

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológiai Tanszék

SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT

Növénybiológiai Intézet

36. OTDK Biológia Szekció

**A fitokróm fotoreceptorok foszforilációjának
funkcionális vizsgálata *Arabidopsis*ban**

Madár Valentina

Témavezető: Dr. Viczián András, tudományos főmunkatárs

Belső konzulens: Dr. Pécsváradi Attila, egyetemi docens

Szeged

2023

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
A fény érzékelése.....	3
Fitokrómok az Arabidopsisban.....	4
A fitokrómok molekuláris szerkezete, fényelnyelése.....	4
A fitokrómok hatása a növények egyedfejlődésére	7
A fitokrómok foszforilációja.....	7
Eddigi eredmények.....	10
Célkitűzések	12
PhyB foszforilációja.....	12
PhyA foszforilációja	12
Anyagok és módszerek.....	14
Növényvonalak szelekciója	14
Csíranövények nevelése fehérjeizoláláshoz	14
Növényi össz-fehérjekivonatok készítése	15
Fehérjemennyiség meghatározása amidofekete oldattal	15
Western blot hibridizálás.....	16
A csíranövények hipokotilhosszának, sziklevélméretének megállapítása (fenotipizálás)	17
Lézerpásztázó konfokális mikroszkópia.....	17
Kvantitatív RT-PCR.....	18
Eredmények és értékelésük	19
A phyB foszforilációja	19
Fenotipizálás eltérő hőmérsékleten.....	19
Sziklevélméret meghatározása	20
Növénynevelés vörös fénypulzus kezeléssel.....	21
Sejtmagi komplexekbe rendeződés	22
A phyA foszforilációja.....	24
Transzgénikus növényvonalak szelekciója.....	24
Fenotipizálás távoli vörös megvilágítással.....	25
Fehérjebomlás sebessége.....	28

Intracelluláris lokalizáció.....	30
PHYA-YFP mRNS felhalmozódása távoli vörös fényben és sötétben	31
Összefoglalás	33
Köszönetnyilvánítás	34
Irodalomjegyzék.....	35

Bevezetés

A növények számára a külső környezethez való alkalmazkodás alapvető fontosságú, ugyanis helytűlő életmódot folytatnak. Esetükben az optimálisabb környezeti feltételek elérése aktív helyváltoztatással nem lehetséges, így számukra a legfőbb túlélési stratégiát a környezet változásainak érzékelése, majd az ezekhez történő alkalmazkodás jelenti. Különösen fontos környezeti tényező a fény, mely kulcsfontosságú energiát és információt hordoz. Azon túl, hogy a fotoszintézis által kémiai kötésekben energiaként raktározódik, nagyon fontos környezeti jel, mely komoly hatással van a növények életfolyamataira teljes életciklusuk alatt. Ennek jelentőségére jól látható, amikor összehasonlítunk kettő, egyidős kétszikű csíranövényt, melyek közül az egyik teljes sötétben csírázott és növekedett, a másik pedig fényben. A sötétben nőtt növény, melyet etiolált növénynek is nevezünk, teljesen más testfelépítést mutat, mint a fényben nőtt társa: hipokotilja (szik alatti szára) megnyúlt, halványsárga sziklevelei összezártak és aprók. Etioplasztok találhatók benne, melyek fotoszintézisre képtelenek, mivel nem található bennük klorofill. A sötétben végbemenő egyedfejlődést skotomorfogenezisnek nevezzük. Ezzel szemben a fényben nőtt növény, fotoszintetizál, kloroplasztiszokat tartalmaz, melyek képesek a fényenergia asszimilálására. Zöld sziklevelei nagyok, kinyíltak, hipokotilja rövid és egyenes, ugyanis a fény gátolja a megnyúlását. A fényben történt növekedést, fejlődést fotomorfogenezisnek nevezzük (más szóval de-etioláció). Mint látjuk a fotoszintézis és a fotomorfogenezis egyaránt fényfüggő folyamat, de érdekesség, hogy a növények képesek de-etiolált jegyeket kialakítani, olyan alacsony fényintenzitáson, ahol a fotoszintézis folyamata még nem indult el. Ez rámutat arra, hogy a növények különálló fény által indukált jelátvitel révén aktiválják a fotomorfogenezist, a fotoszintézistől függetlenül.

A fény érzékelése

A környezeti fényviszonyok érzékelésére a növényekben fotoreceptoroknak nevezett fehérjeszenzorok alakultak ki az evolúció során. Ezek a fényérzékeny molekulák a fehérjeláncon túl egy speciális kromofórt is tartalmaznak, melyek képesek eltérő hullámhosszúságú fotonok elnyelésére. Az elnyelt fotonok hatására a receptor aktiválódik és különböző jelátviteli utakat indít el, melyek más és más fiziológiai és morfológiai választ váltanak ki (Sullivan & Deng, 2003). A növények három hullámhossz-tartományban képesek a földfelszínre érő napsugarakat érzékelni. Az UV-B tartományban az UVR8 (UV-B resistance 8), az UV-A és kék tartományban a kriptokrómok és fototropinok, míg a vörös ($\lambda_{\max}=660$ nm) és a távoli vörös ($\lambda_{\max}=730$ nm) fényben a fitokrómok indítanak el és irányítanak különböző

jelátviteli kaszkádokat (Galvão & Fankhauser, 2015; Paik & Huq, 2019; Pham és mtsai., 2018). A vörös fény kiemelt szerepet tölt be a növények életében, ugyanis a kék hullámhossz-tartomány mellett ez hasznosul a leginkább a fotoszintézis során. Míg a vörös fény elnyelődik és energiaként hasznosul, addig a távoli vörös áthatol a leveleken, ezért a vörös-távoli vörös fény aránya fontos információt hordoz a növények számára a környezetükben lévő elérhető fényenergia mennyiségéről és a közvetlen szomszédai jelenlétéről. Ezt az információt a fitokrómok biztosítják a növények számára, melyek a moháktól a kétszikűekig megtalálhatók a növényvilágban (Li és mtsai., 2015).

Fitokrómok az Arabidopsisban

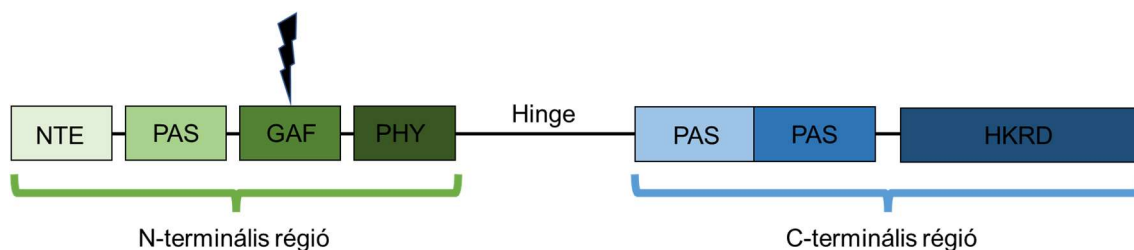
Az általunk vizsgált modellnövényben, az *Arabidopsis thaliana*-ban (lúdfű) összesen öt fitokrómot azonosítottak (Sánchez-Lamas és mtsai., 2016). Ezeket hagyományosan két csoportba soroljuk. Az I. típus, amely csak a fitokróm A-t (phyA) tartalmazza, fényben instabil és kulcsfontosságú szerepet tölt be olyan extrém alacsony fényintenzitásnál, ahol más fotoreceptor inaktív. A kimagasló fényérzékenysége miatt a szkotomorfogenezis-fotomorfogenezis folyamat átkapcsolásában és a csírázás indukciójában vesz részt. A II. típusba tartoznak a fitokróm B, C, D, E receptorok (phyB-phyE) (Nagy és Schäfer, 2002; Sharrock, 2008). Folyamatos vörös fényben ők játszanak domináns szerepet, ugyanis az I-es típusú fitokróm ilyen körülmények között már lebomlik. Befolyásolják a csíranövény fejlődését, növekedését (gátolják a hipokotilmegnyúlást, serkentik a sziklevelek növekedését). A fitokrómok által irányított fotomorfogenikus válaszok megfigyelhetők a felnőtt növényekben is: árnyékkerülés, a cirkadián óra szabályozása, a gázcserenyílás-és kloroplasztisz-mozgások, a virágzás kiváltása (Franklin & Quail, 2010).

A fitokrómok molekuláris szerkezete, fényelnyelése

A működőképes fitokrómok dimerként vannak jelen a növényben, mely kettő holoprotein összekapcsolódásával alakul ki. Egy ilyen körülbelül 125 kDa nagyságú holoprotein egy apoproteinből és egy hozzá kapcsolódó lineáris tetrapirrol vázas kromofórból áll, és két nagyobb doménre tagolódik (1. ábra). Az N-terminális domén 70 kDa nagyságú és a fényérzékelésben továbbá a jelátvitelben játszik szerepet, és további al-doménekre tagolódik. Ezek az (1) NTE (N-terminal extension) a molekula flexibilis térszerkezetű N-terminális vége, (2) PAS (Per/Arnt/Sim) domén, ami általában fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításában játszik szerepet, (3) a GAF domén (cyclic guanosine monophosphate (cGMP) phosphodiesterase/adenylyl cyclase/FhlA domain), melyhez utokatalitikusan a kromofór

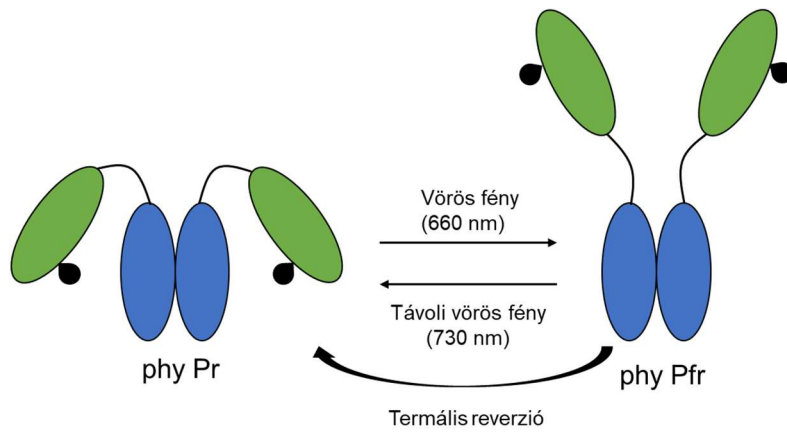
kötődik, és a (4) fitokrómokra jellemző PHY domén. A C-terminális domén 55 kDa-os és a jelátvitel modulációjában játszik szerepet. Három al-doménra bontható, a HKRD (Histidine Kinase Related Domain) bakteriális hisztidin kinázokkal mutat némi homológiát, míg tartalmaz két PAS domént is, melyek a fényfüggő interdomén kölcsönhatásokban és feltehetően más fehérjékkel való kölcsönhatásban játszanak szerepet, továbbá a működéshez esszenciális dimerizációért felelősek (Bae & Choi, 2008; Rockwell és mtsai., 2006). Az N- és C-terminális domént egy csukló (hinge) motívum köti össze, mely kulcsfontosságú szerepet játszik a receptorfehérje térszerkezetének kialakításában és az aktív állapot megtartásában (1. ábra).

A fitokrómok dimerként működnek és két eltérő térszerkezeti formájuk (konformer) ismert, melyek fényelnyelése különböző. Az inaktív, ún. Pr forma a vörösben, 660 nm-es elnyelési maximummal, míg a másik, a biológiailag aktív Pfr forma távoli vörösben, 730 nm-es elnyelési maximummal rendelkezik. Az aktív és inaktív forma fény hatására átalakul egymásba: a Pr forma vörös besugárzásnál Pfr-ré alakul, azaz aktiválódik, míg távoli vörösben az aktív Pfr forma alakul át Pr-ré, azaz inaktiválódik (2. ábra). Mivel a két konformer elnyelési spektruma részben átfed egymással, még erős vörös besugárzásnál sem éri el a Pfr arány a 100%-ot. Az aktív forma aránya legfeljebb az összes fitokróm (P_{tot}) 88%-a lehet. Az adott sugárzási viszonyok között kialakuló Pfr forma/összes fitokróm arány (Pfr/P_{tot}) felel a létrejövő jelátvitelért és élettani válaszokért (Nagy & Schäfer, 2002).



1. ábra: A fitokróm monomer szerkezeti egységei. Az N-terminális domén további al-doménekre osztható: NTE, PAS, GAF és a fitokrómokra jellemző PHY domének. A GAF doménhez kapcsolódik autokatalitikusan a tetrapirrol vázú kromofór (fekete villám jel). A C-terminális domén kettő PAS motívumot és egy hisztidin kinázokkal rokon domént (HKRD) tartalmaz. Bővebb magyarázatot lásd a szövegben (Bae és Choi, 2008 alapján).

