alatt növeltünk *Ws* és *phyA-5* csíranövényeket. A negyedik napon megmértük a különböző körülmények között fejlődött csíranövények átlagos hipokotil hosszát. A kapott eredmények alapján kiszámoltuk a 60%-os növekedés gátláshoz tartozó fényintenzitást minden hullámhosszon. Ezután vettük az intenzitások reciprokat, mert ez az érték arányos az adott hullámhosszon a PHYA-nak és jelátvitelének az érzékenységével. Végül az érzékenység értékeket a legnagyobb értékre (718 nm) normalizáltuk és a relatív érzékenysége értékeket a hullámhossz függvényében ábrázoltuk.

A kísérletek során fényforrásként erre a célra átalakított Prado (Leitz, Németország) vetítógépet használtunk. A fényt egy 250 W-os halogén izzó szolgáltatta, amiből a Schott (Németország) cég kis félérték szélességű (≤ 12 nm) interferenciafiltereinek segítségével állítottuk elő a kezeléseket során használt fényt.

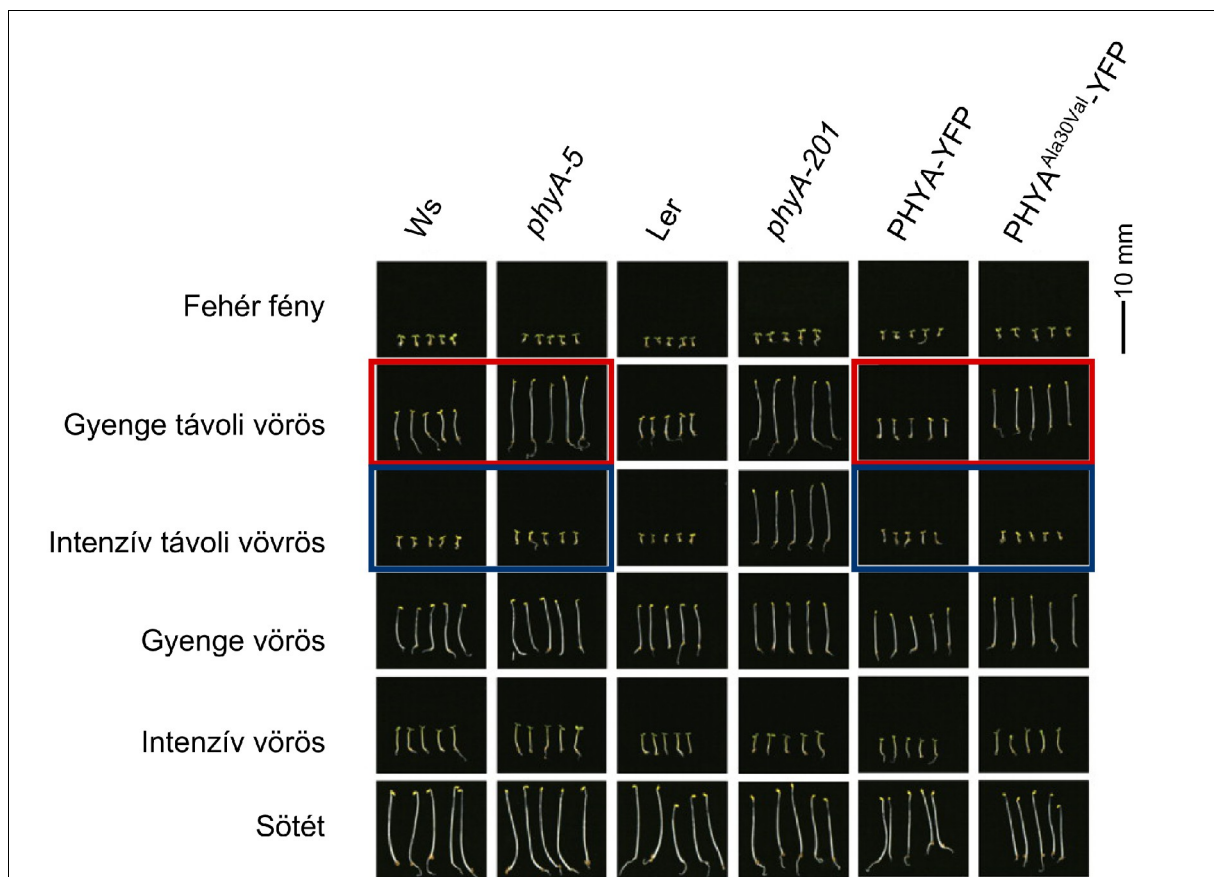
4 – A phyA-5 allél vizsgálata

4.1 – A psm fenotípust létrehozó mutáns lókuszon azonosítása

A mutánsanalízis, ahogy azt már a bevezetőben is említettem, a fitokróm kutatás egyik központi módszerévé vált. A *psm* (phytochrome signalling mutant) mutáns növényt Garry Whitelam laboratóriumában izolálták, Wassilevskya (Ws) háttérű, etil-metil szulfonáttal (EMS) mutagenizált magpopulációból, mint távoli vörös fényben csökkent fiziológiai választ mutató mutáns. Egy korábbi munka során bebizonyosodott, hogy a mutáns fenotípusa menekíthető, ha a PHYA-GFP fúziós proteint a virális 35S, vagy az endogén PHYA promóter



kontrollja alatt fejezzük ki a *psm* mutáns növényekben (Kim és mtsai. 2000). Ez az eredmény arra utalt, hogy a mutáció intragenikus, vagyis a *phyA* gén szekvenciáját érinti. Ezért a *phyA* gént izoláltuk *psm* és vad típusú *Ws* növényekből, majd független klónok DNS szekvenciáinak összehasonlítása fény derített a DNS bázis sorrendben bekövetkezett citozin → timin mutációra. A mutáns allélról kifejeződő fehérje Ala → Val aminosavszubsztitúciót hordoz a fehérjeszekvencia 30. pozíciójában (PHYA^{Ala30Val}). Az Ala30 oldallánc erősen konzervált a növények körében (9. ábra). Miután bizonyítást nyert, hogy a PHYA génben keletkezett változás felelős a *psm* növények fenotípusáért, a nemzetközi irányvonalaknak megfelelően (Quail és mtsai. 1994) az allél a *phyA-5* nevet kapta, és a továbbiakban így hivatkozom rá.



10.ábra – A PHYA^{Ala30Val} fehérjét kifejező növények hipokotil növekedésének gátlása különböző hullámhosszú és intenzitású fénykezelés hatására

A felül jelzett vonalak csírái 4 napig nőttek a bal oldalon jelzett fénykörülmények között. A képek a 4. napon készültek. A PHYA^{Ala30Val} fehérjét kifejező vonalak csak gyenge távoli vörös fényben mutattak a vad típustól eltérő fejlődést.

Piros keretben: a PHYA^{Ala30Val} és PHYA^{Ala30Val}-YFP fehérjéket kifejező vonalak gyenge távoli vörös fényben a *phyA* null mutánshoz (*phyA-201*) hasonlóan viselkednek.

Kék keretben kiemelve látható, hogy ugyanezen vonalak intenzív távoli vörös fényben a vad típussal megegyező fenotípust mutatnak.

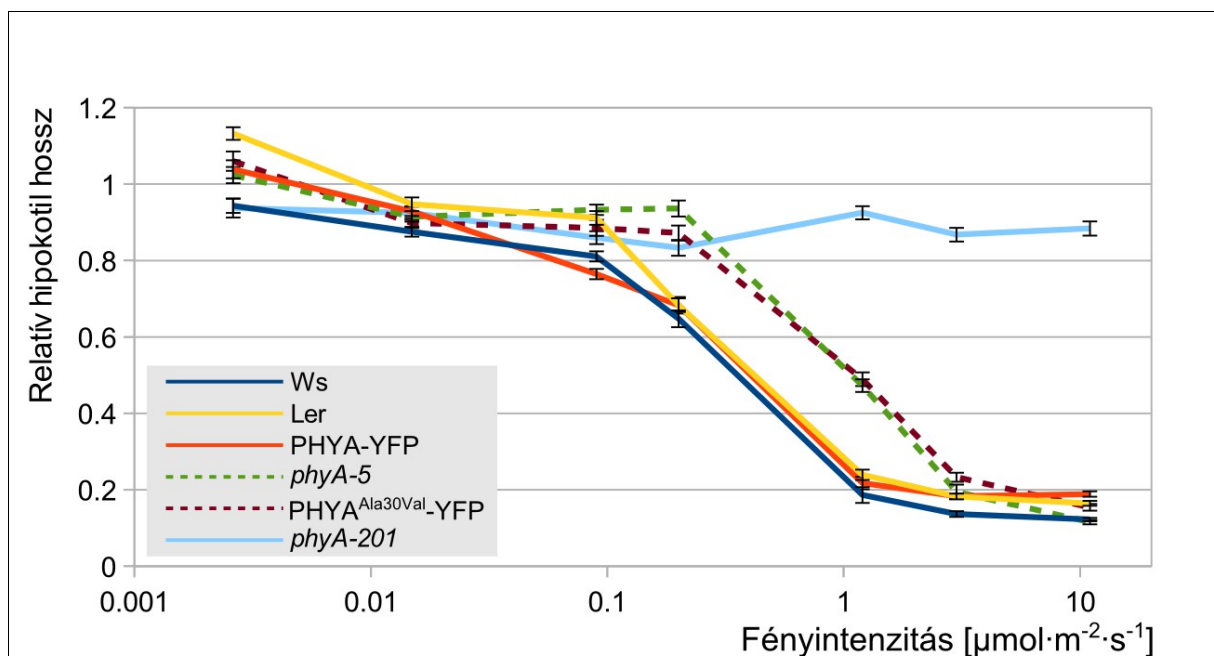
4.2 – A *phyA-5* fenotípusa és komplementációja

Hogy megerősítsük, valóban a PHYA génben bekövetkezett mutáció felelős a *psm* növények fenotípusáért, komplementációs kísérlettel bizonyítani akartuk, hogy a PHYA Ala30Val aminosav szubsztitúciója áll a jelenség háttérében. A komplementáció egyben kizárja a másodlagos mutációk esetleges szerepét, melyek az EMS mutagenézis mellékhatásaként a jönnek létre a genomban. Ehhez két génkonstrukciót építettünk:

- $PHYA_{\text{prom}}\text{-PHYA-YFP}$ – fitokróm A promóter hajtotta vad típusú *phyA*-YFP génfúzió
- $PHYA_{\text{prom}}\text{-PHYA}^{\text{Ala30Val}}\text{-YFP}$ – fitokróm A promóter hajtotta mutáns *phyA*-YFP génfúzió

Mindkét génkonstrukciót Landsberg erecta (Ler) ökotípus, *phyA-201* (*phyA* null mutáns) háttérbe transzformáltuk.

A transzgénre homozigóta utódvonalak kiválasztása után első lépésként megvizsgáltuk e vonalak hipokotil növekedési válaszát különböző hullámhosszú és intenzitású fénykezelés hatására. A kísérletek eredményét a 10. ábra foglalja össze, melyen látható, hogy a $PHYA^{\text{Ala30Val}}$ fehérjét kifejező növények kizárólag gyenge távoli vörös fényben viselkednek eltérően a vad típusú PHYA-t kifejező növényektől.



11. ábra – A $PHYA^{\text{Ala30Val}}$ fehérjét kifejező növényvonalak távoli vörös fényérzékenysége csökkent

Az ábrán bemutatott hipokotil-rövidülési teszt során a növények 4 napig nőttek különböző intenzitású távoli vörös fényben. A negyedik napon meghatároztuk átlagos hipokotil hosszukat ($n \geq 30$) és azt a fényintenzitás függvényében ábrázoltuk. A fényintenzitást logaritmikus skálán ábrázoltuk, a hibásávok a standard hibát mutatják.

További munkánk során a távoli vörös függő jelátvitel vizsgálatára koncentráltunk, mivel csak ebben az esetben találtunk különbséget a vad típusú és mutáns fehérjét kifejező vonalak között. A 11. ábrán bemutatott grafikonokon 4 napig különböző intenzitású távoli vörös fényben növesztett *Ws*, *phyA-5* és *PHYA-YFP-t*, *PHYA^{Ala30Val}-YFP-t* kifejező *phyA-201* és *Ler phyA-201* növények hipokotil rövidülési válasza látható. Kísérlet során bebizonyosodott, hogy a vad típusú *PHYA* fehérjét hordozó növények (vad típusú *Ws*, *Ler* és a *PHYA-YFP-t* kifejező *phyA-201*) azonos módon viselkednek. Esetükben a hipokotil rövidülés kiváltásához legalább $0,26 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású távoli vörös fény szükséges és $1,56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású távoli vörös kezelésnél a fiziológiai eléri maximális mértékét. A *PHYA^{Ala30Val}* fehérjét hordozó növények (*phyA-5* és a *PHYA^{Ala30Val}-YFP-t* kifejező *phyA-201*) szintén azonos módon reagáltak a távoli vörös fény kezelésre. Esetükben azonban a vad típusúhoz hasonló hipokotil rövidülési válasz eléréséhez kb. háromszor akkora távoli vörös fényintenzitásra volt szükség. A hipokotil rövidülés kiváltásához szükséges minimális intenzitás esetükben $0,64 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, míg a maximális fiziológiai válasz kiváltásához $3,82 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású távoli vörös fényre volt szükség. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a *PHYA^{Ala30Val}* fehérjét kifejező növények távoli vörös fényre hiposzenzitívek.

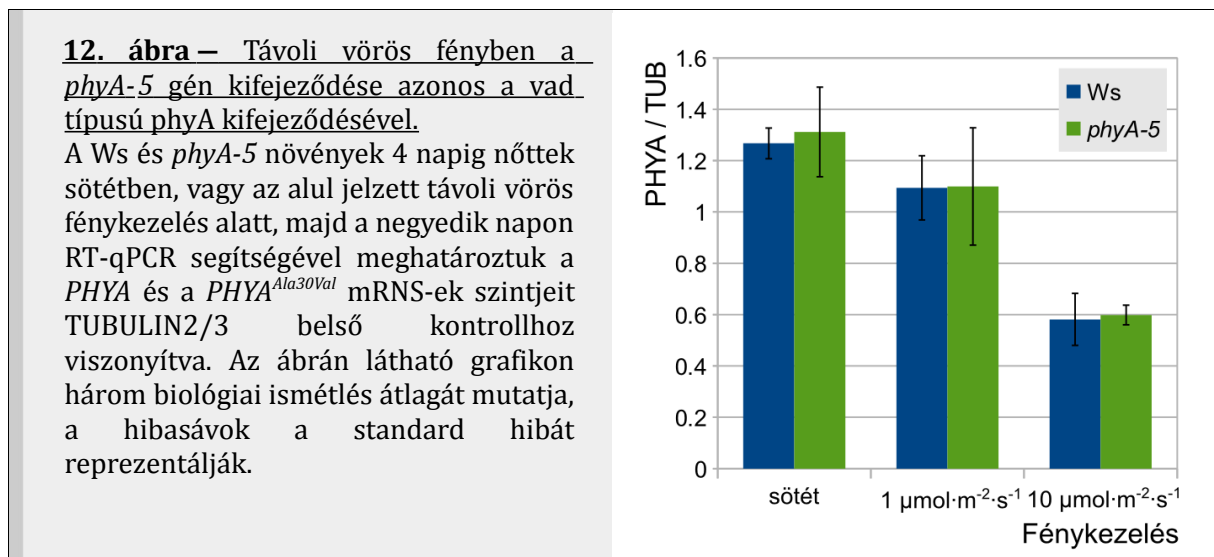
4.3 – Kísérleti célok és hipotézisek

A *PHYA^{Ala30Val}* molekulát kifejező növényvonalak gyenge távoli vörös fényben csökkent érzékenységgel rendelkeznek. Ilyen fénykörülmények között a *PHYA* az egyetlen aktív fotoreceptor. A *phyA-5* növények fenotípusának hátterében álló molekuláris mechanizmust a következő feltevések tesztelésén keresztül térképeztük fel:

- Megváltoztatja-e *phyA-5* mutáció a *PHYA* mRNS szintjét, a gén kifejeződésnek és/vagy a *PHYA* mRNS stabilitásának csökkentésén keresztül.
- Csökkenti-e a *phyA-5* mutáció okozta *Ala30Val* aminosav szubsztitúció a *PHYA* molekula fehérjestabilitását és ezen keresztül *PHYA* fehérjeszintjét.
- Megváltozik-e *PHYA* molekula sejten belüli dinamikája az *Ala30Val* szubsztitúció következtében. A *PHYA* sejtmagi importja ugyanis esszenciális része a *PHYA* jelátvitelének.
- Sérült-e *PHYA^{Ala30Val}* molekuláról kiinduló jel továbbítása a jelátviteli lánc elemeihez való csökkent affinitás miatt. (VLFR és HIR válasz)

4.4 – A *phyA-5* mutáció hatása a *PHYA* mRNS szintjére

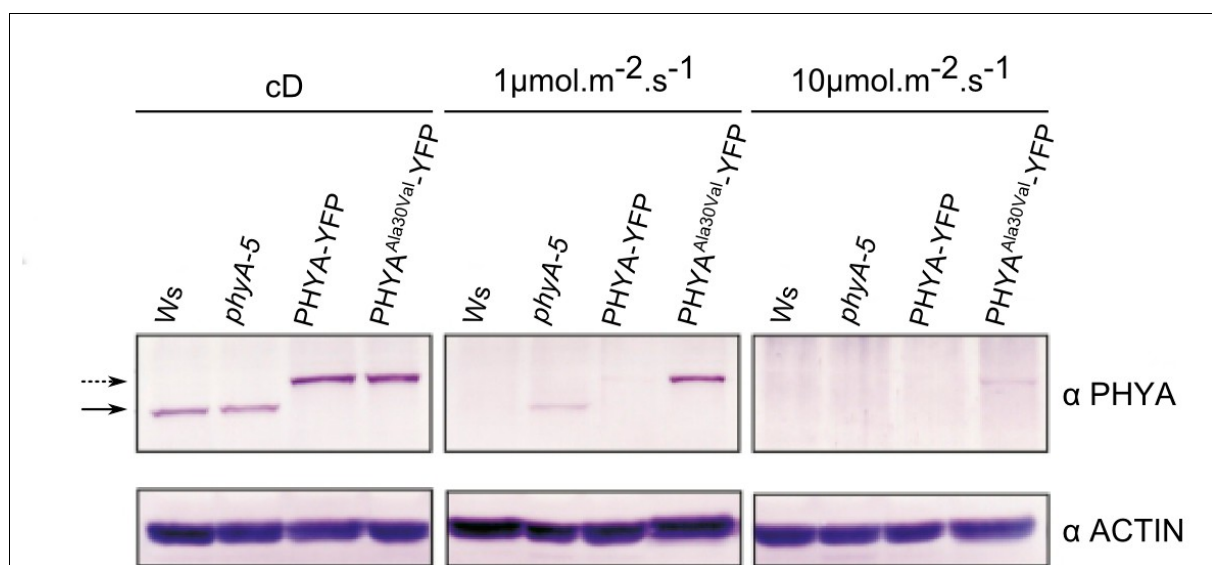
Bár nem általános, de elképzelhető, hogy a kódoló szekvencián belül található mutáció megváltoztatja *PHYA* mRNS sejten belüli mennyiségét, az mRNS megváltozott kifejeződésén, vagy stabilitásán keresztül. Ennek a hipotézisnek a tesztelésére 4 napig növesztettünk sötétben, gyenge ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) és intenzív ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) távoli vörös fény alatt *Ws* és *phyA-5* növényeket. Ezt követően RT-qPCR segítségével meghatároztuk a *PHYA* és *PHYA-5* mRNS-ek szintjeit *TUBULIN 2/3* mRNS belső kontrollhoz viszonyítva. A 12. ábrán bemutatott grafikonon látható, hogy a vad típusú és mutáns növények azonos *PHYA* és *PHYA-5* mRNS szintekkel rendelkeznek mindhárom fénykezelés esetében. Következtetésként levonhatjuk, hogy a *phyA-5* allél a vad típusú *PHYA*-val megegyező módon fejeződik ki mind sötétben, mind távoli vörös fényben.



4.5 – A *phyA-5* mutáció hatása a *PHYA* fehérjedinamikájára

Egy adott fehérje mennyiségét a sejtben a fehérje szintézise és a degradációja között kialakuló egyensúly határozza meg. A *PHYA* P_r formája stabil, míg a fény hatására kialakuló P_{fr} forma kb. 60 perces féléletidővel elbomlik (lásd később). Az előző kísérletek megmutatták, hogy *Ws* és *phyA-5* növények azonos *PHYA* és *PHYA-5* mRNS szintekkel rendelkeznek. Így a *PHYA* és *PHYA^{Ala30Val}* fehérjemolekulák is nagy valószínűséggel azonos sebességgel szintetizálódnak. Mivel a *phyA-5* fenotípus egyik lehetséges okának a *PHYA^{Ala30Val}* fehérje csökkent stabilitását tartottuk, megvizsgáltuk a *PHYA* és *PHYA^{Ala30Val}* fehérjék szintjeinek változását. A kísérlet során 4 napig sötétben, gyenge és intenzív távoli vörös fényben növesztettünk *PHYA*-t (*Ws* és *PHYA*-YFP-t kifejező *phyA-201*) és *PHYA^{Ala30Val}*-t kifejező (*phyA-5* és *PHYA^{Ala30Val}*-YFP-t kifejező *phyA-201*) csíranövényeket. A negyedik

napon a növényekből fehérje kivonatot készítettünk, amiben Western blot segítségével meghatároztuk a PHYA és PHYA^{Ala30Val} fehérjék szintjeit. A 13. ábrán bemutatott Western blot-on látható, hogy sötétben a Ws és a phyA-5 növényekben a PHYA és a PHYA^{Ala30Val} fehérjék szintjei azonosak. Ez az eredmény bizonyítja, hogy a phyA-5 mutáció nem befolyásolja a PHYA gén kifejeződését. Az ábrán látható az is, hogy a sötétben nőtt, PHYA-YFP-t és a PHYA^{Ala30Val}-YFP-t kifejező növényekben szintén azonosak az említett fehérjék szintjei. Ez bizonyítja, hogy a vizsgált vonalakban a transzgenek kifejeződése azonos. A 4 napig tartó gyenge (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) távoli vörös fénykezelés hatására a vad típusú PHYA fehérje szintje (Ws és a PHYA-YFP fehérjét kifejező *phyA-201*) detektálhatósági szint alá csökkent, míg a PHYA^{Ala30Val} fehérje szintje (*phyA-5* és a PHYA^{Ala30Val}-YFP fehérjét kifejező *phyA-201*) a sötét kontrollhoz képest csökkent, de jól detektálható szinten maradt. A 4 napig intenzív távoli vörös (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) fényvel kezelt növényekben a PHYA, a PHYA^{Ala30Val} és a PHYA-YFP fehérjék lebomlottak, csak a PHYA^{Ala30Val}-YFP fehérjét kifejező *phyA-201* vonalban maradt nagyon kevés detektálható fehérje.



