

37. OTDK Biológia szekció

**FLX-LIKE fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata a TOC1
óraféhrjével *Arabidopsis thaliana* modellszervezetben**

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Genetikai Tanszék



Készítette:

Petrus Júlia

Biológa BSc, 3. évfolyam

Témavezető: Dr. Kozma-Bognár László, egyetemi docens

2024

Tartalomjegyzék

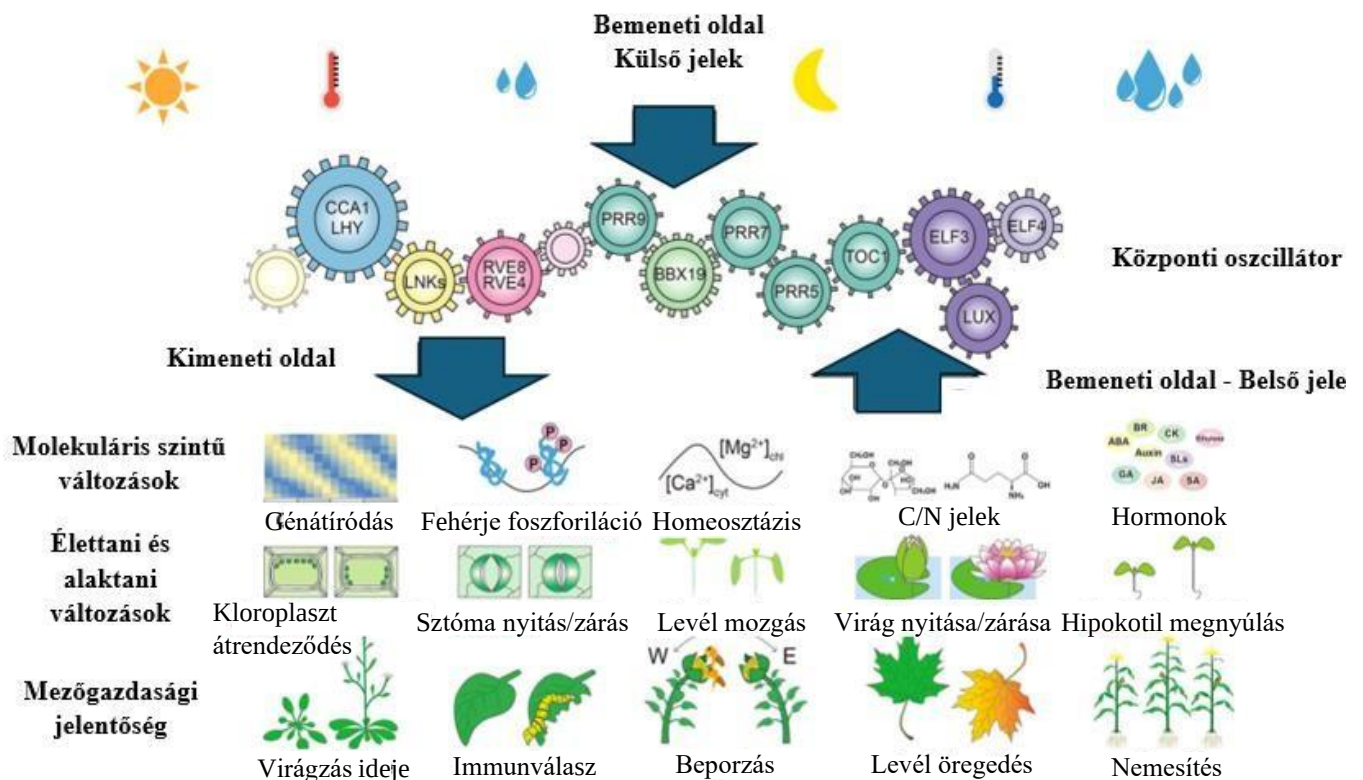
Tartalomjegyzék.....	2
Bevezető.....	3
A cirkadián óra.....	3
A TOC1 fehérje.....	5
Membrán nélküli testek	6
Az <i>FLX-LIKE</i> géncsalád.....	8
Célkitűzés	10
Anyagok és módszerek.....	11
Preparatív PCR	11
Gélelektroforézis	11
Gél extrakció	11
Izolált fragment emésztés	11
pSK plazmid emésztése.....	12
pSK plazmid agaróz gélen futtatása és gélből tisztítása	12
Ligálás	12
LB tápoldat, táptalaj készítése	12
Transzformálás	12
Leoltás	13
Miniprep készítés.....	13
Teszt emésztés	13
Miniprep DNS tisztítása szekvenáláshoz.....	14
Visszatranszformálás.....	14
Emésztés élesztő vektorba illesztéshez.....	14
Az élesztő vektorokban készült klónok tesztelés.....	14
Élesztő sejtekbe való transzformálás, fehérje-fehérje kölcsönhatások meghatározása	15
Magok sterilizése	15
Keresztezés.....	16
Eredmények.....	17
Az <i>FLL1</i> és <i>FLL3</i> élesztő vektorokba klónozása	17
Fehérje kölcsönhatások vizsgálata	19
Keresztezett nullmutáns növények létrehozása	21
Diskusszió.....	23
Köszönetnyilvánítás	24
Irodalom	25

Bevezető

A cirkadián óra

A Föld közel 24 órás tengely körüli forgásából adódóan sok környezeti tényező mutat napi ingadozást. A legtöbb faj ilyen periodikusságot mutató környezetben alakult ki, így evolúciós előnyt jelentett, ha belső folyamataikat minél nagyobb pontossággal hozzá tudták igazítani a külső változásokhoz. Néhány prokariótánál és a legtöbb eukariótánál megfigyelhető, hogy a sejtek számos élettani és anyagcsere folyamata állandó körülmények mellett is fenntartja ciklikusságát (Edgar *et al.*, 2012). Az életfolyamatokban megfigyelhető napi ritmusokat, amelyek állandó körülmények között is fennmaradnak, cirkadián ritmusoknak, az őket létrehozó és fenntartó genetikai oszcillátort pedig cirkadián órának nevezzük. A központi oszcillátor, a bemeneti és a kimeneti oldal a cirkadián rendszer három nagy elméleti egysége. A bemeneti oldal jelenti a külső vagy belső környezetből érkező jeleket, amelyek beállítják az oszcillátor fázisát és sebességét, optimalizálva annak működését az adott körülményekhez. Ilyen jelek lehetnek például a fény, a hőmérséklet, páratartalom vagy hormonális jelek. A kimeneti oldal jelenti azokat az élettani és alaktani változásokat, amelyeket az óra irányít (Xu *et al.*, 2022).

Növényeknél a cirkadián óra számos élettani folyamatra hatással van a gének átírásának, a fehérjék aktivitásának, a hormonok szintézisének és az anyagcserének a szabályozása által. Így szerepet játszik a virágzás idejének meghatározásában, a hipokotil növekedésében, a levelek mozgásában és öregedésében, a sztómák nyitásában és zárásában, valamint a biotikus és

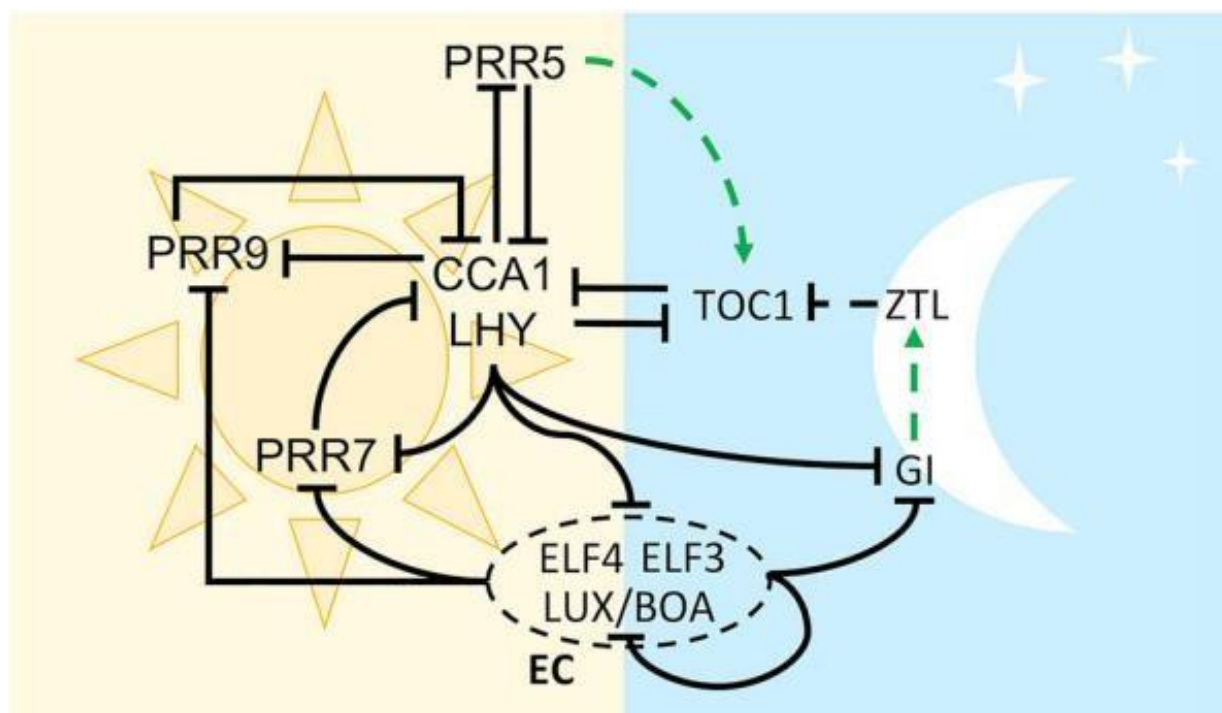


1. ábra A cirkadián óra működését és hatásait összefoglaló ábra szárazföldi növényekben (Xu *et al.*, 2022)

abiotikus stressz válaszokban is (**1. ábra**) (Xu *et al.*, 2022). Ezek mind mezőgazdaságilag is fontos jellegek, így a cirkadián órában szerepet játszó gének gyakran célpontok új növény fajták nemesítésekkor (Turner *et al.*, 2005)

Az óra molekuláris szintű működésének alapelve valamennyi eukarióta élőlénynél megegyező: egymással összefüggésben lévő transzkripciós-transzlációs visszacsatolási hurkokból, oszcillátorokból állnak. Az oszcillátorok komponensei viszont eltérőek, fajoként más-más gének és fehérjék látják el ezt a feladatot. (Wijnen & Young, 2006). Növényi kutatásoknál széles körben elterjedt modellszervezet az *Arabidopsis thaliana*, magyar nevén lúdfű. A cirkadián órát kialakító negatív visszacsatolási hurkok molekuláris komponenseiről ebben a növényben tudunk a legtöbbet. A cirkadián óra hálózatos és összetett szerkezetéből adódóan viszont még mindig maradtak megválaszolatlan kérdések.