Amikor a növény sötétbe kerül (például lenyugszik a Nap) és több fény már nem éri, a Pfr formák keletkezése leáll. A Pfr forma azonban nem csak a távoli vörös besugárzás hatására képes visszaalakulni Pr formává, hanem a spontán bekövetkező, úgynevezett termális reverzió révén is. A jelenség hátterében a Pfr forma konformációja áll, ugyanis ez egy termodinamikailag instabil állapotot jelent (Klose és mtsai., 2020). Így az éjjel folyamán a Pfr mennyiségének lecsökkenésével a fitokrómok irányította jelátvitel leáll. Pr és Pfr formák egymásba alakulásának mechanizmusait a 2. ábra foglalja össze.



2. ábra: A fitokrómok konformációváltozásai. Vörös fény hatására a Pr forma Pfr formává, azaz aktív térszerkezetű fitokrómmá alakul. Távoli vörös fény hatására a Pfr forma visszaalakul Pr formává, azaz inaktiválódik. Mindemellett a Pfr forma spontán, akár sötétben is visszaalakulhat Pr formává, mivel a Pfr forma termodinamikailag instabilabb a Pr formával szemben (Klose és mtsai., 2020 alapján).

A fitokrómok hatása a növények egyedfejlődésére

Hagyományos értelemben véve a jelátvitelben részt vevő faktorok azt támogatják, vagy gátolják, és működésük eredményeképpen alakul ki az adott környezeti és élettani állapotnak megfelelő jelátvitel. A fitokróm fotoreceptorok számos olyan faktorral lépnek kapcsolatba működésük során, melyek a növények életfolyamataiban döntő szereppel bírnak. Gyenge fényben a csírázás kezdetekor (például a talaj alatt) a phyA a jelátvitel legfőbb modulátora. A növényeknek ebben a korai életszakaszában még kevés fény áll rendelkezésre, így sokkal kevesebb aktív, Pfr formájú fitokróm található bennük, azaz a Pfr/Ptot arány alacsony. A phyA esetében ez az alacsony arány is képes beindítani olyan jelátviteli kaszkádokat, melyek a szkotomorfogenezis-fotomorfogenezis átmenetet segítik elő és jelátvitelt biztosítanak. Amikor fénybe kerül a növény (a talajszint felett) úgy a phyA szerepe is háttérbe szorul, ugyanis ez a típusú fitokróm fényben rendkívül bomlékony. A fotomorfogenikus fejlődés legfőbb irányítójává ekkor a phyB válik, amely ekkor az össz-fitokróm mennyiség 80%-át teszi ki. Mivel sokkal több fény áll rendelkezésre, így a Pfr/Ptot arány is megemelkedik így a nagyobb mennyiségű phyB Pfr már egy jelentősen több jelátviteli faktorral tud kölcsönhatást létesíteni, amely lehetővé teszi az aktív jelátvitelét. Mivel a Pr és Pfr állapot elnyelési spektruma mindkét típusú fitokróm esetében átfed, így vizsgálataink során figyelembe kell venni az adott megvilágítás alatt létrejövő Pfr/Ptot arányt. Ez gyenge, illetve távoli vörös fényben kicsi, amely azt eredményezi, hogy csak a phyA jelátvitelére tudunk következtetni az ilyen körülmények között kialakult fenotípusból. Vörös fényben nőtt növény esetén a phyB hatását tudjuk tanulmányozni, ugyanis ekkor a Pfr/Ptot arány magas, illetve a phyA elbomlik és a phyB lesz a domináns fitokróm. Ezért a méréseinkhez használt monokromatikus távoli vörös ($\lambda=727\text{ nm}$) fényben a phyA, míg vörös ($\lambda=664\text{ nm}$) fényben a phyB jelátvitelét tudjuk vizsgálni.

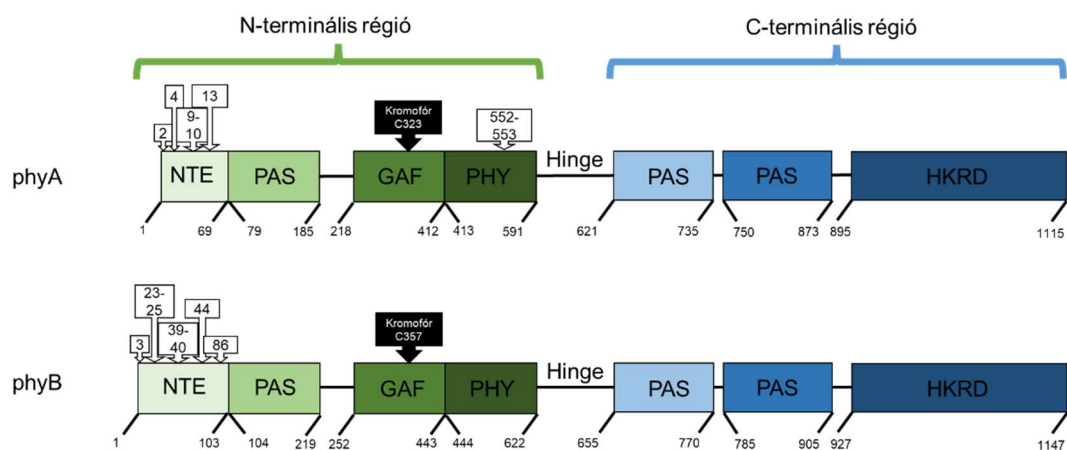
A fitokrómok foszforilációja

Az elmúlt években fény derült arra, hogy a fitokrómok poszttranszlációs módosulásukon mennek keresztül, melyek hatással vannak a jelátvitelre. Ezek egyike a foszforiláció. Tömegspektrométeres mérésekkel kimutatták, hogy a phyB NTE doménjában a 86-os pozíciójú szerin (S86) aminosav foszforilálódik (Medzihradszky és mtsai., 2013). Olyan mutáns phyB molekulákat hoztak létre, melyekben a S86 aminosavat megváltoztatták. Amennyiben ezt a szerint alanin aminosavra cserélték (S-A mutáns), úgy a molekula a nem foszforilált állapotot mutatta, míg amikor aszparaginsav aminosavra (S-D mutáns) cserélték, a molekula a foszforilált állapotot mimikálta (utánozta). A phyB(S86A) változatot kifejező vörös

fényben nőtt növények hipokotilja rövid, míg a phyB(S86D)-t kifejezőké hosszú volt. A phyB(S86A) tehát hiperszenzitív, míg a phyB(S86D) mutáns hiposzenzitív fotomorfogenikus fenotípust mutatott. Kiderítették azt is, hogy a folyamat hátterében a Pfr forma megváltozott instabilitása rejlik. Amennyiben a phyB 86-os pozíciójú szerinje foszforilált állapotban van, a Pfr forma gyorsabban alakul vissza Pr-ré, míg, ha ez a pozíció defoszforilált állapotban van, ez a visszaalakulás sokkal lassabban megy végbe (Medzihradszky és mtsai., 2013). Tehát ha azonos vörös fényintenzitáson neveljük a kétféle csíranövényt, a növényben található fitokrómok össz mennyiségének kisebb százalékát teszi ki a Pfr forma (alacsony Pfr/Ptot arány), amennyiben foszforilált állapotban (mint a phyB(S86D) mutáns esetében) vannak jelen a fitokrómok. Ellenkező esetben, amikor csak defoszforilált fitokróмокat találunk (mint az phyB(S86A) mutáns) ez az arány nagyobb. További vizsgálatok feltárták azt is, hogy a phyB molekula több foszforilálódni képes aminosavat is tartalmaz és az is kiderült, hogy ezek foszforilációs állapota befolyásolja az általuk irányított jelátvitelt (Hajdu és mtsai., 2015; Nito és mtsai., 2013; Viczián és mtsai., 2020).

Azt, hogy a phyA NTE doménje foszforilálódik, régóta ismert tény (Stockhaus és mtsai., 1992). Néhány éve számítógépes elemzéssel azonosítottak nagy valószínűséggel foszforilálódó aminosavakat a phyA csukló régiójában: kettő szerin (S590, S602) mellett egy treonint (T593). Ezeknek a funkcióját defoszforilációt, illetve foszforilációt utánzó mutánsokkal vizsgálták. Az eredményekből kirajzolódott, hogy míg ezek a mutációk egyenként nem okoznak különösebb eltérést a vad típusú phyA-hoz képest, viszont, azok a phyA változatok, melyekben mindhárom aminosavat megváltoztatták, hiposzenzitív fotomorfogenikus fenotípust indukáltak, mind az A, mind a D mutációk esetében (Zhou és mtsai., 2018).

Kutatócsoportunk tömegspektrométeres eljárással azonosított olyan *in planta* foszforilálódó aminosavakat mind a phyA, mind a phyB fotoreceptoron, melyeket eddig nem vizsgáltak (3. ábra). Ezen munka során azt tűztük ki célul, hogy ezeknek a foszforilációra képes aminosavainak jelátvitelre gyakorolt hatását vizsgáljuk meg.



3. ábra: A vizsgált foszforilációs pozíciók. A kísérleteink során az ábrán számmal jelölt foszforilációs helyek vizsgálatával foglalkozunk. A phyA és phyB esetén is az NTE régió érintett legfőképpen, továbbá a phyA esetén a PHY domén kettő aminosavát is vizsgáljuk. A fekete téglalap a kromofór pozícióját jelöli.

Eddigi eredmények

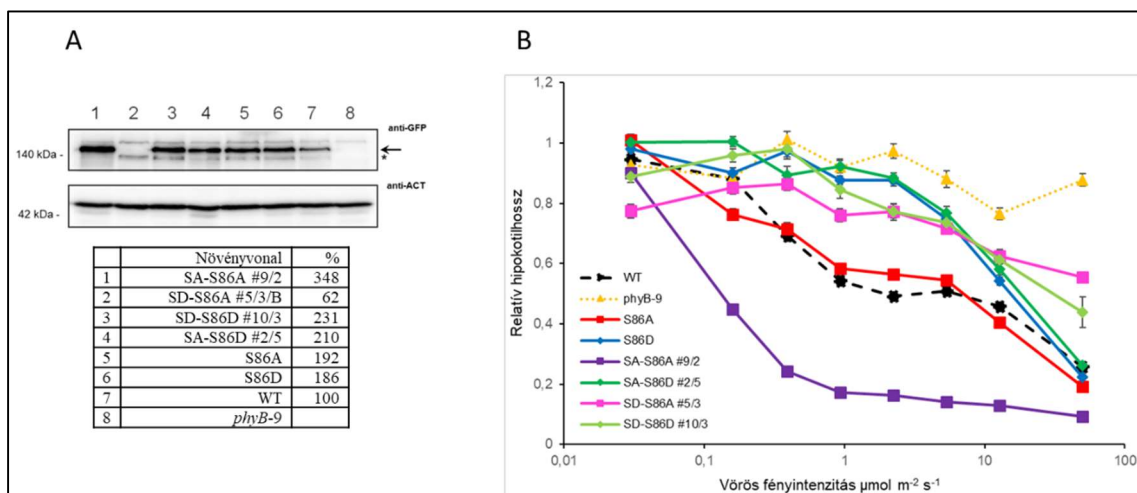
Ez a fejezet összefoglalja azokat az eredményeimet, melyeket a Bsc szakdolgozatomban közöltem és közvetlen előzményét jelentik a mostani munkámnak. Korábban a phyB S86-os szerinje mellett, kutatócsoportunk korábbi tömegspektrométeres mérései azt is kimutatták, hogy az NTE doménben további szerin aminosavak (S3, S23-25, S39-40 és S44) foszforilációja is megtörténik. Korábbi munkánk során ezeknek foszforilációját vizsgáltuk, úgy, hogy ezeket a szerineket (S) alaninra (A) vagy aszparaginsavra (D) cseréltük úgy, hogy a molekula a 86-os szerinjét már A vagy D aminosavra cseréltük (S86A ill. S86D). Így létrejött négy olyan mutáns phyB változat, melyek segítségével felderíthetjük, hogyan befolyásolja az NTE domén vizsgált szerinjeinek a foszforilációja az S86-os mutánsok jelátvitelét (1. táblázat).

