

A fotomorfogenezist negatívan reguláló COP1 ligáz fitokróm-A indukált inaktivációja, modifikációja

Az elmúlt három év során befejeztük azt a kísérletsorozatot, amely arra irányult, hogy feleletet tudjunk adni a következő kérdésekre: (1) mi a molekuláris magyarázata annak, hogy a fitokróm-A (PHYA) N-terminális fragmentumokat (N-406 és N-686) fúziós fehérjeként kifejező transzgenikus növények egy jelentős hányada cop1-nullhoz hasonló fenotípust mutat, (2) rendelkeznek-e ezek a PHYA N-terminális doménjeit tartalmazó fúziós fehérjék fotoreceptor-aktivitással, (3) befolyásolja-e ezen fúziós fehérjék biológiai aktivitását sejten belüli lokalizációjuk módosítása, (4) függ-e a PHYA fény indukálta proteolízise a fehérje sejten belüli lokalizációjától és (5) van-e valamelyik strukturálisan/funkcionálisan azonosítható doménnek kitüntetett szerepe a PHYA fotoreceptor fényindukált, gyors degradációjában.

Kísérleteink egyértelműen bizonyították, hogy a PHYA N-terminális fragmentumait tartalmazó PHYA-N406/CPRF/YFP-NLS és PHYA-N-686/CPRF/YFP/NES fúziós fehérjék, ellentétben a natív PHYA vagy a teljes hosszúságú PHYA/YFP fúziós fehérjékkel, konstitutív módon vagy a sejtmagban vagy a citoplazmában lokalizálódnak, azaz sejten belüli lokalizációjukat a fény nem befolyásolja. Megállapítottuk továbbá, hogy a fenti fúziós fehérjék nem rendelkeznek fotoreceptor-aktivitással, mivel magas expressziós szintjük ellenére sem voltak képesek a phyA-201 null mutáns komplementációjára (hipokotil-megnyúlás, virágzási idő, PRR9, CHS gének VLFR indukciója). A fentiek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a PHYA fotoreceptor N-terminális fragmentumai – ellentétben a PHYB, PHYD-PHYE fotoreceptorok N-terminális fragmentumaival – nem képesek fotoreceptorként működni, azaz a PHYA fehérje C-terminális fragmentuma, a dimerizáció biztosításán túlmenően, szükséges a PHYA szabályozta jelátviteli lánc működéséhez.

Bár a fenti fúziós fehérjék nem funkcionáltak fotoreceptorként, érdekes módon expressziójuk differenciáltan módosította a transzgenikus növények fejlődését fényben és sötétben egyaránt. A PHYA-N-686/CPRF/YFP/NES vagy PHYA-N-686/CPRF/YFP-NLS konstrukciót expresszáló transzgenikus növények mind sötétben, mind fényben hasonlóan módon fejlődtek, mint a vad típusú vagy phyA-null növénykéik. Ez azt mutatja, hogy ezek a fúziós fehérjék nem interferáltak az ismert jelátviteli láncok működésével, tehát nem fejtettek ki domináns negatív hatást. Ezzel ellentétben a PHYA-N406 /CPRF/YFP-NLS konstrukciót expresszáló csiranövények markáns cop1-null fenotípust mutattak sötétben és fényben egyaránt. Ez a fenotípus jól megfigyelhető volt az egyedfejlődés korai szakaszában (a csírázást követően 2-3 hétig), majd fokozatosan gyengült, és mire a növények virágozni kezdtek, a transzgenikus és kontroll növények fenotípusa, beleértve a virágzási időt is, gyakorlatilag megkülönböztelenné vált. A PHYA-N406/CPRF/YFP-NES konstrukciót expresszáló csiranövények fenotípusa az egyedfejlődés korai szakaszában (a csírázást követően 2-3 hét) nem különbözött szignifikánsan a kontroll növényekétől sem fényben, sem sötétben. Érdekes módon ugyanezek a növények markáns cop1-null fenotípust mutattak az egyedfejlődés későbbi szakaszában, tehát a konstitutív módon a sejtmagban vagy a citoplazmában lokalizált fúziós fehérjék az egyedfejlődés különböző fázisaiban interferáltak a COP1 E3 ligáz működésével. E megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy az egyedfejlődés korai szakaszaiban (sötét-fény átmenet) sejtmagi lokalizációjú, az egyedfejlődés későbbi

szakaszaiban pedig citoplazmás elhelyezkedésű COP1 fehérje aktivitása gátolt. Ezt a következtetést jól alátámasztja az a tény, hogy élesztő-2-hibrid vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a PHYA-N406 fragmentum konformációtól független módon képes kölcsönhatásba lépni a COP1 fehérjével.