A növényi cirkadián óra középpontjában három gén áll: a reggeli kifejeződést mutató *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1*) és *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*), valamint az esti *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION1*). Ezek a gének maguk is kölcsönösen gátolják egymást, emellett még számos más molekula hat a gének átíródására. A *CCA1/LHY* termelődésére negatív hatással vannak a *PRR5,7* és *9* (*PSEUDO RESPONSE REGULATOR*) fehérjék, amelyek napközben fokozatosan termelődnek. A *PRR7/9* gén kifejeződését az úgynevezett Evening Complex (EC) gátolja, amely az *ELF3*, *ELF4* (*EARLY FLOWERING*) és *LUX* (*LUX ARRHYTHMO*) fehérjéből áll. A *TOC1* és *PRR5* lebontását a *ZTL* (*ZEITLUPE*)



2. ábra A cirkadián óra molekuláris működésének vázlata (Ronald & Davis, 2019)

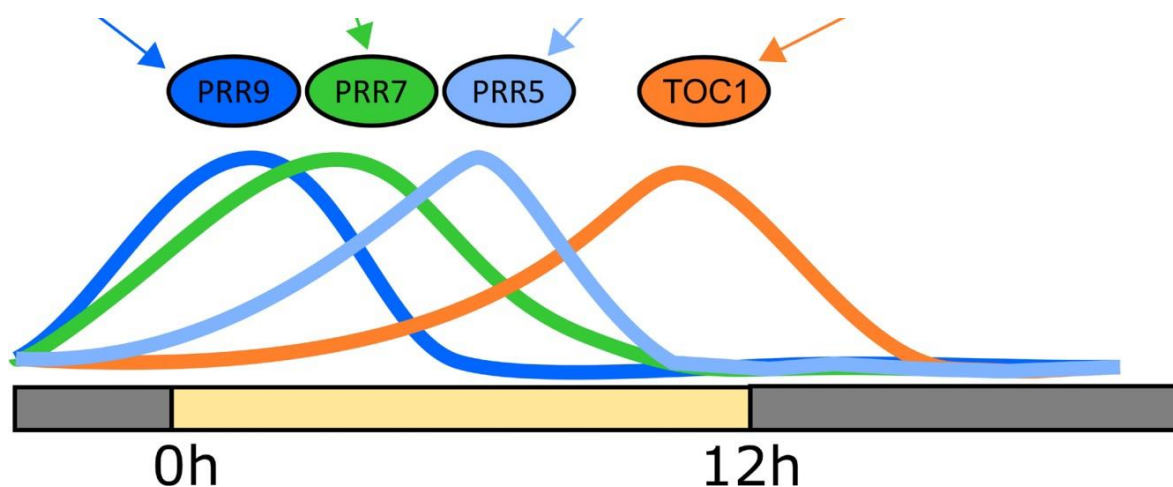
és GI (GIGANTEA) fehérjékkel való kölcsönhatásuk idézi elő (**2. ábra**) (Ronald & Davis, 2019).

Az egyes növényi szövetek saját működésű órával rendelkeznek, amelyek egymással kapcsolatban állnak. (Endo *et al.*, 2014)

A TOC1 fehérje

A *TOC1* az úgynevezett *PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR)* gén családba tartozik, amely elengedhetetlen a cirkadián óra működéséhez. (Hotta, 2022). Mind a központi oszcillátorban, mind a kimeneti és a bemeneti oldalban van szerepük, így ezek a gének gyakran célpontok különböző nemesítési folyamatokban, hogy megváltoztassák a növény fényperiódus érzékelését, és így a virágzás idejét (Turner *et al.*, 2005). Tagjai változó mennyiségben előfordulnak a zöld algáktól kezdve az egyszikűekig. *Arabidopsis thaliana*-ban 5 *PRR* gén található: *PRR9*, *PRR7*, *PRR5*, *PRR3* és *TOC1/PRR1*. A *PRR* fehérjék a sejtmagban komplexeket tudnak létrehozni más fehérjékkel, és így képesek kötni a DNS-t, illetve különböző fehérjékkel kölcsönhatva transzkripciót szabályozni (Hotta, 2022).

Három nagy szerkezeti egységgel rendelkeznek: a PR domén a homo-és heterodimerek kialakításához fontos, a CCT domén fehérjéket és DNS-t tud kötni, illetve a kettő közti régió (Inter Region) (Wenkel *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2010.) A *PRR* gének a nap folyamán különböző mértékű transzkripciós aktivitással rendelkeznek, az egyes gének legnagyobb mértékű átíródása két-három órás csúszásokkal történik, „expressziós hullámokat” létrehozva (**3. ábra**). Először a *PRR9* transzkripciója éri el a csúcst hajnal környékén, majd sorban a *PRR7*, *PRR5*, *PRR3* és végül alkonyatkor a *TOC1* géné (Matsushika *et al.*, 2000). A *PRR5*, *PRR6* és *PRR7* fehérjék, de főképpen a *TOC1* fehérje, transzkripciós represszorként



3. ábra A *PRR* gének átíródásának mértéke a nap folyamán (Hotta, 2022)

funkcionálnak: a központoszcillátor két fontos fehérjéjének a *CCA1* és az *LHY* gének promótereit tudják kötni, ezzel akadályozva az átírásukat (Nakamichi *et al.*, 2010).

A TOC1 fehérje a központi oszcillátor egyik fontos tagja. Emellett a vörös/távoli vörös fényjeleket továbbító szabályozási láncnak is fontos eleme (Mas *et al.*, 2003).

Membrán nélküli testek

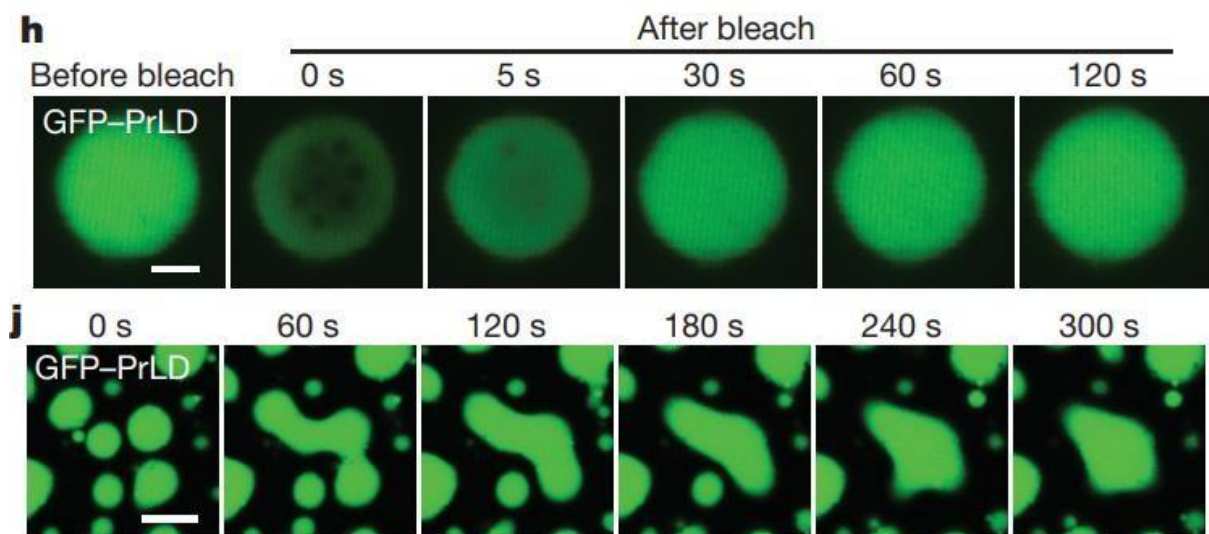
A sejtekben történő biokémiai folyamatok térben és időben elkülönülten mennek végbe, ezzel növelve hatékonyságukat és irányíthatóságukat (Weber&Brangwynne, 2012). E célból alakultak ki a membránnal körülvelt kompartmentek a sejtekben, amelyekben más-más folyamatok mennek végbe (Xu *et al.*, 2021). Ilyen például a sejtmag, a mitokondrium, az endoplazmatikus retikulum vagy a kloroplaszt (Lusk&King, 2017; Frey&Mannella, 2000; Csordás *et al.*, 2018; Hallick, 1992).

Emellett a sejtekben számos olyan test is létezik, amelyek képesek elkülönülni a környezetüktől membrán nélkül is, úgynevezett fázis-szeparáció révén (Brangwynne *et al.*, 2009). Erre az első megfigyelés a sejtmagvacska volt, amely a sejtmagban a riboszómális RNS molekulák szintéziséért felelős (Wagner, 1835).

A membrán nélküli testek mikrométer nagyságúak, és bennük fehérjék, illetve nukleinsavak koncentrálnak. A citoplazmában és a sejtmagban egyaránt előfordulnak (Banani *et al.*, 2017). Habár gél vagy szilárd halmazállapotúak is lehetnek, a folyékony halmazállapot a legjellemzőbb ezekre a testekre, mivel ebben az állapotban tudnak a benne lévő molekulák szabadon diffundálni (Field *et al.*, 2023.). Egy oldat ilyen fajta tartós ketté válását egy töményebb és egy hígabb oldatra folyadék-folyadék fázis-szeparációnak (liquid-liquid phase separation-LLPS) nevezzük (Hyman *et al.*, 2014).