13. ábra – A PHYA és PHYA^{Ala30Val} fehérjék degradációja gyenge távoli vörös fényben eltérő.

A növények 4 napig nőttek sötétben, vagy távoli vörös fényben, majd a 4. napon Western blot segítségével meghatároztuk a PHYA és a PHYA^{Ala30Val} fehérjék szintjeit. A folytonos nyíl az endogén PHYA és PHYA^{Ala30Val} fehérjéket, a szaggatott nyíl a PHYA-YFP és a PHYA^{Ala30Val}-YFP fúziós fehérjéket jelöli. Az alsó sorban látható az aktin fehérjemennyisége, mely mutatja, hogy a különböző fehérjemintákból azonos mennyiségűt használtunk.

A PHYA fehérje P_r (inaktív) formája stabil, míg P_{fr} (aktív) formáját gyorsan lebontja egy eddig ismeretlen molekuláris gépezet. Távoli vörös fény hatására az összes PHYA-nak

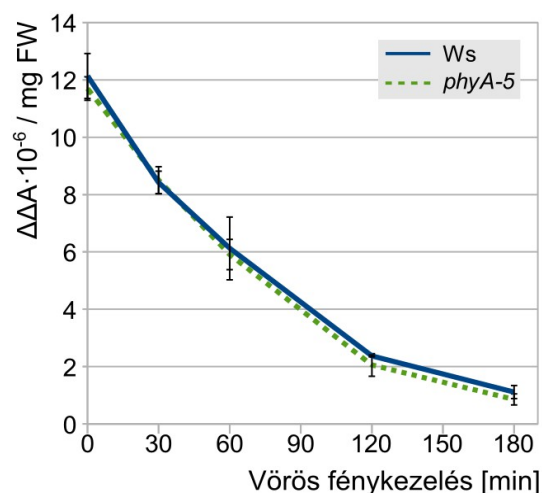
legfeljebb 2-3%-a alakul P_{fr} formába, ezért a PHYA degradációja ilyen körülmények között lassú. Ezzel ellentétben vörös fény hatására az összes PHYA-nak kb. 85%-a alakul P_{fr} formába, így ilyen körülmények között a PHYA degradációja meglehetősen gyors folyamat.

Hogy eldöntsük, vajon a *phyA-5* mutáció degradációra gyakorolt hatása csak távoli vörös fénykezelés esetén érvényesül, amikor a PHYA-nak csak kis része van P_{fr} formában, vagy általánosan érinti a PHYA molekulák degradációjában résztvevő mechanizmust, akkor is amikor a PHYA nagy része P_{fr} formában van, megvizsgáltuk a PHYA degradációját intenzív vörös fényben.

A kísérlet során 4 napos sötétben nőtt *Ws* és *phyA-5* növényeket 3 órás intenzív vörös besugárzásnak vetettünk alá és a kezelés alatt spektroszkópiai úton követtük a PHYA és $PHYA^{Ala30Val}$ fehérjék mennyiségének változását a csíranövényekben (lásd 7.2.6). A 14. ábrán látható, hogy a sötétben nőtt növényekben (0 percnél) a PHYA és $PHYA^{Ala30Val}$ fehérjék szintjei azonosak, valamint a PHYA és $PHYA^{Ala30Val}$ fehérjék degradációja azonos kinetikát mutat. Ez az eredmény bizonyítja, hogy a $PHYA^{Ala30Val}$ molekula a degradációban szerepet játszó molekulákkal a vad típusú PHYA-val azonos módon képes kölcsönhatásba lépni és a $PHYA^{Ala30Val}$ degradációja csak gyenge távoli vörös fényben sérült.

14. ábra – A PHYA és *PHYA-5* fehérjék degradációs kinetikája azonos intenzív vörös fényben.

4 napos, sötétben nőtt *Ws* és *phyA-5* csíranövényeket intenzív vörös fényvel kezeltünk és a kísérlet 3 órás időszakában fotometriai úton mértük a PHYA és a $PHYA^{Ala30Val}$ fehérjék mennyiségének változását. Az Y tengelyen a P_r és P_{fr} forma abszorpciókülönbségét ábrázoltuk. Minden mérési pont legalább három biológiai ismétlés átlaga, a hibásávok a standard hibát reprezentálják.

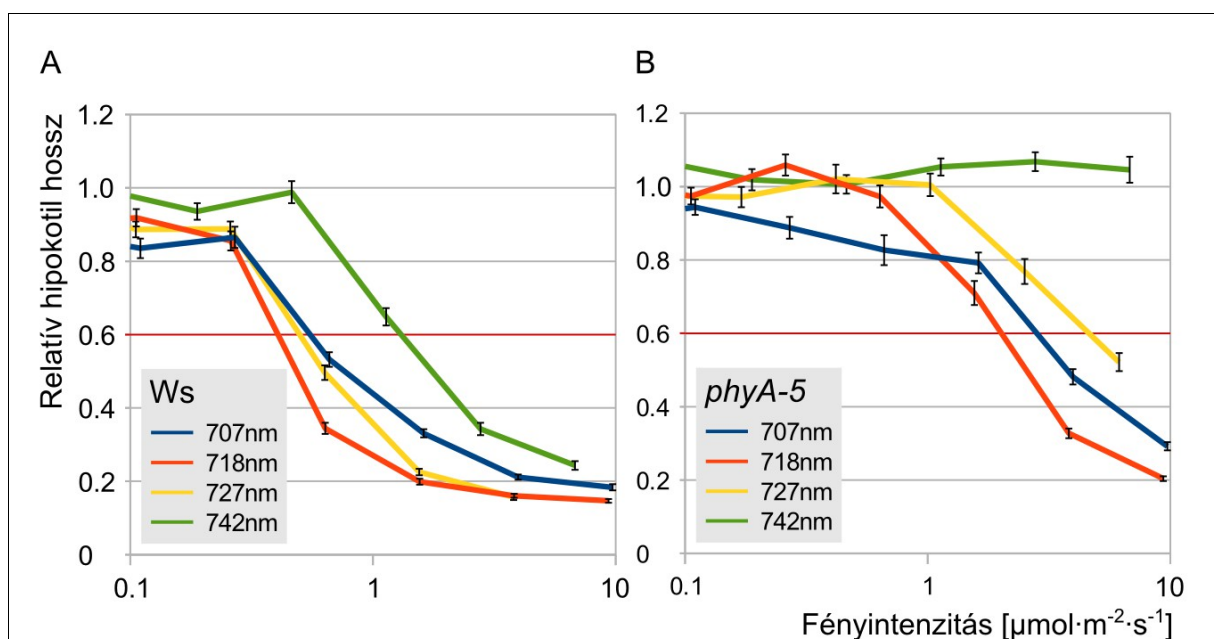


4.6 – A PHYA és a $PHYA^{Ala30Val}$ közvetítette jelátvitel hullámhosszfüggése

A *phyB* mutáns növényekben a vörös és távoli vörös hullámhossztartományt (600 - 800 nm) csak a PHYA receptor érzékeli. Ezekben a növényekben adott mértékű fiziológiai válasz kiváltásához 720 nm hullámhosszon szükséges a legkisebb fényintenzitás, vagyis erre a fényre a legérzékenyebbek, ezen a hullámhosszon van a PHYA akcióspektrumának

maximuma (Shinomura és mtsai. 2000). Az irodalomból ismert, hogy a PHYA NTE doménjét érintő mutációk képesek a kék fény irányába tolni a PHYA akcióspektrumát, vagyis a legnagyobb érzékenység hullámhosszát (Cherry és mtsai. 1992). A *phyA-5* növények fenotípusának háttérében álló egyik lehetséges ok, hogy az Ala30Val aminosavcsere megváltoztatja a kromofór működését, így a PHYA^{Ala30Val} fehérje legnagyobb érzékenysége rövidebb hullámhosszúságú tartományba tolódott. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez 4 napig különböző hullámhosszúságú és intenzitású fény alatt növesztettünk *Ws* és *phyA-5* csíranövényeket, majd a negyedik napon megmértük az átlagos hipokotil hosszukat. A kísérlet eredményét a 15. ábrán bemutatott grafikonok foglalják össze. Az **A** panelon látható a *Ws*, a **B** panelon a *phyA-5* növények fiziológiai válasza. Szembetűnő, hogy a *phyA-5* növények azonos fiziológiai válasz kiváltásához minden hullámhosszon nagyobb fényintenzitást igényelnek.

Ezeknek a méréseknek a segítségével készítettük el a *Ws* és a *phyA-5* növények akcióspektrumait, a 60%-os hipokotil növekedés gátláshoz tartozó fényintenzitást véve alapul. Mivel ezeknek az intenzitásértékeknek a reciproka, arányos az adott



15.ábra – A *phyA-5* növények érzékenysége távoli vörös fényre erősen csökken a fény hullámhosszának növekedésével.

A *Ws* (A panel) és *phyA-5* (B panel) növények 4 napig nőttek különböző hullámhosszúságú távoli vörös fénykezelés alatt (707nm/718nm/727nm/742nm). A negyedik napon meghatároztuk átlagos hipokotil hosszukat ($n \geq 30$) és azt a fényintenzitás függvényében ábráztuk. A fényintenzitást logaritmikus skálán ábráztuk, a hibásávok a standard hibát mutatják.

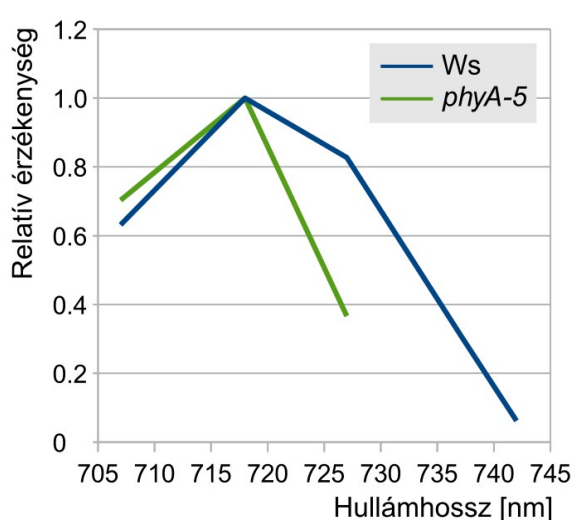
hullámhosszhoz tartozó érzékenységgel. A számított értékeket a legnagyobb érzékenységre

normalizálva kaptuk a *Ws* és a *phyA-5* növények akcióspektrumát, melyet a 16. ábra mutat be. Fontos kiemelni, hogy a mind a *Ws*, mind a *phyA-5* növények legnagyobb érzékenysége 718 nm hullámhosszra esik. Ennél hosszabb hullámhosszakon, pedig a *phyA-5* növények érzékenysége drasztikusan csökken, míg 742 nm hullámhosszúságú fényre már nem is reagálnak a vizsgált intenzitás-tartományban.

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a *phyA-5* növények minden hullámhosszon nagyobb fényintenzitást igényelnek a vad típusú *Ws* növényekével azonos mértékű fiziológiai válasz kiváltásához. A *phyA-5* növények relatív érzékenysége nem tolódott rövidebb hullámhossz irányába, hiszen az megegyezik a vad típusú *Ws* növényekével. 718 nm-nél nagyobb hullámhosszokon pedig a *phyA-5* növények relatív érzékenysége meredekebben csökken, mint a vad típusú *Ws* növényeké.

16. ábra – A *Ws* és *phyA-5* növények 718nm hullámhosszúságú fényre a legérzékenyebbek, ennél nagyobb hullámhosszakon a *phyA-5* relatív érzékenysége a *Ws* növényekéhez képest erősen csökkent.

Az ábrán látható akcióspektrumok a 13. ábrán bemutatott hipokotil rövidülési mérés alapján készültek. Az egyes hullámhosszakhoz tartozó relatív érzékenységeket a 60%-os hipokotil növekedés gátláshoz tartozó fényintenzitások reciprokaként határoztuk meg, majd normalizáltuk őket a legnagyobb érzékenységre.



4.7 – A PHYA^{Ala30Val} fehérje közvetítette VLFR válasz sérült

A PHYA fehérje extrém fényérzékenységgel rendelkezik. A sötétben P_r (inaktív) formában szintetizált PHYA fehérje olyan kis fény dózisokra is reagál, amely semmilyen más fotoreceptort nem hozna működésbe. Ennek oka, hogy a PHYA egyik legfontosabb szerepe a csírázás után a szkotomorfogenezis és fotomorfogenezis programjai közötti átkapcsolás. Ezeket a válaszokat összefoglalóan VLFR (very low fluence response), ide tartoznak a hipokotil kanyargó kiegyenesedése, a sziklevelek kinyílása és a cirkadián óra beállításához szükséges gének (pl.: *PRR9*) kifejeződésének markáns indukciója.

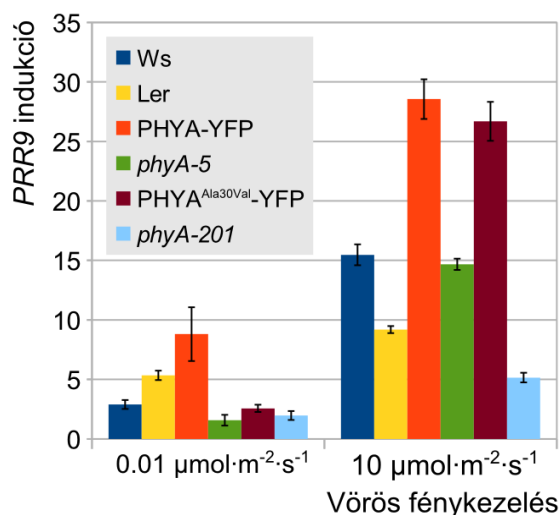
Hogy megvizsgáljuk, vajon a *phyA-5* mutáció befolyásolja-e a PHYA közvetítette VLFR választ, 4 napos sötétben nőtt csíranövényeket 1 percreg kezelünk 0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ és 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású vörös fényvel. Ezt követően 1 óráss sötét kezelés során hagytuk

felhalmozódni az indukált gének mRNS-eit. A *PRR9* mRNS-ének szintjeit RT-qPCR segítségével mértük meg *TUBULIN2/3* mRNS belső kontrollhoz viszonyítva, míg a *PRR9* gén indukcióját a sötét kontrollban mért *PRR9* / *TUBULIN2/3* arányához viszonyítva határoztuk meg. A kísérlet eredményét a 17. ábra mutatja be. Látható, hogy alacsony intenzitású vörös fénykezelés esetén a vad típusú *PHYA* fehérjét kifejező növényvonalak (*Ws*, *Ler*, *PHYA*-YFP-t kifejező *phyA-201*) a *PRR9* mRNS-ének szignifikáns indukcióját mutatják, ezzel ellentétben a *PHYA*^{Ala30Val} fehérjét kifejező növényvonalakban (*phyA-5*, *PHYA*^{Ala30Val}-YFP-t kifejező *phyA-201*) a *PRR9* mRNS-ének szintje megegyezik *phyA-201* null mutánsban mérhető szinttel. Erős vörös fénykezelés hatására a *Ws* és *phyA-5* növényekben és a *PHYA*-YFP-t és *PHYA*^{Ala30Val}-YFP-t kifejező *phyA-201* vonalak páronként megegyező *PRR9* mRNS indukciót mutatnak.

Összegzésként elmondható, hogy a *phyA-5* mutáció dóziszfüggő módon befolyásolja a *PHYA* jelátvitelét VLFR körülmények között: nagyon alacsony vörös dózis hatására a vad típusú *PHYA*-t kifejező vonalakban már beindul a jelátvitel, míg a *PHYA*^{Ala30Val} fehérjét hordozó vonalakban nem. Intenzív vörös fényimpulzus hatására azonban a *PHYA* és a *PHYA*^{Ala30Val} fehérjék azonos módon képesek a *PRR9* gén kifejeződését indukálni.

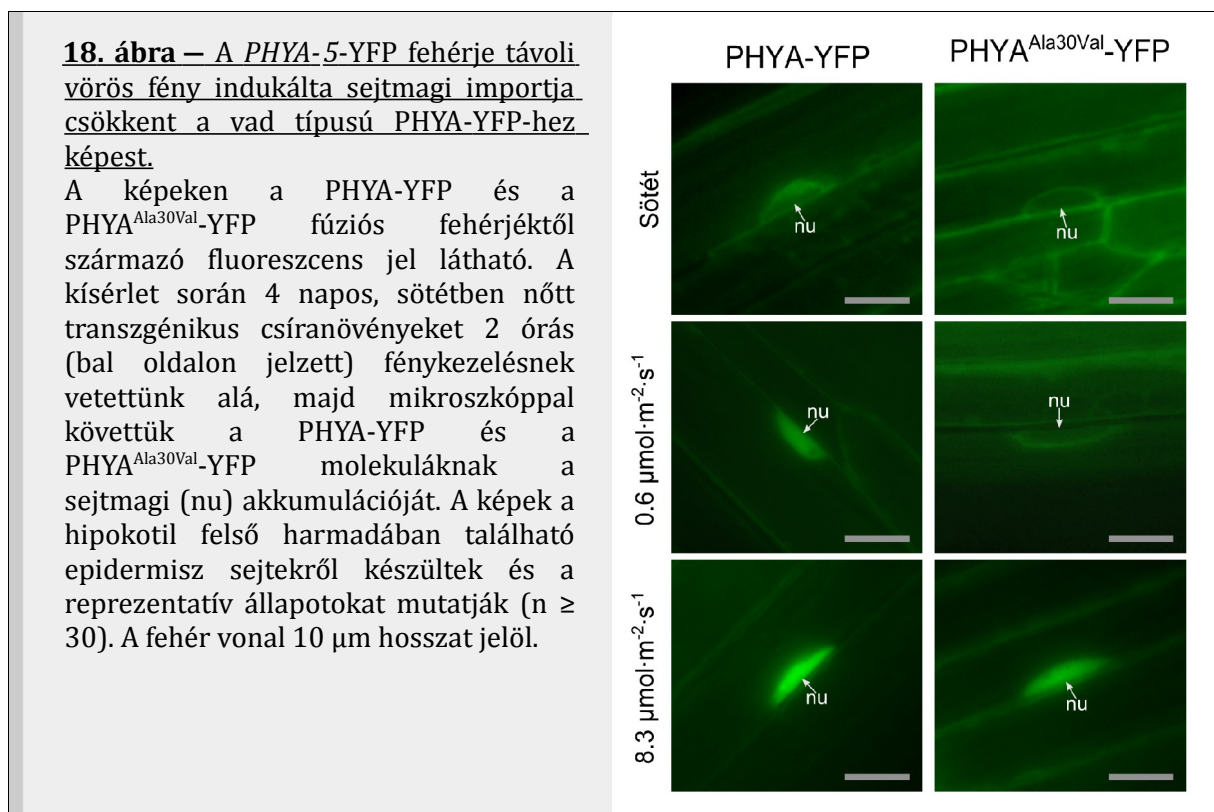
17. ábra – A *PHYA*^{Ala30Val} fehérjét kifejező vonalakban, gyenge vörös fényben a VLFR válasz sérült

A kísérlet során 4 napos sötétben nevelt csíranövényeket kezeltünk 1 perces vörös fényimpulzussal, majd 1 óráig sötétkezelés után megmértük a *PRR9* mRNS-ének szintjeit RT-qPCR segítségével, *TUBULIN2/3* mRNS belső kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. A *PRR9* mRNS indukcióját sötétben tartott kontroll növények *PRR9* / *TUBULIN 2/3* szintjéhez képest határoztuk meg. Minden mérési pont három biológiai ismétlés átlagát mutatja, a hibaszávok a standard hibát reprezentálják.