A fenti PHYA fragmentumok fényindukált proteolízisét vizsgálva azt találtuk, hogy a PHYA-N686/CPRF/NLS vagy NES/YFP fúziós fehérjék degradációja megegyezik a natív PHYA fotoreceptor degradációjával. Azaz ezek a fehérjék fényben nagyon gyorsan degradálódnak (féléletidő: 20 perc), ugyanakkor a PHYA-N406-CPRF/NLS vagy NES/YFP fúziós fehérjék fényben és sötétben egyaránt stabilak voltak. Ennek alapján megállapítottuk, hogy a natív PHYA fotoreceptor fényindukált proteolízisében a 406-686 aminosavak által behatárolt domén alapvetően fontos szerepet játszik, mivel ennek deletálása fényben stabilizálja a fehérjét.

A fentieket összegezve kijelenthető, hogy a PHYA fotoreceptor N-terminális fragmentumai nem funkcionálnak fotoreceptoroként, és az egyedfejlődés különböző fázisaiban domináns negatív módon interferálnak a COP1 E3 ligáz aktivitásával. Ez a kölcsönhatás azon alapszik, hogy a PHYA406 N-terminális fragmentum – ellentétben a natív PHYA fehérjével – stabilak, így irreverzibilis módon inaktíválják a COP1 E3 ligázt.

A natív PHYA indukálta jelátviteli lánc szabályozásában, a PHYA fotoreceptor fényindukált degradációjában (de-szenzitizálás) fontos szerepet játszik a fotoreceptor fényindukált sejtmagi importja. A fenti kísérletek bizonyították, hogy a PHYA egy N-terminális doménja alapvetően fontos a fényindukált proteolízishez de jellegüknél fogva nem adhattak információt arról, hogy a natív PHYA molekula melyik doménja szükséges a sejtmagi importhoz. Az elmúlt évek során megállapítást nyert, hogy a PHYA sejtmagi importját az FHY1 és FHL fehérjék közvetítik. Az FHY1/FHL fehérjék konformációtól függő módon képesek kölcsönhatni a PHYA Pfr formájával, az így keletkezett komplexeket az importin rendszer az FHY1/FHL fehérjék NLS szekvenciái révén felismeri (a PHYA molekula nem tartalmaz funkcionális sejtmagi import szignált), majd a sejtmagba transzportálja. A PHYA N-terminális fragmentumok sejtmagi importjának vizsgálatát a PHYA-N406/CPRF/YFP ill. PHYA-N686/CPRF/YFP fúziós fehérjékkel végeztük el. Ezek a fúziós fehérjék nem tartalmaztak semmilyen ismert lokalizációs szignált és sejtmagi importjuk az FHY1/FHL fehérjékkel való kölcsönhatástól függött. Kísérleteink egyértelműen bizonyították, hogy mindkét PHYA N-terminális fragmentum képes az FHY1/FHL fehérjékkel konformációtól függő módon kölcsönhatásba lépni (élesztő-2-hibrid és *in vivo* immunprecipitációs vizsgálatok) és fényindukált módon a sejtmagba transzportálódni. Ezek az adatok bizonyítják, hogy a PHYA fényindukált proteolízisét és sejtmagba irányuló transzportját a fehérje különböző doménjei közvetítik. Nevezetesen az első 406 aminosav alkotta fragmentum elegendő a PHYA fotoreceptor fényindukált sejtmagi transzportjához (tehát ez a domén felelős a natív PHYA molekulának a FHY1/FHL fehérjékkel való kölcsönhatásáért), míg a 406-686 aminosavakat tartalmazó PHYA fragmentum szükséges a fotoreceptor fényindukált proteolíziséhez. Az a tény, hogy a PHYA-N686/CPRF/YFP fúziós fehérje nem komplementálja a phyA null mutánst (nem funkcionális fotoreceptor), de képes a fény hullámhosszától és intenzitásától függő módon a sejtmagba importálódni és lebomlani, számos érdekes lehetőséget kínál a továbbiakban. Ezek közül talán a legérdekesebb az, hogy az FHY1/FHL fehérjéket és a PHYA-N686 fragmentumot használva elvileg lehetségessé vált egy olyan vektorrendszer felépítése, amely lehetővé teszi, hogy egy

jelátviteli lánc működését fényfüggővé változtassuk nemcsak növényekben, hanem élesztő vagy humán sejtekben is.