Fluoreszcens jelölés segítségével a testek fénymikroszkóppal megfigyelhetők. Gömbölyű, folyadékcsepp-szerű alakjuk van, amely könnyen változhat a folyadék áramlása vagy fizikai akadályba való ütközés esetén. Ha egymással kerülnek érintkezésbe a testek, akkor gyakran megfigyelhető, hogy egyesülnek, egy nagy testté olvadnak össze (**4./j ábra**) (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2016). Egy érdekes kísérleti módszer segítségével könnyen igazolni lehet, hogy az adott membrán nélküli test mennyire folyékony, azaz mennyire gyorsan tudnak diffundálni a benne lévő molekulák (**4./h ábra**).

A FRAP (Fluorescens Recovery After Photobleaching) egy olyan eljárás, amely során a molekulákat fluoreszcensen jelölik, majd egy nagy energiájú fénnel kiégetik a molekulákat egy kis pontban, így azok elveszítik a fluoreszcens képességüket. Egy idő után a molekulák diffúziója révén az elsötétült pontba újra fluoreszcens molekulák kerülnek, és eltűnik a kiégetett rész. Minél gyorsabban áll helyre az eredeti állapot, annál gyorsabban diffundálnak az adott rendszerben a molekulák (Jönsson *et al.*, 2008). Folyadék-folyadék fázis szeparációval létrejött testek esetén ez igen gyorsan bekövetkezik, ami szintén a test folyadék halmazállapotára utal (Bergeron *et al.*, 2016).



4. ábra

h: Egy membrán nélküli test photobleaching előtt, majd az erős fény besugárzás után, ahogy fokozatosan visszaalakul az eredeti állapotba.

j: Membrán nélküli testek összeolvadásáról készült felvételek fénymikroszkóppal.

(Fang *et al.*, 2019.)

Ezeket a testeket olyan molekulák képesek létrehozni, amelyek szerkezete megengedi, hogy sok gyenge kölcsönhatást tudjanak kialakítani egymás között (Lyon *et al.* 2021). Az ilyen fehérjék nagy számú, töltéssel rendelkező, poláris, illetve aromás aminosavakból épülnek fel, amelyek elektrosztatikus, dipólus-dipólus és más gyenge kölcsönhatások létrehozását teszik lehetővé molekulán belül és molekulák között is (Brangwynne *et al.*, 2015).

Ezeknek a kölcsönhatásoknak a kialakulása csökkenti a komponensek oldékonyságát, és egy bizonyos küszöbérték felett különválnak a környezetüktől. Ugyanígy, ha a küszöbérték alá csökken a gyenge kötések száma, a testek szétesnek (Lin *et al.*, 2015). Ez a sejtekben lezajló folyamatok gyors ki-bekapcsolására ad lehetőséget, így a sejt hatékonyan tud reagálni a környezeti változásokra (Chen *et al.*, 2022).

A membrán nélküli kompartmentekben például enzimek, transzkripció faktorok koncentrálódhatnak, így növelve az adott biokémiai folyamat vagy az adott gén átírásának a sebességét. Illetve a testekben annak érdekében is lehet növelni egy molekula koncentrációját, hogy ne tudja ellátni máshol a funkcióját (Alberti *et al.*, 2019).

Az elmúlt években számos új információ derült ki arról, hogy milyen fontos szerepe van a folyadék-folyadék fázis szeparációnak növényekben. Az így kialakult testeknek hatása van a növény növekedésére, fejlődésére, a virágzásra és a stressz válaszokra is (Liu *et al.*, 2023).

Az FLX-LIKE géncsalád

Arabidopsis thaliana-ban az *FLX* géncsalád öt tagból áll: *FLC EXPRESSOR (FLX)*, *FLX-LIKE 1 (FLL1)*, *FLX-LIKE 2 (FLL2)*, *FLX-LIKE 3 (FLL3)* és *FLX-LIKE 4 (FLL4)*. Mind az öt génnek fontos szerepe van a virágzási idő szabályozásában, a virágzás megindításában.

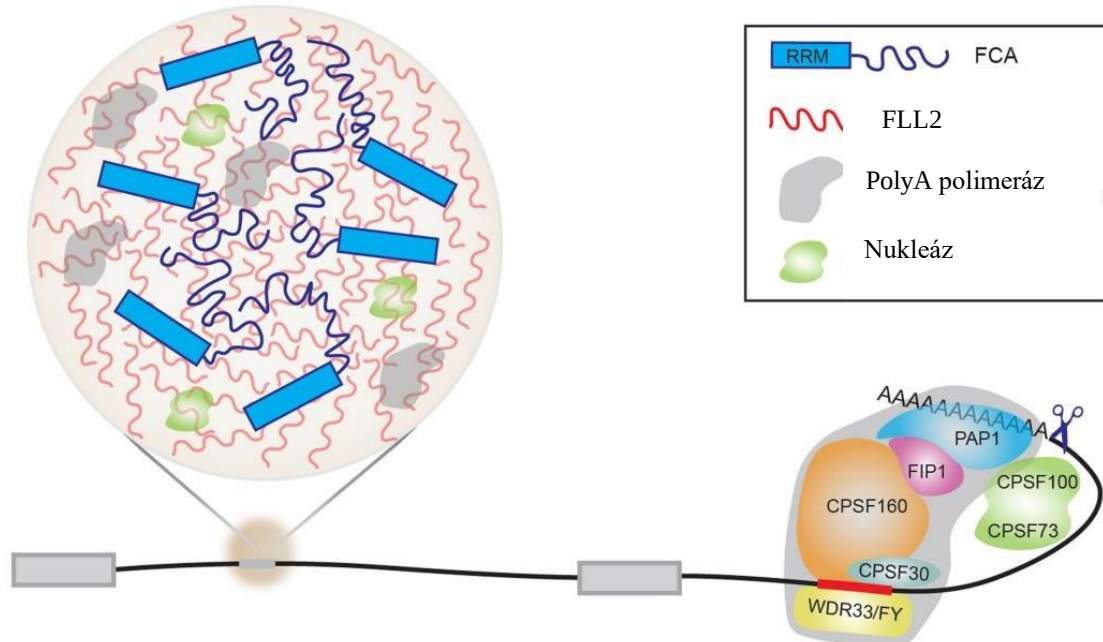
A virágzás idejét nagyban befolyásolják a különböző környezeti hatások. *Arabidopsis thaliana* és sok más faj esetén hosszú hideg időszak után – vernalizáció után - a növények gyors virágzásba kezdenek. Így a növények a megfelelő időpontban, a hosszú, hideg tél után tavasszal kezdenek el virágozni. Ennek a folyamatnak a molekuláris hátterében többek között a *FLOWERING LOCUS C (FLC)* fehérje áll, ami egy transzkripció represszor, és képes gátolni virágzást elősegítő géneket (Carol *et al.*, 2008)

Hosszú hidegnek kitett növényekben lecsökken az *FLC* szintje, és a virágzás megindulhat. Ahhoz, hogy az *FLC* fehérjének vernalizáció előtt elég magas legyen a szintje, a *FRIGIDA (FRI)* fehérjére is szükség van. Az *FRI* fehérje nem önmagában, hanem más fehérjékkel alkotott komplex formájában fejti ki hatását. Ebben a komplexben megtalálható többek között az *FLX* és az *FLL4* fehérje is (Lee *et al.*, 2013).

Az *FLL2* fehérjének szintén az *FLC* szabályozásában van szerepe. Az *FLL2* jelenléte elengedhetetlen az *FCA (FLOWERING LOCUS A)* fehérjét tartalmazó membrán nélküli testek kialakulásához a sejtmagban (**5. ábra**) (Fang *et al.*, 2019) . Az *FCA* fehérje RNS molekulákat képes kötni, és fázis szeparáció által membrán nélküli testeket hoz létre (Simpson *et al.*, 2003).

Ezekben a testekben különböző mRNS 3' vég módosító fehérjék tömörülnek össze, amelyek az *FLC* virágzási represszor génjének a csendesítésében vesznek részt. Az *FLC* génről átíródó antiszensz mRNS érése során a 3' vég poliadenilációjával olyan folyamatok indulnak be, amelyek a kromatin metilálásához, és így az *FLC* csökkent átírásához vezetnek (Wu *et al.*,

2016). Az FLC fehérje szintjének csökkenésével pedig felszabadulnak a gátlás alól bizonyos virágzást elősegítő fehérjéket kódoló gének.



4. ábra Az FLL2 fehérje membrán nélküli testeket hoz létre, annak érdekében, hogy bizonyos helyeken elősegítse a pre-mRNS poliadenilációját (Fang et al., 2019)

Kísérleteik során Fang et al. létrehoztak olyan mutáns növényeket, amelyekben az FLL2 génről hibás fehérje íródott át. Ekkor az FCA fehérjét tartalmazó membrán nélküli testek száma jelentősen csökkent a sejtmagban, illetve a növény későn virágzott.

Abban az esetben viszont, ha kiütötték az FLL2 gént, tehát nem íródott át róla fehérje, nem tapasztalták a fentebbi változásokat. Azt feltételezték, hogy ebben az esetben az FLL2 feladatát egy másik FLX-LIKE fehérje vette át. Valószínűsíthetőleg az FLL1 vagy az FLL3, mivel ezeknek a szerkezete hasonlít a legjobban a FLL2 fehérjéjéhez (Fang et al. 2019).

Célkitűzés

A növényi cirkadián óra felépítéséről és működéséről egyre többet tud a tudomány, de bonyolult szerkezetéből adódóan még számos megválaszolatlan kérdéssel állunk szembe. A TOC1 óraféhrjéről ismert, hogy membrán nélküli testekben található meg a sejtmagban (Wang *et al.* 2010). Ám ezeknek a testeknek a kialakulásáról, illetve a TOC1 féhrjére és annak funkciójára gyakorolt hatásukról nem sokat tudunk. Az FLL2 féhrjéről ismert, hogy más membrán nélküli testek kialakításában részt vesz (Fang *et al.*, 2019), emellett ismert a TOC1 féhrjével való kölcsönhatása is (Braun *et al.* 2011).