Elnevezés	Leírás
SA-S86A	Az S86 mellett, a többi NTE szerin is defoszforilált. (S3/23-25/39/40/44/86A)
SA-S86D	Az S86 foszforilációt utánoz, a többi NTE szerin defoszforilált. (S3/23-25/39/40/44A-S86D)
SD-S86A	Az S86 defoszforilált, a többi NTE szerin foszforilációt utánoz. (S3/23-25/39/40/44D-S86A)
SD-S86D	Az S86 mellett, a többi NTE szerin is foszforilációt utánoz. (S3/23-25/39/40/44/86D)

1. táblázat. A korábbi munkámban vizsgált phyB NTE konstrukciók és leírásaik.

A transzformált transzgén endogén, *pPHYB* promóterből, *YFP*-hez (yellow fluorescent protein) kapcsolt *PHYB* kódoló régióból és egy *NOS* terminátor szakaszból épül fel. Ezeket a transzgéneket fejeztük ki phyB hiányos növényekben. Olyan növényvonalakat válogattunk ki, ahol ezen transzgenváltozatok terméke azonos szinten fejeződik ki, így, ha ezek fenotípus-vizsgálatakor bármi eltérést tapasztalunk az pusztán a megváltoztatott PHYB fehérje miatt lehet. A transzgenikus növényvonalak hipokotilhosszát vizsgáltuk olyan körülmények között (folyamatos vörös megvilágítás), amikor ennek kialakításáért elsősorban a phyB jelátvitel felel. Korábban kiderült, hogy a fitokrómok Pfr formáját az S86 foszforilációja destabilizálja (Medzihradzky és mtsai., 2013), ami a hipokotil megnyúlás gátlását befolyásolja vörös

fényben. Az általunk vizsgált változatok ezt a hatást megerősítették és kirajzolódott, hogy a további mutációk az NTE doménben együttesen felerősíthetik vagy éppen gyengíthetik a már meglévő S86 mutáció hatását (4. ábra)



4. ábra: Vizsgált négy konstrukciót kifejező növényekben a PHYB-YFP mennyisége és fenotípusa. (A) A fenotipizálásra kiválasztott növényvonalak PHYB-YFP tartalma. Közel azonos expressziós-szintű növényvonalakat kiválogatva western blot módszerrel meghatároztuk a kimérafehérjék mennyiségét. A megfelelő háttér értékek kivonása után a PHYB-YFP jelét (fekete nyíl) az aktin jelre normalizáltuk, és a PHYB-YFP vad típus-t (WT) vettük 100%-nak. A csillaggal jelölt sáv valószínűleg a PHYB lebomlási terméke, így a jelek kvantitálása során a két sáv összegével számolunk. **(B) A kiválasztott transzgénikus növények relatív hipokotilhossza vörös fényintenzitás függvényében.** 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYB-YFP változatokat kifejező csíranövényeket különböző intenzitású vörös fényben, majd a mért hipokotilhossz értékeket az adott vonal sötétben mért értékeire normalizáltuk. A hibásávok standard hibát jelölnek ($n \geq 30$).

A méréseinkből kitűnik, hogy amennyiben az NTE domén kiválasztott aminosavai nem tudnak foszforilálódni, úgy sokkal erőteljesebb jelátvitelt tapasztalunk (SA-S86A, lila görbe). Ennél a vonalnál mértük a legerősebb a hipokotilmegnyúlás gátlást, erősebbet, mint az S86A vonalnál. Ebből arra következtetünk, hogy az NTE kiválasztott szerinjeinek a defoszforiláltsága kiegészíti a defoszforilált S86-os kulcspozíciónak a hatását. Ellenkező esetben, ha az S86 foszforilációt utánzó mutációt tartalmaz (S-D), úgy az NTE többi szerin aminosava foszforilációs állapotának megváltoztatása nem okoz jelátviteli eltérést az egyszeres mutánsához (S86D) képest. Mivel az összes S86 mutációt tartalmazó *phyB*-t kifejező növény fotomorfogenezise sérül, megállapítottuk, hogy a foszforilált S86 dominánsan felelős a jelátvitel csillapításáért, és az NTE domén szomszédos szerinjeinek foszforilációja elsősorban kiegészítő élettani szerepű.

Célkitűzések

PhyB foszforilációja

Korábbi méréseink bebizonyították, hogy az NTE többi foszforilációra képes szerin aminosava fontos szerepet tölt be a hipokotilhossz kialakításában az S86 funkcióját részben módosítva. További mérésekkel fel szeretnénk térképezni ezeknek a mutációknak élettani hatásait a már vizsgált növényvonalakkal.

A tervezett kísérletek a következők:

1. Hipokotilhossz mérés eltérő hőmérsékleten. Eddigi vizsgálódásunk 22 °C-on történt. A továbbiakban 17 és 27 °C-on is megvizsgáljuk a növények fényválasztát.
2. PhyB felhalmozódása, sejtmagi komplexképzése. Korábbi kísérletek bebizonyították, hogy a phyB esetén annál erősebb a jelátvitel, minél erősebb a sejtmagi komplexekbe rendeződés. Mikroszkópos mérésekkel ezeknek a csoportosulásoknak a meglétét szeretnénk vizsgálni.
3. Sziklevélméret meghatározása. A hipokotilhossz mérés mellett a sziklevélméret is egy széles körben vizsgált fenotipikus jelleg, mely a phyB jelátvitel erősségét jól mutatja.
4. Hipokotilhossz mérés fénypulzusos kezeléssel. Feltételezésünk szerint a mutáns fitokrómok által kialakított, fenotípusban megnyilvánuló jelátvitel háttérében a phyB Pfr forma stabilitása áll. Ezzel a méréssel a termális reverzió erősségét akarjuk vizsgálni, azaz, hogy rövid, erős megvilágítás után a sötétben milyen gyorsasággal csökken a Pfr/Ptot arány.

PhyA foszforilációja

Kutatócsoportunk korábbi tömegspektrométeres mérései során azonosítottunk foszforilálódó szerin aminosavakat a phyA NTE és PHY doménjében. A kutatásunk célja, hogy S-A és S-D aminosavcserék segítségével előállított mutáns phyA fehérjék segítségével megvizsgáljuk, hogy ezeknek az aminosavaknak a foszforilációja milyen jelátviteli változásokat okoz.

A tervezett kísérletek a következők:

1. Növényvonalak szelekciója. Azonos mennyiségű PHYA-YFP kiméraféhrjét kifejező vonalak kiválogatása.

2. Kiválasztott növényvonalak fenotipizálása: erős és gyenge távoli vörös fényben nőtt csíranövények hipokotilhossz-mérése.
3. PHYA-YFP kimérafehérje fényindukált lebomlásának megfigyelése különböző megvilágítási körülmények között. Mivel a phyA egy fény hatására bomló receptorfehérje, így a jelátvitel hátterében ennek bomlása is fontos körülmény.
4. PHYA-YFP sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata. Korábbi kísérletek megmutatták, hogy a phyA megfelelő lokalizációja szükséges a megfelelő jelátvitelhez. Mikroszkópos kísérlettel a különböző mutáns PHYA-YFP kimérafehérjék lokalizációját szeretnénk nyomon követni.
5. PHYA-YFP mRNS szintjének mérése. A fehérjemennyiség kialakításában a transzkripciónak is fontos szerepe van a fehérjelebomlás mellett. A kísérlettel azt szeretnénk vizsgálni, hogy a fény milyen mértékben befolyásolja a transzkript felhalmozódását.

Anyagok és módszerek

Növényvonalak szelekciója

Az *Arabidopsis thaliana* *phyA-201* és *phyB-9* mutánsát használjuk, melyek rendre endogén, vad típusú *phyA*-t vagy *phyB* nem tartalmaznak (Reed és mtsai., 1993). A munka megkezdése előtt a transzgének bejuttatása ezekbe a mutánsokba megtörtént, és a növényvonalak első, antibiotikum-szelekción átesett utódgenerációjával kezdtük meg a munkát. Először olyan vonalakat kerestünk, melyekben egy genetikai kópiában tartalmazzák a transzgént. Ezt úgy mutattuk ki, hogy ezek a növényvonalak követik a mendeli 3:1 hasadást, azaz szelekciós (higromicin 15 mg/ml) lemezen a csíranövények egynegyede elpusztul. Ezután ezek a higromicin-rezisztens csíranövényeket felneveltük és a tőlük gyűjtött magokat szélesztettük szelekciós lemezekre. Ekkor már olyan növényeket kerestünk, amelynek az összes utódja túlélte szelekciós táptalajon és ezeknek a magjaival, csíranövényeivel végeztük a további kísérleteket.

Táptalaj: MS1 medium

Összetevők 1 literhez:

- 4,32 g MS (Murashige and Skoog medium) por
- 10 g szacharóz
- 10 g bakteriológiai agar
- 5,6-5,8 pH beállítás 1 M-os KOH oldattal

Csíranövények nevelése fehérjeizoláláshoz

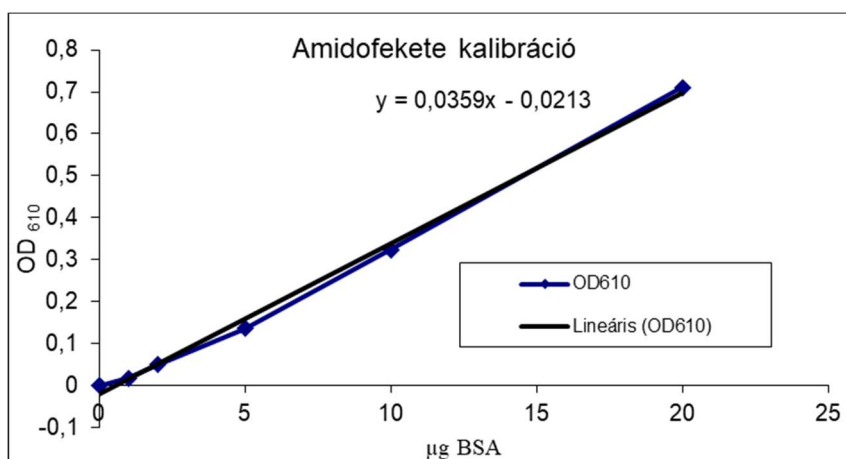
1. A vizsgálni kívánt növényvonalak magjait négy réteg desztillált vízzel átitatott szűrőpapírra vetettük ki.
2. A magokat három napon keresztül 4 °C-on, sötétben tároltuk.
3. 7 órás fénykezelés, 22 °C-on, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson (fehér fény).
4. Négy nap sötétben nevelés 22 °C-on.
5. A csíranövények összegyűjtése zöld (525 nm) biztonsági fényben, 2 ml-es mikrocentrifuga csövekbe, melyek tartalmaztak 1-1 db 5 mm átmérőjű üveggolyót, folyékony nitrogénben fagyasztás, tárolás -80 °C-on.

Növényi össz-fehérjekivonatok készítése

1. A fagyasztott mintákat rázógépből (Retsch M301) rázzuk 2 percig (30 1/s).
2. Minden 100 µg elporított mintához 150 µl 95 °C-os feltárópuffert adunk, majd 2 percig inkubáljuk 95 °C-on [feltárópuffer: 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 M urea, 2% nátrium-laurilszulfát (SDS), 20% glicerin, 100 mM ditiotritol (DTT), 0,2% brómfenolkék]
3. Újabb rázás rázógépből (2 perc, 30 1/s).
4. 15 perc centrifugálás (20000 g) után átszívjuk a felülúszót steril 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe.
5. Tárolás -20 °C-on.

Fehérjemennyiség meghatározása amidofekete oldattal

1. 10 µl fehérjekivonatot 190 µl vízzel elkeverünk, majd hozzáadunk 800 µl csapadékképző oldatot [10% ecetsav, 90% metanol, 0,1% amidofekete festék]
2. 20 percig centrifugáljuk (25 °C, 20000 g).
3. Eltávolítjuk a felülúszót, majd a csapadékot 1 ml mosó pufferrel [10% ecetsav, 90% metanol] centrifugáljuk (25 °C, 10 perc, 20000 g), majd a csapadékot szobahőmérsékleten megszáritjuk.
4. 1 ml 0,2 M NaOH-ban feloldjuk a száraz csapadékot.
5. Fotométerben 610 nm-en mérjük a minták optikai denzitását, melyből következtetünk a koncentrációjukra (3. ábra).



5. ábra: Az amidofekete oldat kalibrálása növényi össz-fehérjetartalom meghatározásához. Ismert töménységű bovine serum albumin (BSA) oldat fehérjetartalmát mértük és a kapott értékeket ábrázoltuk. A mért pontokra illesztett lineáris jelzi, hogy az oldat milyen koncentráció-tartományban használható, illetve az egyenes egyenletével a mért optikai denzitásból (OD₆₁₀) kiszámolható az ismeretlen fehérjeoldat koncentrációja.

