

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2923.

SZŐKE ANITA

Celluláris és molekuláris élettan
című program

Programvezető: Dr. Hunyady László, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Káldi Krisztina, egyetemi tanár

A metabolizmus és a cirkadián óra kölsönhatásainak vizsgálata *Neurospora crassa* modellszervezetben

Doktori értekezés

Szóke Anita

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Káldi Krisztina, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kozma-Bognár László, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Wiener Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csermely Péter, az MTA tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kardon Tamás, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Wunderlich Lívius, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés (irodalmi háttér).....	9
1.1. A cirkadián ritmus.....	10
1.1.1. A cirkadián ritmus legfontosabb paraméterei	11
1.2. A molekuláris oszcillátor	12
1.3. <i>Neurospora crassa</i> , a cirkadián ritmus modellorganizmusa.....	13
1.4. A <i>Neurospora crassa</i> cirkadián oszcillátora.....	16
1.4.1. A <i>Neurospora</i> cirkadián oszcillátorának elemei	19
1.4.1.1. Az óra pozitív faktora, a white collar komplex (WCC)	19
1.4.1.2. Az óra negatív faktora, a frequency fehérje (FRQ).....	20
1.4.2. A fény hatása a <i>N. crassa</i> oszcillátorának működésére	22
1.4.3. A hőmérséklet, mint Zeitgeber.....	25
1.4.4. A tápanyagkínálat, mint Zeitgeber	26
1.5. A cirkadián ritmus kimenete	28
1.6. A RAS fehérjecsald.....	30
1.6.1. A RAS2 szerepe a glükózérzékelésben péklesztőben és <i>N. crassa</i> -ban.....	32
2. Célkitűzések.....	35
2.1. A RAS2 fehérje szerepének vizsgálata a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában.....	35
2.2. A cirkadián ritmus szerepének vizsgálata a tápanyagkínálat jelentős megváltozása esetén.....	35
3. Módszerek	36
3. 1. A kísérletek során alkalmazott <i>N. crassa</i> törzsek	36
3.2. Új törzs létrehozásához szükséges DNS modifikáció lépései.....	39
3.2.1. Polimeráz láncreakció	39
3.2.2. Fragmentum izolálás	39
3.2.3. Restrikciós emésztés	39
3.2.4. Ligáció.....	40
3.2.5. $\Delta H5\alpha$ sejtek hősokk transzformációja.....	40
3.2.6. Plazmid DNS izolálás.....	40
3.2.7. Plazmid DNS előkészítése elektroporációhoz.....	40
3.2.8. <i>N. crassa</i> transzformálása elektroporációval	41
3.3. <i>N. crassa</i> tenyésztése szilárd táptalajon.....	42

3.3.1. Race Tube analízis	42
3.4. <i>N. crassa</i> tenyésztése folyékony kultúrában	43
3.5. Teljes sejtlizátum készítése	44
3.6. Szubcelluláris frakcionálás	45
3.7. Fehérjeszeparálás SDS-PAGE módszerrel	45
3.8. Western-blot.....	46
3.9. Fehérjék immundetektálása	46
3.10. A GST-AC-RBD és a RAS _{2FLAG,STREP} fehérjék interakciójának vizsgálata	48
3.11. RNS izolálás.....	49
3.12. cDNS szintetizálás	50
3.13. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció.....	50
3.14. RNS szekvenálás és adatelemzés.....	52
3.15. <i>In vivo</i> luciferáz assay	53
4. Eredmények	55
4.1. A RAS jelpálya szerepet játszik a <i>Neurospora</i> óra metabolikus kompenzációjában.....	55
4.1.1. A RAS2 befolyásolja a konidizációt <i>N. crassa</i> -ban.....	55
4.1.2. A RAS2 szerepet játszik a cirkadián ritmus glükózkompenzációjában	59
4.1.3. A <i>ras2</i> mutáció a molekuláris óra komponenseinek expresszióját és foszforilációját is megváltoztatja	61
4.1.4. A molekuláris óra glükózra adott válasza a RAS2-től függ.....	70
4.1.5. A RAS2 és a cirkadián óra közötti jelátviteli útvonal elemzése	72
4.2. A hosszan tartó tápanyagmegvonáshoz való alkalmazkodás a cirkadián óra molekuláris átszerveződéséhez vezet.....	74
4.2.1. Glükózmegvonás hatására megváltozik a központi órakomponensek szintje.....	74
4.2.2. Az órakomponensek éhezésre adott válaszában számos modulátor játszik szerepet.....	83
4.2.3. A glükózmegvonás eltérő módon hat a transzkriptomra a <i>wt</i> -ban és a $\Delta wcc-1$ -ben	87
4.2.4. Az éhezésből való hatékony regeneráció feltétele a működőképes óra	93
5. Megbeszélés.....	100
5.1. A RAS2 fehérje szerepe a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában ...	100
5.2. A hosszantartó glükózmegvonás hatása a molekuláris órára.....	102
6. Következtetések.....	108
6.1. A RAS2 az óra metabolikus kompenzációjának egy új faktora	108