Így felmerült a kérdés, hogy vajon az FLL2 féhrjének lehet-e szerepe a TOC1 sejtmagi testek kialakításában, és így hatással van-e a cirkadián óra működésére is. Laborunk korábbi élesztő két-hibrid kísérletei igazolták az FLL2 és a TOC1 féhrjék kölcsönhatását. Ez támogatta a hipotézist, mely szerint az FLL2 féhrjének lehet szerepe a TOC1 sejtmagi testek kialakításában. Ugyanakkor az *fl2* nullmutáns növények vizsgálata azt mutatta, hogy a cirkadián óra működése nem változott meg. Más kutatók, más jellegeket vizsgálva is találkoztak hasonló jelenséggel, és arra jutottak, hogy az *FLL2* nullmutációja esetén valamelyik másik FLX-LIKE féhrje veszi át a szerepét (Fang *et al.*, 2019). Ezek alapján feltételezzük, hogy az FLL2 a TOC1 féhrjén (pontosabban a TOC1 sejtmagi testek kialakításán) keresztül hat az órára, de a redundancia miatt pusztán az FLL2 eltávolítása nem okoz cirkadián fenotípust.

Ezért szeretnénk megvizsgálni a többi FLX-LIKE féhrje hatását is a TOC1 féhrjére és a cirkadián órára. Egyrészt élesztő két-hibrid rendszer segítségével szeretnénk volna tesztelni a többi FLX-LIKE féhrje kölcsönhatását a TOC1 féhrjével. Valamint olyan mutáns növényeket hozunk létre keresztezéssel, ahol az FLX-LIKE féhrjék különböző kombinációkban vannak kiütve, és azt vizsgáljuk, hogy melyik kombináció esetében jelenik meg olyan fenotípus, ami a TOC1 féhrjemegváltozott funkciójára utal. A cirkadián fenotípus meghatározás érdekében az FLX-LIKE mutáns növényeket olyan vonallal keresztezzük, ahol a *CCA1* gén (ami szintén egy óragén) promóteréhez egy luciferázt kódoló szakasz van csatolva, így a gén kifejeződése és az óra működése a lumineszcencia mérésével láthatóvá tehető. A TOC1 sejtmagi testek mikroszkóppal történő nyomon követéséhez egy TOC1-YFP fúziós féhrjét kifejező transzgént is bejuttatunk.

Anyagok és módszerek

Preparatív PCR

A géneket egy *Arabidopsis thaliana* cDNS könyvtárból nyertük ki preparatív PCR segítségével. Ehhez 28,7 µl vizet, 10 µl 5x Phusion puffert, 6,3 µl 2 mM dNTP mixet, 2 µl 10 µM primer mixet, 2 µl templátot és 1 µl Phusion enzimet mértünk össze 1-1 reakcióba.

PCR protokoll: 95 °C 2 perc, 40x(95 °C 1 perc, 55 °C 1 perc, 72 °C 0,5 perc), 72 °C 7 perc

Gélelektroforézis

A mintákat 1%-os agaróz gélen futtattuk meg, ehhez jellemzően 0,6 g agarózt és 60 ml 1x TBE puffert mértünk össze (1 % (w/v) agaróz gél). Mikrohullámú sütőben felmelegítettük, hogy az agaróz fel tudjon oldódni. Megvártuk, amíg lehűl és 3 µl etídium-bromid festéket adtunk hozzá. Kiöntöttük a futtatókádba, megvártuk, amíg megszilárdult a gél, felvittük a mintákat, majd 70 V-on futtattuk.

Gél extrakció

A gélből kivágott mintákat a Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit segítségével tisztítottuk meg. 500 µl NTI pufferben melegítettük az Eppendorf-csőben lévő gélkockát, amíg fel nem olvadt. Ezután átpipettáztuk a tisztító oszlopra, és fél percig centrifugáltuk (11 000 g mindegyik centrifugálási lépésnél). A gyűjtőcsőbe átfolyt folyadékot kiöntöttük. Az oszlopra 700 µl NT3 puffert mértünk, majd fél percig centrifugáltuk, és a gyűjtőcsőben megjelenő folyadékot kiöntöttük. Az NT3-as mosási lépést még egyszer megismételtük. Ezután egy perces szárítási centrifugálás következett. Miután kivettük, a gyűjtőcsövet egy Eppendorf csőre cseréltük, és erre raktuk rá az oszlopot. Az oszlopra 30 µl steril desztillált vizet mértünk, egy percig vártunk, majd egy percig centrifugáltuk. Az átfolyt folyadékot visszapipettáztuk az oszlopra, és megint egy percig centrifugáltuk.

Izolált fragment emésztés

Az izolált fragmenteket a következőképpen emésztettük EcoRI és BamHI restriktációs enzimekkel: 4 µl steril deszt. víz, 4 µl 10x BamHI puffer, 30 µl izolált fragment, 1-1µl restriktációs enzim. Ezt egy-egy Eppendorf-csőbe mértük össze, majd a mintákat 1 órára 37 °C-os termosztátba helyeztük.

pSK plazmid emésztése

A plazmidot a következőképpen emésztettük szintén EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel: 15 µl steril deszt. víz, 3 µl 10x BamHI puffer, 10 µl pSK plazmid, 1-1 µl restrikciós enzim. Az összemért emésztés 1 órára 37 °C-s termosztátba helyeztük.

pSK plazmid agaróz gélen futtatása és gélből tisztítása

Az emésztett pSK vektort a fentebb leírt módon 1%-os agaróz gélen megfuttattuk, majd a Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kittel tisztítottuk a gélből az emésztett vektort.

Ligálás

Az *FLL1* és *FLL3* fragmentumokat külön-külön egy-egy Eppendorf csőben pSK vektorral ligáltuk: 13 µl inszert, 2 µl pSK vektor, 2 µl ligáz puffer, 5mM riboATP, 1 µl T4 ligáz összetételű elegyben. Az összemért ligálásokat 22 °C-on inkubáltuk 1-1.5 órán át.

LB tápoldat, táptalaj készítése

1000 ml tápoldathoz: 10 g triptont, 5 g élesztő kivonatot és 10 g NaCl-ot mértünk ki. Ezeket 1000 ml desztillált vízben feloldottuk, majd kuktában sterilizáltuk üvegekben.

Táptalaj készítése esetén kuktázás előtt még 1,5g agar/100ml hozzámerése szükséges. A sterilizált LB oldathoz, miután lehűlt, még a szükséges antibiotikum törzsoldatból adtunk hozzá steril fülke alatt. A pSK plazmid és a pGADT7 élesztő vektor esetén ampicillines (100 µg/ml) táptalaj, a pGBKT7 esetén kanamicines (50 µg/ml) LB táptalaj szükséges. Majd az agart és antibiotikumot tartalmazó tápoldatokat steril fülke alatt Petri-csészékbe öntöttük.

Transzformálás

A 20 µl végtérfogatú ligálásokat egy-egy kompetens sejteket (100 µl) tartalmazó Eppendorf-csőbe mértük jégen, és harminc percet vártunk. Ezután a csöveket 2 percre 42 °C-os termosztátba raktuk, majd visszaraktuk őket a jégre. Hozzáértünk 1 ml LB tápoldatot és 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk forgatással. Ezután 4000rpm-en centrifugáltuk a mintákat egy percre, majd a felülúszót leöntöttük, és a maradék folyadékban felfuszpendáltuk a sejteket. A pSK plazmiddal transzformált sejteket fogadó lemezekre 40 µl Xgal-t és 40 µl IPTG-t szélesztettünk sterilfülke alatt. Ezután a felfuszpendált sejteket is szélesztettük ezekre a lemezekre. A lemezeket 37 °C-on inkubáltuk másnap reggelig.

Leoltás

Minden lemezről egyedi telepeket oltottunk le steril kémcsövekbe. Ehhez minden kémcsőbe 5-5 ml LB tápoldatot mértünk, illetve 5-5 µl antibiotikum törzsoldatot. Sterilfülke alatt a lemezekről steril fogpiszkálóval egy-egy telepet megszűrtünk, majd a fogpiszkálót a kémcsőbe ejtettük. A kémcsöveket forgókerékbe rakva 37 °C-on inkubáltuk másnap reggelig.

Miniprep készítés

A kémcsövekből egy-egy Eppendorf-csőbe öntöttük a baktérium szuszpenziót, majd maximum fordulatszámon 2 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, és újra megtöltöttük az Eppendorf-csőveket a kémcsövekben lévő folyadékkal, centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük. Az Eppendorf-csővekbe 100 µl I. oldatot mértünk, és ebben felszuszpendáltuk a sejteket. Majd ehhez 200 µl II. oldatot mértünk, és jégen 5 percig inkubáltuk a mintákat. Ezután 150 µl III. oldatot mértünk hozzá, és jégen 15 percig inkubáltuk. 5 percig maximum fordulaton centrifugáltuk a csöveket, ezután új Eppendorf-csővekbe átpipettáztunk 400 µl tiszta folyadékot, vigyázva, hogy a cső aljára leült törmelék ne szívjuk fel. 500 µl 2-propanolt mértünk a tiszta folyadékot tartalmazó Eppendorf-csővekbe, és szobahőn 30 percig inkubáltuk. Ezután maximum fordulaton 5 percig centrifugáltuk, és a felülúszót leöntöttük. 500 µl 70%-os etanolt mértünk a mintákra és 5 percig rajta hagytuk, majd leöntöttük. Ezután megvártuk, amíg teljesen megszáradnak a minták, majd 40 µl steril desztillált vizet mértünk rá.