Western blot hibridizálás

1. 10%-os akrilamid géleket készítünk (1. táblázat), majd a gélelektroforézishez futtatópufferbe [25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS] helyezzük.

Oldatok	10%-os Elválasztó gél (10 ml)
Víz	4,0 ml
30% Akrilamid mix	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Oldatok	Gyűjtő gél (3 ml)
Víz	2,1 ml
30% Akrilamid mix	0,5 ml
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,38 ml
10% SDS	0,03 ml
10% APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

2. táblázat. A munka során használt denaturáló akrilamid gél összetétele.

30% Akrilamid mix: 30% [w/v] akrilamid-bisz-akrilamid 37.5:1 oldat; APS: ammónium-perszulfát; TEMED: tetrametil-etilendiamin.

2. A gélek minden zsebébe 20-20 µg fehérjekivonatot töltünk és molekulasúly marker (ProSieve Quadcolor, Lonza) mellett futtatjuk őket.
3. A gélelektroforézist a gyűjtő gélben 80 V-on, az elválasztó gélben 120 V-on végezzük (BioRad), míg a brómfenolkék ki nem fut a gélből (kb. 90 perc).
4. A blottolás során az elválasztott fehérjéket polivinilidén-difluorid membránra (Immobilon) vesszük át, hideg (4 °C) transzfer pufferben [25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% etilalkohol, 0,15 % SDS], 2 órán keresztül, 100 V feszültségen.
5. Ezután a membránokat 16 órán keresztül 4 °C -on blokkoltuk 5% zsírszegény tejporral kiegészített mosópufferben [0,05 M Tris-HCl pH:7,4, 0,2 M NaCl, 0,05% Tween] billegtető platformon.
6. Miután lemostuk a tejport (10 perc, mosópuffer), 90 percig hibridizáltuk az elsődleges ellenanyaggal [anti-GFP (Living Colors), 1:2000; vagy anti-aktin (Sigma), 1:10000], mosópufferben. Ezután majd 4×10 percig mostuk a membránokat.
7. Ezután 90 percig hibridizáltuk a másodlagos ellenanyaggal [Goat anti-mouse (Invitrogen), 1:10000] mosópufferben, majd 4×10 percig mostuk a membránokat.

8. Az előhívás során luminol:peroxid 1:1 arányú elegyét alkalmaztuk a gyártó utasításait követve (Millipore). A filterekről CCD kamerával (ORCA-II, Hamamatsu) olyan digitális felvételeket készítettünk, melyek nem tartalmaznak jel-telített pixeleket.
9. A felvételeket Metamorph szoftverben (Molecular Devices) dolgoztuk fel, és végeztük el a fehérjesávok denzitometrálását.

A csíranövények hipokotilhosszának, sziklevélméretének megállapítása (fenotipizálás)

1. A kiválasztott növényvonalakat 9 cm átmérőjű műanyag Petri csészébe helyezett 4 réteg, desztillált vízzel átitatott szűrőpapírra vetettük.
2. 3 napig sötétbe tettük őket, 4 °C-ra, majd 7 órán át 22 °C-on, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson (fehér fény) kezeltük őket.
3. A csíranövények 22 °C-on, 4 napig nőttek az oszlopokba rendezett Petri csészéken úgy, hogy phyA esetén távoli vörös (727 nm), phyB esetén vörös (660 nm) fény besugárzást csak felülről kaptak. Az oszlopba rendezéssel különböző besugárzott fény mennyiségen neveltük a növényeket úgy, hogy az oszlop tetejétől az aljáig a fényintenzitás csökkent. Ugyanezen a hőmérsékleten, fénytől elzárva is neveltünk növényeket (sötét kontroll).
4. A csíranövényeket 1.5% agart tartalmazó lemezekre helyeztük. Egy-egy vonalat egy lemezre raktunk, így össze tudtuk hasonlítani, milyen mértékű a hipokotil megnyúlás, különböző besugárzásnál.
5. A lemezeket lapszkennerral beolvastuk és az ImageJ szoftver (Schneider és mtsai., 2012) segítségével egyenként megmértük minden csíranövény hipokotilhosszát. Az így kapott eredményeket Excelben összesítettük, átlagot és standard hibát számoltunk. Kiszámoltuk fényben nőtt növények a sötét kontrollhoz viszonyított relatív hipokotilhosszát. Ezt úgy értük el, hogy az egy növényvonalnál minden egyes fényintenzitáson kapott hipokotilhossz-átlagértékeket a saját sötét kontroll értékével elosztottuk.

Lézerpásztázó konfokális mikroszkópia

Mikroszkópos vizsgálatokhoz 4 napos, szűrőpapíron nőtt csíranövényeket vizsgáltunk, melyeket az ábrán feltüntetett ideig világítottunk meg a szintén az ábrán feltüntetett intenzitású fénnel. Az YFP jel észleléséhez DMI6000 alapra épített Leica SP5 AOBS lézerpásztázó konfokális mikroszkópot és HC PL APO 20× (NA:0.7) objektívet használtunk (Leica) az alábbi

szoftveres beállításokkal: 400 Hz mintavételi sebesség; 3× vonalankénti átlagolás; 200 µm konfokális apertúra (pinhole); 514 nm-es gerjesztőfény; 545–582 nm tartományra beállított detektor.

Kvantitatív RT-PCR

1. A kiválasztott növényvonalakat 9 cm átmérőjű műanyag Petri csészébe helyezett 4 réteg, desztillált vízzel átitatott szűrőpapírra vetettük.
2. 3 napig sötétbe tettük őket, 4 °C-ra, majd 7 órán át 22 °C-on, 100 µmol m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson (fehér fény) kezeltük őket.
3. A csíranövények 22 °C-on, 4 napig nőttek 20 µmol m⁻² s⁻¹ távoli vörös (727 nm) fényben, illetve sötétben, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk őket.
4. A fagyasztott minták RNS tartalmát RNS izoláló kittel kivontuk a gyártó utasításait követve (Macherey Nagel).
5. Nanodrop lészülékkel (Eppendorf) RNS koncentrációt mértünk, majd 1 µg-ot használtunk fel cDNS készítéséhez. Ehhez a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et használtuk és a gyártó (Thermo Scientific) utasításait követtük.
6. A cDNS íráshoz PCR készüléket (Thermo Scientific) használtunk az alábbi programot futtatva: 5 perc 25 °C, 60 perc 42 °C, végül 10 perc 70 °C.
7. Ezután a mintákat ötszörösére hígítottuk vízzel és összemértük az RT-PCR többi reagensével (mintánként: 7.5 µl SYBR-green (Bio-Rad), 4.5 µl víz, 1.5 µl génspecifikus primerpár (3-3 µM, 1.5 µl cDNS minta).
8. Az RT-PCR reakciót az 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) berendezésen végeztük az alábbi programot használva: 60 s 95 °C, ezután 40x ismételve az alábbi ciklust: 15 s 95 °C; 15 s 60 °C; 60 s 72 °C.

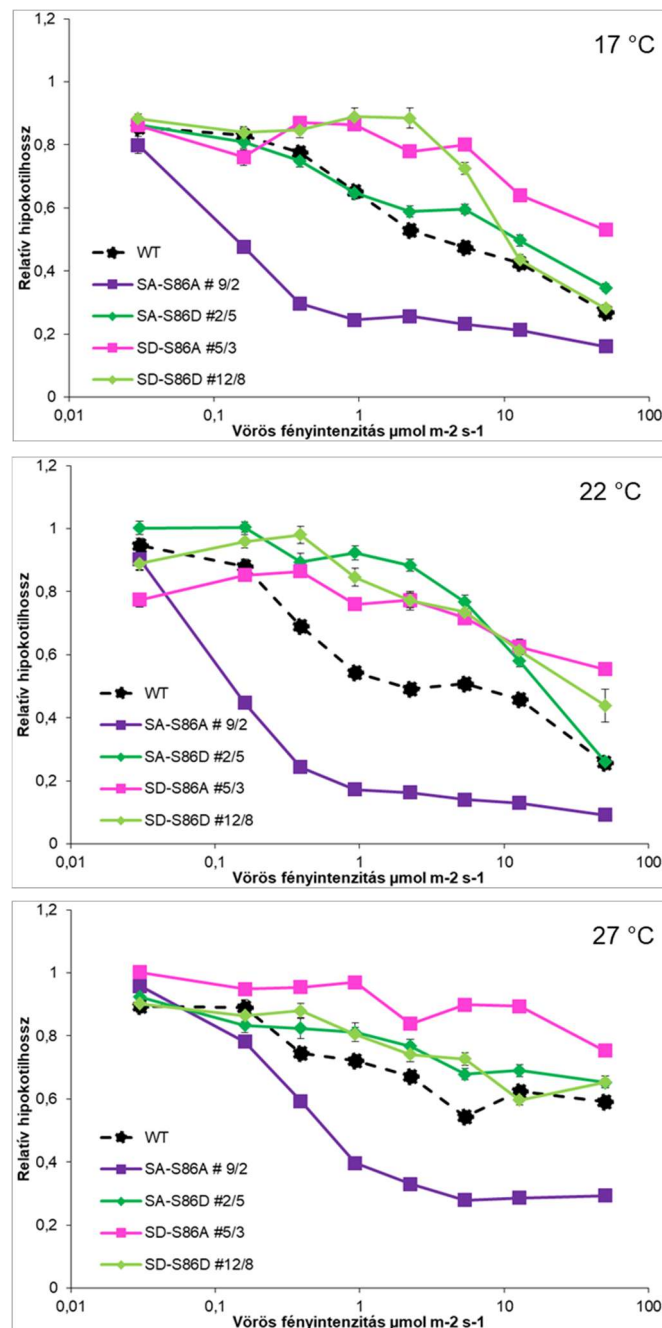
A kísérlet során a YFP-t, illetve a tubulin-t (TUB) detektáltuk. Kiértékeléskor a YFP jelet a TUB jelre normalizáltuk, majd a távoli vörös kezelés, illetve sötét kezelés hatására kialakult relatív értékeket kétmintás t-próba segítségével elemeztük.

Eredmények és értékelésük

A phyB foszforilációja

Fenotipizálás eltérő hőmérsékleten

Az általunk korábban vizsgált (l. 1. táblázat az „Eddigi eredmények” című fejezetben) különböző phyB-YFP kimérafehérjéket kifejező növényvonal hipokotilhosszát azonos fényintenzitás-tartományban, de eltérő hőmérsékleti körülmények között mértük meg (6. ábra)



6. ábra: Transzgénikus növények relatív hipokotilhossza vörös fényintenzitás függvényében.

4 napon keresztül neveltük a különböző PHYB-YFP változatokat a *phyB-9* mutáns háttérben kifejező csíranövényeket különböző hőmérsékleten, eltérő intenzitású vörös fényben, majd a mért hipokotilhossz értékeket az adott vonal sötétben mért értékeire normalizáltuk. A hibasávok standard hibát jelölnek ($n \geq 30$). A 22°C-os diagram az eddigi eredmények részről, szerkesztve.

Mindhárom esetben a fekete szaggatott vonallal jelölt transzgénikus vad típusú (WT) görbéhez viszonyítunk és az alábbi megfigyeléseket tettük:

(i) A hiperszenzitív fenotípust mutató SA-S86A vonal az összes hőmérsékleti kezelés esetén erős hipokotilmegnyúlás gátlást mutat, azaz a hőmérséklet emelése alig befolyásolja a jelátvitel hatékonyságát. A mérésből kirajzolódik az is, hogy a hőmérséklet emelése alapvetően érzéketleníti a rendszert, mivel a fitokrómok Pfr formái termodinamikailag instabilak és a termális reverzió gyorsul magasabb hőmérsékleten így képes a phyB hő-szenzorként is működni. (Legris és mtsai., 2016). A hőmérséklet növekedése tehát egyre több aktív állapotú fitokrómot von ki a rendszerből, így az általuk indított jelátvitel erőssége is csillapodik, viszont az SA-S86A változat Pfr konformerje annyira stabil magas hőmérsékleten is, hogy a jelátvitel erőssége alig csökken az alacsonyabb hőmérséklethez képest.