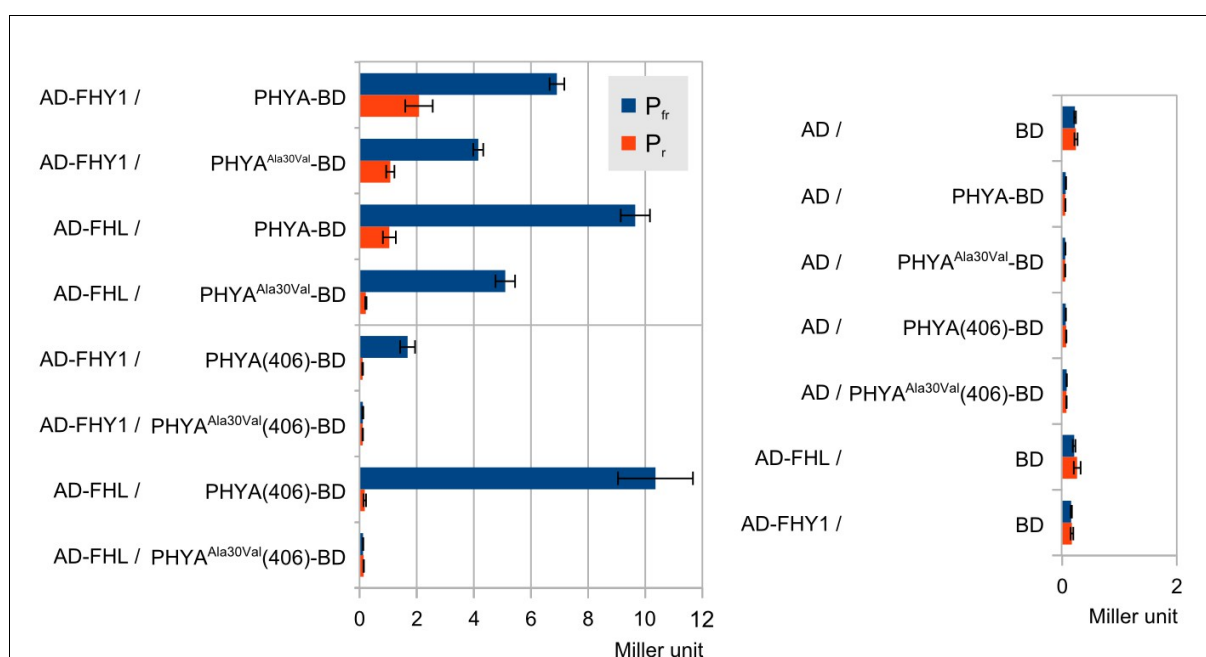
4.8 – A PHYA és a PHYA^{Ala30Val} sejten belüli lokalizációja

A PHYA jelátvitelének egyik első és esszenciális lépése a molekula fényfüggő sejtmagi importja. Hogy megvizsgáljuk a *phyA-5* mutáció hatását a PHYA molekula sejtmagi importjára, 4 napos, sötétben nőtt PHYA-YFP és PHYA^{Ala30Val}-YFP fehérjét kifejező *phyA-201* növényeket 1 órás gyenge ($0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) és intenzív ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) távoli vörös kezelésnek vetettük alá, majd fluoreszcens mikroszkóppal követtük a sejtmagi YFP jel intenzitásának változását. Az eredményeket a 18. ábra mutatja be. Látható, hogy sötétben egyik vonal sejtmagjában sem látható YFP jel, mivel sötétben a PHYA-YFP és a PHYA^{Ala30Val}-YFP fehérjék is kizárólag a citoplazmában találhatóak. Nincs számottevő különbség a két fehérje lokalizációjában intenzív távoli vörös kezelés után sem, mind a PHYA-YFP, mind a PHYA^{Ala30Val}-YFP intenzíven halmozódott fel a sejtmagban. Szembetűnő azonban a különbség gyenge távoli vörös kezelés után. Amíg a PHYA-YFP markáns sejtmagi felhalmozódást mutatott, addig a PHYA^{Ala30Val}-YFP fehérje sejtbeli eloszlása a sötétben nőtt növényekére hasonlít: a sejtmagban nem látható YFP jel, mert nem történt PHYA^{Ala30Val}-YFP felhalmozódás. A fiziológiai vizsgálatokat jól kiegészítik ezek az eredmények, ahol e két vonal viselkedése között szintén csak gyenge távoli vörös fényben tapasztaltunk eltérést.



4.9 – A PHYA^{Ala30Val} fehérje csökkent affinitással kötődik az FHY1 és FHL sejtmagi transzport fehérjékhez

A PHYA-YFP és PHYA^{Ala30Val}-YFP sejten belüli dinamikája és a fiziológiai adatok egyezése alapján valószínűnek tűnt, hogy a *phyA-5* mutáció okozta Ala30Val aminosav szubsztitúció a sejtmagi transzport molekulákkal való kölcsönhatást zavarja meg. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez élesztő két hibrid rendszerben teszteltük a PHYA és a PHYA^{Ala30Val}, valamint ezen fehérjék az N-terminális 406 aminosavát tartalmazó csonka verzióinak (PHYA(1-406) és PHYA^{Ala30Val}(1-406)) kölcsönhatását a FHY1 valamint a FHL molekulákkal. A kísérlet során használt élesztő sejteket a PHYA egyik verzióját és az egyik transzportert hordozó két plazmiddal transzformáltuk. A felnövesztett élesztő kultúrákat kettéosztottuk. A kultúrák egyik fele 5 perces vörös fénykezelést kapott, ami indukálja a PHYA és a transzporterek kölcsönhatását. A kultúra másik fele a vörös kezelést követően 5 perces távoli vörös fénykezelést kapott, ami semlegesítette a vörös fény hatását. A kísérlet eredményét a 19. ábra mutatja be. Látható, hogy a PHYA verziók és a transzport molekulák kötődése vörös fény (P_{fr} forma) függő. A PHYA és a PHYA(406) molekulák számottevően nagyobb



19. ábra – A PHYA^{Ala30Val} molekula kisebb affinitással kötődik a FHY1 és FHL sejtmagi transzporterekhez, mint a PHYA

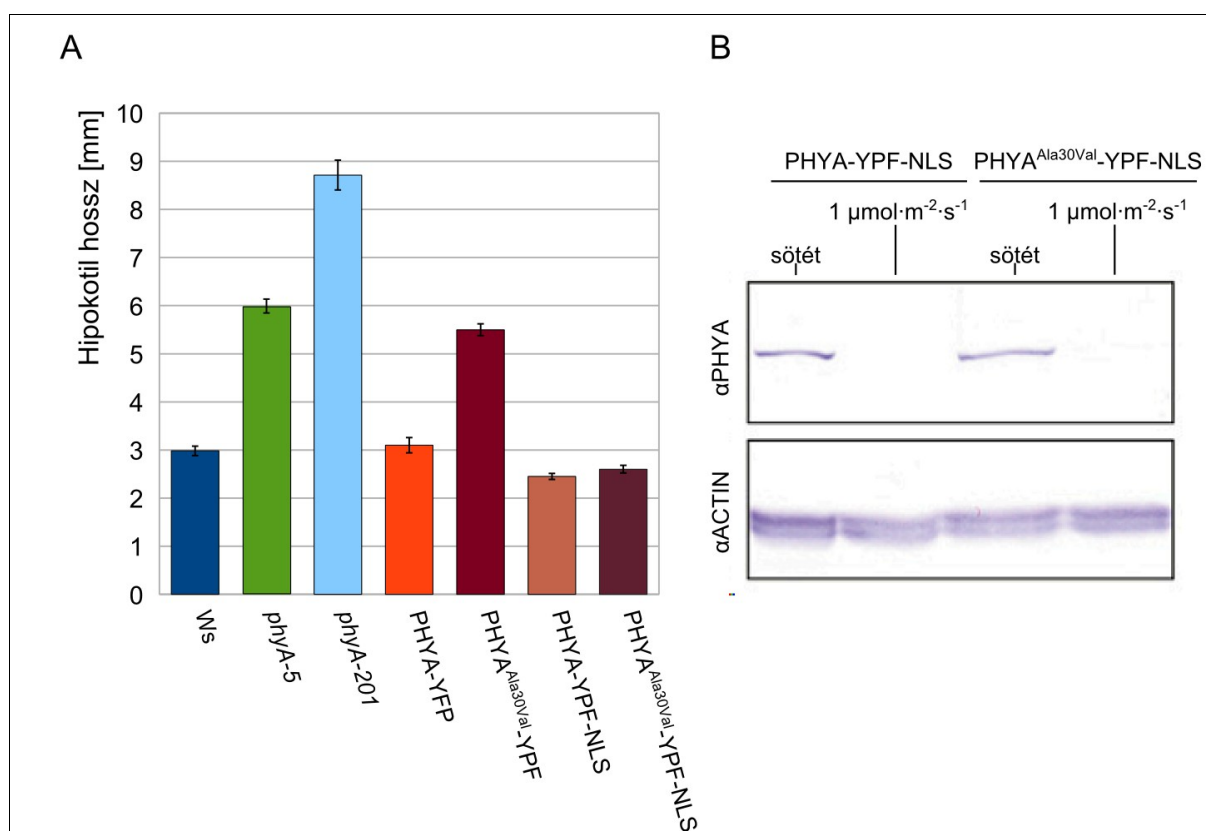
Az élesztő törzseket a jelzett plazmid párokkal transzformáltuk (AD - GAL4 aktivációs doménje, BD - GAL4 DNS kötő doménje). A folyadék kultúrákat sötétben neveltük, majd elfejeztük. A P_{fr} minták 5 perc vörös, P_r minták vörös, majd 5 perc távoli vörös kezelést kaptak. A β -galaktozidáz aktivitását a fénykezelést követő 4 óras sötét inkubáció után mértük meg. A feltüntetett eredmények 3 mérés átlagai, a hibasávok a standard hibát jelzik.

affinitással kötik az FHY1 és FHL molekulákat, mint a PHYAAla30Val és PHYAAla30Val(406) molekulák.

Következtetésként levonhatjuk, hogy a kísérlet során használt körülmények között a vad típusú PHYA és PHYA(406) fehérjék nagyobb affinitással képesek a transzport molekulákat kötni, mint a PHYA^{Ala30Val} és a PHYA^{Ala30Val}(406).

4.10 – A *phyA-5* fenotípus komplementációja nukleáris lokalizációs szignál segítségével

Az eddigi kísérletek tanulsága szerint a *phyA-5* allél fenotípusáért a PHYA^{Ala30Val} molekula sérült sejtmagi importja felelős, mivel a PHYA^{Ala30Val} molekula kisebb affinitással kötődik a FHY1 és FHL transzporterekhez, mint a vad típusú PHYA. Amennyiben a PHYA^{Ala30Val} fehérje jelátvitelét tekintve teljesen funkcionális PHYA molekula, csak alacsony intenzitású távoli



20. ábra – A PHYA^{Ala30Val}-YFP-NLS gyenge távoli vörös fényben vad típusú fenotípust és degradációt mutat.

A – Az alul jelzett vonalak 4 napig nőttek gyenge távoli vörös fényben, majd megmértük átlagos hipokotil hosszukat ($n \geq 30$) sötétben nőtt kontroll növényekhez viszonyítva. A hibaszávok a standard hibát jelzik.

B – A PHYA-YFP-NLS és a PHYA^{Ala30Val}-YFP-NLS fehérjék mennyiségi vizsgálata 4 napos sötétben és gyenge távoli vörös fényben nőtt növényekből készült fehérjekivonatokban. A különböző vonalokból azonos mennyiségeket analizáltunk, amit azt aktin mennyisége mutatja.

vörös fényben nem képes a vad típuséhoz hasonló sejtmagi szintet elérni, akkor a PHYA^{Ala30Val}-YFP és NLS (nuclear localization signal) szignálpeptid fúziója vad típusú PHYA-YFP-vel megegyezően működik.

Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez *PHYA_{prom}*-PHYA-YFP-NLS és *PHYA_{prom}*-PHYA^{Ala30Val}-YFP-NLS génkonstrukciókat hoztunk létre és azokat Ler *phyA-201* háttérbe transzformáltuk. Az utódvonalakat 4 napig gyenge vörös fényben növesztve mindkét növényvonal a vad típusú PHYA-t hordozó vonalakéval (Ws, PHYA-YFP-t kifejező *phyA-201*) azonos hipokotil növekedés gátlást mutatott. Megvizsgáltuk ezen túl a mindkét NLS fúziós fehérjét kifejező vonal fehérjedegradációját 4 napos gyenge távoli vörös fénykezelés után ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Mindkét vonalban a PHYA-YFP-NLS és a PHYA^{Ala30Val}-YFP-NLS detektálhatósági szint alá csökkent, ami megegyezik a vad típusú PHYA (Ws) reakciójával (lásd 13. ábra). A 20. ábrán bemutatott eredmények bizonyítják, hogy a *phyA-5* allél okozta fenotípus háttérben a sérült sejtmagi import áll és a PHYA^{Ala30Val} molekula a jeltovábbítása nem sérült.

5 – A *phyA-5* allél jellemzésével kapcsolatos eredmények megvitatása

5.1 – A *phyA-5* mutáció okozta Ala30Val aminosavcsere kondicionális, hiposzenzitív fenotípust hoz létre távoli vörös fényben

Dolgozatom előző fejezetében ismertetett kísérletes munka vezetett a *phyA-5* allélt hordozó növények komplex fenotípusa mögött álló molekuláris mechanizmus megismeréséhez. A *phyA-5* mutánst Garry Whitelam laboratóriumában izolálták vad típusú *Ws* növények EMS mutagenizált populációjából. A *phyA-5* allérről átíródó fehérje a kódoló régióban bekövetkezett C → T nukleotid cserének köszönhetően a 30. pozíciójában Ala helyett Val aminosavat hordoz. Az említett Ala a fitokrómok NTE doménjében található és erősen konzervált az egész növényvilágban (9. ábra). Az NTE domén kizárólag a növényi fitokrómokra jellemző, és a jelátvitelben betöltött szerepéről meglehetősen kevés adat áll rendelkezésünkre.

Az egyik első, a PHYA NTE régiójával kapcsolatos kísérletes munka, dohányban (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) kifejezett rizs PHYA rendszert használt. Az NTE domén első 10 Ser aminosavát (2-4, 10-14, 19, 20) alaninra cseréltek (rizs PHYA^{Ser/Ala}) és dohányban fejtek ki. A hipokotil növekedés gátlása alapján a vad típusú dohány (dohány PHYA) mutatta a legkisebb, a vad típusú rizs PHYA-t kifejező vonalak közepes, míg a mutáns rizs PHYA^{Ser/Ala} fehérjét kifejező dohány növények a legnagyobb vörös fényérzékenységet (Stockhaus és mtsai. 1992). Egy másik munka dohányban kifejezett vad típusú és a 7-69 aminosavat nem tartalmazó deléciós zab (*Avena sativa*) PHYA változat segítségével vizsgálata az NTE domén szerepét. A deléciós mutáns zab PHYA(Δ7-69)-t kifejező transzgénikus dohány fényérzékenysége a vad típusú zab PHYA-t kifejezőkhöz képest megközelítően 80%-al csökkent (Cherry és mtsai. 1992). A dohányban kifejezett 6-12 aminosavra deléciós mutáns zab PHYA(Δ6-12) fehérje csak a VLFR válaszokban – gyenge távoli vörös fényimpulzus kezelés alatt – mutatott hiperszenzitív reakciót a vad típusú zab PHYA-t kifejező növényekhez képest. Ha ezt a mutáns zab PHYA(Δ6-12) fehérjét *Arabidopsis*-ban fejezték ki, a növények VLFR válasza a vad típusú zab PHYA-t kifejező növényekével megegyező volt. Folyamatos távoli vörös fényben azonban, – dohányban és lúdfűben is – a zab PHYA(Δ6-12)-t kifejező növények csökkent választ mutattak (Casal és

mtsai. 2002). Egy újabb tanulmányban *phyA* null mutáns lúdfűben kifejezett *Arabidopsis* PHYA(Δ 6-12) hatását vizsgálták. A növényeket távoli vörös pulzusokkal kezelve a vad típusú PHYA-t kifejező kontroll növényekkel egyező VLFR választ mutattak. Ezzel ellentétben a folyamatos távoli vörös fényvel kezelt mutáns PHYA(Δ 6-12)-t kifejező növények sérült HIR válaszreakciót mutattak a vad típusú PHYA-t kifejező növényekhez képest. A mutáns PHYA(Δ 6-12) fehérje degradációja vörös és távoli vörös fényben is gyorsabb volt, mint a vad típusú PHYA-é, ami egyik lehetséges magyarázata lehet a tapasztalt fenotípusnak (Trupkin és mtsai. 2007). A PHYA szubsztitúciós és deléciós változatain végzett kísérletek eredményeit az 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat - A PHYA NTE régiójával kapcsolatos publikációk és eredmények összefoglalása.

Gazdanövény	Transzgén eredete	PHYA fehérje-változat	Fenotípus	Publikáció
<i>Nicotiana tabacum</i> (dohány)	<i>Oriza sativa</i> (rizs)	PHYA ^{Ser/Ala} (2-4, 10-14, 19, 20)	hiperszenzitív vörös fényben	(Stockhaus és mtsai. 1992)
<i>Nicotiana tabacum</i> (dohány)	<i>Avena sativa</i> (zab)	PHYA(Δ 7-69)	csökkent fényérzékenység vörös fényben	(Cherry és mtsai. 1992)
<i>Nicotiana tabacum</i> (dohány)	<i>Avena sativa</i> (zab)	PHYA(Δ 6-12)	VLFR hiperszenzitív HIR csökkent	(Casal és mtsai. 2002)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (lúdfű)	<i>Avena sativa</i> (zab)	PHYA(Δ 6-12)	VLFR vad típusú HIR csökkent	
<i>Arabidopsis thaliana</i> (lúdfű)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (lúdfű)	PHYA(Δ 6-12)	VLFR vad típusú HIR csökkent Fehérjestabilitás sérült	(Trupkin és mtsai. 2007)

Összefoglalva, az idézett munkák eredményei alapján a PHYA NTE doménje szükséges a PHYA teljes biológiai aktivitásához. Továbbá egyszikűekben feltehetően létezik egy negatív visszacsatolás, mely az NTE domén szerin aminosavainak foszforilációján keresztül csökkenti a PHYA érzékenységét. Fontos megjegyezni azonban, hogy az egyszikű fitokrómok sok tekintetben eltérnek kétszikű homológjaiktól. Rendelkeznek pl. sötét reverzióval, ami a lúdfű PHYA-ra nem jellemző. Az idézett munkák nem tisztázzák maradéktalanul a tapasztalt hatások molekuláris hatásmechanizmusát, ezért nem értelmezhetőek általánosan és további vizsgálatok szükségesek egy konzisztens modell felállításához a PHYA NTE doménjének a jelátvitelben betöltött szerepéről.

A *phyA-5* mutáció nem érinti az NTE domén szerin oldalláncait, a következtében kialakuló fenotípus mégis meglehetősen komplex:

- alacsony intenzitású távoli vörös fényben nőtt *phyA-5* növények markánsan

csökkent választ mutatnak, ennek ellenére intenzív távoli vörös fényben a *phyA-5* növények hipokotil rövidülési válasza azonos a vad típusú *Ws* növényekével (10. és 11. ábra).

- a *phyA-5* növények hipokotil növekedésének gátlása a távoli vörös fény hullámhosszának emelkedésével meredekebben csökken, mint a vad típusú *Ws* növényeké (15. és 16. ábra hipokotil növekedés és akcióspektrum)
- a *phyA-5* növények VLFR és HIR válaszukban is csökkent válaszreakciót mutatnak a vad típusú *Ws* növényekhez képest (17. ábra VLFR, 11., 15. ábrák HIR válasz).

5.2 – A *phyA-5* mutáció nem befolyásolja a *PHYA* mRNS kifejeződését

Az egyik lehetséges molekuláris mechanizmus, ami *phyA-5* fenotípusának hátterében állhat, hogy a *phyA-5* allélban bekövetkezett C → T nukleotid csere megváltoztatja a *PHYA* mRNS-ének sejtbeli mennyiségét azáltal, hogy csökkenti a *phyA-5* gén kifejeződését, vagy a mutáns mRNS stabilitását. RT-qPCR kísérletek során azonban bebizonyosodott, hogy a *PHYA* (*Ws* növényekben) és a *PHYA-5* (*phyA-5* növényekben) mRNS-ek szintjei páronként megegyeznek 4 napos sötétben nőtt és 4 napig különböző intenzitású távoli vörös kezelések kitett növényekben. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a *phyA-5* mutáció nem befolyásolja a sem a kifejeződést, sem az mRNS stabilitását. Továbbá valószínűsíti, hogy a *phyA-5* fenotípus hátterében a fehérje viselkedését érintő változások állnak.

5.3 – A *PHYA*^{Ala30Val} fehérje lebomlása távoli vörös fényben sérült, míg vörös fényben a vad típusával megegyező

A kérdés megválaszolására, hogy a *phyA-5* növények fenotípusát vajon a *PHYA*^{Ala30Val} fehérje gyorsabb degradációja okozza-e, megvizsgáltuk a *PHYA* és *PHYA*^{Ala30Val} fehérjék bomlását távoli vörös fényben és vörös fényben is.

4 napig alacsony intenzitású távoli vörös fényben növesztett *phyA-5* csíranövények megnövekedett *PHYA*^{Ala30Val} fehérjeszintet mutattak a vad típusú *Ws* növényekhez képest. Sötétben a két fehérje szintje azonos volt, míg 4 napos intenzív távoli vörös kezelés hatására mindkét fehérje lebomlott. A fiziológiai válaszreakciók esetében is csak alacsony intenzitású távoli vörös fénykezelésnél tapasztaltunk csökkent hipokotil növekedési választ a *phyA-5* növények esetében. A *phyA-5* növények csökkent fiziológiai válasza és a *PHYA*^{Ala30Val} fehérje megnövekedett stabilitása látszólagos ellentmondásban állnak

egymással.

Sötétben nőtt csíranövényekben a PHYA nagy mennyiségben van jelen. Vörös fénykezelés hatására azonban a PHYA kb. 60 perces féléletidővel elbomlik. Amennyiben az Ala30Val aminosavcsere megzavarná a PHYA-nak a degradációban szerepet játszó fehérjékkel való kölcsönhatását, akkor intenzív vörös kezelés esetén a a PHYA és PHYA^{Ala30Val} fehérjéknek eltérő degradációs kinetikával kéne rendelkezniük. Ezért megmértük a PHYA és a PHYA^{Ala30Val} fehérjék bomlását vörös fényben. Mivel a két fehérje bomlásának kinetikája teljesen megegyezett arra a következtetésre jutottunk, hogy a az Ala30Val szubsztitúció nem befolyásolja a PHYA fehérjedegradációban résztvevő fehérjékkel való kölcsönhatást és a *phyA-5* fenotípus hátterében más mechanizmus áll.