Fitokróm-A tartalmú sejtmagi fehérjekomplexek izolálása és a komplexek alkotóelemeinek meghatározása és jellemzése

A sejtmagi PHYA-t tartalmazó fehérjekomplexek pontos funkciója a fényindukált és PHYA-kontrollált jelátviteli láncok működésében nem volt ismert vizsgálataink elkezdésekor. A legáltalánosabban elfogadott nézet szerint ezek a komplexek a PHYB komplexekhez hasonlóan a jelátviteli lánc deszenzitizálásában játszhatnak szerepet oly módon, hogy a fény intenzitásától függően az aktuálisan fölöslegessé vált komponensek, köztük maga a PHYA fotoreceptor ezekbe a sejtmagi komplexekbe elkülönülnek. Az ily módon inaktivált molekulák aztán a fényintenzitástól függően újra mobilizálódhatnak és ismét a jelátviteli lánc aktív elemeiként működhetnek. Ez különösen vonzó elméletnek tűnik a PHYA fotoreceptor esetében, mivel a PHYA fehérje fényben nagyon gyorsan lebomlik. A fenti teória értelmében a sejtmagi PHYA molekulák egy része a sejtmagi komplexek alkotóelemeként sokkal lassabban degradálna, így szükség esetén újra, fehérjeszintézis és sejtmagi import nélkül betölthetné biológiai funkcióját. Az első kísérletek elvégzésekor kiderült, hogy a PHYB komplexek izolálására kidolgozott módszer a PHYA komplexek izolálására nem használható, mert a PHYA-tartalmú komplexek sokkal instabilabbak és így a kitermelés nagyon alacsony hatásfokú. Ezt követően kiderült, hogy a növények kis mérete miatt a MALDI-TOPF vizsgálatok elvégzéséhez elegendő sejtmagi komplexet a rendelkezésre álló metodikával képtelenség *Arabidopsis thaliana* növényekből izolálni, mivel olyan mennyiségű kiindulási anyagra van szükség, amit a jelenlegi üvegházi kapacitás mellett nem tudunk biztosítani. Az első év után úgy döntöttünk, hogy átalakítjuk a kísérleti stratégiánkat és két alternatív megközelítési módot követünk párhuzamosan. Az első azon alapult, hogy transzgenikus rizsnövényeket állítunk elő, amelyek expresszálják az *Arabidopsis thaliana* PHYA fotoreceptort PHYA-YFP ill. PHYA-TAP fúziós fehérjeként. A rizsnövények méretük miatt optimális kiindulási alapanyagoknak tűntek preparatív kísérletekhez. Emellett bizonyítottuk, hogy a rizs phyA null mutásokat sikeresen tudtuk ezekkel a fúziós fehérjékkel komplementálni, tehát az *Arabidopsis* PHYA fotoreceptor biológiailag aktív maradt a transzgenikus rizs növényekben. A transzgenikus növények tenyésztésekor azonban kiderült, hogy a transzgenre homozigóta rizsnövényeket nem vagy csak nagyon kis százalékban tudunk előállítani, mert az *Arabidopsis* PHYA magas szintű expressziója inaktiválja az endogén rizs PHYA és a fúziós *Arabidopsis* PHYA-TAP/YFP fehérjéket kódoló gének expresszióját az F2 és F3 nemzedékekben az ún. co-silencing (gén-csendesítés) mechanizmus következtében. Ezekkel a kísérletekkel párhuzamosan azonban elkezdtük ill. folytattuk azokat a kísérleteket, amelyek arra irányultak, hogy olyan *Arabidopsis* mutánsokat izoláljunk, amelyekben a sejtmagi PHYA fotoreceptort tartalmazó komplexek kialakulása aberráns és markánsan eltér a vad típusban leírt komplextől. Ehhez a megközelítéshez olyan transzgenikus *Arabidopsis* növényt állítottunk elő, amely egy endogén PHYA fehérjét nem expresszáló phyA mutánsban expresszálja a PHYA-TAP-YFP fúziós fehérjét. A homozigóta transzgenikus magokat EMS kezeléssel mutagenizáltuk, és a mutagenizált növények önbeporzásával előállított mutáns populációból (kb. 60 000 csíranövényt átvizsgálva) kiválasztottuk azokat a