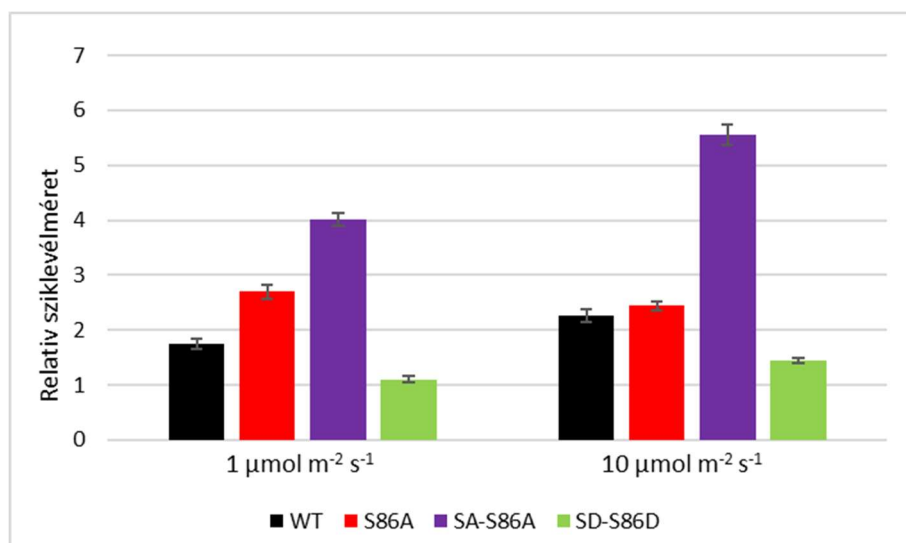
(ii) Tovább elemezve az adatainkat megállapíthatjuk, hogy az SA-S86D vonal 22 és 27 °C-on hiposzenzitív fenotípust mutat, viszont alacsonyabb hőmérsékleten 17 °C-on már a vad típusú phyB-hez hasonló jelátvitelt képes vezérelni, míg az S86D nem. Ebből arra következtetünk, hogy alacsonyabb hőmérsékleten az NTE legelejének defoszforiláltsága képes ellensúlyozni az S86-os pozíció foszforiláltságát. Egy friss tanulmány felfedte a phyB natív térszerkezetét (Hua és mtsai 2022). Itt kirajzolódik, hogy az általunk vizsgált NTE régió annak ellenére, hogy a fehérjeszekvencia elején található, természetes konformációban a GAF doménhez és az itt csatlakozó kromofórhoz is közel kerül, ami arra enged következtetni, hogy amennyiben ennek foszforiláltsági állapota megváltozik, az közvetlen hatással lehet a fényérzékelésre.

(iii) Amennyiben viszont az összes vizsgált szerin foszforilált (SD-S86D), úgy a fenotípus ilyen körülmények között is erős hiposzenzitivitást mutat vörös fényben, ezt a gyenge választ a hőmérséklet csökkenése sem tudja ellensúlyozni.

Sziklevélméret meghatározása

Egy másik informatív, a fotomorfogenikus fejlődést jellemző fenotipikus bélyeg a csíranövények szikleveleinek mérete. Ez a morfológiai jegy a hipokotilhossz változásával ellentétes „irányú” változás segítségével mutatja a fitokróm rendszer hatékonyságát. Minél nagyobb a fényben nőtt növény sziklevele, annál erőteljesebb a csíranövényben lejátszódó

fényindukált jelátvitel. Amennyiben a sziklevelek kicsik maradnak a megvilágítás ellenére, úgy az gyenge fényérzékelésre utal. Mérésünk során a vad típussal és az S86A vonallal vetettük össze a két legjellegzetesebb mutáns vonalat, az SA-S86A-t és az SD-S86D-t (7. ábra).



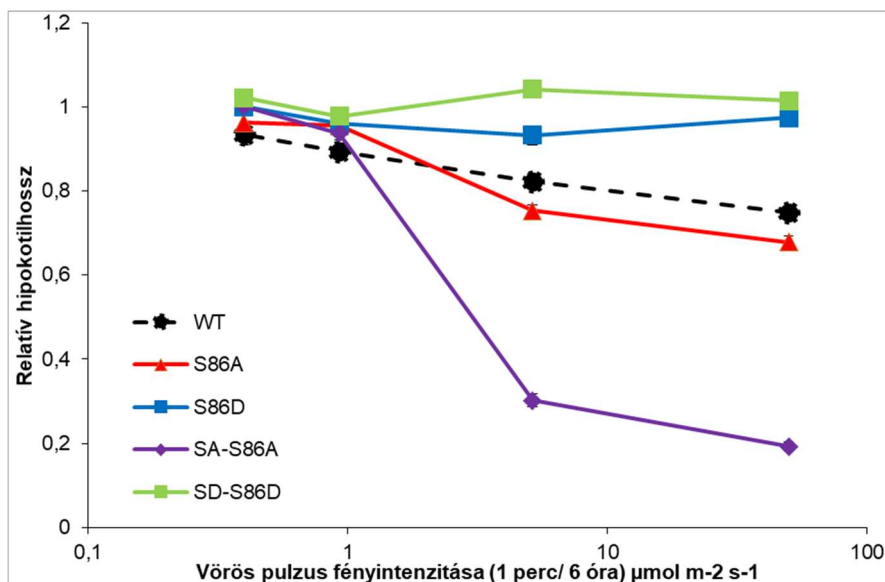
7. ábra: Transzgenikus növények relatív sziklevélmérete vörös fényintenzitás függvényében. 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYB-YFP változatokat kifejező csíranövényeket különböző hőmérsékleten, kétféle intenzitású vörös fényen és értékeket az adott vonal sötétben mért értékeire normalizáltuk. A hibasávok standard hibát jelölnek ($n \geq 20$).

A mérésből kitűnik, hogy az SA-S86A lényegesen nagyobb sziklevélmérettel bír a vad típushoz képest, míg az SD-S86D a vad típusnál is kisebb sziklevélmérettel rendelkezik. Az SD-S86D növények relatív sziklevélmérete alig nagyobb az 1-es értéknél, azaz alig nőtt nagyobbra, mint a teljesen sötétben fejlődő kontroll. Jól látszik az is, hogy az SA-S86A az S86A mutációt hordozó vonalnál is hatékonyabb fotomorfogenezist idéz elő. Ez a megfigyelés tehát megerősíti a korábbi hipokotilméréssel végzett fenotípus vizsgálataink eredményét.

Növénynevelés vörös fénypulzus kezeléssel

Az eddig közzétett megfigyelések alapján azt feltételeztük, hogy a phyB NTE doménjének a foszforilációja a phyB termális reverziójának sebességét változtatja meg, ezáltal finomhangolja a fényszabályozott jelátvitelt (Medzihradzky és mtsai., 2013; Viczián és mtsai., 2020). Ezt egy olyan kísérlettel tudjuk tesztelni, melyben a növényeket sötétben neveljük, de időközönként rövid, erős és gyenge vörös fénypulzusokkal világítjuk meg őket. A pulzusok hatására kialakul az adott intenzitásra jellemző Pfr/Ptot arány. A pulzus utáni a sötét szakaszban a Pfr inaktiválódik, azaz visszaalakul Pr formává a termális reverzió révén. A kísérlet végére

kialakuló hipokotilhossz a pulzusok között fennmaradó a Pfr konformációjú phyB stabilitásán múlik (8. ábra).



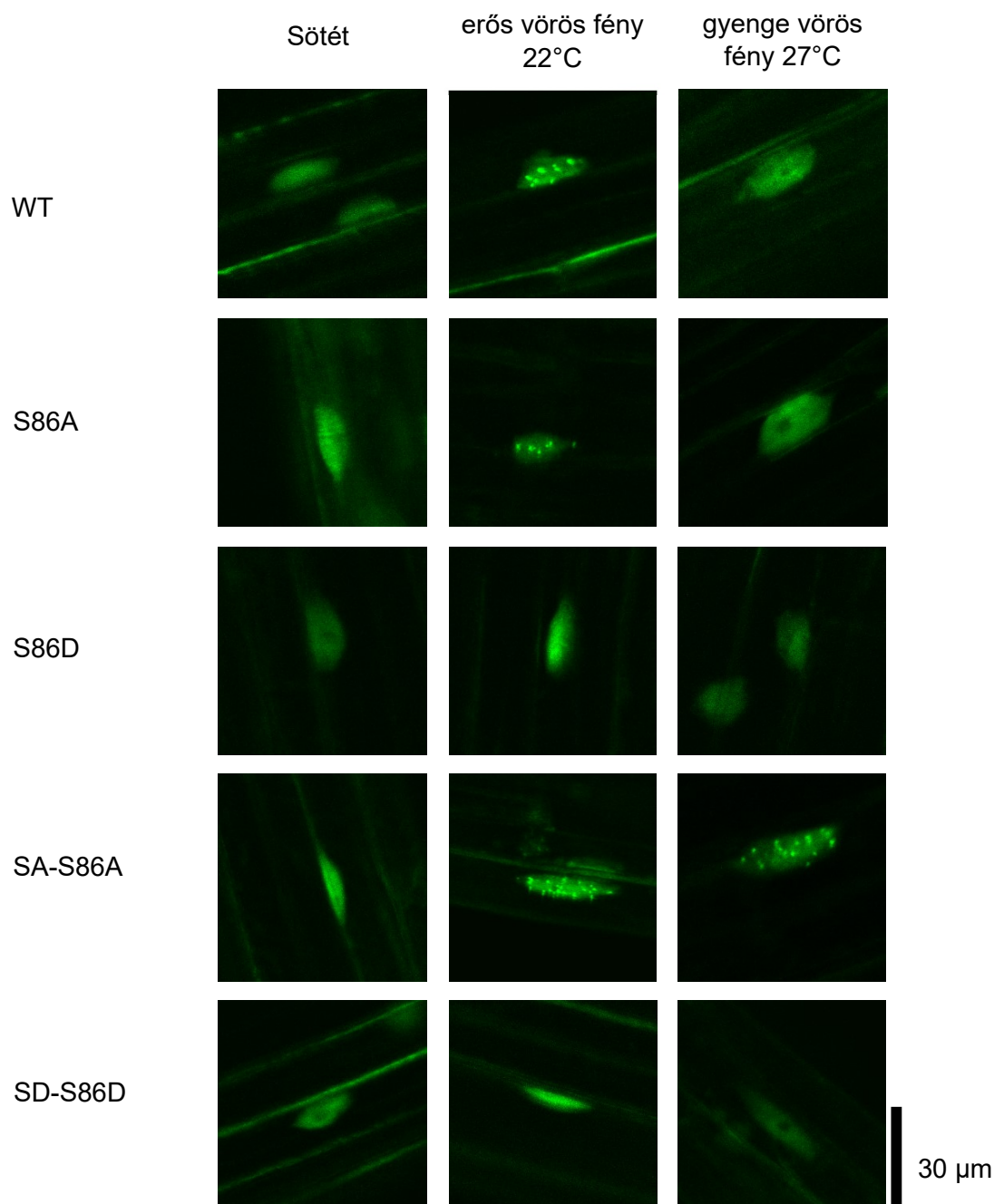
8. ábra: Transzgénikus növények relatív hipokotilhossza eltérő vörös fényintenzitású 1 perces fénypulzus, majd 6 óra sötét kezelés függvényében. 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYB-YFP változatokat kifejező csíranövényeket többféle intenzitású vörös fény pulzus, majd 6 óra sötét kezelésben és értékeket az adott vonal sötétben mért értékeire normalizáltuk. A hibaszávok standard hibát jelölnek ($n \geq 30$).

Ahogy a 8. ábrán is látszik a lilával jelölt SA-S86A vonal reagált a legérzékenyebben a fényre, a fekete szaggatott vonallal jelölt vad típushoz képest. Ebből az látszik, hogy ennek a nem foszforilálódó mutánsnak a legstabilabb a Pfr formája, azaz a 6 óra sötét kezelés alatt ebben a vonalban volt a legtovább aktív a jelátvitel a lassú termális reverzió miatt. Enyhe hiperszenzitivitást mutat a pirossal jelölt S86A kontroll vonalunk, azaz ebben a vonalban is tovább maradt aktív a jelátvitel. A kézzel (S86D) és zölddel (SD-S86D) jelölt foszforilációt mimikáló mutánsok ilyen körülmények között is hiposzenzitív fenotípust mutatnak, ami arra enged következtetni, hogy a foszforiláció destabilizálja a Pfr formát, azaz a sötétben gyorsabban lezajlik a termális reverzió, ami a jelátvitel leállítását okozza.

Sejtmagi komplexekbe rendeződés

Korábbi kutatások bebizonyították, hogy a phyB által indított jelátvitel erőssége összefüggést mutat az általa formált sejtmagi komplexek kialakulásával (Kircher és mtsai., 2002). Az általunk létrehozott mutáns phyB fehérjéhez hozzákaptunk egy YFP

jelölőfehérjét és ezeket a kimérafehérjéket fejeztettük ki *phyB-9* háttérben. Ezáltal detektálhatóvá váltak és lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal vizsgálni tudjuk a sejten belüli elhelyezkedésüket (9. ábra).