5.4 – A *phyA-5* mutáció megváltoztatja a PHYA sejten belüli eloszlását

A PHYA közvetítette jelátvitelében a sejtmagi import esszenciális szerepet játszik, mely szigorúan fényfüggő folyamat. A PHYA fehérje importját két, részben átfedő szerepű transzport fehérje biztosítja: az FHY1 és FHL. Jelentőségüket mutatja, hogy az *fh1/fhl* dupla null mutáns növények *phyA* null mutáns fenotípust mutatnak, távoli vörös fényre „vakok”. Hogy megvizsgáljuk, hogy a *phyA-5* növények fenotípusának hátterében esetleg a sérült sejtmagi import áll-e, fluoreszcens mikroszkóp segítségével megvizsgáltuk a PHYA-YFP és PHYA^{Ala30Val}-YFP fehérjék sejtmagi akkumulációját különböző távoli vörös fénykezelések után. Eredményeink megint egybehangzóak voltak a növények fiziológiai válaszaival:

- sötétben a nem volt látható PHYA-YFP és PHYA^{Ala30Val}-YFP-től származó fluoreszcens jel a sejtmagban.
- intenzív távoli vörös fénykezelés hatására azonban a PHYA-YFP-t vad típusú és a PHYA^{Ala30Val}-YFP növények sejtmagjaiban is intenzív YFP jel volt látható, ami PHYA-YFP és a PHYA^{Ala30Val}-YFP fehérjék sejtmagi akkumulációját bizonyítja.
- alacsony intenzitású távoli vörös kezelés hatására azonban csak a vad típusú PHYA-YFP-t kifejező növények sejtmagjaiban történt PHYA-YFP felhalmozódás, míg a PHYA^{Ala30Val}-YFP-t kifejező növények a sötétben nőtt növények „üres” sejtmagjaival mutattak egyezést.

Az eredmények valószínűsítették, hogy a PHYA^{Ala30Val} fehérje kisebb affinitással kötődik a sejtmagi import molekulákhoz, de ez a hatás csak alacsony intenzitású távoli vörös fényben érvényesül. Feltehetően vörös és intenzív távoli vörös fényben a rendelkezésre álló nagyobb

mennyiségű PHYA^{Ala30Val} P_{fr} molekula már képes ellensúlyozni a FHY1 és a FHL molekulákkal való gyengébb kötődés hatását, ezzel a vad típushoz hasonló sejtmagi akkumulációt hozva létre.

5.5 – A PHYA^{Ala30Val} molekula kisebb affinitással kötődik az FHY1 és FHL sejtmagi transzport fehérjékhez

Miután fény derült a *phyA-5* növények sérült sejtmagi importjára, felmerült a kérdés, hogy megváltoztatja-e az Ala30Val aminosavcsere a PHYA molekula kötődését a FHY1 és a FHL transzport molekulákhoz. A kérdés megválaszolásához élesztő két-hibrid rendszert használtunk, mely bizonyította, hogy a mind a teljes hosszúságú PHYA^{Ala30Val}, mind az N-terminális 406 aminosavat tartalmazó PHYA^{Ala30Val}(1-406) fragment jelentősen kisebb affinitással kötődik a FHY1 és FHL molekulákhoz (19. ábra). Bár a teljes hosszúságú fehérjék esetében a különbségek nem drámaiak (kb. 50-60%-a a vad típusénak) fontos megjegyezni, hogy a PHYA és transzportereinek kötődése egyensúlyi reakció. Így a kialakuló egyensúlyt alapjaiban meghatározza a reakciópartnerek sztöchiometrikus viszonya. Növényben a PHYA mennyisége jóval meghaladja meg a FHY1 és a FHL fehérjék mennyiségét. Ezt a körülményt élesztőben nem lehet reprodukálni. Emellett élesztőben a vizsgált kölcsönható fehérjék egy NLS szignálpeptidhez fuzionáltak, így az *in vivo* szituációtól eltérően mesterségesen az élesztősejtek sejtmagban lokalizáltak. Az élesztő két-hibrid kísérletek során tehát nem valósul meg az *in vivo* rendszerben oly fontos fényfüggő sejtmagi import. Feltehetően ezeknek a különbségeknek köszönhetően ilyen szerény az élesztőben mért különbség, míg növényben alacsony intenzitású távoli vörös fényben a fiziológiai szinten tapasztalt különbség számottevően nagyobb (kb. 3-szoros).

Hiltbrunner és munkatársai megmutatták, hogy az NTE domén önmagában nem képes kötődni az FHY1 és FHL molekulákhoz (Hiltbrunner és mtsai. 2006). Az általunk elvégzett kísérletek eredményei ezt kiegészítik azzal, hogy az NTE domén és a Ala30 aminosav és a környezetében elhelyezkedő aminosavak feltehetően részei a transzport molekulák kötésében szerepet játszó fehérjefelszínnek. Ez a felszín feltehetően függ a fehérje harmadlagos szerkezetétől és nagy valószínűséggel a PHYA aktív konformációjának (P_{fr}) kialakulásával válik funkcionálissá (Leitgeb és mtsai. 2012).

5.6 – A *phyA-5* növények fenotípusa a sérült sejtmagi importon keresztül valósul meg

Kísérleti eredményeink egybehangzóan a PHYA^{Ala30Val} fehérje sérült sejtmagi importjára utaltak, mint a *phyA-5* mutáció hátterében álló molekuláris mechanizmus. Nyitva maradt azonban a kérdés, hogy képes-e a sejtmagban elhelyezkedő PHYA^{Ala30Val} molekula a vad típusú PHYA-val megegyező jeltovábbításra. Ezért a létrehoztuk a PHYA-YFP-NLS és a PHYA^{Ala30Val}-YFP-NLS fúziós fehérjéket kifejező növényvonalakat. Ezeknek a vonalaknak a mikroszkópos vizsgálata megmutatta, hogy a PHYA-YFP-NLS és a PHYA^{Ala30Val}-YFP-NLS molekulák a fényviszonyoktól függetlenül a sejtmagban lokalizáltak és gyenge távoli vörös fényben is mindkét vonal a vad típusú Ler és Ws növényekre jellemző fiziológiai választ mutatta. A vad típusú PHYA és a PHYA^{Ala30Val} molekulák távoli vörös fény érzékelése és jeltovábbításának hatékonysága megegyező. Így a *phyA-5* növények fenotípusának hátterében a PHYA^{Ala30Val} fehérje sejtmagi import molekulákkal (FHY1 és FHL) való csökkent kölcsönhatása áll. Ez a gyengébb kölcsönhatás csak alacsony intenzitású távoli vörös fényben jár együtt a PHYA^{Ala30Val} csökkent sejtmagi importjával és a következtében kialakuló sérült válaszreakciókkal. A *phyA-5* növények fenotípusa kondicionális viselkedést mutat, hiszen intenzív távoli vörös fényben a *phyA-5* növények a vad típusú Ws növényekkel megegyező válaszreakciókat mutattak. Ennek a jelenségnek a magyarázata feltehetően az említett fényviszonyok között kialakuló magasabb és a PHYA-val megegyező PHYA^{Ala30Val} P_{fr} szint, mely képes ellensúlyozni a PHYA^{Ala30Val} fehérje és a sejtmagi transzporterek (FHY1, FHL) csökkent kötődésének hatását.

5.7 – A *phyA-5* fenotípust létrehozó folyamatok modellje

Hiltbrunner és munkatársai bizonyították, hogy a PHYA fényfüggő sejtmagi importjában a FHY1 és a FHL molekulák kulcsszerepet játszanak. Ebben a munkában közölt élesztő kéthibrid eredmények alapján úgy gondolták, hogy a PHYA NTE doménje önmagában nem képes az FHY1 és a FHL molekulákkal való fényfüggő kölcsönhatásra (Hiltbrunner és mtsai. 2006). Az aktív PHYA fehérje (P_{fr} konformációja) kb. 60 perces féléletidővel elbomlik, de a bomlás sebessége függ a PHYA sejtbeli lokalizációjától. Fankhauser és munkatársai bizonyították, hogy a PHYA fotoreceptor bomlása a citoplazmában – *phy1/fhl* dupla null mutáns növényben, ahol nincs PHYA sejtmagi import – szignifikánsan lassabb, mint vad típusú növényekben, ahol a PHYA sejtmagi importja ép (Debrieux & Fankhauser 2010).

A dolgozatomban bemutatott kísérletes munka kiegészíti ezeket az információkat azzal,

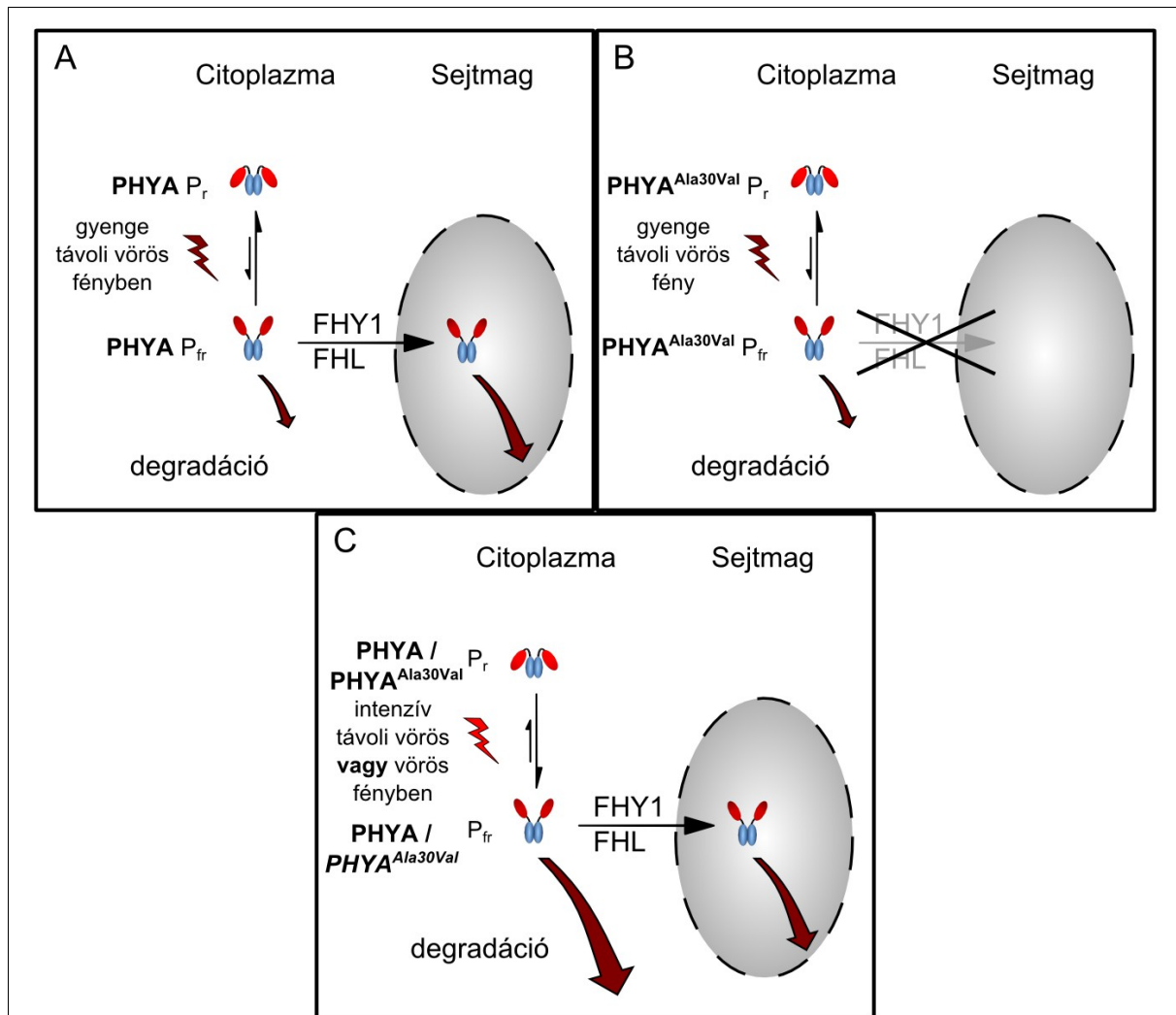
hogy a PHYA Ala30 oldallánca feltehetően fontos eleme annak a fehérjefelszínnek, ahol a FHY1, FHL és a PHYA molekulák kötődése kialakul. Bár az FHY1 és az FHL molekulák fehérje szintű homológiája viszonylag alacsony (~30%) az élesztő kéthibrid méréseink alapján valószínű, hogy a FHY1 és a FHL molekuláknak azonos a kötőhelyük a PHYA felszínén, hiszen a *phyA-5* mutáció mindkét transzport fehérje kötési affinitását csökkentette.

A *phyA-5* növények fenotípusa csak alacsony távoli vörös fényben érvényesül, ahol kimutatható, hogy a PHYA^{Ala30Val} fehérje sejtmagi importja erősen csökkent a vad típusú PHYA-hoz képest. Feltehetően az összes gyenge távoli vörösben tapasztalható jelenség: (i) hiposzenzitív HIR és VLFR válasz, (ii) csökkent PHYA^{Ala30Val} degradáció, (iii) csökkent érzékenység hosszú hullámhosszú távoli vörös fényben a sérült sejtmagi importtal hozható összefüggésbe.

A PHYA^{Ala30Val} viselkedésének modelljét a 21. ábra mutatja be. Vörös és intenzív távoli vörös fényben a PHYA^{Ala30Val} molekula magas P_{fr} szintje ellensúlyozza az Ala30Val aminosav csere okozta csökkent kötődést a FHY1 és FHL molekulákhoz, és ennek következtében a *phyA-5* növények megkülönböztethetetlenek a vad típusú növényektől.

Alacsony intenzitású távoli vörös fényben azonban a PHYA^{Ala30Val} molekula sejtmagi importja szignifikánsan csökkent – a vad típusú PHYA-hoz képest – és ez a jelátvitel és a degradáció limitáló faktorává válik. Ilyen körülmények között a *PHYA-5* molekula nem képes a sejtmagba jutni, így degradációja lassabb a vad típusú PHYA-nál és ezáltal megnövekedik a kialakuló egyensúlyi fehérjeszint. A *PHYA-5* fehérje sérült jelátvitel is a csökkent sejtmagi import következménye (VLFR és HIR egyaránt).

A távoli vörös fény a növekvő hullámhosszal egyre alacsonyabb P_{fr} arányt hoz létre, így nem meglepő, hogy a *phyA-5* növények ebben a tartományban a hullámhossz növekedésével egyre kisebb fiziológiai válaszreakciót mutatnak, mint a vad típusú *Ws* növények.



21. ábra – A PHYA^{Ala30Val} fehérje sejtmagi importja sérült gyenge távoli vörös fényben
A PHYA^{Ala30Val} fehérje működésének modellje:

A – Gyenge távoli vörös fényben a vad típusú PHYA P_{fr} aránya alacsony. Az FHY1 és FHL molekulákkal való kölcsönhatásnak köszönhetően azonban sejtmagi transzportja hatékony. Ennek következtében jelátvittele aktív, degradációja pedig gyors, hiszen a gyors sejtmagi és a lassabb citoplazmás degradációs folyamatok is zajlanak.

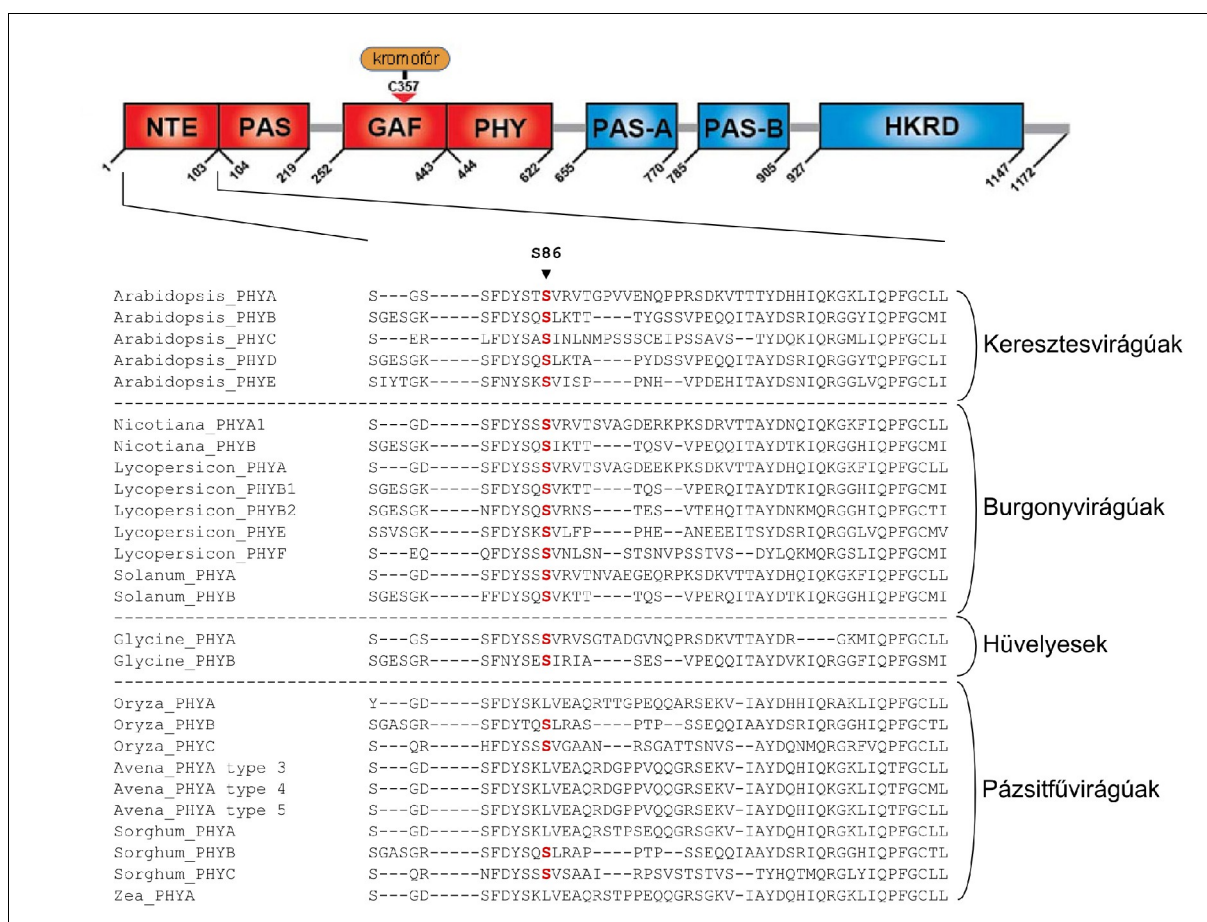
B – Gyenge távoli vörös fényben a PHYA^{Ala30Val} a vad típusú PHYA-val megegyező, alacsony P_{fr} arányt ér el. Viszont az NTE doménben lévő Ala30Val aminosav csere következtében az FHY1 és FHL sejtmagi transzpor molekulákhoz nem, vagy csak kevésbé képes kötődni. Így jelátvittele nem működik, vagy sérült, degradációja pedig lassabb a vad típusú PHYA-énál, mert csak a citoplazmában lévő lassabb degradációs folyamat megy végbe.

C – Intenzív távoli vörös fényben, vagy vörös fényben a kialakuló magas P_{fr} arány képes ellensúlyozni az Ala30Val mutáció hatását, így a PHYA^{Ala30Val} és a PHYA molekulák egyforma sejtmagi importot, degradációt és biológiai aktivitást mutatnak.

6 – A PHYB Ser86 foszforilációjával kapcsolatos kísérleti eredmények

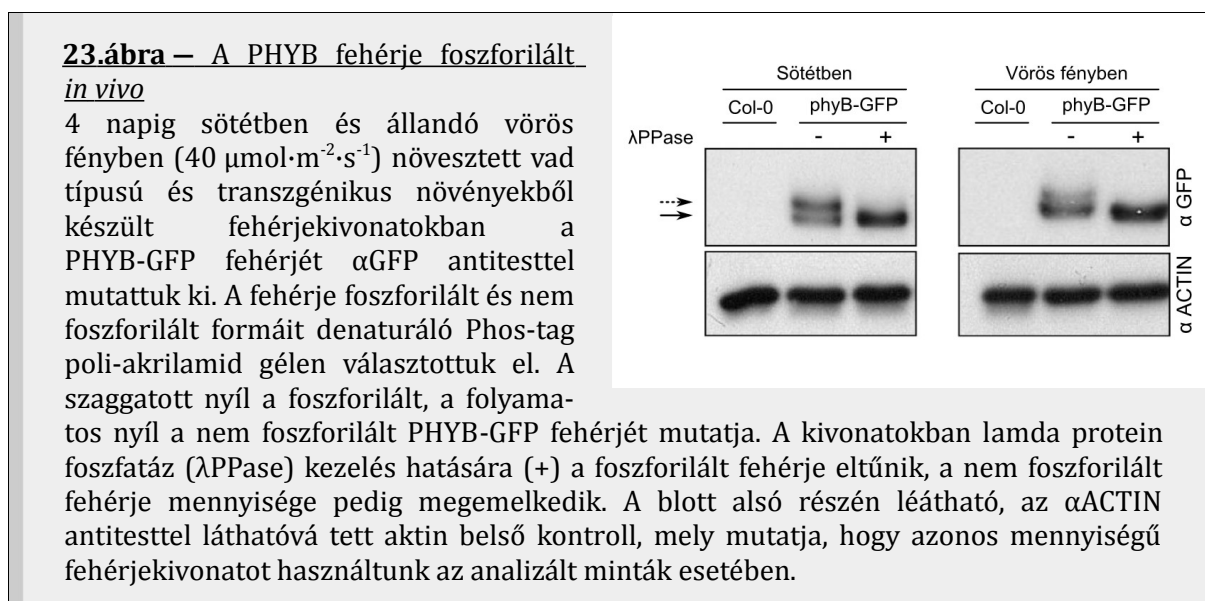
6.1 – A PHYB NTE doménje foszforilált szerin oldalláncokat hordoz

Korábbi tanulmányok megmutatták, hogy a PHYB képes *in vitro* autofoszforilációra, a fehérje NTE régiójában található szerin oldalláncokon (Han és mtsai. 2010). Nyitva maradt azonban a kérdés, hogy hordoz-e foszforilált aminosav oldalláncokat a PHYB *in vivo*. Ennek tisztázásához három hetes fény sötét cikluson növesztett transzgenikus növényekből izoláltunk PHYB-TAP-GFP fúziós fehérjét, melynek MALDI-TOF-MS analízisét a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomika Csoportja végezte el. Ez a vizsgálat vezetett a PHYB NTE régiójában található több foszfo-szerin oldallánc felfedezéséhez. Két peptid tartalmazott foszfát csoportot fajlagos töltésük alapján: az egyik a 23., 24. és 25. pozícióban



található Ser oldalláncok egyikén, míg egy másik peptid a 86. pozíciójú Ser oldalláncon. A későbbi kísérletek a 86. pozícióban található Ser foszforilációjának markáns biológiai jelentőségét erősítették meg. Fitokróm fehérjeszekvenciák összehasonlítása rámutatott, hogy a PHYB molekula Ser86 aminosav erősen konzervált a kétszikű növények körében és előfordulása gyakori az egyszikű növények PHYB homológjai között is. (22. ábra)

Az MALDI-TOF-MS analízis eredményét megerősítendő sötétben és vörös fényben nevelt PHYB-YFP csíranövényekből készült fehérjekivonatokat is megvizsgáltunk Zn-Phos-Tag denaturáló gélelektroforézis segítségével (Kinoshita & Kinoshita-Kikuta 2011). A módszer során használt módosított poliakrilamid mátrix nagyobb affinitással köti a foszforilált fehérjéket, ezáltal lehetővé téve ugyanazon fehérje foszforilált és nem foszforilált formáinak elválasztását. A 23. ábrán látható kísérleti eredmények tanúsítják, hogy a PHYB-GFP fehérje élő növényben is foszforilált. Elmondható, hogy a PHYB egy foszfoprotein, mely tény megerősítést nyert két kísérleti rendszerben is.