I. oldat

1% (w/v) glükóz
10 mM EDTA
50 mM Tris-HCl, pH 7.5

II. oldat (frissen készítendő)

1% SDS
0.2 M NaOH

III. oldat

3M Kálium-acetát (KOAc),
pH 5.2

Teszt emésztés

Az *FLL1*-es mintákat HindIII restrikciós enzimmal emésztettük, így egy 730 bp-os és egy 3275 bp-os fragmentet vártunk. Az *FLL3*-as mintákat PstI és HindIII restrikciós enzimekkel hasítottuk: 550 bp-os és 3320 bp-os fragmenteket vártunk.

FLL1 emésztési elegy (20 µl): 13 µl steril desztillált víz, 2 µl HindIII puffer, 4 µl DNS, 0,5 µl RNáz, 0,5 µl HindIII

FLL3 emésztési elegy (20 µl): 12,5 µl steril desztillált víz, 2 µl HindIII puffer, 4 µl DNS, 0,5 µl RNáz, 0,5 µl HindIII, 0,5 µl PstI

37 °C-on 1 óráig inkubáltuk, majd a fentebb leírt módon agaróz gélen megfuttattuk.

Miniprep DNS tisztítása szekvenáláshoz

Az elkészített miniprepeket RNáz kezeltük, majd a Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit segítségével megtisztítottuk.

Összemért elegy: 8 µl steril desztillált víz, 5 µl Tango (Y) puffer, 36 µl DNS, 1 µl RNáz, majd 37 °C-on 1 óráig inkubáltuk.

Visszatranszformálás

Az FLL1 pSK, FLL3 pSK, valamint a pGADT7 és pGBKT7 élesztő vektort tartalmazó miniprepekből 1-1 µl-t egy-egy kompetens sejteket tartalmazó Eppendorf-csőbe mértünk jégen, és harminc percet vártunk. Ezután a csöveket 2 percig 42 °C-os termosztátba raktuk, majd visszaraktuk őket a jégre. Hozzáértünk 1 ml LB tápoldatot, és 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk forgatással. Sterilfülke alatt 200 µl szélesztettünk LB+ampicillin lemezekre, illetve a pGBKT7 vektor esetén LB+kanamicin lemezekre. A lemezeket 37 °C-on inkubáltuk éjszakán át. Majd a fentebb leírt módon 4-4 telepet leoltottunk minden lemezről, 12-16 óráig inkubáltuk őket, majd ugyanúgy miniprepeket készítettünk (összesen 16-ot) belőlük, és a 4-4 azonos tartalmúakat összeöntöttük.

Emésztés élesztő vektorba illesztéshez

Mindegyik miniprepből kivett mintát külön-külön megemésztettük EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel.

Összemért elegy (mintánként 50 µl végtérfogat): 16 µl steril desztillált víz, 5 µl 10x BamHI puffer, 25 µl DNS, 1 µl RNáz, 1,5 µl BamHI enzim, 1,5 µl EcoRI enzim

37 °C-on 1 óráig inkubáltuk.

Az élesztő vektorokban készült klónok tesztelés

FLL1-et tartalmazó élesztő vektorokat HindIII restrikciós enzimmal emésztettük. Várt fragmentek:

pGADT7: vektorba ligálás esetén 1229 bp, 539 bp, 7187 bp

pGBKT7 vektorba ligálás esetén: 1498 bp, 1280 bp, 574 bp, 4937 bp

FLL3-at tartalmazó élesztő vektorok esetén EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztettünk.

Várt fragmentek: 2985 bp és 852 bp

+kontroll emésztés pSK plazmid ligátumokkal

Élesztő sejtekbe való transzformálás, fehérje-fehérje kölcsönhatások meghatározása

A transzformáláshoz előbb kompetensé tettük az élesztő sejteket steril körülmények között. Ehhez 3-4 napig, 30 °C-on növesztett élesztő sejteket használtunk, amelyből aztán leoltottunk egy telepet 5 ml YPD-be (30 °C-on, 250 rpm). Majd a kultúrát 50 ml 30 °C-os YPD-be öntöttük át, 30 °C-on rázattuk 5-6 órát, majd steril Falcon csőbe átöntöttük. 4000 rpm-n 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntöttük. 40 ml steril desztillált vizet öntöttünk rá, és átmostuk vele a sejteket. Újabb centrifugálás után leöntöttük a felülúszót. 40 ml 1xTE/LiAC oldatot mértünk a csőbe, összeforgattuk a sejtekkel, majd centrifugálás után eltávolítottuk a felülúszót. Ezután a sejteket 1,5 ml 1xTE/LiAC oldatban felvettük, és 30 °C-os vízfürdőbe helyeztük 15 percig, majd 15 µl ssDNS-t (heringsperma) adtunk hozzá, és vortexeltük.

A fenti módon előkészített kompetens élesztő sejtekből 50 µl-t, a vizsgálni kívánt DNS-ből 7.5 µg mennyiségeket összemértünk, és vortexeltük. A mintákat 30 percig 30 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd onnan 20 percig 42 °C-os vízfürdőbe tettük át. Ezután a mintákat 1 percig maximum fordulaton centrifugáltuk, majd a felülúszót alaposan eltávolítottuk. A sejteket 200 µl steril desztillált vízben felvettük, és szelekciós lemezre szélesztettük, és 3-5 napig növesztettük őket. A kinőtt, vagyis mindkét plazmidot hordozó telepek közül transzformálásunként 3-3 telep sejtjeit 50 µl steril vízben szuszpendáltuk, majd szelekciós lemezre cseppentettük. A foltokat 30 °C-on növesztettük 1 napig, majd 20 µl 2.5 mM luciferin oldatot pipettáztunk a felszínükre. A luciferáz enzimreakció által létrehozott fényt egy Hamamatsu Orca II mélyhűtött CCD kamerával detektáltuk, majd a Hokawo szoftver segítségével kvantitáltuk.

Magok sterilizése

A magokat sterilizálás után MS3 szilárd táptalajokon csíráztattuk.

1000 ml tápoldathoz: 30 g szacharóz, 4,3 g MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture), 8 g agar és 1000 ml desztillált víz szükséges. A kimért szacharózt és MS-t feloldottuk a desztillált vízben, majd KOH segítségével beállítottuk a pH-t 5,6-6,0 közötti értékre. Ezután hozzáadtuk az agart is az oldathoz, majd kuktában főzéssel sterilizáltuk a tápoldatot. Miután lehűlt, steril fülke alatt lemezekre öntöttük szét, és hagytuk megszilárdulni.

A magokat Eppendorf csövekbe helyeztük, és steril fülke alatt 1 ml 30%-os Domestos oldatot mértünk rájuk, és 8 percig rajtuk hagytuk. Egy rövid centrifugálást követően pipetta segítségével eltávolítottuk a magokról a folyadékot, és 1 ml steril desztillált vizet mértünk a csövekbe. Egy újabb rövid centrifugálás után pipettával leszívtuk a vizet a magokról, és újabb 1 ml desztillált vizet mértünk rájuk. Ezt összesen ötször ismételtük meg, az ötödik centrifugálás

után, rajta hagytuk a magokon a vizet. Pipetta segítségével áthelyeztük a magokat a csőből az MS3 lemezekre, és celofánnal kétszer körbe tekertük a lemezek szélét. 3 napig hűtőbe helyeztük ezeket, majd két hétig fénykamrában csíráztak a növények.

Keresztezés

Az anyának szánt virágok szíromleveleit és az éretlen porzókat csipesz segítségével eltávolítjuk, sztereomikroszkóp alatt rögzítve. Csipesszel érett porzókat vagy portokokat veszünk ki az apának szánt virágokból, és azokat a lecsupaszított bibékhez érintjük, hogy a pollen rákerüljön. Majd ellenőrizzük, hogy megfelelő mennyiségű pollen került a bibére. Ezek után a hajtást, amelyen a keresztezett virág található, támasztékhoz kötjük, és a szokványos körülmények között neveljük tovább. A sikeres keresztezést a bibe növekedéséből, illetve majd a termő éréséből lehet látni. Az F1 magokat az érett becőből szedjük ki.

Eredmények

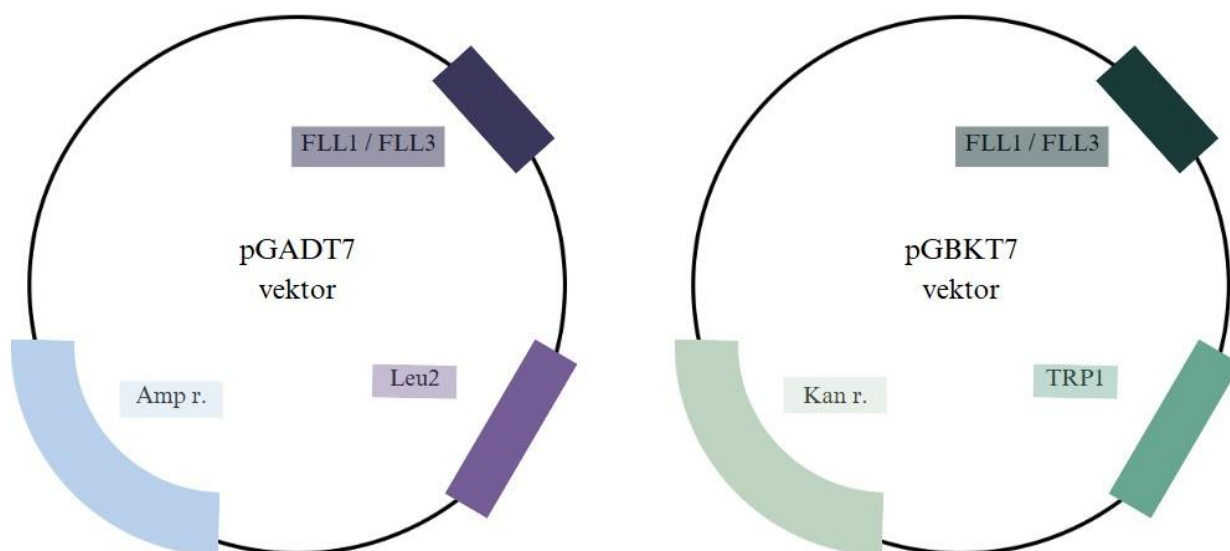
Az *FLL1* és *FLL3* élesztő vektorokba klónozása

Az *FLL1* és *FLL3* géneket egy méret szelektált *Arabidopsis thaliana* cDNS könyvtárból nyertük ki preparatív PCR által. A könyvtárhoz az RNS-eket 4 napos növényekből vonták ki. PCR reakcióhoz megfelelő primereket terveztünk, hogy csak az *FLL1*, illetve az *FLL3* sokszorozódjon fel. A primerek végét úgy terveztük, hogy azok lehetővé tegyék majd az élesztős vektorokba való klónozást. A PCR reakció után a mintákat gélelektroforézissel elválasztottuk, és kivágtuk. Ezután a mintákat izoláló kit segítségével megtisztítottuk a gélből. Az *FLL1* és az *FLL3* gént is EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztettük, és újra megtisztítottuk a DNS-t. A felszaporított pBLUESCRIPT SK vektort (pSK), amibe a két gént (külön-külön) terveztük klónozni, szintén emésztettük ezzel a két enzimmel, és megtisztítottuk.