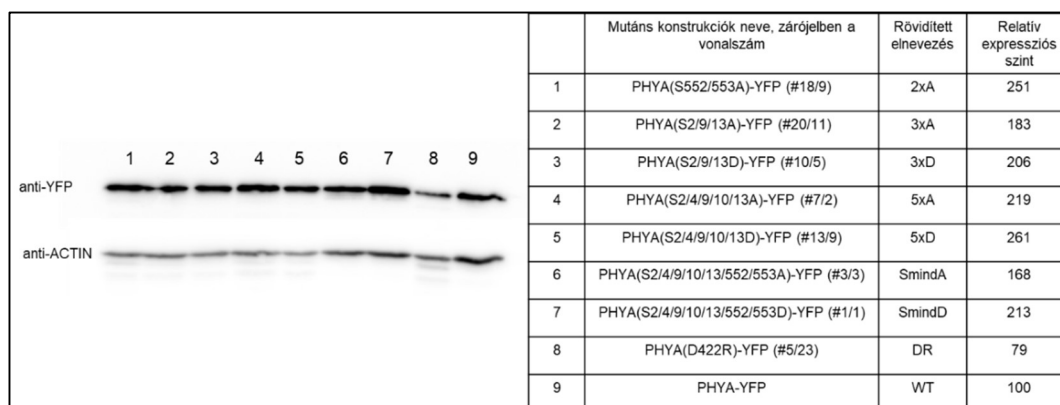
9. ábra: A különböző PHYB-YFP változatok lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal észlelve az eltérően fénykezelt növényekben. 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYB-YFP változatokat kifejező csíranövényeket sötétben, eltérő hőmérsékleten, majd 6 óra erős ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) vagy gyenge ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) vörös fény kezelés után lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal detektáltuk a YFP jelet.

A sötét kontrollokban nem tudtunk megfigyelni egyik esetben sem sejtmagi komplexeket, ezekben az esetekben nem aktív a jelátvitel. 6 óra erős ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) megvilágítás hatására 22 °C-on (maximális Pfr/Ptot arány a WT phyB esetében) a WT, az S86A és az SA-S86A vonalnál tapasztalunk sejtmagi komplexképződést, viszont a foszforilációt utánzó vonalaknál (S86D, SD-S86D) ez a jelenség elmarad. Ez az eredmény összhangban van az eddigi fenotípus mérésekkel, azaz ezeknél a vonalaknál gyengébb a phyB által indított jelátvitel. Ezentúl kíváncsiak voltunk még arra, hogy az erősen hiperszenzitív SA-S86A vonal mutat-e eltérést komplexformálás tekintetében olyan körülmények között, amikor lényegesen alacsonyabb a Pfr/Ptot hányados értéke. Mivel ez a vonal egy korábbi kísérletünkben 27 °C-on, gyenge fényben is erős fotomorfogenezis mutatott alacsony fényintenzitáson ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (6. ábra, 3. diagram), így ezt a kísérletet is ilyen körülmények közé terveztük. Ahogy a 9. ábra utolsó oszlopa is mutatja, csak az SA-S86A mutáns képes 27 °C-on, alacsony fényintenzitáson kialakítani sejtmagi komplexeket, a WT és az S86A már nem. Ebből arra következtetünk, hogy az SA-S86A konstrukciónak nem csak a Pfr formája stabilabb, hanem a sejtmagi komplexei is stabilabbak, melyek alátámasztják ennek a vonalnak az erős és hatékony jelátvitel következtében kialakuló fenotípusát.

A phyA foszforilációja

Transzgénikus növényvonalak szelekciója

Kísérleteinkben egy *PHYA* promóterből, egy mutációkat tartalmazó *PHYA*, egy hozzá kapcsolt *YFP* kódoló régióból és egy *NOS* terminátor régióból álló transzgént fejeztetünk ki phyA hiányos növényekben. Ahhoz, hogy a fotomorfogenikus válasz mértéke és az ezek vizsgálatával foglalkozó kísérletek eredménye összevethető legyen egymással, olyan növényvonalakat kell kiválogatnunk, melyek azonos szinten fejezik ki az eltérő *PHYA*-*YFP* változatokat. Ezért független transzformánsok kimérafehérje-tartalmát határoztuk meg Western blot hibridizációval. A 10. ábrán található táblázatban az általunk vizsgált növényvonalak mutáns kimérafehérje tartalma, mutációk során megváltoztatott aminosavai, elnevezései és ezek rövidítései is megtalálhatók.



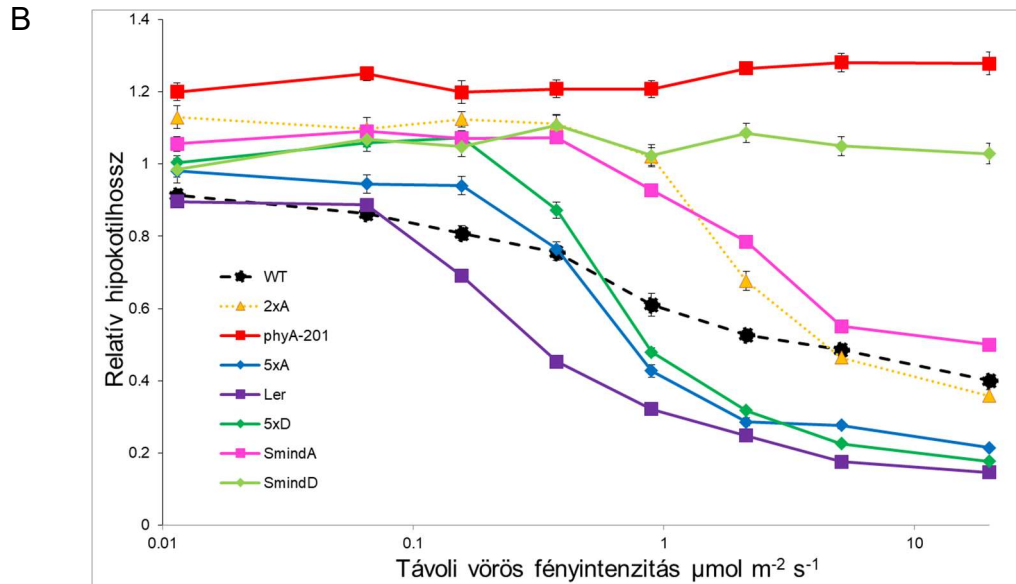
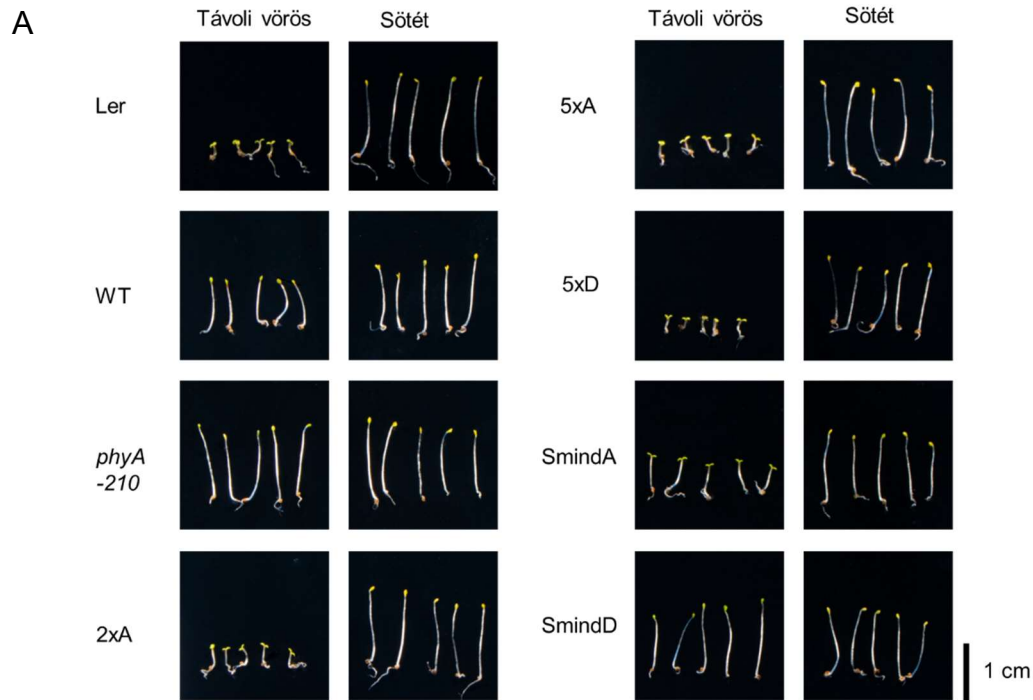
10. ábra: A különböző PHYA-YFP kimérafehérje változatokat kifejező transzgénikus vonalak összehasonlítása. 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYA-YFP változatokat kifejező csíranövényeket sötétben, majd a belőlük készült össz-fehérje kivonatokat western blot eljárás után anti-GFP és anti-actin ellenanyaggal tettük láthatóvá. A kapott anti-GFP jelet az anti-actin jelre normalizáltuk, majd a WT-t vettük 100%-nak és a többi jelet ehhez viszonyítottuk.

A 3xA, 3xD, 5xA, és 5xD mutáns vonal csak az phyA NTE régiójában tartalmaz defoszforilált, illetve foszforilációt utánzó mutációkat. A 2xA csak a PHY doménben tartalmaz defoszforilációt utánzó mutációt. Az SmindA és SmindD vonal együttesen tartalmazznak mutációkat az NTE-ben is a PHY régióban is. A géleképből és a relatív expressziós szintekből is kitűnik, hogy ezek a kiválasztott transzformánsok közel azonos mértékben fejezik ki a mutáns PHYA-YFP kimérafehérjéket így a későbbiekben vizsgálni kívánt fotomorfogenikus válasz mértéke a bejuttatott mutáns phyA-tól függ és nem a receptorfehérje mennyiségétől.

Fenotipizálás távoli vörös megvilágítással

A rendelkezésre álló fitokróm mennyiségnek egy kis része távoli vörös fényben (727 nm) is képes aktív, Pfr konformációt formálni. A legtöbb fitokróm esetében (phyB-phyE) ez a kis mennyiségű Pfr nem képes aktív jelátviteli kaszkádokat indítani, viszont a phyA igen (Nagy és Schäfer 2002). Azért, hogy a többi fitokróm hatása ne érvényesüljön a fotomorfogenikus válaszban a phyA vizsgálatára végzett kísérletekben távoli vörös kezelést alkalmazunk. A

csíranövényeket sötétben, illetve erős ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) távoli vörös fényben neveltük, majd a hipokotiljuk hosszát megmértük (11. ábra).