6.2 – A PHYB foszforilált és defoszforilált formáit imitáló molekulákat kifejező növényvonalak

A PHYB Ser86 foszforiláció PHYB jelátvitelre gyakorolt hatásának vizsgálatához két génkonstrukciót építettünk. Ezek a PHYB Ser86 oldalláncának foszforilált, illetve defoszforilált állapotát utánzó aminosav szubsztitúciót hordozó PHYB változatokat kódolnak:

- $35S_{\text{prom}}\text{-phyB}^{\text{Ser86Ala}}\text{-YFP}$

Ez a génkonstrukció a *PHYB* gén irányított mutagenézissel létrehozott verzióját kódolja, mely Ser86Ala szubsztitúciót eredményez. Erről a génről kifejeződő PHYB

molekula a 86. szerin oldalláncának defoszforilált állapotára jellemző negatív töltésekben szegény állapotot hoz létre.

- $35S_{\text{prom}}\text{-phyB}^{\text{Ser86Asp}}\text{-YFP}$

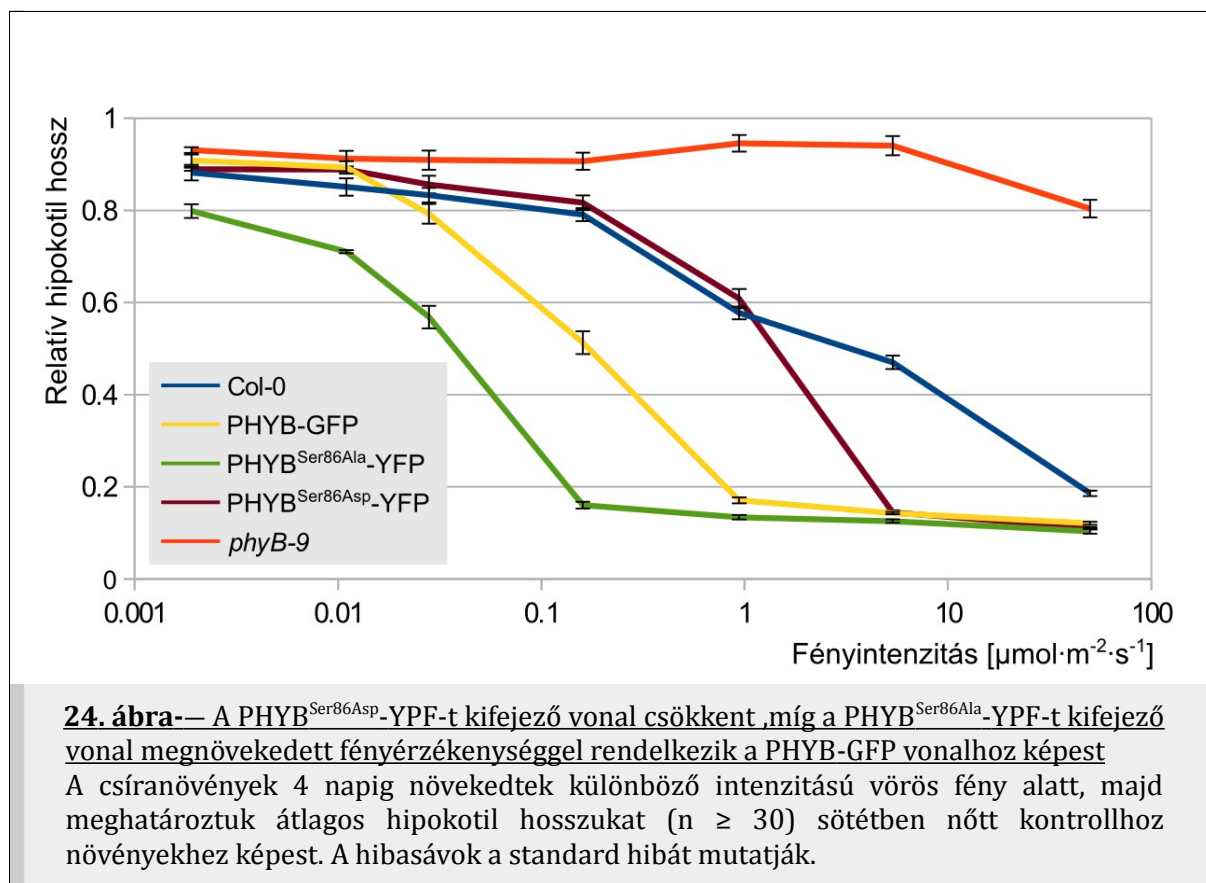
Ez a génkonstrukció a *PHYB* gén irányított mutagenézissel létrehozott verzióját kódolja, mely Ser86Asp szubsztitúciót eredményez. Erről a génről kifejeződő PHYB molekula a 86. szerin oldallánc foszforilált állapotára jellemző negatív töltésekben gazdag állapotot hoz létre.

Mindkét génkonstrukciót *Arabidopsis thaliana* Col-0 ökotípus, *phyB-9* (a *phyB* null mutáns allélját hordozó) háttérbe transzformáltuk. A további kísérleteket a transzgént azonos szinten kifejező homozigóta utódvonalakon végeztük. A kísérletek kontrolljaként egy korábban készült, körültekintően karakterizált $35S_{\text{prom}}\text{-PHYB-GFP}$ transzgént *phyB-9* háttérben hordozó vonalat használtunk.

6.3 – A $\text{PHYB}^{\text{Ser86Asp}}$ fehérjét kifejező növények csökkent vörös fényérzékenységgel rendelkeznek

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a PHYB Ser86 aminosav Ala és Asp szubsztitúciói hogyan befolyásolják a növények fényfüggő fiziológiai fejlődését. A kísérlet során 4 napig növesztettünk csíranövényeket különböző intenzitású vörös fény alatt. A 4. nap végén megmértük a különböző intenzitású vörös fénykezelésnek kitett csíranövények átlagos hipokotil hosszát. A 24. ábrán bemutatott grafikonon látszik, hogy az összes PHYB túltermelő vonal (PHYB-GFP , $\text{PHYB}^{\text{Ser86Ala}}\text{-YFP}$, $\text{PHYB}^{\text{Ser86Asp}}\text{-YFP}$) érzékenyebb vörös fényre, mint a vad típusú Col-0 növény, melynek fiziológiai válasza kb. $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös fényintenzitásnál éri el maximális értékét. A transzgenikus PHYB túltermelő vonalak közül a legkisebb vörös fényérzékenységgel a $\text{PHYB}^{\text{Ser86Asp}}\text{-YFP}$ – PHYB foszforilált állapotát utánzó – fehérjét kifejező vonal rendelkezik, ami kb. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös fényintenzitásnál éri el fiziológiai válaszáinak maximumát. A második legérzékenyebb vonal a vad típusú PHYB-GFP fúziós fehérjét kifejező vonal, aminek fiziológiai válasza kb. $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös fényintenzitás mellett éri el a telített szintet. A vörös fényre legérzékenyebb a $\text{PHYB}^{\text{Ser86Ala}}\text{-YFP}$ – PHYB defoszforilált állapotát utánzó – fehérjét kifejező vonal, melynek fiziológiai válasza már $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös fényintenzitásnál telített szintet ér el. Összefoglalva elmondható, hogy a minden PHYB fehérjét túltermelő vonal a vad típusú Col-0 növényhez képest hiperszenzitív vörös fényre. A túltermelő vonalak fiziológiai válaszáról elmondható, hogy a PHYB fehérje defoszforilált formáját hordozó vonal

(PHYB^{Ser86Ala}-YFP) extrém fényérzékenységgel, míg a a PHYB fehérje foszforilált formáját hordozó vonal (PHYB^{Ser86Asp}-YFP) erősen csökkent fényérzékenységgel rendelkezik. Mindkét vonal kb. 1-1 nagyságrenddel kisebb, vagy nagyobb fényintenzitás mellett mutat a vad típusú PHYB-GFP fehérjét kifejező vonalhoz hasonló fiziológiai választ.



6.4 – Kísérleti célok és hipotézisek

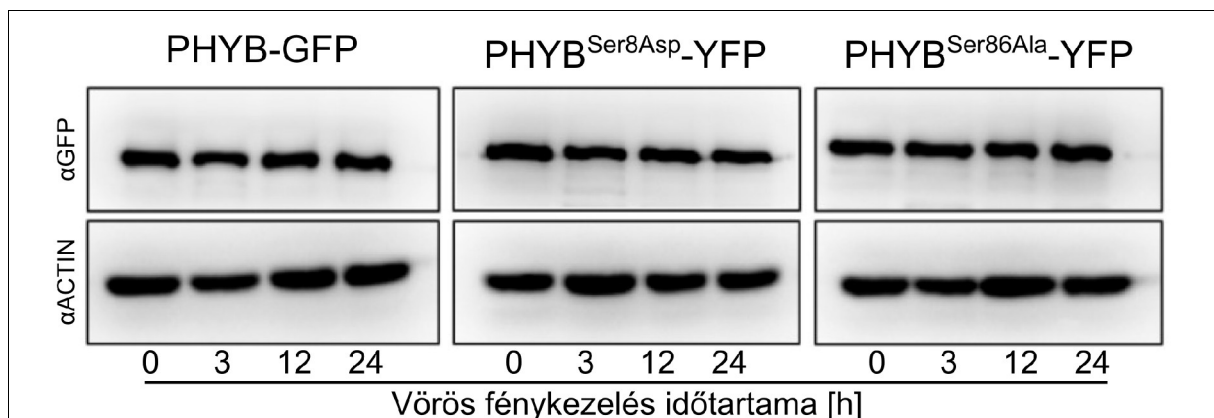
Vörös fényben a PHYB fotoreceptor játssza az elsődleges szerepet a növekedés és egyéb fényfüggő folyamatok szabályozásában. A PHYB MALDI-TOF-MS analízise alapján a molekula NTE régiójának Ser86 oldallánca a foszforilált. A foszforilált (PHYB^{Ser86Asp}) és defoszforilált (PHYB^{Ser86Ala}) állapotait utánzó irányított mutagenézissel létrehozott PHYB variánsokat kifejező növények fejlődése vörös fényben jelentős eltérést mutatott a vad típusú PHYB-t kifejező kontroll növényekéhez képest, azt sugallva, hogy a PHYB foszforilációja a Ser86 oldalláncon egy lehetséges érzékenység csökkentő mechanizmus része a PHYB jelátvitelében. A PHYB Ser86 foszforiláció háttérében álló molekuláris mechanizmus feltárásához a következő kérdések megválaszolásán keresztül jutottunk el:

- Hogyan befolyásolja a Ser86Asp és a Ser86Ala aminosav szubsztitúció a PHYB fehérje stabilitását

- Hogyan befolyásolja a Ser86Asp és a Ser86Ala aminosav szubsztitúció a PHYB sejtmagi importját
- Hogyan befolyásolja a Ser86Asp és Ser86Ala aminosav szubsztitúció a PHYB sejtmagi komplex képzését
- Hogyan befolyásolják a Ser86Asp és a Ser86Ala aminosav szubsztitúciók a PHYB-nek a jelátviteli láncának komponenseivel való kölcsönhatást
- Hogyan befolyásolja a Ser86Asp és a Ser86Ala aminosav szubsztitúció a PHYB molekula spektrális tulajdonságait
- Hogyan befolyásolja a Ser86Asp és a Ser86Ala aminosav szubsztitúció a PHYB molekula spontán relaxációját (más néven sötét reverzióját)

6.5 – A PHYB fehérjestabilitását a Ser86Asp és Ser86Ala aminosav szubsztitúció nem befolyásolja

PHYB molekula Ser86Ala és Ser86Asp aminosav szubsztitúcióinak PHYB jelátvitelre gyakorolt hatásának egyik lehetséges magyarázata, hogy az említett aminosavcserék megváltoztatják a PHYB fehérje stabilitását és ezzel a jelátvitelben résztvevő molekulák mennyiségét. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez 4 napos, sötétben nevelt, PHYB-GFP-t, PHYB^{Ser86Asp}-YFP-t és PHYB^{Ser86Ala}-YFP-t kifejező csíranövényeket kezeltünk $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös fényvel 3, 12 és 24 órán át. Ezután a növényekből fehérjekivonatot készítettünk, majd



25. ábra – A PHYB Ser86Ala és Ser86Asp aminosav szubsztitúciói nem befolyásolják a PHYB vörös fény indukálta lebomlását

A kísérlet során a 4 napig sötétben nőtt, PHYB-GFP, PHYB^{Ser86Asp}-YFP és aPHYB^{Ser86Ala}-YFP fehérjéket kifejező csíranövényeket kezeltünk $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású vörös fényvel 3, 12 és 24 órán keresztül. Ezt követően össz-fehérje kivonatot készítettük és Western blot segítségével meghatároztuk a PHYB-GFP és a foszfovariánsok fehérjeszintjeit, melyeket GFP antitest segítségével mutattunk ki. Minden mintából azonos mennyiségű összfehérjét használtunk a kísérlet során, amit az azonos aktin fehérje mennyisége is mutat.

a PHYB-GFP és foszfovariánsainak mennyiségét Western blot segítségével meghatároztuk. A kísérlet eredményét bemutató 25. ábrán látható, hogy a kezelés során a PHYB-GFP, PHYB^{Ser86Asp}-YFP és aPHYB^{Ser86Ala}-YFP fehérjék szintje nem változik a fénykezelés során. Ez alapján a PHYB és foszfovariánsainak eltérő vörös fényérzékenységeért nem a foszfovariánsok megváltozott fehérjestabilitása és az ebből eredő eltérő mennyiségük tehető felelőssé.

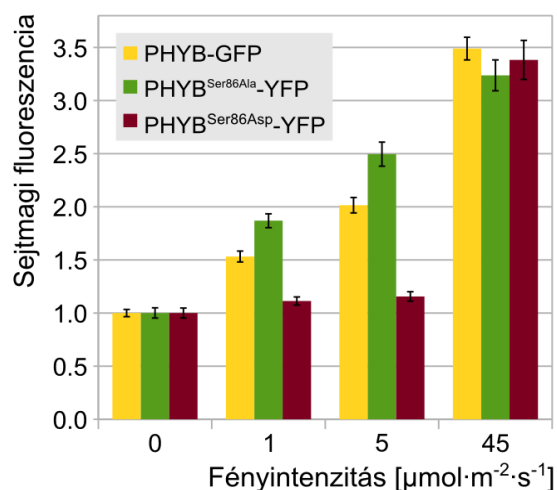
6.6 – A PHYB^{Ser86Asp} fehérje csökkent sejtmagi importtal rendelkezik

A PHYB fehérje jelátvitelében is fontos szerepe van a sejtmagi importnak, hiszen a citoplazmában elhelyezkedő PHYB nem működőképes (Palágyi és mtsai. 2010). Mikroszkópos kísérletek tanúsága alapján a sötétben nőtt növények citoplazmájában és sejtmagiában is jelentős mennyiségű PHYB fehérje található. Fénykezelés hatására azonban a sejtmagi PHYB mennyiség jelentősen megemelkedik (Pfeiffer és mtsai. 2012). Hasonlóan a PHVA-hoz a PHYB sem hordoz sejtmagi lokalizációs szignált (NLS), így sejtmagi transzportja NLS motívumot tartalmazó molekulákkal való kölcsönhatáson keresztül valósul meg. A sejtmagi PHYB szint fénykezelés hatására való megemelkedésében pedig a PHYB P_{fr} formájával specifikusan kölcsönható molekulák játszanak szerepet. A PHYB sejtmagi transzportjában eddig egyetlen, bizonyítottan résztvevő fehérje a PIF3 bHLH transzkripció faktor (Pfeiffer és mtsai. 2012). Mivel a PHYB^{Ser86Ala}-YFP és PHYB^{Ser86Asp}-YFP mutáns fehérjék ellentétes módon befolyásolták a fényfüggő hipokotil növekedést a vad típusú PHYB-GFP fehérjét kifejező vonalhoz képest, felmerült a kérdés, hogy ezt a hatást esetleg a megváltozott sejtmagi import okozza. Ennek tesztelésére 4 napos sötétben nőtt növényeket kezeltünk 2 órán keresztül különböző intenzitású vörös fényvel, majd mikroszkóppal követük a különböző PHYB változatok sejtmagi akkumulációját. A fiziológiai tesztekkel egybehangzóan a PHYB^{Ser86Ala}-YFP felhalmozódása volt a legerősebb 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ és 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású fénykezelés után. A PHYB-GFP akkumulációja, bár jól mérhető volt, elmaradt a PHYB^{Ser86Ala}-YFP szintjétől, míg a PHYB^{Ser86Asp}-YFP sejtmagi szintje nem mutatott szignifikáns emelkedést a sötétben nőtt kontroll növények sejtmagi PHYB^{Ser86Asp}-YFP szintjéhez képest. Ezzel ellentétben 2 órás 43 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös fénykezelés hatására, mindhárom PHYB variáns azonos sejtmagi akkumulációt mutatott. A 26. ábrán bemutatott eredményeket összefoglalva elmondhatjuk, hogy alacsony PHYB P_{fr} szintek esetén – alacsony intenzitású vörös fénykezelés hatására – a PHYB^{Ser86Ala}-YFP

fehérje importja hatékonyabb, mint a PHYB-GFP-é, míg a PHYB^{Ser86Asp}-YFP sejtmagi szintje nem mutatott számottevő emelkedést. Intenzív vörös fénykezelés alatt viszont a három forma sejtmagi importja egymástól megkülönböztethetetlen.

26. ábra – A PHYB^{Ser86Asp}-YFP alacsony intenzitású vörös fényben csökkent sejtmagi importot mutat

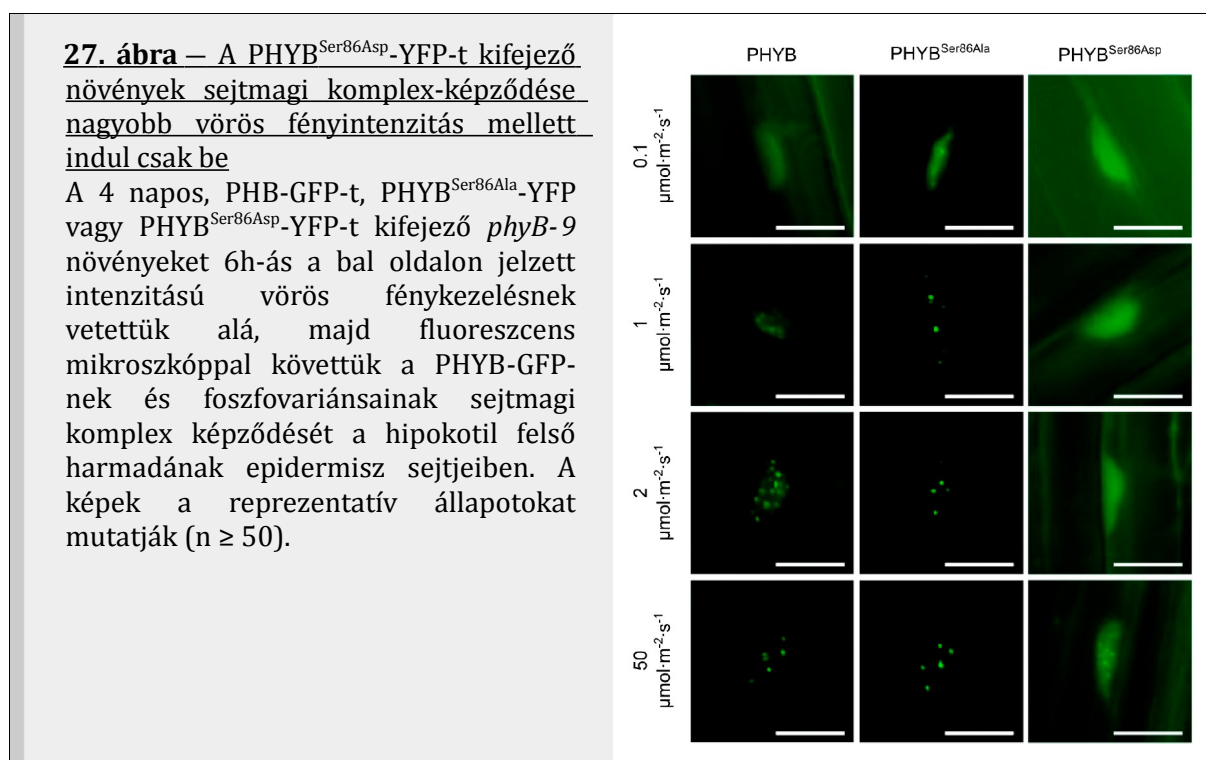
4 napos sötétben nőtt növényeket az alul jelzett intenzitású vörös fényvel, 2 órán át kezeltük (kivéve: 0 - sötét kontroll). Ezután a hipokotil felső harmadának epidermisz sejtjeiről epifluoreszcens mikroszkóp segítségével képeket készítettünk (minden kezelés esetén $n \geq 40$) és a képeken megmértük az átlagos sejtmagi fluoreszcencia intenzitását. A grafikonon a kezeletlen mintához viszonyított fluoreszcencia intenzitás növekedése látható. A hibaszávok a standard hibát jelzik.