mutáns növényeket, amelyek távoli vörös fényben hipo- vagy hiperszenzitív fenotípust mutattak. A kiválasztott mutánsokban (150 független mutáns) megvizsgáltuk a PHYA tartalmú sejtmagi komplexek kialakulását és stabilitását, és genetikailag térképeztünk 10 olyan vonalat, amelyekben a PHYA komplex kialakulása ill. stabilitása szignifikánsan különbözött a vad típusban leírttól. A 10 mutáns vonalból 4-ben azt találtuk, hogy a mutáns fenotípus együtt szegregál a transzgénnel, tehát a mutáció valószínűleg a transzgénben lokalizált. Ezért ezeket a mutációkat nem térképeztük tovább, hanem megszekvenáltuk a mutánsokból a PHYA-TAP-YFP transzgént és megállapítottuk, hogy a mutációk minden esetben a fúziós fehérje aminosavsorrendjének megváltozását eredményezték. Mivel ezek minden esetben aminosavcserét eredményeztek, folytattuk e mutánsok jellemzését. Bizonyítottuk, hogy ezekben a mutánsokban a fúziós fehérje nem degradálódik fény hatására, a mutánsok kivétel nélkül hiposzenzitivitást mutatnak távoli vörös fényben és nem mutatható ki sejtmagi PHYA-t tartalmazó sejtmagi komplexek kialakulása. A másik 6 mutáns esetében, amelyekben a mutációk durva térképezése arra engedett következtetni, hogy a mutációk nem a transzgént érintették, folytattuk a genetikai térképezést. Az elmúlt év során befejeztük a genetikai térképezést, és az egyes mutációk pozícióját kb. 150-200 kb-nyi pontossággal behatároltuk. E mutánsok genomjának újraszekvenálását a freiburgi egyetemen működő ún. Solexa platform segítségével megkezdjük. Az 5 mutáns teljes genomjának újraszekvenálása kb. 2-2.5 hónapot fog igénybe venni. A 6. mutánsban a betérképezett mutáció nagyon közelinek tűnt a LIP1 génhez, amelyről kimutattuk, hogy fontos szerepet játszik a cirkadián óra fény által történő beállításában. Ebből kifolyólag meghatároztuk ebben a genetikai háttérben a LIP1 gén szekvenciáját, és megállapítottuk, hogy egy pontmutáció következtében ebben a mutánsban nem keletkezik LIP1 fehérje. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a LIP1 fehérje a cirkadián rendszerben betöltött szerepe mellett szükséges a PHYA sejtmagi komplexek kialakulásához is.

A mutációk által érintett gének azonosításán túlmenően folytattuk a kiválasztott 6 mutáns vonal fiziológiai, sejtbiológiai karakterizálását. Ezek a vizsgálatok a befejezésükhöz közelednek és a jelenleg rendelkezésünkre álló adatok alapján a következő megállapításokat tehetjük. A fenti 6 mutáció különböző mértékben és módon, de megváltoztatja a PHYA sejtmagi komplexek kialakulását, méretét és stabilitását. Mivel ezek a mutációk nem érintik közvetlenül a PHYA fehérjét, ezért feltételezzük, hogy a mutációk vagy a PHYA fehérje poszt-transzlációs módosításában szerepet játszó kináz/foszfatáz fehérjék aktivitását, specifikitását, vagy pedig a PHYA fehérjével a sejtmagi komplexekben kölcsönható faktorok valamelyikét érintik. A fenti általánosítás alól az egyetlen kivétel a LIP1 fehérje. A LIP1 gén egy atipikus kis-GTP-kötő fehérjét kódol, amelyről kimutattuk, hogy rendelkezik GTP-áz aktivitással, tehát valószínűleg enzimeként működik. A LIP1 fehérje konformációfüggő módon képes kölcsönhatni a PHYA fotoreceptorral élesztő-2-hibrid kísérletekben, a LIP1-YFP fúziós fehérje mind a sejtmagban, mind a citoplazmában megtalálható. A LIP1 fehérje hiányában a PHYA tartalmú sejtmagi komplexek kisebbek, de stabilabbak, és a mutáns növények hiperszenzitívek vörös és kék fényben.