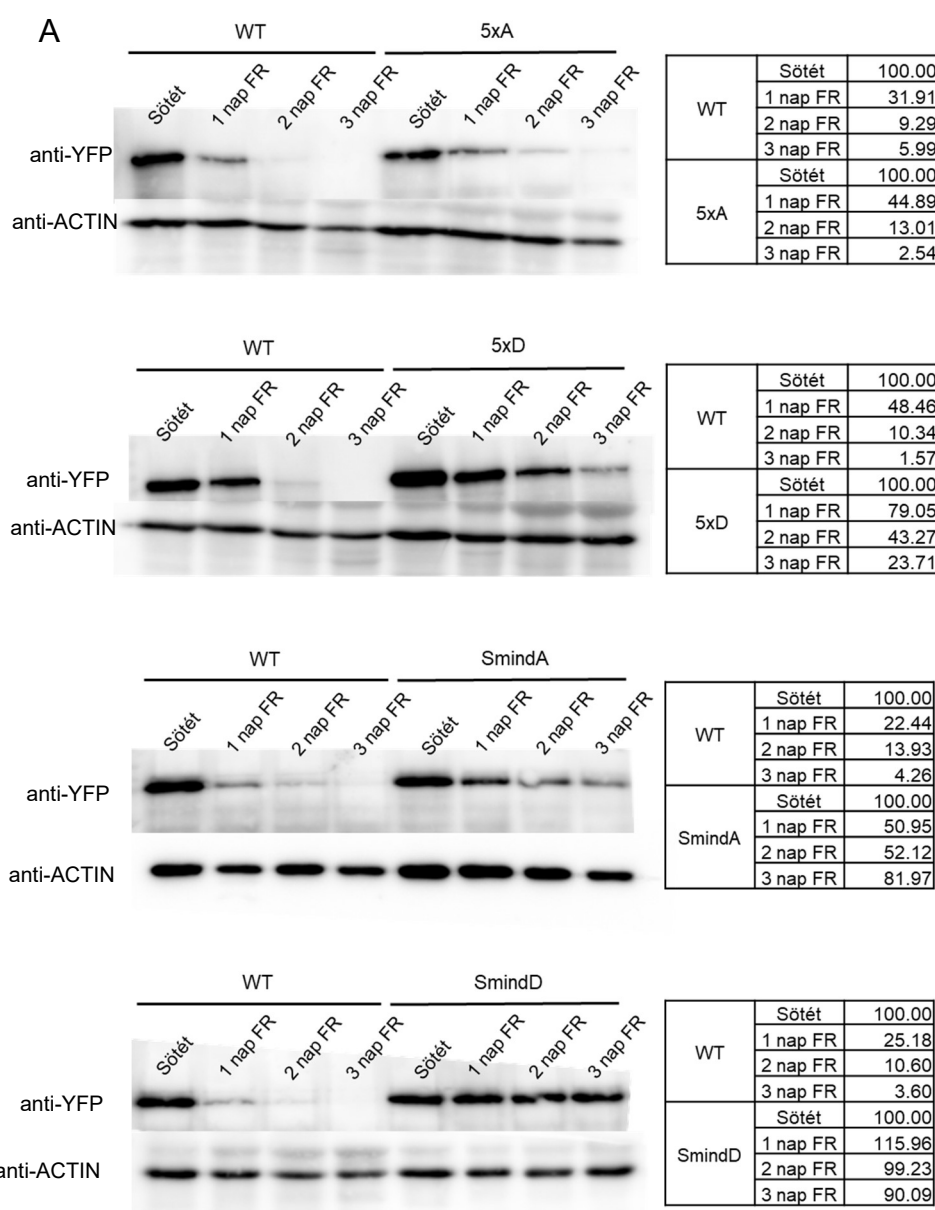
11. ábra: A panel: Eltérő konstrukciókat kifejező csíranövények képei 4 napos távoli vörös, illetve sötét kezelés után. 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYA-YFP változatokat kifejező csíranövényeket távoli vörös fényben, illetve sötétben, majd a csíranövényeket lefotóztuk.

B panel: A különböző PHYA-YFP verziókat kifejező csíranövények hipokotilhossza távoli vörös fény besugárzás függvényében. 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYA-YFP változatokat kifejező csíranövényeket távoli vörös fényben, illetve sötétben, majd a csíranövények hipokotilhosszát megmértük. A fényben nőtt növények hipokotilhosszát az adott vonal sötétben mért átlagértékére normalizáltuk, majd ábrázoltuk. A vonalak részletes leírása a 10. ábrán látható. A hibasávok standard hibát jelölnek ($n \geq 30$).

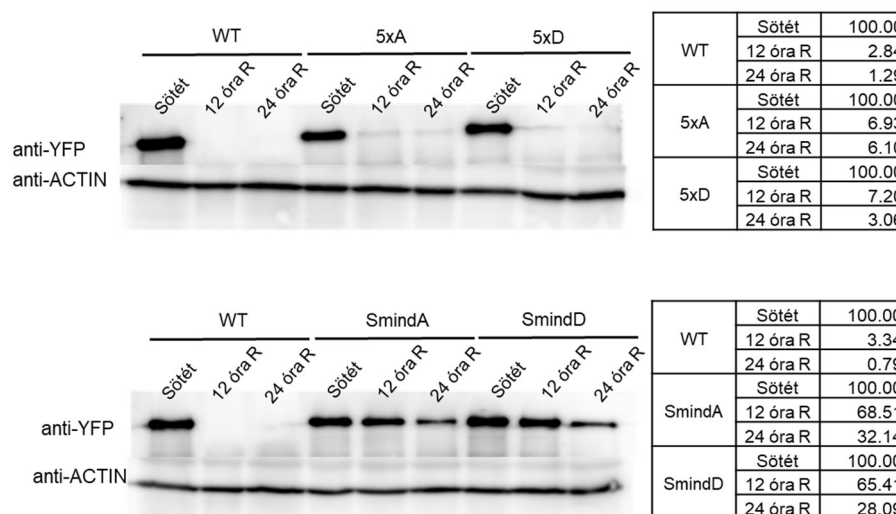
A pirossal jelölt *phyA-201* vonal nem tartalmaz phyA-t, a sötét kontrollhoz képest nem rövidül tehát teljesen érzéketlen a távoli vörös besugárzásra. Lefutása azt is mutatja, hogy ezen a kísérleti körülményen a phyA-n kívül más fitokróm nem vezérel olyan jelátvitelt, ami a hipokotilhosszt befolyásolja. A Ler jól mutatja a távoli vörös általi rövidülést, míg ezt a jelenséget a vad típusú PHYA-t a *phyA-201* háttérben kifejező vonal (WT) csak részben komplementálja. A világos zölddel jelölt SmindD vonal hipokotilhossza a *phyA* mutánséhoz hasonlít, ami arra utal, hogy kiválasztott aminosavakon a foszforiláció mimikálása teljesen érzéketleníti a phyA-t, inaktív a jelátvitel. Az NTE-ben történt mutációk hatására megfigyelhető, hogy amennyiben ezek foszforilációt mimikálnak (5xD), úgy gyengébb, míg, ha defoszforiláltak (5xA), úgy erősebb a fényválasz egymáshoz viszonyítva, gyenge fényben. Sérült a fényválasza mind az SmindA mind a 2xA vonalnak is. Ennek hátterében a PHY régióban történt mutáció állhat. Mivel jelentős különbséget nem látunk a 2xA és az SmindA között, így megfigyelhető, hogy a fényérzékelést segítő defoszforilációt utánozó NTE mutációk nem képesek ellensúlyozni a PHY doménben létrehozott mutációk hatásását. Amennyiben ezeket a pozíciókat megváltoztatjuk, úgy sérül a fényérzékelés és ezáltal a jelátvitel is. Az SmindA-t meg az SmindD-t összevetve viszont kitűnik, hogy amennyiben az NTE-ben és a PHY doménekben is foszforilációt mimikáló módosítást hajtunk végre, úgy teljesen elmarad a fotomorfogenikus válasz, phyA hiányos, etiolált fenotípust kapunk. Összességében ezen konstrukciók közül a PHY domént megváltoztató változatok (2xA, SmindA, SmindD) módosítják legjobban a fényérzékelést, így a fotomorfogenikus válasz kialakításában is ezek a pozíciók a legfontosabbak.

Fehérjebomlás sebessége

A phyA-ra jellemző fényérzékelési mintázat kialakításában (pontosabban a távoli vörös fényben történő fényérzékelésben) nagy szerepe van a phyA fényindukált lebomlásának (Rausenberger és mtsai, 2011). Ebben a kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy az általunk létrehozott mutációk mennyire befolyásolják a phyA stabilitását fényben. A 4 napos sötétben nőtt csíranövények nevelésének végén eltérő hosszúságú vörös, illetve távoli vörös kezelést alkalmaztunk. Így a fényben történő bomlás sebességét képesek voltunk megmérni western blot segítségével (12. ábra).



B

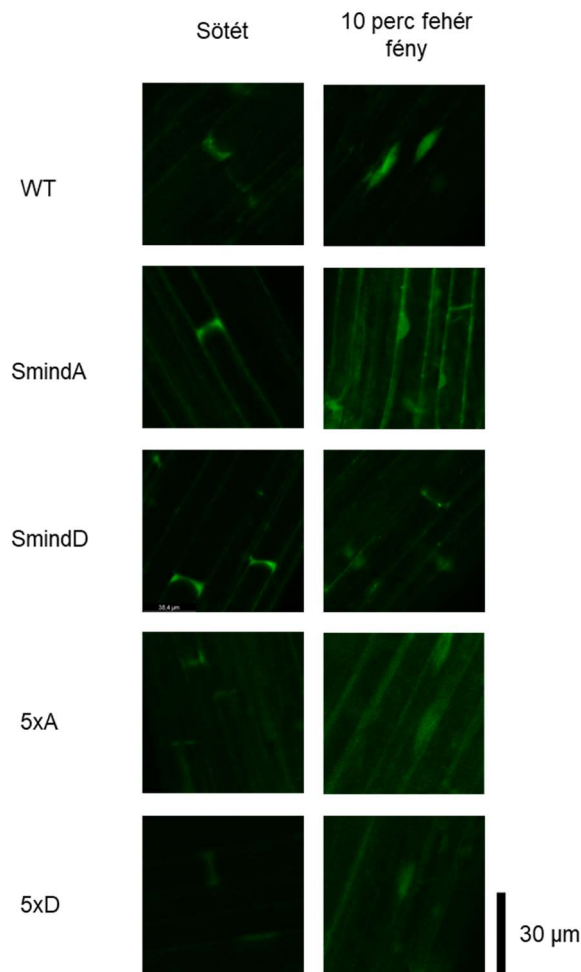


12. ábra: Kiválasztott transzgénikus növényvonalak kimérafehérje szintjének fogyása megvilágítás hatására. 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYA-YFP változatokat kifejező csíranövényeket sötétben, majd a növénynevelés végén eltérő hosszúságú távoli vörös (FR, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, A panel), illetve vörös (R, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, B panel) kezelést alkalmaztunk. A növényi mintákból készült össz-fehérje kivonatokat western blot eljárás után anti-GFP és anti-aktin ellenanyaggal tettük láthatóvá. A kapott anti-GFP jelet az anti-aktin jelre normalizáltuk, majd a sötétben nőtt kontrollokat vettük 100%-nak és a többi jelet ehhez viszonyítottuk.

Minden mérésnél a transzgénikus, vad típusú PHY-YFP-t kifejező csíranövényekhez (WT) viszonyítottunk. A távoli vörös kezelés hossza 1, 2 és 3 nap volt (12. ábra, A panel). Ilyen körülmények között az 5xA változat a leginstabilabb a mutáns változatok közül, ugyanolyan mértékben degradálódik, mint a WT. Az 5xD és SmindA változatok lassabban fogynak a WT-hez képest távoli vörös fényben, míg az SmindD lényegében stabil, nem csökken a mennyisége ilyen körülmények között. Vörös fényben (12. ábra, B panel) rövidebb megvilágítást alkalmaztunk mivel ebben az esetben lényegesen gyorsabb degradációra számítottunk. A WT és az NTE mutánsok (5xA, 5xD) már 12 óra vörös fény hatására is szinte teljesen elbomlottak, viszont az SmindA és SmindD változatok sokkal stabilabbnak bizonyultak. Érdekes ellentmondásnak tűnik, hogy ezek vonalak sokkal hiposzenzitívebb fenotípust mutatnak, mint az NTE mutánsok, de mégis stabilabb a bennük lévő fehérjeváltozat. Ez arra utal, hogy a phyA funkciója ugyan sérül ezeknek a mutációknak köszönhetően, de a növényekben mégis felhalmozódik - a minden bizonnyal inaktív - phyA fotoreceptor. A jelenség hátterében a mutáns phyA változatok megváltozott sejtmagi importja, illetve a sejtmagban kialakuló egyéb transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatás erőssége állhat. A későbbiekben ezeket a lehetőségeket szeretnénk vizsgálni.

Intracelluláris lokalizáció

A phyA helyes jelátviteléhez fontos a phyA megfelelő sejten belüli elhelyezkedése. A phyB-val ellentétben itt nem a csak a sejtmagban detektálható a jel, hanem a citoplazmában is, mert a phyA a citoplazmában is képes feldúsulni. A hatékony jelátvitel elindítását viszont a sejtmagi importja után fogja elindítani a receptor, így kísérletünk során is ezt akartuk detektálni (13. ábra).



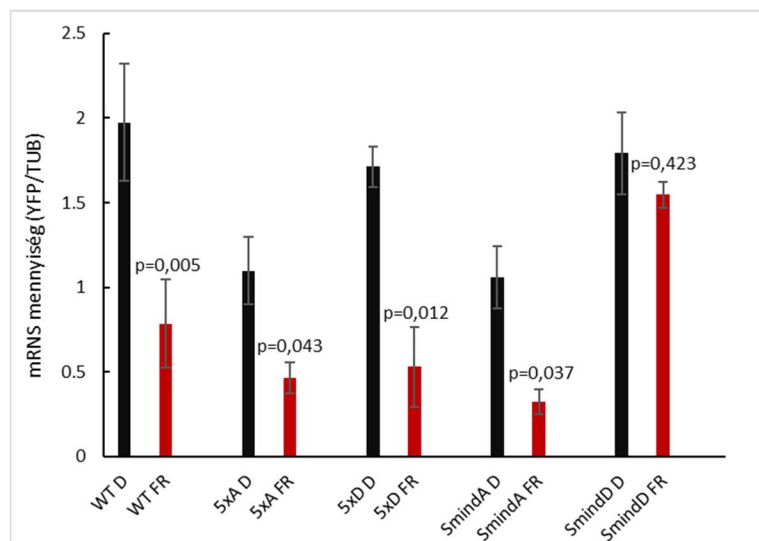
13. ábra: Transzgénikus növények lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal készített képe eltérő növénynevelési körülmények között. 4 napon keresztül neveltük a különböző PHYA-YFP változatokat kifejező csíranövényeket sötétben 22 °C-on, majd a kezelés végén 10 perc fehér fény ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kezelés után lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal detektáltuk a YFP jelet.