6.7 – A PHYB^{Ser86Asp} fehérje csökkent sejtmagi komplexképzést mutat

Sötétben a sejtmagban lokalizált PHYB a nukleoplazmában diffúz állapotban van jelen. Vörös besugárzás hatására a sejtmagi PHYB mennyisége nő és a megvilágítás időtartamától, valamint intenzitástól függő módon megindul az aktív PHYB P_{fr} molekuláknak nukleáris protein komplexekhez kapcsolódása, melyeket spekle-nek (nuclear bodies vagy photobodies) nevez a szakirodalom (Kircher és mtsai. 2002). Az így kialakult komplexeknek száma és mérete a vörös fény intenzitásától függ. Hogy megvizsgáljuk a PHYB^{Ser86Asp} és PHYB^{Ser86Ala} aminosav szubsztitúciók hatását e komplex-képződési folyamatra, 4 napos sötétben nőtt növényeket kezeltünk 6 óra hosszan különböző intenzitású vörös fényvel. Ezt követően mikroszkóppal követtük a PHYB-GFP-nek és foszfovariánsainak sejtmagi viselkedését. A kísérlet eredményeit a 27. ábra foglalja össze. Látható, hogy a PHYB^{Ser86Ala}-YFP, defoszforilált formát utánzó variánst kifejező növények esetében már $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású vörös besugárzás után kialakulnak a nukleáris komplexek. A vad típusú PHYB-GFP-t kifejező növényeknek ezzel ellentétben egy nagyságrenddel nagyobb intenzitású, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös besugárzásra van szükségük ahhoz, hogy beinduljon a sejtmagi komplexek képződése. A legnagyobb vörös fényintenzitásra a PHYB^{Ser86Asp}-YFP, foszforilált formát utánzó variánst kifejező növényeknek

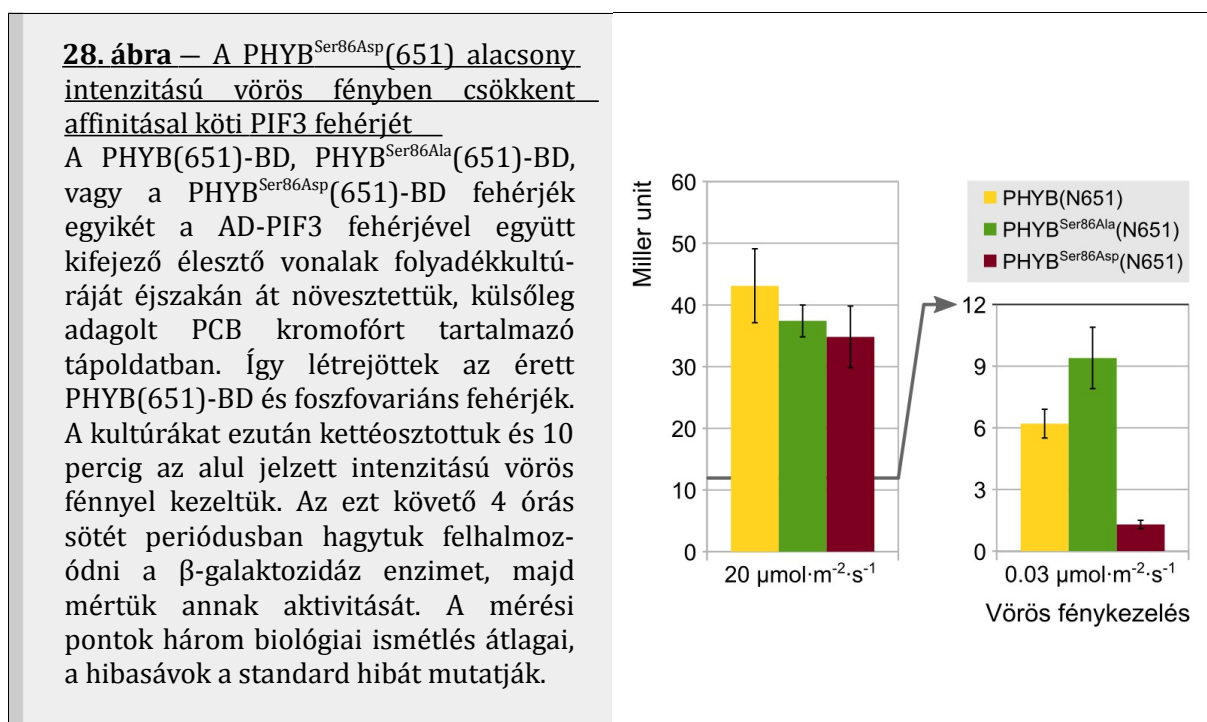
van szüksége, melyek sejtmagi komplex-képződése a PHYB-GFP-vel és a PHYB^{Ser86Ala}-YFP-vel ellentétben $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitású vörös besugárzás hatására még nem indul be. $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös fényintenzitás esetében, ahol a hipokotil növekedési válasz és a sejtmagi import már mindhárom PHYB formát kifejező növény esetében maximális szintet ér el hasonló számú és méretű sejtmagi komplexet formázott.



6.8 – A PHYB^{Ser86Asp} csökkent PIF3 kötő kapacitással rendelkezik alacsony intenzitású vörös fényben

A PHYB konformáció függő módon hat kölcsön jelátvitelének komponenseivel, amik közül a PIF géncsalád tagjai a legjobban karakterizáltak. Az előző kísérletek megmutatták, hogy a PHYB^{Ser86Asp}-YFP-t, – foszforilált formát utánzó variáns – kifejező növények fiziológiai válasza és a PHYB^{Ser86Asp}-YFP molekulák a sejtmagi importja is csökkent volt a vad típusú PHYB-GFP-t kifejező növényekhez viszonyítva. Mivel a PIF3 az egyetlen faktor, amely bizonyítottan részt vesz a PHYB sejtmagi importjában (Pfeiffer és mtsai. 2012), következő lépésként tesztelni szeretnénk volna, hogyan befolyásolják a Ser86 aminosav szubsztitúciói a PHYB - PIF3 kölcsönhatást. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához élesztő két-hibrid rendszert használtunk. A kísérlet során használt élesztő vonalak a AD-PIF3 fúziós fehérje mellett a PHYB(1-651)-BD, a PHYB(1-651)^{Ser86Asp}-BD, PHYB(1-651)^{Ser86Ala}-BD fúziós fehérjék valamelyikét fejezték ki. Az élesztősejteket vörös fényel kezelve a PHYB(651) és foszfováriánsai P_{fr} konformációba alakulnak, melyek képesek a PIF3 molekulát megkötni. Az így

kialakuló komplexek számával arányos a β -galaktozidáz riporter génnel kifejeződése az élesztő sejtekben. Az élesztőkultúrákat alacsony intenzitású vörös fényvel kezelve ($0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a $\text{PHYB}(\text{N651})^{\text{Ser86Ala}}$ rendelkezett a legnagyobb, a $\text{PHYB}(\text{N651})$ szignifikánsan kisebb, míg a $\text{PHYB}(\text{N651})^{\text{Ser86Asp}}$ a legkisebb AD-PIF3 kötési kapacitással. Magas intenzitású $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vörös fénykezelés esetén a három $\text{PHYB}(651)$ variáns közel azonos AD-PIF3 kötési kapacitással rendelkezett, mely azt mutatja, hogy a $\text{PHYB}(651)$ Ser86Asp, vagy Ser86Ala szubsztitúciója nem zavarja fizikailag az AD-PIF3 kötődését, csak a kölcsönható molekula párok létrejöttének kinetikáját befolyásolja. Az kísérlet eredményét a 28. ábra mutatja be.

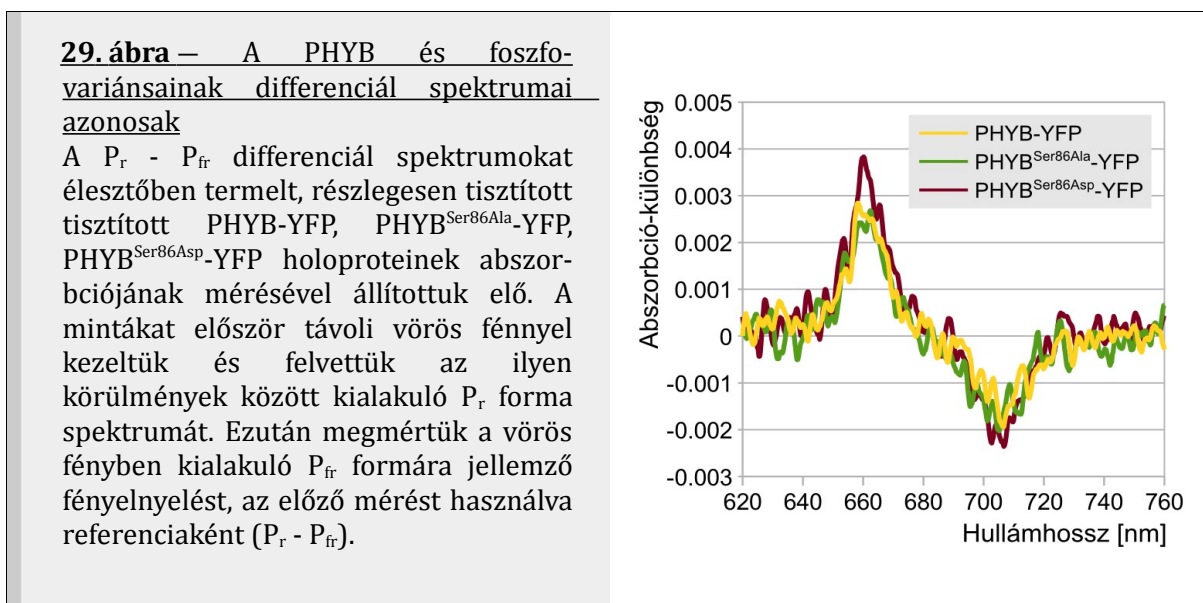


6.9 – A PHYB foszfovariánsainak spektrális tulajdonsága és fotokonverziója megegyezik a vad típusú PHYB molekuláéval

A PHYB foszfovariánsainak fiziológiai és molekuláris analízise során a Ser86 foszforilált állapotát utánzó, $\text{PHYB}^{\text{Ser86Asp}}\text{-YFP}$ -t kifejező növények mindig csökkent, míg a defoszforilált állapotát utánzó $\text{PHYB}^{\text{Ser86Ala}}\text{-YFP}$ molekulát kifejező növények érzékenyebb jelátvitelt mutattak a vad típusú $\text{PHYB}\text{-GFP}$ -t hordozó növényekhez viszonyítva. Az jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy a Ser86 szubsztitúciói megváltoztatják a kromofór viselkedését és ez áll az eddig ismertetett eredmények háttérében. A kérdés tisztázásához, hogy a PHYB Ser86 Asp és Ala szubsztitúciói befolyásolják-e a PHYB kromofórjának fényfüggő viselkedését, megmértük az említett molekulák differenciál spektrumát, valamint $P_{\text{fr}} \rightarrow P_r$ fotokonverziójuk kinetikáját. A kísérletekhez a PHYB-YFP-t és foszfovariánsait

élesztő heterológ rendszerben termeltük annak érdekében, hogy kizárjuk a növényi sejtekben jelenlevő kölcsönható partnerek esetleges befolyásoló hatását. A kísérletek során az élesztő sejtekben termelt PHYB-YFP, PHYB^{Ser86Asp}-YFP és PHYB^{Ser86Ala}-YFP apoproteinek érését hozzáadott PCB kromofórral segítettük elő.

A differenciálspektrum méréséhez a PHYB-YFP, PHYB^{Ser86Asp}-YFP és a PHYB^{Ser86Ala}-YFP fúziós fehérjék egyikét kifejező élesztő kultúrákat növesztettünk. A mérés során a PHYB variánsoknak először a vörös (660 nm) fényben kialakuló spektrumát rögzítettük, amit a távoli vörös (715 nm) fényben kialakuló spektrum referenciájaként használtunk. Ezzel a módszerrel jól láthatóvá tehetőek a a $P_{fr} \rightarrow P_r$ konformációs átalakulást kísérő spektrális változások, mivel csak azokon a hullámhosszokon kapunk csúcsot és völgyet, ahol változik a molekula fényelnyelése a konformáció változást követően. A 29. ábrán látható differenciál spektrumok alapján a PHYB-YFP és a foszfovariánsainak differenciál spektrumai között nincs számottevő különbség.

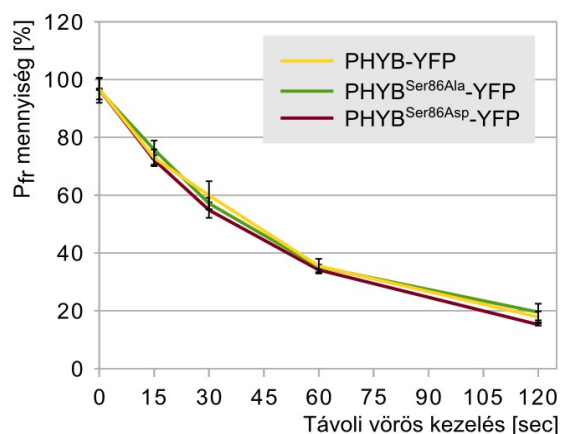


A második kérdés ami megválaszolásra várt, hogy befolyásolja-e a PHYB Ser86 Asp és Ala szubsztitúciója a kromofór és a fehérje fényfüggő konformációváltozását. A mérés során a mintákat először intenzív vörös fényel kezelve ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a az elméletileg lehetséges legmagasabb PHYB P_{fr}/P_{tot} arányt (85%) hoztuk létre, majd a mintákat különböző ideig tartó távoli vörös fénykezeléssel ($6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) újra P_r formába alakítottuk. A fénykezelést követően mértük a távoli vörös fény dózis függvényében csökkenő P_{fr}/P_{tot} arányt. Mivel ilyen intenzitás és időtartamok mellett a távoli vörös besugárzás dózisa nem volt elég ahhoz, hogy a hullámhosszra jellemző P_{fr}/P_{tot} egyensúly

(kb. 2-3% P_{fr}) kialakulhasson, a $P_{fr} \rightleftharpoons P_r$ egyensúly ilyen körülmények között erősen a PHYB P_r képződés irányába tolódik. Így a 30. ábrán bemutatott grafikonon a különböző PHYB variánsoknak a $P_{fr} \rightarrow P_r$ fotokonverziós kinetikája látható. Mindhárom forma fotokonverziójának féleletideje kb. 45 másodperc $6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ távoli vörös fénykezelés hatására. Az eredmények alapján a három vizsgált PHYB variáns azonos $P_{fr} \rightarrow P_r$ fotoreverziónak kinetikával rendelkezik, vagyis a Ser86 szubsztitúciói nem befolyásolják sem a kromofór, sem az ezt követő PHYB fehérjemolekula konformációváltását.

30. ábra – A PHYB és foszfovariánsai azonos $P_{fr} \rightarrow P_r$ *in vitro* fotokonverziós kinetikával rendelkeznek

Az élesztőben kifejezett, érett PHYB-YFP, PHYB^{Ser86Ala}-YFP, PHYB^{Ser86Asp}-YFP fehérjék fotokonverziójának méréséhez a kultúrákat először intenzív vörös fénykezeléssel ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) P_{fr} konformációba alakítottuk, majd különböző időtartamú távoli vörös kezeléssel ($6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) P_r konformációba alakítottuk vissza. A fénykezelés végén mértük a kialakult P_{fr} / P_{tot} arányt. Az értékeket az elérhető legmagasabb P_{fr} arányhoz (85% P_{fr} / P_{tot}) viszonyítva ábráztuk. Minden mérési pont legalább 3 biológiai ismétlés átlaga, a hibaszalagok a standard hibát mutatják.



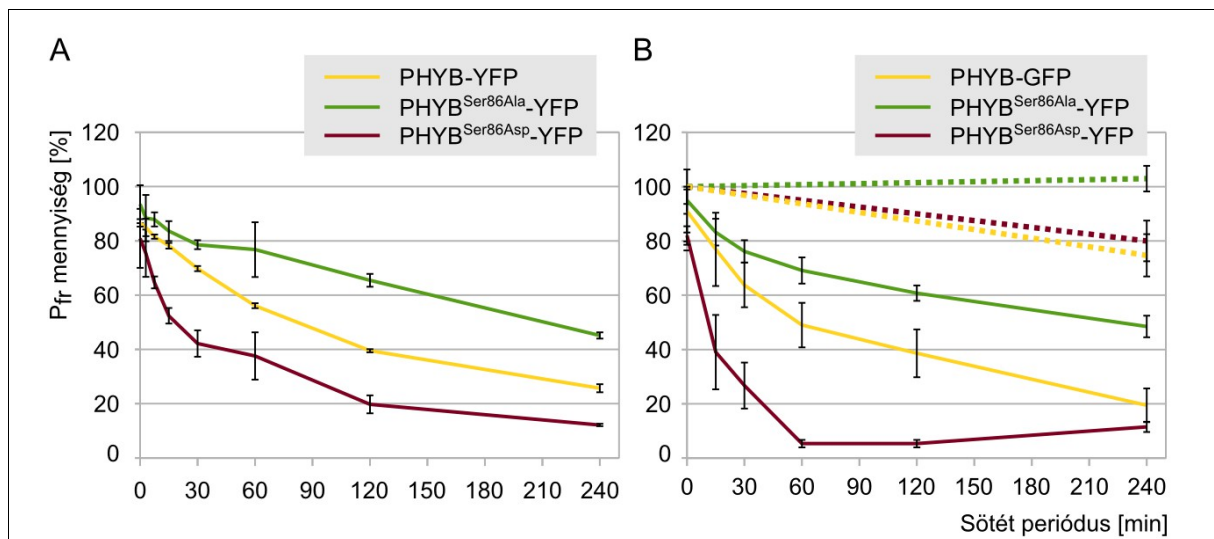
6.10 – A PHYB^{Ser86Asp} felgyorsult sötét reverziós kinetikával rendelkezik

A változó környezeti faktorok folyamatos monitorozásában elsődleges szereppel bír az adott jelet felfogó aktivált receptor molekulák inaktivációja. A PHYB esetében ezt a folyamatot sötét reverzióknak hívjuk, mely az aktív PHYB P_{fr} molekulák spontán relaxációját jelenti inaktív P_r konformációba. Ez a reakció a fotokonverziótól eltérően csak $P_{fr} \rightarrow P_r$ irányban játszódik le. A vad típusú PHYB sötét reverziója kb. 60 perces féleletidővel zajlik, így meglehetősen lassú folyamat az aktív PHYB P_{fr} molekulákat létrehozó fotokonverzióhoz képest. Utóbbi féleletideje intenzív vörös fénykezelés esetén másodperces skálán mozog. Belátható, hogy a sötét reverzió akkor gyakorol számottevő hatást a PHYB jelátvitelre, amikor a PHYB P_{fr} mennyisége alacsony, ami vad típusú PHYB esetében csak alacsony intenzitású vörös kezelés hatására jön létre. Lehetséges azonban, hogy a PHYB foszforilációja a 86. szerin oldalláncon befolyásolja a sötét reverzió sebességét és a PHYB és

foszfovariánsainak eltérő viselkedését a megváltozott sötét reverzió okozza. A kérdés tisztázásához megmértük a PHYB-GFP, a PHYB^{Ser86Asp}-YFP és a PHYB^{Ser86Ala}-YFP molekulák sötét reverziójának kinetikáját növényi, valamint élesztő heterológ rendszerekben.

Elsőként az élesztő sejtekben kifejezett PHYB-YFP, PHYB^{Ser86Asp}-YFP és PHYB^{Ser86Ala}-YFP molekulák *in vitro* sötét reverziójának kinetikáját vizsgáltuk meg. A folyadék kultúrákat 1 percre intenzív vörös fényel kezeltük ($60 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), hogy az elméletileg legmagasabb $P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}}$ arányt létrehozzuk (85%). A fénykezelt folyadékkultúrák adagjait ezután sötétbe helyeztük, melyekben követtük a PHYB-nek és foszfovariánsainak sötét reverzióját, mérve a csökkenő $P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}}$ arányt a kísérlet 6 órás időtartama alatt. A 31. ábra A paneljén bemutatott grafikon mutatja, hogy a PHYB^{Ser86Asp}-YFP molekula gyorsabb, míg a PHYB^{Ser86Ala}-YFP molekula lassabb sötét reverzióval rendelkezik, mint a vad típusú PHYB-YFP molekula.

Ezt követően megmértük a PHYB-GFP, a PHYB^{Ser86Asp}-YFP és a PHYB^{Ser86Ala}-YFP sötét reverzióját élő növényben. A transzgéneket először *phyA-211/phyB-9* dupla null mutáns háttérbe kerestettük, hogy az etiolált növényeken végzett mérés során elkerüljük a nagy mennyiségben jelen levő PHYA fehérje zavaró hatását. A kísérlet során az említett vonalak négy napos, sötétben nőtt csíranövényeit 5 percre intenzív vörös fényel kezeltük ($60 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), hogy a lehetséges legmagasabb $P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}}$ arányt létrehozzuk, majd a mintákat sötétbe helyeztük és követtük a csökkenő $P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}}$ arányt a kísérlet 6 órás időtartama alatt. A 27. ábra B paneljén láthatóak az *in vivo* sötét reverziós kinetika grafikonjai, mely az A panelen bemutatott, *in vitro* mérésekkel nagyfokú hasonlóságot mutatnak: a PHYB^{Ser86Asp}-YFP molekulák gyorsabb, míg a PHYB^{Ser86Ala}-YFP molekulák lassabb relaxációs kinetikát mutatnak, mint a vad típusú PHYB-GFP fehérje.