Az *FLL1* és *FLL3* géneket egy-egy pSK vektorba ligáltuk, majd a ligátumokat *Escherichia coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. A kinőtt telepeket kék-fehér színszelekció segítségével különítettük el egymástól, és a fehér telepek közül oltottunk le LB tápoldatra. A felszaporított sejtekből miniprepeket készítettünk. A ligálás sikerességének ellenőrzése érdekében tesztelésztést hajtottunk végre a mintákon, agaróz gélen megfuttattuk, és kiválasztottuk a megfelelő mintákat. Ezek után szekvenálással is ellenőriztük a kiválasztott klónokat. Hibát nem detektáltunk egyik esetben sem.

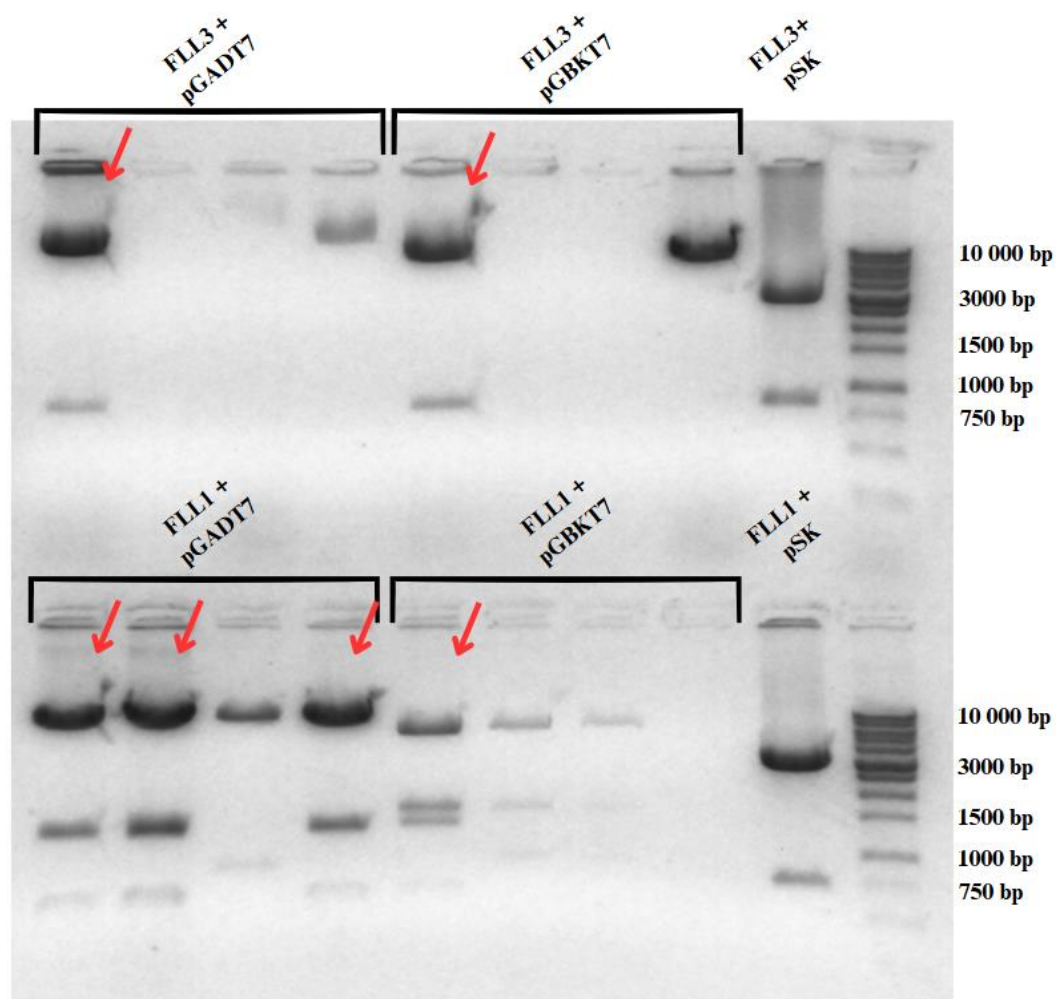
A kiválasztott hibátlan klónokat visszatranszformálás után felszaporítottuk, és restrikciós enzimekkel kivágtuk belőlük a géneket. Az *FLL1* és *FLL3* géneket élesztő vektorokba ligáltuk: pGADT7 és pGBKT7 vektorokba mindkét génből egyet-egyet, tehát összesen négyféle konstrukciót állítottunk elő.

A pGADT7 vektorban található egy ampicillin rezisztenciát kódoló szakasz, ami *E. coli* baktériumok esetén szelekciós lehetőséget biztosít. Ampicillin tartalmú táptalajon, csak a vektort tartalmazó baktériumok tudnak szaporodni. Élesztőbe való bejuttatás után a *Leu2* rész hasonló feladatot lát. A *Leu2* az izopropil-malát dehidrogenáz enzimet kódolja, ami elengedhetetlen a sejteknek ahhoz, hogy leucint tudjanak előállítani. A pGBKT7 vektorban is vannak olyan szakaszok, amelyek biztosítják, hogy csak a vektort tartalmazó telepek tudjanak felnőni. *Escherichia coli* esetén a kanamicin rezisztenciát kódoló részt lehet kihasználni, míg élesztő használatakor a *TRP1* szakaszt. Ez a triptofán előállításához szükséges egyik enzimet kódolja. (6. ábra)



5. **ábra** A pGADT7 és a pGBKT7 vektorok sematikus felépítése

A ligátumokat *Escherichia coli* sejtekbe transzformáltuk, majd a kinőtt telepekből leoltottunk, felnövesztettük őket, és miniprepeket készítettünk belőlük. A ligálás sikerességét itt is tesztelésztéssel ellenőriztük. Mind a négyféle kombinációban volt korrekt klón (7. **ábra**).



7. **ábra** Az FLL1 és FLL3 gének élesztő vektorokba való ligálása után tesztelésztéssel ellenőriztük a ligálás sikerességét. A mintákat agaróz gélen futtattuk, és az eredményről felvételt készítettünk. A piros nyilak a korrektklónokat jelzik.

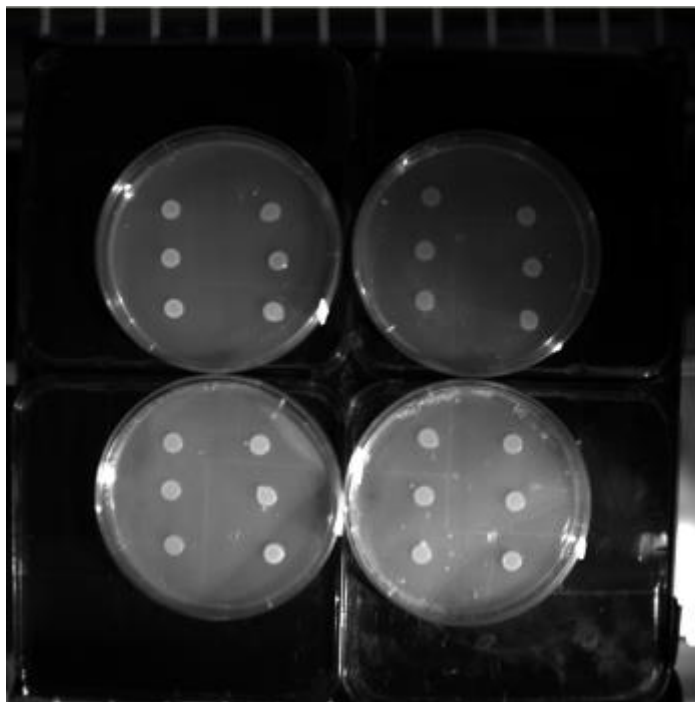
Fehérje kölcsönhatások vizsgálata

Élesztő két-hibrid rendszer segítségével szeretnénk volna megvizsgálni az FLL1 és FLL3 fehérjék kölcsönhatását a TOC1 órafehérjével. Valamint ismét igazolni szeretnénk volna az FLL2 kölcsönhatását a TOC1 fehérjével. Ezt olyan élesztő törzs segítségével tettük meg, amely egy luciferáz kódoló gént hordoz mint riporter gén. Így luciferin hozzáadása után a fehérjék kölcsönhatását lumineszcens jelként lehet észlelni, amelynek intenzitása arányos a kölcsönhatás erősségével. Ehhez az előállított élesztő vektor konstrukciókat, valamint kontrollként üres vektorokat is különböző kombinációkban kompetenssé tett élesztő sejtekbe transzformáltunk.