Az összes vonal esetében, sötétben gyenge sejtplazmás jelet láthatunk. 10 perc megvilágítás után a sejtmagban is kimutatható az YFP jel a WT vonalnál. Hasonlóképpen, a két NTE mutáns (5xA, 5xD) esetén jól látható a megvilágítás hatására a sejtplazmás jel mellett megjelenő

sejtmagi jel is, tehát az NTE módosítása nem változtatja meg a phyA sejtmagi importját. Az alkalmazott 10 perc megvilágítás után az SmindA phyA változat sejtmagi importja is megfigyelhető. Az SmindD esetében viszont egyáltalán nem észleltünk sejtmagi importot, ami arra utal, hogy ez a foszforilációt utánzó phyA nem képes bejutni sejtmagba, (13. ábra). Ez a jelenség magyarázhatja ezeknek a növényeknek a sérült fotomorfogenezisét (11. ábra). Adataink arra utalnak, hogy a phyA sejten belüli elhelyezkedését kiváltó okokat tovább kell vizsgálni, mert magyarázatot adhatnak a megváltoztatott foszforilációjú phyA változatok által irányított fotomorfogenikus válaszokra.

PHYA-YFP mRNS felhalmozódása távoli vörös fényben és sötétben

Azt figyeltük meg, hogy fénykezelés hatására a mérhető kimérafehérje mennyisége különböző képpen csökken a különböző transzgénikus növényvonalakban, miközben sötétben azonos mennyiségű PHYA-YFP-t tartalmaznak (12. ábra). Leginkább az SmindD vonal tér el a többitől, ugyanis ebben távoli vörös fényben nem tapasztaltunk csökkenést a megvilágítás hatására (12. ábra, A panel). Annak ellenére, hogy a PHYA fényben bekövetkező lebomlása a jelátvitel fontos lépése, a jelenség hátterében az mRNS szint változása is állhat (Rausenberger és mtsai, 2011). Ezért kvantitatív RT-PCR segítségével megvizsgáltuk, hogy sötétben, illetve távoli vörös fényben hogyan alakul a PHYA-YFP-t kódoló mRNS szintje (14. ábra).



14. ábra: A különböző PHYA változatokat kifejező transzgénikus növényekben mérhető PHYA-YFP mRNS mennyisége. A fekete oszlopok (D) a 4 napig sötétben, míg a piros oszlopok (FR) a 4 napig távoli vörös fényben ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nőtt csíranövények relatív PHYA-YFP mRNS szintjét ábrázolják (a tubulinhoz viszonyítva). A hibaszalagok standard hibát jelölnek (n=9). A p-értékek a FR-ben mért értékek sötétben mért értékekhez viszonyított szignifikanciáját jelöli (p<0,05 szignifikáns különbség).

A WT, 5xA, 5xD és az SmindA vonalak esetében szignifikáns eltérést tapasztalunk ($p < 0,05$) a sötétben és a távoli vörös fényben nőtt növények között, amely mutatja, hogy a 4 napos távoli vörös kezelés csökkenti a *PHYA-YFP* transzkript szintjét. Ezek a vonalak ilyen körülmények között mutatnak fotomorfogenikus választ (11. ábra), illetve a kimérafehérje a sejtmagban feldúsul (13. ábra). Az SmindD vonal esetében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a sötétben és távoli vörösben nőtt növények *PHYA-YFP* mRNS mennyiségében. Ebben a vonalban sérült a fényválasz (11. ábra) és a sejtmagi import is (13. ábra). Összevetve az SmindD kimérafehérje mennyiségével távoli vörösben (12. ábra, A panel) valószínűsíthető, hogy a fényben detektált magas fehérjeszintet magyarázza az emelt mRNS szint. A jelenség hátterében az állhat, hogy az SmindD esetében létrehozott mutációk már olyan mértékben módosítják a receptor működését, hogy funkciója távoli vörös fényben erősen sérül, nem jut be a sejtmagba, nem alakítja ki a jelátvitelhez szükséges kölcsönhatásokat más faktorokkal, így a saját transzkripcióját sem tudja szabályozni. Ezek a foszforilációt utánzó mutációk egy távoli vörös fényben funkcióképtelen phyA változatot hoznak létre, ami megmagyarázza, hogy miért mutat azonos fenotípust a phyA hiányos mutánssal (11. ábra).

Összefoglalás

A munkánk során a fitokróm A és B foszforilációjának élettani hatását vizsgáltuk. A phyB esetében a korábban megfigyelt fenotípusos válaszok okait kerestük. Megfigyeltük, hogy az SA-S86A vonalunk magas hőmérsékleten is nagy fokú fényérzékenységet mutat, ráadásul fénypulzusos megvilágítás alatt is jól működik, ami arra enged következtetni, hogy ennek a phyB változatnak nagyon stabil a Pfr formája mind sötétben, mind magas hőmérsékleten. Meglepő újdonság volt az, hogy alacsony hőmérsékleten (17 °C) a phyB NTE legelejének defoszforilációja ellensúlyozni tudja az S86 foszforiláltságát (SA-S86D). Ennek további vizsgálata a Pfr forma eddig nem ismert hőmérsékletfüggő stabilizálási mechanizmusára vethet fényt.

Méréseink megmutatták, hogy a phyA esetében az NTE domén általunk vizsgált aminosavainak foszforilációja nem változtatja meg jelentősen a receptorfehérje funkcióját, viszont amennyiben a PHY doménben lévő aminosavaknak változik meg a foszforilációs állapota, az már markáns jelátviteli változásokat indukál. A leglátványosabb változásokat a jelátvitelben akkor tapasztaltuk, amennyiben foszforilációt utánzó mutációkat idézünk elő, ami a phyA funkciójának erőteljes sérülését okozza (SmindD). Sejtmagi importja sérül, nem képes gátolni a hipokotil megnyúlását, valamint az mRNS szintje sem csökken le. Mivel ennek a phyA változatnak a stabilitása fényben magasabb, mint a vad típusúé, valószínűsíthetjük, hogy a változás oka nem a jelátvitel számára elérhető receptorfehérje mennyiségének elégtelensége. Jövőbeli terveink között szerepel ennek a jelenségnek a feltárása különös tekintettel a phyA sejtmagi importjában részt vevő fehérjepartnerekkel történő kölcsönhatásának vizsgálatára.

Köszönetnyilvánítás

A dolgozatban leírt kísérleteket a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézetében a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjaként végeztem.

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Viczián Andrásnak azt a mérhetetlenül sok segítséget, útmutatást és figyelmet, amivel munkám során végig kitüntetett. Köszönöm a csoportvezetőmnek, Dr. Silhavy Dánielnek, hogy kutatócsoportjának tagjaként készíthettem el a dolgozatomat. Emellett szeretném megköszönni a csoport összes tagjának a támogatásukat, a segítségüket és a mérhetetlenül pozitív hozzáállásukat.

Nagyon hálás vagyok a belső konzulensemnek, Dr. Pécsváradi Attilának, hogy külső szakdolgozójaként is maximálisan támogatott és kellő szabad kezet adott munkám során.

A munka az Új Nemzeti Kiválóság Program ÚNKP-21-2-SZTE-375 kódszámú pályázatának, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap OTKA K138022-as pályázatának támogatásával készült.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak és a barátaimnak, hogy munkám során mindvégig hittek bennem és támogattak.

Irodalomjegyzék

- Bae, G., & Choi, G. (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 281–311. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092859>
- Franklin, K. A., & Quail, P. H. (2010). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 11–24. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp304>
- Galvão, V. C., & Fankhauser, C. (2015). Sensing the light environment in plants: Photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.013>
- Hajdu, A., Ádám, É., Sheerin, D. J., Dobos, O., Bernula, P., Hiltbrunner, A., Kozma-Bognár, L., & Nagy, F. (2015). High-level expression and phosphorylation of phytochrome B modulates flowering time in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 83(5), 794–805. <https://doi.org/10.1111/tpj.12926>
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognár L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adám E, Schäfer E, 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. *Plant Cell*. 2002 Jul;14(7):1541-55. doi: 10.1105/tpc.001156.
- Klose, C., Nagy, F., & Schäfer, E. (2020). Thermal Reversion of Plant Phytochromes. *Molecular Plant*, 13(3), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.12.004>
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E. S., Rojas, C. C. R., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P. A., Schäfer, E., Vierstra, R. D., & Casal, J. J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6314), 897–900. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5656>
- Li, F.-W., Melkonian, M., Rothfels, C. J., Villarreal, J. C., Stevenson, D. W., Graham, S. W., Wong, G. K.-S., Pryer, K. M., & Mathews, S. (2015). Phytochrome diversity in green plants and the origin of canonical plant phytochromes. *Nature Communications*, 6, 7852. <https://doi.org/10.1038/ncomms8852>
- Li H, Burgie ES, Gannam ZTK, Li H, Vierstra RD. (2022) Plant phytochrome B is an asymmetric dimer with unique signalling potential. *Nature*. 2022 Apr;604(7904):127–133. doi: 10.1038/s41586-022-04529-z. Epub 2022 Mar 30.
- Medzihradzsky, M., Bindics, J., Ádám, É., Viczián, A., Klement, É., Lorrain, S., Gyula, P., Mérai, Z., Fankhauser, C., Medzihradzsky, K. F., Kunkel, T., Schäfer, E., & Nagy, F.

- (2013). Phosphorylation of phytochrome B inhibits light-induced signaling via accelerated dark reversion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(2), 535–544. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.106898>
- Nagy, F., & Schäfer, E. (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 329–355. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135302>
- Nito, K., Wong, C. C. L., Yates, J. R. 3rd, & Chory, J. (2013). Tyrosine phosphorylation regulates the activity of phytochrome photoreceptors. *Cell Reports*, 3(6), 1970–1979. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.006>
- Paik, I., & Huq, E. (2019). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 92, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.007>
- Pham, V. N., Kathare, P. K., & Huq, E. (2018). Phytochromes and Phytochrome Interacting Factors. *Plant Physiology*, 176(2), 1025–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01384>
- Rausenberger J, Tscheuschler A, Nordmeier W, Wüst F, Timmer J, Schäfer E, Fleck C, Hiltbrunner A. (2011) Photoconversion and nuclear trafficking cycles determine phytochrome A's response profile to far-red light. *Cell*. 2011 Sep 2;146(5):813-25. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.023.
- Rockwell, N. C., Su, Y.-S., & Lagarias, J. C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 837–858. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208>
- Sánchez-Lamas, M., Lorenzo, C. D., & Cerdán, P. D. (2016). Bottom-up Assembly of the Phytochrome Network. *PLoS Genetics*, 12(11), e1006413. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006413>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sharrock, R. A. (2008). The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biology*, 9(8), 230. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-230>
- Stockhaus, J., Nagatani, A., Halfter, U., Kay, S., Furuya, M., and Chua, N.-H. (1992). Serine-to-alanine substitutions at the aminoterminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity. *Genes Dev.* 6, 2364-2372.

- Sullivan, J. A., & Deng, X. W. (2003). From seed to seed: The role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental Biology*, 260(2), 289–297. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00212-4](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00212-4)
- Viczián, A., Ádám, É., Staudt, A.-M., Lambert, D., Klement, E., Romero Montepaone, S., Hiltbrunner, A., Casal, J., Schäfer, E., Nagy, F., & Klose, C. (2020). Differential phosphorylation of the N-terminal extension regulates phytochrome B signaling. *The New Phytologist*, 225(4), 1635–1650. <https://doi.org/10.1111/nph.16243>
- Zhou Y, Yang L, Duan J, Cheng J, Shen Y, Wang X, Han R, Li H, Li Z, Wang L, Terzaghi W, Zhu D, Chen H, Deng XW, Li J. (2018) Hinge region of Arabidopsis phyA plays an important role in regulating phyA function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Dec 11;115(50):E11864-E11873. doi: 10.1073/pnas.1813162115. Epub 2018 Nov 26.