31. ábra – A PHYB és foszfovariánsainak sötét reverziós kinetikája különböző.

A - A PHYB-YFP, PHYB^{Ser86Ala}-YFP, PHYB^{Ser86Asp}-YFP fehérjéket élesztő sejtekben fejeztük ki és PCB kromofór hozzáadásával hoztuk létre az érett fehérjét. A folyadékkultúrákat ezután intenzív vörös fényel kezeltük ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Majd az ezt követő sötét kezelés során mértük a csökkenő $P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}}$ arányt, ezen keresztül követve a PHYB-YFP-nek és foszfovariánsainak *in vitro* sötét reverzióját.

B - A PHYB-GFP, PHYB^{Ser86Ala}-YFP, PHYB^{Ser86Asp}-YFP fehérjéket kifejező *phyA-211/phyB-9* háttérű növényeket 5 percig intenzív vörös fényel kezeltük ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Az ezt követő sötét kezelés során mértük a csökkenő $P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}}$ arányt, ezen keresztül mérve a PHYB-GFP és foszfovariánsainak *in vivo* sötétreverzióját. A szaggatott vonalak az összes fitokróm (P_{tot}) mennyiségének változását mutatják a mérés során.

Mind a két grafikonon az értékeket az elérhető legmagasabb P_{fr} arányhoz (85% $P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}}$) viszonyítva ábrázoltuk. Minden mérési pont legalább három biológiai ismétlés átlaga, a hibásávok a standard hibát jelzik.

7 – A PHYB foszforilációjával kapcsolatos eredmények megvitatása

7.1 – A PHYB fehérje foszforilált *in vivo*

Az előző fejezetben ismertetett kísérletek során bizonyítottuk, hogy a PHYB foszfoprotein, mely *in vivo* foszforilált. Lúdfűből izolált PHYB-YFP-TAPc minták MALDI-TOF MS analízise során derült fény arra, hogy PHYB Ser22-25 aminosav oldalláncainak valamelyike, valamint a Ser86 aminosav oldallánca foszfát csoportot hordoz. A PHYB Ser22-25 aminosavak alanin Ala (PHYB^{Ser22-25Ala}), vagy aszparaginsav Asp (PHYB^{Ser22-25Asp}) szubsztitúciós változatai nem változtatták meg a PHYB jelátvitelét. Ezzel ellentétben a Ser86 Ala és Asp szubsztitúciói jelentősen megváltoztatták a növények vörös fényérzékenységét. A jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy a Ser22-25 aminosavak foszforilációja más foszforilációs (pl. Ser86), vagy egyéb jelátviteli eseményektől függ és szabályzó, finomhangoló szerepet tölt be. A PHYB Ser86 erősen konzervált a II-es típusú és kevésbé konzervált az I-es típusú fitokrómok körében. Már korábbi munkák fényt derítettek a PHYB fehérje *in vitro* autofoszforilációjára (Phee és mtsai. 2008) azonban ennek a munkának az eredményei ezidáig nem nyertek megerősítést *in vivo* rendszerben.

A PHYB Ser86 oldalláncon megismert foszforiláció biológiai jelentőségét és molekuláris hatásmechanizmusát *phyB-9* null mutáns háttérben kifejezett Ser86 aminosav szubsztitúciókat hordozó PHYB variánsok segítségével tártuk fel. A PHYB^{Ser86Ala} változat a Ser86 nem foszforilált, míg a PHYB^{Ser86Asp} a foszforilált Ser86 oldallánc töltésviszonyait imitálja. Az irodalomból már ismert, hogy bizonyos aminosav szubsztitúciók befolyásolják a PHYB molekula jelátvitelét. Ezek a mutációk két csoportba oszthatóak: az egyik csoportba a jelátviteli lánc komponenseivel (pl.:PIF3) való kölcsönhatás változik meg, míg a másik csoportba tartozó mutációk a kromofór fotokémiai viselkedését zavarják meg. Mindkét esetben a vörös fény érzékelése erősen sérül. Az említett aminosavcserek a PHYB N-terminális doménjeinek PAS GAF és a kettő között elhelyezkedő ún. „light-sensing knot” régiójában találhatóak. Mindannyiuk közös vonása, hogy a térszerkezeti adatok alapján a kromofór közvetlen környezetét alkotják (Kikis és mtsai. 2009). A PHYB Ser86 szubsztitúcióinak hatásmechanizmusa különbözik az előbb említettektől, amit a következő tények támasztanak alá:

- A Ser86 oldallánc a PHYB NTE régiójában található, viszonylag távol a „light-sensing

knot"-tól.

- A munkánk során használt PHYB variánsok fotokémiai viselkedése a vad típusú PHYB-vel teljesen egyező: $P_{fr} \rightarrow P_r$ fotoreverziós kinetikájuk és differenciál spektrumaik azonosak (30. és 29. ábrák).
- Élesztő két-hibrid rendszerben a $PHYB^{Ser86Ala}(651)$ és a $PHYB^{Ser86Asp}(651)$ változatok PIF3 kötő képessége csak alacsony vörös fényben tér el a $PHYB(651)$ -étől, erős vörös fényben mindhárom forma azonos erősséggel kötődik a PIF3 fehérjéhez (28. ábra).

7.2 – A $PHYB^{Ser86Ala}$ és a $PHYB^{Ser86Asp}$ fiziológiai hatásai csak alacsony intenzitású vörös fényben érvényesülnek

A $PHYB^{Ser86Ala}$ -YFP és a $PHYB^{Ser86Asp}$ -YFP fehérjéket kifejező vonalak fiziológiai válaszreakciója minden kísérletben nagyon hasonló mintázatot mutatott: azonos szintű válaszreakció kiváltásához $PHYB^{Ser86Asp}$ -YFP-t kifejező növényeknek nagyobb, míg a $PHYB^{Ser86Ala}$ -YFP-t kifejező vonalaknak alacsonyabb intenzitású vörös fénykezelésre volt szükségük, mint a vad típusú $PHYB$ -GFP-t kifejező növényeknek. A transzgenikus vonalak a fúziós fehérjéket azonos szinten fejezték ki. Ezen túl a $PHYB$ és foszfovariánsai nem mutattak eltérő degradációt olyan alacsony intenzitású vörös fénykezelés esetén, ahol a fiziológiai válaszban komoly eltérés volt a növényvonalak között. Kellően intenzív fénykezelés után azonban mindhárom növényvonal a vad típusú $PHYB$ -GFP vonallal azonos mértékű válaszreakciót mutatott. Ez a jelenség igaz mind a csírázást követő hipokotil megnyúlás gátlásra, a különböző $PHYB$ variánsok sejtmagi importjára és a variánsok élesztő két-hibrid rendszerben mért *in vitro* PIF3 kötő kapacitására is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a $PHYB$ variánsainak jelátvittele nem sérült, hiszen mindegyik képes a vad típusával megegyező szintű fiziológiai válaszok kiváltására, csak érzékenységi tartományuk tolódik el. A fitokróm jelátvitel intenzitása a $PHYB$ P_{fr} konformációban lévő molekulák relatív mennyiségétől függ (Chen és mtsai. 2003). A $PHYB$ molekulák $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ egyensúlyban vannak. Ennek az egyensúlynak három meghatározó eleme van:

- a $PHYB$ molekulákat érő fény spektrális összetétele (vörös fény P_{fr} , távoli vörös fény P_r képződés irányába tolja az egyensúlyt)
- a másik tényező ami a $PHYB$ $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ egyensúlyát befolyásolja, a sötét reverzió (a $PHYB$ P_{fr} formájának relaxációja). Ez a folyamat kizárólag $P_{fr} \rightarrow P_r$ irányban zajlik és reakciósebessége állandó. Féléletideje növényben, a vad típusú $PHYB$ fehérje esetében: ~1 óra

- a fényintenzitás szintén meghatározó eleme lehet a kialakuló $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ egyensúlynak. Míg maximális fiziológiai választ kiváltó intenzitású vörös fénykezelés mellett a $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ egyensúly néhány másodperc alatt beáll, alacsony vörös fényintenzitás mellett ez az idő az óras nagyságrendig is kitolódik.

Belátható, hogy alacsony intenzitású vörös fényben a sötét reverzió már jelentős mennyiségű P_{fr} PHYB-t képes „kivonni” a rendszerből ezzel jelentősen csökkentve a kialakuló egyensúlyi PHYB P_{fr} arányt.

Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a PHYB^{Ser86Asp} relaxációja gyorsabb, a PHYB^{Ser86Ala} relaxációja pedig lassabb, mint vad típusú a PHYB molekuláké. Ezek az eredmények jó összhangban vannak a fiziológiai mérések eredményeivel. Alacsony intenzitású vörös fénynek kitett növényekben feltehetően más P_{fr} arányok mellett áll be az egyensúly a megváltozott relaxációs sebességeknek köszönhetően: a PHYB^{Ser86Asp} esetében alacsonyabb, míg a PHYB^{Ser86Ala} magasabb szinten és ez vezet a kialakuló gyengébb, vagy kifejezettebb fiziológiai válaszhoz.

7.3 – A PHYB^{Ser86Asp} sejtmagi komplex-képzése eltér a PHYB^{Ser86Ala} és PHYB vad típusétól

A sejtmagi komplexek (speckle) viselkedése némiképp eltér a többi fiziológiai válasz mutatta mintázattól. Ez esetben is igaz, hogy a PHYB^{Ser86Ala} változat alacsonyabb, míg a PHYB^{Ser86Asp} magasabb fényintenzitást igényel a sejtmagi komplexek képződésének beindulásához. A PHYB^{Ser86Ala} és a vad típus esetében hasonló a kialakuló sejtmagi komplexek száma és mérete, míg a PHYB^{Ser86Asp} esetében még a maximális fiziológiai válasz kiváltásához elegendő fényintenzitáson is csak kis számú és kisebb méretű sejtmagi komplex képződik. Lehetséges, hogy a Ser86Asp szubsztitúció nagy mértékben megváltoztatja a PHY felületi töltésviszonyait, vagy az ilyen töltésviszonyokkal rendelkező molekulák természetben nem tapasztalható nagy száma felelős a kialakult jelenségért. A PHYB nukleáris komplexeinek szerepe hosszú évek óta vita tárgya a fotobiológusok körében. Mivel a teljes hosszúságú fitokróm esetében az aktivitás és a nukleáris komplex-képződés között pozitív korreláció van, valószínűnek tűnt, hogy ezek a nukleáris komplexek a jelátvitel fontos szereplői (Chen és mtsai. 2003). Ezt azonban cáfolja, hogy a PHYB(1-651) molekula legalább olyan aktív jelátvitelre képes, mint a teljes hosszúságú PHYB, az előbbi mégsem képes a sejtmagi komplexeket létrehozni (Palágyi és mtsai. 2010). Az itt bemutatott kísérletekből úgy tűnik, hogy a sejtmagi PHYB komplexek megjelenése egy

adott P_{fr} határértékhez kötött, aminek eléréséhez a PHYB^{Ser86Ala} változat igényli a legkisebb fényintenzitást, a PHYB közepeset, míg a legmagasabbat a PHYB^{Ser86Asp}.

7.4 — A PHYB Ser86 foszforilációja feltehetően autofoszforiláció

Phee és munkatársai megmutatták, hogy a PHYB P_r és P_{fr} formája is képes autofoszforilációra *in vitro* rendszerben (Phee és mtsai. 2008). Azonban az autofoszforilációt nem tudták detektálni, a olyan PHYB(Δ 100) változat esetében amely nem tartalmazta a PHYB első 100 aminosavát, vagyis a molekula NTE régióját. Mindezen eredmények egybehangzóak az általam bemutatott kísérletek eredményeivel.

Sajnos egyelőre nem áll rendelkezésünkre olyan kísérleti rendszer, amelyben megbízhatóan és gyorsan lehetne követni a PHYB molekula oldalláncainak bekövetkező foszforilációt esetleg annak változását. A bemutatott eredmények alapján szerintem a foszforilációnak kiemelkedő szerepe van a fitokróm jelátvitel szabályozásában, modulációjában és a jövőbeli eredmények talán arra is választ adnak, hogyan lehetséges, hogy a fitokrómok ilyen összetett hatással vannak a növények fejlődésére, elágazó, összetett jelátviteli hálózat nélkül.

A jelen eredményeket összefoglaló erősen hipotetikus modell hasznos lehet a jövő kísérleti irányvonalának meghatározásában. A PHYB és két foszfovariánsa élesztőben és növényben is nagyon hasonló viselkedést mutatott: PHYB^{Ser86Asp} P_{fr} formája gyorsabban, míg PHYB^{Ser86Ala} P_{fr} formája lassabban alakult vissza az inaktív P_r formába, mint a vad típusú PHYB molekula. Ez alapján jogos felvetésnek tűnik, hogy a vad típusú PHYB molekuláknak csak egy része hordoz foszfát csoportot a Ser86 oldalláncon. Feltehetően ennek köszönhető, hogy a PHYB relaxációjának sebessége minden mérés során valahol a PHYB^{Ser86Asp} és a PHYB^{Ser86Ala} között helyezkedett el. Egy másik felmerülő kérdés, hogy hogyan alakul ki ez a foszforilációs mintázat. Az egyik lehetőség, hogy egy specifikus kináz látja el ezt a feladatot. A másik lehetőség, hogy a PHYB autofoszforilálja a Ser86 oldalláncot. Ez utóbbi hipotézist támasztják alá Phee és munkatársainak eredményei, valamint az, hogy az itt bemutatott kísérletek során mind növényben, mind élesztőben a PHYB és foszfo-variánsai nagyon hasonló relaxációs kinetikát mutattak. Bár nem zárható ki, nem valószínű hogy élesztőben lenne egy a PHYB Ser86 oldalláncát olyan fokig foszforiláló kináz ami reprodukálja a vad típusú PHYB növényben tapasztalható relaxációs viselkedését.

A PHYB relaxációja fontos faktora a növényi alkalmazkodásnak. Azzal, hogy a PHYB relaxációja viszonylag lassú, míg az aktív P_{fr} forma fényfüggő létrejötte gyors, a PHYB képes

mérni a növényt érő átlagos fény mennyiséget. Ezzel elkerülhetővé válik, hogy a növény „feleslegesen” reagáljon pl.: egy felhő árnyékára, ehelyett életfolyamatait egy átlagos fényintenzitáshoz hangolja és ebben az adaptációs folyamatban szerintem a Ser86 oldallánc foszforiláltsági szintjének meghatározó szerepe van.

8 – Összefoglalás

Munkánk céljával a fitokróm fotoreceptorok (*PHY*) N-terminális NTE régiójának *Arabidopsis thaliana* növényben betöltött szerepének tanulmányozását tűztük ki. A fitokrómok vörös és távoli vörös fényt érzékelő fotoreceptorok, melyek a központi szerepet játszanak a növények egész életében a fényfüggő fejlődési folyamatok szabályozásában: a csírázástól egészen a virágzásig. *Arabidopsis*-ban a fitokrómok egy kis, öttagú géncsaládot alkotnak (*PHYA* - *PHYE*), melyek közül *PHYA* és a *PHYB* rendelkeznek kiemelkedő szereppel. Az elmúlt két évtizedben mutagenizált magpopulációk vizsgálatával próbálták azonosítani a fitokrómokról kiinduló jelátviteli lánc elemeit. Meglepő módon ezeknek a munkáknak nem sikerült azonosítani egy hosszú sok elemből álló, állati rendszerekre jellemző jelátviteli hálózatot, melynek létét a fitokrómok szerteágazó hatásai alapján feltételezték. Ezzel szemben nagy számú mutáns fitokróm allélt (SNP) azonosítottak. Ezeknek a megváltozott jelátvitellel rendelkező fitokróm változatoknak a vizsgálata arra utalt, hogy a fitokrómok jelátvitelének szabályozása nagyrészt a magán a molekulán történik. Ennek eredményeként a fitokrómok poszttranszlációs módosításai (pl.: foszforiláció, szumoiláció) és sejtmagi importjuk szabályozása váltak a fitokrómok közvetítette fényérzékelés kutatásának központi kérdéseivé.

Az tézisemben bemutatott munka első felében karakterizáltuk a *phyA-5* hiposzenzitív *PHYA* mutánst, melynek fiziológiai és molekuláris vizsgálatának segítségével bizonyítottuk, hogy az NTE régióban elhelyezkedő, evolúciósan konzervált Ala30 aminosav oldallánc fontos szerepet játszik a *PHYA* sejtmagi importját végző – FHY1 és FHL – molekulákkal való kölcsönhatás létrehozásában. Az Ala30 és környezete nagy valószínűséggel része annak a fehérjefelszínnek, mely a *PHYA* sejtmagi transzporterekkel való kölcsönhatás fizikai felszínét biztosítja és a *PHYA* fényaktivációjával, – a P_{fr} forma kialakulásával – válik funkcionálissá.

A munka második felében a *PHYB* NTE régiójában elhelyezkedő, kétszikúek körében konzervált Ser86 aminosav oldallánc foszforilációjának vörös fényérzékelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A fiziológiai és molekuláris vizsgálatokhoz célzott mutagenezissel előállított, a Ser86 foszforilált ($PHYB^{Ser86Asp}$) és defoszforilált ($PHYB^{Ser86Ala}$) állapotait utánzó molekulákat fejeztettünk *phyB* null mutáns növényekben. A vizsgálatok meggyőzően bizonyították, hogy az aktív *PHYB* (P_{fr}) molekulák inaktivációjának sebessége erősen függ a Ser86 oldallánc foszforiláltságának állapotától. A $PHYB^{Ser86Asp}$ esetében a relaxáció olyan

mértékben felgyorsul, ami már összemérhető a fotokonverzió – P_{fr} molekulák keletkezésének – sebességével ezzel hiposzenzitív viselkedést idézve elő. A $PHYB^{Ser86Ala}$ változat ezzel ellentétben hiperszenzitivitást idéz elő a relaxáció drasztikus csökkenésén keresztül. Élesztőben termeltetett PHYB változatok segítségével bizonyítottuk, hogy a Ser86 aminosav foszforilációs állapota valóban megváltoztatja a PHYB inaktivációjának sebességét.

9 – Summary

In this study we investigated the role of the N-terminal NTE domain of the *PHYTOCHROME* (*PHY*) photoreceptor in *Arabidopsis thaliana*. PHYs are red and far red light sensing photoreceptors, which are essential regulators of the light dependent developmental processes throughout the entire life of plants: from germination to flowering. In *Arabidopsis*, *PHYA* and *PHYB* are the most important members of the small, five-member *PHY* gene family (*PHYA* - *PHYE*). During the past two decades numerous genetic screens were carried out in search for the downstream components of the *PHY* signal transduction. Interestingly, these works failed to reveal a long animal-type signalling cascade, which was expected based on the diverse regulatory roles of *PHYs*. Instead several mutant *phy* alleles (SNP) were identified. The altered signalling capability of these *phy* alleles suggested that the regulation of *PHY* signal transduction acts mainly on the *PHY* receptor molecule itself. As a consequence present research on *PHY* light perception concentrates on post-translational modifications (like phosphorylation, sumoylation) and regulation of nuclear import of the *PHY* photoreceptors, which become the most relevant questions of the field.

In the first part of this work we characterized the *phyA-5* allele on the physiological and molecular level. The *PHYA* variant encoded by this mutant allele carries a single amino acid substitution (Ala30Val) in the N-terminal NTE domain of the molecule. This mutant proved to be a useful tool in showing the central role of the NTE domain in the nuclear import of *PHYA*, which is an essential early step in *PHYA* mediated light perception. The Ala30 and the neighbouring amino acid residues are likely an integral part of a protein surface, which directly attaches to the FHY1 and FHL nuclear transporters of *PHYA*.

In the second part of this study we investigated, how phosphorylation influences *PHYB* light perception and light sensitivity. MALDI-TOF coupled MS analysis of purified *PHYB*-GFP-TAPc protein samples revealed a phospho-serin (S86) residue in the NTE domain of *PHYB*. By the use of artificially generated amino acid substitutions, which mimic the phosphorylated state (Ser86Asp) or the non-phosphorylated state (Ser86Ala) of the *PHYB* molecule, we showed *in vivo*, that Ser86 phosphorylation influences light perception through altering the inactivation (relaxation) rate of the active *PHYB* molecules. By the help of ectopically expressed *PHYB* variants in yeast we proved, that phosphorylation indeed affects the intrinsic relaxation properties of *PHYB* in a heterologous system as well.

10 – Idézett közlemények

- Adam, E. ... Nagy, F., 2011. Altered Dark- and Photoconversion of Phytochrome B Mediate Extreme Light Sensitivity and Loss of Photoreversibility of the phyB-401 Mutant. *PLoS ONE*, 6(11). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3207837/> [Accessed February 23, 2014].
- Ahmad, M. & Cashmore, A.R., 1993. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366(6451), pp.162–166.
- Ahmad, M. ... Cashmore, A.R., 1998. The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Molecular Cell*, 1(7), pp.939–948.
- Andel, F., 3rd, Lagarias, J.C. & Mathies, R.A., 1996. Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. *Biochemistry*, 35(50), pp.15997–16008.
- Ang, L.H. ... Deng, X.W., 1998. Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Molecular Cell*, 1(2), pp.213–222.
- Von Arnim, A.G. & Deng, X.W., 1994. Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell*, 79(6), pp.1035–1045.
- Balegh, S.E. & Biddulph, O., 1970. The photosynthetic action spectrum of the bean plant. *Plant Physiology*, 46(1), pp.1–5.
- Ballesteros, M.L. ... Chua, N.H., 2001. LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes & Development*, 15(19), pp.2613–2625.
- Bauer, D. ... Nagy, F., 2004. Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(6), pp.1433–1445.
- Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp.1513–1523.
- Borthwick, H.A. ... Toole, V.K., 1952. A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38(8), pp.662–666.
- Buche, C. ... Kretsch, T., 2000. eid1: A New *Arabidopsis* Mutant Hypersensitive in Phytochrome A–Dependent High-Irradiance Responses. *The Plant Cell*, 12(4), pp.547–559.
- Casal, J.J., Sánchez, R.A. & Botto, J.F., 1998. Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany*, 49(319), pp.127–138.
- Casal, J.J. ... 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(3), pp.1127–1137.