Nyolc féle kombinációt vizsgáltunk:

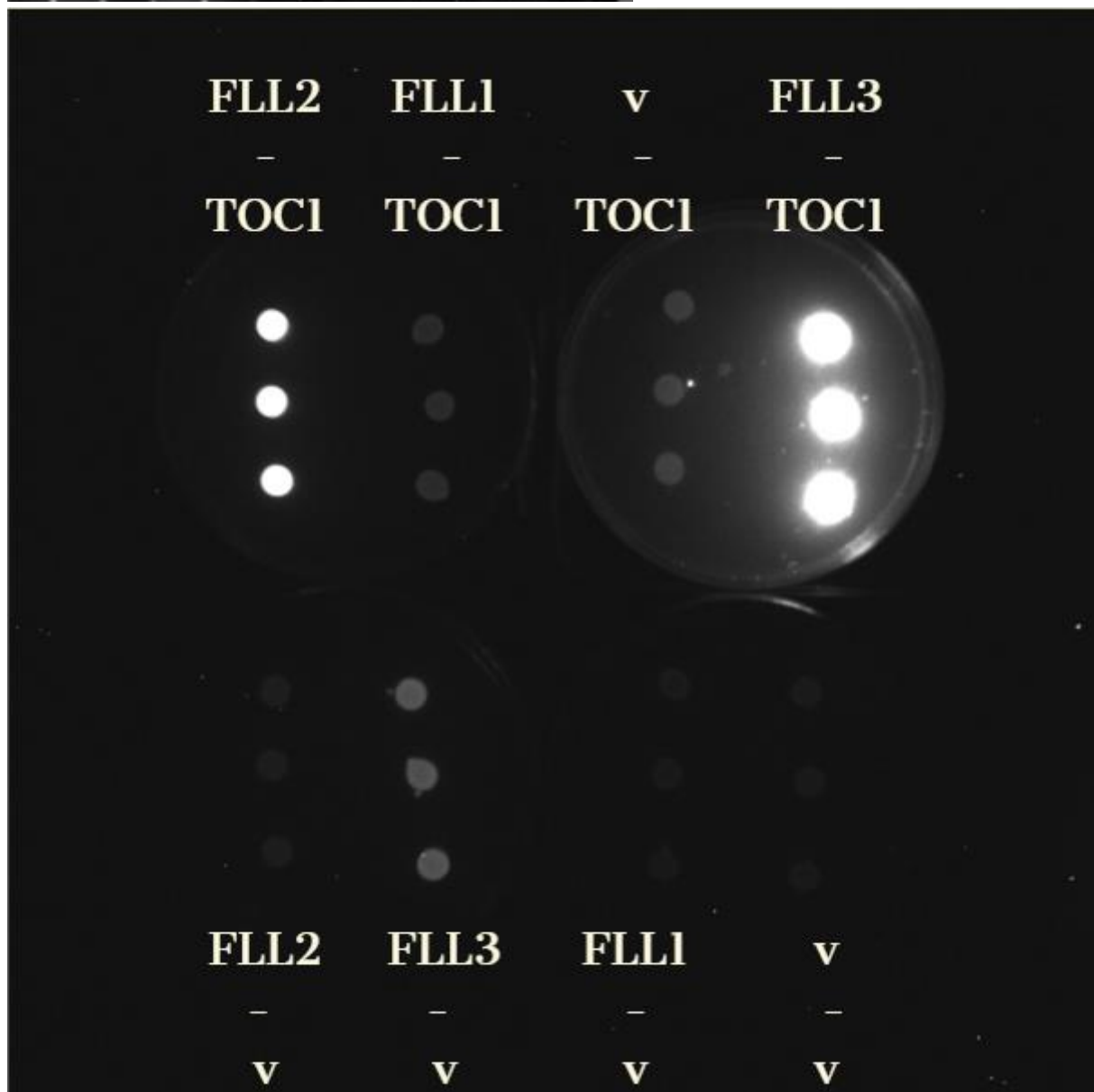
- FLL1-pGBKT7 + TOC1-pGADT7
- FLL2-pGBKT7 + TOC1-pGADT7
- FLL3-pGBKT7 + TOC1-pGADT7
- pGBKT7 + TOC1-pGADT7
- FLL1-pGBKT7 + pGADT7
- FLL2-pGBKT7 + pGADT7
- FLL3-pGBKT7 + pGADT7
- pGBKT7 + pGADT7

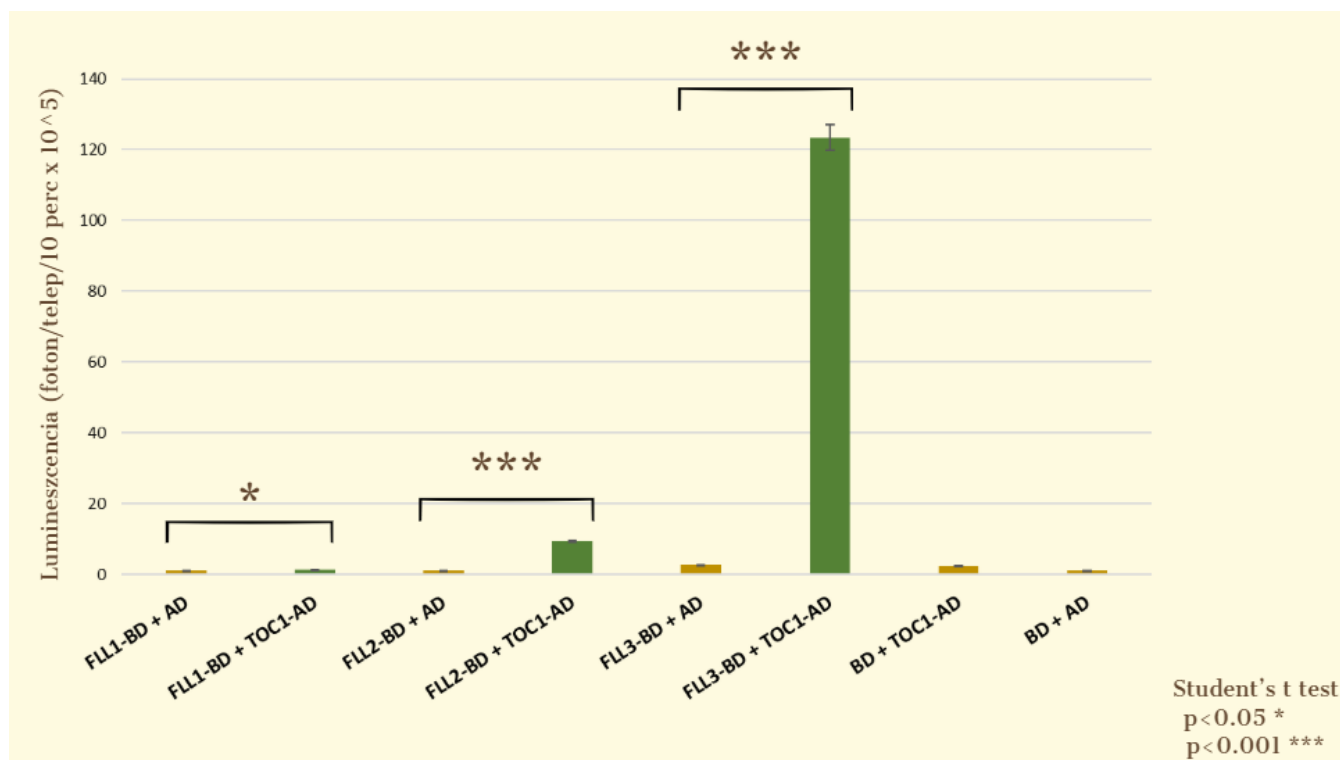
A felnövesztett élesztő sejtekből szuszpenziót készítettünk, és azokból 3x10 µl-t táptalajra cseppentettünk, és 2 napig növesztettük. Majd luciferin hozzáadása után nagy érzékenyséű digitális kamera segítségével felvételt készítettünk a megvilágított lemezekről. Az egy Petri-csészén lévő három „telep” ugyanabból a szuszpenzióból való (**8. ábra**). Ezután sötét körülmények között, 10 perces expozícióval készítettünk felvételt az eredményről (**9. ábra**). A következőket tapasztaltuk: még egyszer megerősítést nyert az az eredmény, hogy az FLL2 és a TOC1 kölcsönhat egymással; ehhez viszonyítva az FLL1 és a TOC1 kölcsönhatása, habár szignifikáns eredménynek mondható, gyengébb. Ellenben az FLL3 és a TOC1 fehérjét is kifejező élesztő esetén a lumineszcencia erőssége jóval nagyobb volt az FLL2-TOC1 mintájához képest. A negatív kontrollok, azaz az üres vektorokat tartalmazó élesztők esetén elhanyagolható erősséű jelet tapasztaltunk. Egyedül az FLL3-üres pGADT7 vektor kombináció esetén volt jelentősebb eltérés a többitől, ami az FLL3 transzaktiváló hatására utalhat.



8. ábra (balra) A vizsgált élesztő „telepek” normál megvilágításban.

9. ábra (lent) Felvétel a vizsgált fehérjéket kifejező, illetve üres vektorokat (v) tartalmazó élesztőkről, különböző kombinációkban.





10. ábra A 9. ábrán látható felvételen érzékelhető lumineszcencia számszerűsítése, és grafikonon való ábrázolása. Barna színnel az üres vektort tartalmazó minták (kontroll), zölddel a két fehérjét kifejező minták lettek ábrázolva. Itt is jól látható, hogy az FLL3-TOC1 kölcsönhatás esetén mennyivel nagyobb volt a lumineszcencia, tehát a kölcsönhatás erőssége.

BD – pGBKT7 vektor, AD – pGADT7 vektor

Keresztezett nullmutáns növények létrehozása

A mutáns növények keresztezéséhez a magokat sterilizáltuk, és táptalajon neveltük két hétig. A mutáns magok mellett *CCA1:LUC* gént tartalmazó vad típusú növényeket is csíráztattunk. Ezekben a növényekben a *CCA1* gén – ami a cirkadián óra egy fontos eleme – promóteréhez egy luciferáz enzimet kódoló részt fuzionáltak. Ezáltal az óra működése a lumineszcencia intenzitás ritmikus változásainak mérésével nyomon követhető. A mutáns növényeket ezekkel a *CCA1:LUC* riportergént kifejező vad típusú növényekkel keresztezzük. Két hét után akicsírázott növényeket (4-6 leveles állapot) földbe kiültettük. A kinőtt mutáns növények nem mutatnak látható morfológiai fenotípust (**11. ábra**).



Vad típus
(*CCA1:LUC*
riportergénnel)

fll1-1
nullmutáns

fll1-2
nullmutáns

11. ábra Mutáns növényekről készült kép 4-6 leveles állapotban. Nem mutatnak látható fenotípust.

Diszkusszió

A kísérlet kezdeti lépéseit sikerült probléma mentesen véghez vinnünk. Mind az *FLL1*, mind az *FLL3* gént eredményesen pGADT7 és pGBKT7 élesztő vektorokba klónoztuk, így azokat következő lépésként élesztő sejtekbe transzformáltuk, és megvizsgáltuk a TOC1 fehérjével való kölcsönhatásukat.

Az eredmények alapján elmondható, hogy mind a három vizsgált fehérje (FLL1, FLL2, FLL3) kölcsönhat a TOC1 fehérjével, de különböző erősségű a kölcsönhatás. Az FLL1-TOC1 kölcsönhatás bizonyult a leggyengébbnek, míg az FLL3-TOC1 vizsgálatokor a másik kettő fehérjéhez képest jóval erősebb kölcsönhatás volt tapasztalható. Így valószínűsíthető, hogy a három vizsgált FLX-LIKE fehérje közül az FLL3-nak van a legnagyobb szerepe a TOC1 órafehérjére való hatásban, ami feltételezhetőleg a sejtmagi testek kialakítása.

A fehérje kölcsönhatásokra kapott pozitív eredmények alapján érdemes lehet tovább vizsgálni az FLX-LIKE fehérjék és a TOC1 órafehérjére kapcsolatát, és ennek a cirkadián órára való hatását.

A cirkadián jelzőgén (CCA1:LUC) nullmutáns *fll* növényekbe juttatása időigényes feladat, de a keresztezés már folyamatban van. A létrehozott vonalak egyszerű, automatizált lumineszcencia-mérése majd egyértelmű választ ad arra, hogy az FLL fehérjék szerepet játszanak-e az óra szabályozásában.

Arra vonatkozólag, hogy a sejtmagi testek formálódása feltétele lenne a TOC1 fehérje megfelelő működésének, nincs semmilyen információ a szakirodalomban. A jövőben remélhetőleg erre a kérdésre is tudunk majd válaszolni.

Bizonyos sejtmagi testekről ismert, hogy kialakulásuk elengedhetetlen feltétele egyes folyamatok normális működésének. Laborunk a fitokróm B fotoreceptor működését is vizsgálja. Ez a fehérje vörös fény elnyelésének hatására a sejtmagba vándorol, ahol számos transzkripciós faktorral hat kölcsön, ezzel szabályozva több ezer gén működését. Olyan mutáns növények esetén, ahol a sejtmagi testek nem tudnak kialakulni, a fitokróm B génszabályozó funkciója is erősen sérült. Tehát ebben az esetben a sejtmagi testek kialakulása feltétele a fitokróm B megfelelő működésének (Chen *et al.*, 2003).

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Kozma-Bognár Lászlónak a lehetőséget, hogy bekapcsolódhattam a labor munkájába. Illetve szeretném megköszönni a sok segítséget, amit a TDK pályamunkám megírásához kaptam.

Valamint szeretném megköszönni Balogné Dosztig Monikának, hogy megtanította nekem a munkafolyamatokat, és a sok hasznos tanácsot és segítséget, amit kaptam tőle.

Irodalom

Alberti, S., Gladfelter, A., and Mittag, T. (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* 176:419–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035>.

Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18:285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>.

Bergeron-Sandoval, L.P., Safaei, N., and Michnick, S.W. (2016). Mechanisms and consequences of macromolecular phase separation. *Cell* 165: 1067–1079

Brangwynne, C., Tompa, P., and Pappu, R. (2015). Polymer physics of intracellular phase transitions. *Nat. Phys.* 11:899–904. <https://doi.org/10.1038/nphys3532>.

Brangwynne, C.P., Eckmann, C.R., Courson, D.S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F., and Hyman, A.A. (2009). Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science* 324: 1729–1732

Braun et al., Arabidopsis Interactome Mapping Consortium. Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science*. 2011 Jul 29;333(6042):601-7. doi: 10.1126/science.1203877. PMID: 21798944; PMCID: PMC3170756.

Carol R. Andersson, Chris A. Helliwell, David J. Bagnall, Trijntje P. Hughes, E. Jean Finnegan, W. James Peacock, Elizabeth S. Dennis, The *FLX* Gene of *Arabidopsis* is Required for *FRI*-Dependent Activation of *FLC* Expression, *Plant and Cell Physiology*, Volume 49, Issue 2, February 2008, Pages 191–200, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm176>

Chen, D., Lyu, M., Kou, X., Li, J., Yang, Z., Gao, L., Li, Y., Fan, L.M., Shi, H., and Zhong, S. (2022). Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome B. *Mol. Cell* 82:3015– 3029.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.026>

M. Chen, R. Schwab, J. Chory, Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (24) 14493-14498, <https://doi.org/10.1073/pnas.1935989100> (2003).

Csordás, G., Weaver, D., and Hajnóczky, G. (2018). Endoplasmic reticulum-mitochondrial contactology: Structure and signaling functions. *Trends Cell Biol.* 28: 523–540.

Edgar, R., Green, E., Zhao, Y. et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485, 459–464 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11088>

Endo, M.; Shimizu, H.; Nohales, M.A.; Araki, T.; Kay, S.A. Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature* 2014, 515, 419–422

Fang, X., Wang, L., Ishikawa, R., Li, Y., Fiedler, M., Liu, F., Calder, G., Rowan, B., Weigel, D., Li, P., and Dean, C. (2019). *Arabidopsis* FLL2 promotes liquid-liquid phase separation of polyadenylation complexes. *Nature* 569:265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1165-8>

- Frey, T.G., and Mannella, C.A.** (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25: 319–324.
- Field, S., Jang, G.J., Dean, C., Strader, L.C., and Rhee, S.Y.** (2023). Plants use molecular mechanisms mediated by biomolecular condensates to integrate environmental cues with development. *Plant Cell* koad062. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad062>.
- Hallick, R.B.** (1992). Chloroplasts. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2: 926–930.
- Hotta CT** (2022) *Genetics and Molecular Biology*, 45, 3(suppl 1), e20220137 <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2022-0137>
- Hyman, A.A., Weber, C.A., and Julicher, F.** € (2014). Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:39–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>.
- Jönsson, Peter et al. (2008)** A Method Improving the Accuracy of Fluorescence Recovery after Photobleaching Analysis *Biophysical Journal*, Volume 95, Issue 11, 5334 – 5348
- Lee, J., Amasino, R.** Two *FLX* family members are non-redundantly required to establish the vernalization requirement in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 4, 2186 (2013). <https://doi.org/10.1038/ncomms3186>
- Lin Y, Protter DSW, Rosen MK, Parker R** (2015) Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. *Mol Cell* 60: 208 – 219
- Liu et al.**, Liquid–liquid phase separation in plants: Advances and perspectives from model species to crops, *Plant Communications* (2023), <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100663>
- Lusk, C.P., and King, M.C.** (2017). The nucleus: Keeping it together by keeping it apart. *Curr. Opin. Cell Biol.* 44: 44–50
- Lyon, A.S., Peeples, W.B., and Rosen, M.K.** (2021). A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22:215–235. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00303-z>
- J. Ronald, S.J. Davis**, Focusing on the nuclear and subnuclear dynamics of light and circadian signalling *Plant Cell Environ.*, 42 (2019), pp. 2871-2884
- Matsushika A, Makino S, Kojima M and Mizuno T** (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudoresponse regulators in *Arabidopsis thaliana*: Insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol* 41:1002-1012.
- Nakamichi N, Kiba T, Henriques R, Mizuno T, Chua N-H and Sakakibara H** (2010) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 22:594-605
- Paloma Más, David Alabadí, Marcelo J. Yanovsky, Tokitaka Oyama, Steve A. Kay**, Dual Role of TOC1 in the Control of Circadian and Photomorphogenic Responses in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, Volume 15, Issue 1, January 2003, Pages 223–236, <https://doi.org/10.1105/tpc.006734>

- Simpson, G. G., Dijkwel, P. P., Quesada, V., Henderson, I. & Dean, C.** FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the Arabidopsis floral transition. *Cell* 113, 777–787 (2003).
- Tiwari SB, Shen Y, Chang H-C, Hou Y, Harris A, Ma SF, McPartland M, Hymus GJ, Adam L, Marion C et al.** (2010) The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytol* 187:57-66.
- Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP and Laurie DA** (2005) The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310:1031-1034.
- Wagner, R.** (1835). Einige Bemerkungen und Fragen über das Keimblaschen (Vesicular Germinativa). *Arch. Anat. Physiol. Wissenschaft Med.* 5: 373–377.
- Wang, L., Fujiwara, S., and Somers, D.E.** (2010). PRR5 regulates phosphorylation, nuclear import and subnuclear localization of TOC1 in the Arabidopsis circadian clock. *EMBO J.* 29: 1903–1915
- Weber, S.C., and Brangwynne, C.P.** (2012). Getting RNA and protein in phase. *Cell* 149:1188–1191. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.022>.
- Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierc J, Samach A and Coupland G** (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of Arabidopsis. *Plant Cell* 18:2971-2984
- Wijnen H, Young MW:** Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annu Rev Genet* 2006, 40:409-448.
- Wu, Z.** et al. Quantitative regulation of FLC via coordinated transcriptional initiation and elongation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, 218–223 (2016).
- Xu X, Yuan L, Yang X, Zhang X, Wang L, Xie Q.** 2022. Circadian clock in plants: linking timing to fitness. *Journal of Integrative Plant Biology* **64**: 792–811.
- Xu, X., Zheng, C., Lu, D., Song, C.-P., and Zhang, L.** (2021). Phase separation in plants: New insights into cellular compartmentalization. *J. Integr. Plant Biol.* 63: 1835-1855.