- Castillon, A., Shen, H. & Huq, E., 2007. Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in Plant Science*, 12(11), pp.514–521.
- Cerdan, P.D. ... Casal, J.J., 2000. Sustained but Not Transient Phytochrome A Signaling Targets a Region of an Lhcb1*2 Promoter Not Necessary for Phytochrome B Action. *The Plant Cell*, 12(7), pp.1203–1212.
- Chen, M., 2008. Phytochrome nuclear body: an emerging model to study interphase nuclear dynamics and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5), pp.503–508.
- Chen, M. ... Chory, J., 2010. Arabidopsis HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes. *Cell*, 141(7), pp.1230–1240.
- Chen, M. ... Chory, J., 2005. Regulation of Phytochrome B Nuclear Localization through Light-Dependent Unmasking of Nuclear-Localization Signals. *Current Biology*, 15(7), pp.637–642.
- Chen, M., Schwab, R. & Chory, J., 2003. Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp.14493–14498.
- Cherry, J.R. ... Vierstra, R.D., 1992. Phytochrome requires the 6-kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), pp.5039–5043.
- Clough, S.J. & Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), pp.735–743.
- Colon-Carmona, A. ... Abel, S., 2000. Aux/IAA Proteins Are Phosphorylated by Phytochrome in Vitro. *Plant Physiology*, 124(4), pp.1728–1738.
- Debrieux, D. & Fankhauser, C., 2010. Light-induced degradation of phyA is promoted by transfer of the photoreceptor into the nucleus. *Plant Molecular Biology*, 73(6), pp.687–695.
- Deforce, L., Tokutomi, S. & Song, P.S., 1994. Phototransformation of pea phytochrome A induces an increase in alpha-helical folding of the apoprotein: comparison with a monocot phytochrome A and CD analysis by different methods. *Biochemistry*, 33(16), pp.4918–4922.
- Desnos, T. ... Harberd, N.P., 2001. FHY1: a phytochrome A-specific signal transducer. *Genes & Development*, 15(22), pp.2980–2990.
- Duek, P.D. & Fankhauser, C., 2005. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends in Plant Science*, 10(2), pp.51–54.
- Duek, P.D. ... Fankhauser, C., 2004. The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1.

- Current Biology*, 14(24), pp.2296–2301.
- Eichenberg, K. ... Schäfer, E., 2000. Arabidopsis phytochromes C and E have different spectral characteristics from those of phytochromes A and B. *FEBS Letters*, 470(2), pp.107–112.
- Eichenberg, K. ... Schäfer, E., 1999. In vivo characterization of chimeric phytochromes in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1), pp.354–359.
- Eichenberg, K. ... Schäfer, E., 2000. Variation in dynamics of phytochrome A in Arabidopsis ecotypes and mutants. *Plant, Cell & Environment*, 23(3), pp.311–319.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A. & Quail, P.H., 2000. HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes & Development*, 14(18), pp.2377–2391.
- Fankhauser, C. ... Chory, J., 1999. PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science*, 284(5419), pp.1539–1541.
- Fankhauser, C. & Chory, J., 2000. RSF1, an Arabidopsis locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiology*, 124(1), pp.39–45.
- Favory, J.-J. ... Ulm, R., 2009. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 28(5), pp.591–601.
- Galstyan, A. ... Martinez-Garcia, J.F., 2011. The shade avoidance syndrome in Arabidopsis: a fundamental role for atypical basic helix-loop-helix proteins as transcriptional cofactors. *The Plant Journal*, 66(2), pp.258–267.
- Genoud, T. ... Fankhauser, C., 2008. FHY1 mediates nuclear import of the light-activated phytochrome A photoreceptor. *PLoS genetics*, 4(8), p.e1000143.
- Gietz, R.D. & Schiestl, R.H., 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), pp.31–34.
- Gil, P. ... Nagy, F., 2000. Photocontrol of subcellular partitioning of phytochrome-B:GFP fusion protein in tobacco seedlings. *The Plant Journal*, 22(2), pp.135–145.
- Han, Y.-J. ... Kim, J.-I., 2010. Autophosphorylation desensitizes phytochrome signal transduction. *Plant Signaling & Behavior*, 5(7), pp.868–871.
- Hanke, J., Hartmann, K.M. & Mohr, H., 1969. [The effects of night breaks on flowering of *sinapis alba* L]. *Planta*, 86(3), pp.235–249.
- Heim, M.A. ... Bailey, P.C., 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5), pp.735–747.
- Hennig, L. ... Schäfer, E., 1999. Dynamic properties of endogenous phytochrome A in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiology*, 121(2), pp.571–577.

- Hiltbrunner, A. ... Schäfer, E., 2006. FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant & Cell Physiology*, 47(8), pp.1023–1034.
- Hisada, A. ... Furuya, M., 2000. Light-induced nuclear translocation of endogenous pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures. *The Plant Cell*, 12(7), pp.1063–1078.
- Hoecker, U., Xu, Y. & Quail, P.H., 1998. SPA1: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *The Plant Cell*, 10(1), pp.19–33.
- Holm, M. ... Deng, X.-W., 2001. Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of Arabidopsis COP1. *The EMBO Journal*, 20(1-2), pp.118–127.
- Holm, M. ... Deng, X.-W., 2002. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes & Development*, 16(10), pp.1247–1259.
- Hornitschek, P. ... Fankhauser, C., 2009. Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *The EMBO journal*, 28(24), pp.3893–3902.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96(1), pp.23–28.
- Jang, I.-C. ... Chua, N.-H., 2005. HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes & Development*, 19(5), pp.593–602.
- Jang, I.-C. ... Chua, N.-H., 2007. Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling. *Genes & Development*, 21(16), pp.2100–2111.
- Kami, C. ... Fankhauser, C., 2010. Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*, 91, pp.29–66.
- Kevei, E., Schafer, E. & Nagy, F., 2007. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), pp.3113–3124.
- Khanna, R. ... Quail, P.H., 2004. A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *The Plant Cell*, 16(11), pp.3033–3044.
- Kikis, E.A. ... Quail, P.H., 2009. Residues clustered in the light-sensing knot of phytochrome B are necessary for conformer-specific binding to signaling partner PIF3. *PLoS Genetics*, 5(1), p.e1000352.
- Kim, L. ... Nagy, F., 2000. Light-induced nuclear import of phytochrome-A:GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis. *The Plant Journal*, 22(2), pp.125–133.
- Kinoshita, E. & Kinoshita-Kikuta, E., 2011. Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics*, 11(2), pp.319–

323.

- Kircher ... Nagy, 1999. Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *The Plant Cell*, 11(8), pp.1445–1456.
- Kircher, S. ... Nagy, F., 2002. Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *The Plant Cell*, 14(7), pp.1541–1555.
- Knapp, A. & Carter, G., 1998. Variability in leaf optical properties among 26 species from a broad range of habitats. *American Journal of Botany*, 85(7), p.940.
- Lagarias, J.C. & Lagarias, D.M., 1989. Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(15), pp.5778–5780.
- Lau, O.S. & Deng, X.W., 2010. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), pp.571–577.
- Laubinger, S., Fittinghoff, K. & Hoecker, U., 2004. The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(9), pp.2293–2306.
- Laubinger, S. & Hoecker, U., 2003. The SPA1-like proteins SPA3 and SPA4 repress photomorphogenesis in the light. *The Plant Journal*, 35(3), pp.373–385.
- Lee, J. ... Deng, X.W., 2007. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *The Plant Cell*, 19(3), pp.731–749.
- Leitgeb, B. ... Viczian, A., 2012. Effects of missense mutation on structure and function of photoreceptor. *Plant Signaling & Behavior*, 7(5), pp.589–591.
- Leivar, P. & Quail, P.H., 2011. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in plant science*, 16(1), pp.19–28.
- Leivar, P. ... Quail, P.H., 2008. The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *The Plant cell*, 20(2), pp.337–352.
- Li, L. & Lagarias, J.C., 1992. Phytochrome assembly. Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(27), pp.19204–19210.
- Lin, C. & Shalitin, D., 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 54, pp.469–496.
- Liscum, E., Hodgson, D.W. & Campbell, T.J., 2003. Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about. *Plant Physiology*, 133(4), pp.1429–1436.
- M. Koornneef, E.R., 1980. Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in Arabidopsis

- thaliana (L.) Heynh. *Z. Pflanzenphysiol.* 100 (1980) 147-160.
- Ma, L. ... Deng, X.W., 2002. Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(10), pp.2383–2398.
- Mathews, S. & Sharrock, R.A., 1997. Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell & Environment*, 20(6), pp.666–671.
- Matsushita, T., Mochizuki, N. & Nagatani, A., 2003. Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature*, 424(6948), pp.571–574.
- McNellis, T.W. ... Deng, X.W., 1994. Genetic and molecular analysis of an allelic series of cop1 mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *The Plant Cell*, 6(4), pp.487–500.
- Nagatani, A., 2004. Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(6), pp.708–711.
- Nagatani, A., Reed, J.W. & Chory, J., 1993. Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiology*, 102(1), pp.269–277.
- Nagy, F. & Schafer, E., 2000. Nuclear and cytosolic events of light-induced, phytochrome-regulated signaling in higher plants. *The EMBO Journal*, 19(2), pp.157–163.
- Ni, M., Tepperman, J.M. & Quail, P.H., 1998. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95(5), pp.657–667.
- Osterlund, M.T. ... Deng, X.W., 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, 405(6785), pp.462–466.
- Oyama, T., Shimura, Y. & Okada, K., 1997. The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes & Development*, 11(22), pp.2983–2995.
- Palágyi, A. ... Kozma-Bognár, L., 2010. Functional analysis of amino-terminal domains of the photoreceptor phytochrome B. *Plant Physiology*, 153(4), pp.1834–1845.
- Park, E. ... Choi, G., 2004. Degradation of Phytochrome Interacting Factor 3 in Phytochrome-Mediated Light Signaling. *Plant and Cell Physiology*, 45(8), pp.968–975.
- Peschke, F. & Kretsch, T., 2011. Genome-Wide Analysis of Light-Dependent Transcript Accumulation Patterns during Early Stages of Arabidopsis Seedling Deetiolation1[W] [OA]. *Plant Physiology*, 155(3), pp.1353–1366.
- Pfeiffer, A. ... Schäfer, E., 2012. Interaction with plant transcription factors can mediate nuclear import of phytochrome B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), pp.5892–5897.
- Phee, B.-K. ... Hahn, T.-R., 2008. A novel protein phosphatase indirectly regulates phytochrome-

- interacting factor 3 via phytochrome. *The Biochemical Journal*, 415(2), pp.247–255.
- Quail, P.H., 1997. An emerging molecular map of phytochromes. *Plant Cell Environment*, 20, pp.657–665.
- Quail, P.H. ... Whitelam, G.C., 1994. Spotlight on Phytochrome Nomenclature. *The Plant Cell*, 6(4), pp.468–471.
- Quint, M. ... Gray, W.M., 2005. Characterization of a novel temperature-sensitive allele of the CUL1/AXR6 subunit of SCF ubiquitin-ligases. *The Plant Journal*, 43(3), pp.371–383.
- Rausenberger, J. ... Hiltbrunner, A., 2011. Photoconversion and Nuclear Trafficking Cycles Determine Phytochrome A's Response Profile to Far-Red Light. *Cell*, 146(5), pp.813–825.
- Reed, J.W. ... Chory, J., 1993. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *The Plant Cell*, 5(2), pp.147–157.
- Rizzini, L. ... Ulm, R., 2011. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science*, 332(6025), pp.103–106.
- Al-Sady, B. ... Quail, P.H., 2006. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Molecular Cell*, 23(3), pp.439–446.
- Saijo, Y. ... Deng, X.W., 2003. The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes & Development*, 17(21), pp.2642–2647.
- Schafer, E. & Bowler, C., 2002. Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Reports*, 3(11), pp.1042–1048.
- Schaffner, W. & Weissmann, C., 1973. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analytical Biochemistry*, 56(2), pp.502–514.
- Seo, H.S. ... Chua, N.-H., 2003. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*, 423(6943), pp.995–999.
- Seo, H.S. ... Chua, N.-H., 2004. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes & Development*, 18(6), pp.617–622.
- Serino, G. & Deng, X.-W., 2003. The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, pp.165–182.
- Sessa, G. ... Ruberti, I., 2005. A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes & Development*, 19(23), pp.2811–2815.
- Sharrock, R.A. & Clack, T., 2004. Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), pp.11500–11505.

- Sharrock, R.A. & Clack, T., 2002. Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant Physiology*, 130(1), pp.442–456.
- Sharrock, R.A. & Quail, P.H., 1989. Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes & Development*, 3(11), pp.1745–1757.
- Shen, H. ... Huq, E., 2008. Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from Arabidopsis depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *The Plant cell*, 20(6), pp.1586–1602.
- Shen, Y. ... Deng, X.W., 2009. Phytochrome A mediates rapid red light-induced phosphorylation of Arabidopsis FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 in a low fluence response. *The Plant Cell*, 21(2), pp.494–506.
- Shimizu-Sato, S. ... Quail, P.H., 2002. A light-switchable gene promoter system. *Nature Biotechnology*, 20(10), pp.1041–1044.
- Shin, J. ... Choi, G., 2009. Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), pp.7660–7665.
- Shinomura, T. ... Furuya, M., 1996. Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), pp.8129–8133.
- Shinomura, T., Uchida, K. & Furuya, M., 2000. Elementary Processes of Photoperception by Phytochrome A for High-Irradiance Response of Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122(1), pp.147–156.
- Singh, B.R. & Song, P.S., 1989. Interactions between native oat phytochrome and tetrapyrroles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 996(1-2), pp.62–69.
- Soh, M.S. ... Song, P.S., 2000. REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(11), pp.2061–2074.
- Stockhaus, J. ... Chua, N.H., 1992. Serine-to-alanine substitutions at the amino-terminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity. *Genes & Development*, 6(12A), pp.2364–2372.
- Strasser, B. ... Cerdán, P.D., 2010. Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10), pp.4776–4781.
- Su, Y. & Lagarias, J.C., 2007. Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant GAF domain tyrosine mutants of Arabidopsis phytochromes in transgenic plants. *The Plant Cell*, 19(7), pp.2124–2139.

- Sullivan, J.A. & Deng, X.W., 2003. From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental Biology*, 260(2), pp.289–297.
- Sullivan, J.A., Shirasu, K. & Deng, X.W., 2003. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Reviews. Genetics*, 4(12), pp.948–958.
- Trupkin, S.A. ... Casal, J.J., 2007. The serine-rich N-terminal region of Arabidopsis phytochrome A is required for protein stability. *Plant Molecular Biology*, 63(5), pp.669–678.
- Ulijasz, A.T. ... Vierstra, R.D., 2010. Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form. *Nature*, 463(7278), pp.250–254.
- Ulm, R. ... Nagy, F., 2004. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), pp.1397–1402.
- Vierstra, R.D. ... Song, P.S., 1987. Comparison of the protein conformations between different forms (Pr and Pfr) of native (124 kDa) and degraded (118/114 kDa) phytochromes from *Avena sativa*. *Photochemistry and Photobiology*, 45(3), pp.429–432.
- Whitelam, G.C. ... Harberd, N.P., 1993. Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *The Plant Cell*, 5(7), pp.757–768.
- Wong, Y.S. ... Lagarias, J.C., 1986. Phosphorylation of *Avena* phytochrome in vitro as a probe of light-induced conformational changes. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(26), pp.12089–12097.
- Xu, Y. ... Quail, P.H., 1995. Missense mutations define a restricted segment in the C-terminal domain of phytochrome A critical to its regulatory activity. *The Plant Cell*, 7(9), pp.1433–1443.
- Yamaguchi, S. ... Sun, T., 1998. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. *The Plant Cell*, 10(12), pp.2115–2126.
- Yanagawa, Y. ... Deng, X.W., 2004. Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes & Development*, 18(17), pp.2172–2181.
- Yang, H.-Q., Tang, R.-H. & Cashmore, A.R., 2001. The Signaling Mechanism of Arabidopsis CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *The Plant Cell*, 13(12), pp.2573–2587.
- Yang, J. ... Wang, H., 2005. Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(3), pp.804–821.
- Yang, K.-Y. ... Soh, M.-S., 2003. Overexpression of a mutant basic helix-loop-helix protein HFR1, HFR1-deltaN105, activates a branch pathway of light signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(4), pp.1630–1642.
- Yanovsky, M.J. ... Casal, J.J., 2002. Missense mutation in the PAS2 domain of phytochrome A

- impairs subnuclear localization and a subset of responses. *The Plant Cell*, 14(7), pp.1591–1603.
- Yanovsky, M.J., Casal, J.J. & Luppi, J.P., 1997. The VLF loci, polymorphic between ecotypes *Landsberg erecta* and *Columbia*, dissect two branches of phytochrome A signal transduction that correspond to very-low-fluence and high-irradiance responses. *The Plant Journal*, 12(3), pp.659–667.
- Yeh, K.C. ... Lagarias, J.C., 1997. A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*, 277(5331), pp.1505–1508.
- Yeh, K.C. & Lagarias, J.C., 1998. Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), pp.13976–13981.
- Yi, C. & Deng, X.W., 2005. COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends in Cell Biology*, 15(11), pp.618–625.
- Zhang, Y. ... Deng, X.W., 2008. Arabidopsis DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 forms a nuclear E3 ubiquitin ligase with DDB1 and CUL4 that is involved in multiple plant developmental processes. *The Plant Cell*, 20(6), pp.1437–1455.
- Zhou, Q. ... Chua, N.-H., 2005. FHL is required for full phytochrome A signaling and shares overlapping functions with FHY1. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 43(3), pp.356–370.
- Zhu, D. ... Deng, X.W., 2008. Biochemical Characterization of Arabidopsis Complexes Containing CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 and SUPPRESSOR OF PHYA Proteins in Light Control of Plant Development. *The Plant Cell*, 20(9), pp.2307–2323.

11 – Saját közlemények

A doktori dolgozatom a következő publikációk adatainak felhasználásával készült:

Missense Mutation in the Amino Terminus of Phytochrome A Disrupts the Nuclear Import of the Photoreceptor. (2012)

Sokolova, V.*, **Bindics, J.***, Kircher, S., Ádám, É., Schäfer, E., Nagy, F. and Viczián, A.

Plant Physiology 158, 107–118.

IF: 6.555 * - Megosztott első szerzők

Phosphorylation of Phytochrome B Inhibits Light-Induced Signaling via Accelerated Dark Reversion in Arabidopsis. (2013)

Medzihradzky M., **Bindics J.**, Ádám É., Viczián A., Klement É., Lorrain S., Gyula P., Mérai Z., Fankhauser C., Medzihradzky K.F., Kunkel T., Schäfer E., Nagy F.

Plant Cell Online 25, 535–544.

IF: 9.575

Egyéb közlemények:

Altered Dark- and Photoconversion of Phytochrome B Mediate Extreme Light Sensitivity and Loss of Photoreversibility of the phyB-401 Mutant. (2011)

Ádám, É., Hussong, A., **Bindics, J.**, Wüst, F., Viczián, A., Essing, M., Medzihradzky, M.,

Kircher, S., Schäfer, E. and Nagy, F.

PLoS ONE 6, e27250.

IF:4.092

Interaction with plant transcription factors can mediate nuclear import of phytochrome B. (2012)

Pfeiffer, A., Nagel, M.-K., Popp, C., Wüst, F., **Bindics, J.**, Viczián, A., Hiltbrunner, A., Nagy, F., Kunkel, T. and Schäfer, E.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 109, 5892–5897.

IF: 9.737

A short amino-terminal part of Arabidopsis phytochrome A induces constitutive photomorphogenic response. (2012)

Viczián, A., Ádám, É., Wolf, I., **Bindics, J.**, Kircher, S., Heijde, M., Ulm, R., Schäfer, E. and Nagy, F.

Molecular Plant 5, 629–641.

IF: 6.126

The Circadian Clock-Associated Small GTPase LIGHT INSENSITIVE PERIOD1 Suppresses Light-Controlled Endoreplication and Affects Tolerance to Salt Stress in Arabidopsis. (2013)

Terecskei, K., Tóth, R., Gyula, P., Kevei, É., **Bindics, J.**, Coupland, G., Nagy, F. and Kozma-Bognár, L.

Plant Physiology 161, 278–290.

IF: 7.394

Összesített IF: 43.479

12 – Köszönetnyilvánítás

A dolgozatomban szereplő eredmények a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ, Foto- és Kronobiológiai Csoport, valamint a Freiburgi Egyetem Dr. Eberhard Schäfer vezette kutatócsoport tagjainak erőfeszítésével születtek meg. Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Nagy Ferencnek, aki a közös munkával eltöltött 5 év alatt szellemileg és szakmailag támogatott és elősegítette fejlődésemet. Dr. Eberhard Schäfernek köszönöm, hogy lehetővé tette, hogy a csatlakozzam németországi csoportjához és ezzel elérhetővé tette azokat a speciális mérőeszközöket, melyek segítségével publikációink színvonala jelentősen növekedett. Kiemelt köszönet jár Dr. Viczián Andrásnak végtelen türelméért és a rengeteg támogatásért, tanácsért amit tőle kaptam, valamint Dr. Ádám Évának a transzgénikus növényvonalak elkészítésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért. Dr. Gyula Péternek pedig köszönöm a rengeteg szakmai és módszertani tanácsot, mely segített elsajátítani és megszeretni a labormunkát.

Köszönöm Dr. Szekeres Miklósnak, hogy elindított a biológus pályán és hogy segítette szellemi épülésemet.

Dr. Horváth Gábornak köszönöm a dolgozatom értékelésében és javításában nyújtott segítségét.

Valamint köszönöm családom és feleségem odaadó és kitartó támogatását.