6.2. A tápanyagmegvonás a molekuláris óra újraszerveződését eredményezi	108
7. Összefoglalás	110
Summary	111
8. Irodalomjegyzék	112
9. Saját publikációk jegyzéke	135
9.1. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények	135
9.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó publikáció	135
10. Köszönetnyilvánítás.....	136

Rövidítések jegyzéke

AC	adenilate cyclase (adenilát-cikláz)
AMP	adenosine monophosphate (adenozin-monofoszfát)
APS	ammonium persulfate (ammónium-persulfát)
ARF	ADP-ribosylation factor (ADP-ribozilációs faktor)
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (aril-szénhidrogén receptor nukleáris transzlokátor)
ATP	adenosine triphosphate (adenozin-trifoszfát)
BMAL1	brain and muscle arnt-like protein-1 (agy és izom eredetű arnt-szerű fehérje-1)
CAMK	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (kalcium/kalmodulin-dependens protein kináz)
cAMP	cyclic AMP (ciklikus AMP)
C-box	clock-box (óra régió)
CC region	coiled coil region (tekerceselt tekercs régió)
CCG	clock-controlled gene (óra által szabályozott gén)
CDC25	cell-division cycle 25 protein (sejtosztódási ciklus 25 fehérje)
CHX	cicloheximide (cikloheximid)
CK-Ia	casein kinase Ia (kazein kináz Ia)
CK-II	casein kinase II (kazein kináz II)
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput (a cirkadián mozgásszervi kimeneti ciklusokat szabályozó fehérje)
CRY	cryptochrome (kriptokróm fehérje)
CSP1	conidial separation protein 1 (konídium szeparációt elősegítő fehérje 1)
CT	circadian time (cirkadián idő)
DD	dark-dark (állandó sötétség)
DEXRAS1	dexamethazone induced RAS1 (dexametazon-indukált RAS1)
DTT	dithiothreitol (ditiotreitól)
ECL	enhanced chemiluminescence (magnövelt kemilumineszcencia)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid (etilén-glikol-tetraecetsav)

ERK	extracellular signal regulated kinase (extracelluláris jel által szabályozott kináz)
FAD	flavine-adenine dinucleotide (flavin-adenin dinukleotid)
FCD	FRQ-CK-Ia interacting domain (FRQ-CK-Ia interakciós domén)
FFC	FRQ-FRH complex (FRQ-FRH komplex)
FGSC	Fungal Genetics Stock Center (Gombák Genetikai Törzsgyűjteménye)
FLO	FRQ-less oscillator (FRQ nélküli oszcillátor)
FRH	FRQ-interacting RNA helicase (FRQ-kel kölcsönható RNS helikáz)
FRQ	frequency protein (frequency fehérje)
FWD-1	F-box/WD-40 repeat containing protein (F-box/WD-40 ismétlődést tartalmazó fehérje)
GAP	guanin nucleotide activating protein (guanin nukleotid aktiváló fehérje)
GEF	guanine nucleotide exchange factor (guanin nukleotid kicserélő faktor)
GO	gene ontology (gén ontológia)
GSK	glycogen synthase kinase (glikogén-szintáz-kináz)
GST	glutathion-S-transferase (glutathion-S-transzferáz)
HRP	horseradish peroxidase (torma-peroxidáz)
IB	inclusion body (zárványtest)
IDP	intrinsically disordered protein (belsőleg rendezetlen fehérje)
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranozide (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid)
IRA	inhibitory regulator of the Ras/cAMP pathway (a RAS/cAMP útvonal gátló hatású szabályozója)
JNK	Jun N-terminal kinase (Jun amino-terminális kináz)
Kss1	Kinase-suppressor of Sst2 (az Sst2 kináz-szuppresszora)
laWCC	light activated WCC (fényaktivált WCC)
LB	Luria Bertani
LD	light-dark (fény-sötétség)

IFRQ	long FRQ (hosszú FRQ)
LL	light-light (állandó világos)
LOV-domain	light oxygen voltage sensing domain (fény oxigén feszültség érzékelő domén)
LRE	light-responsive element (fény-reszponzív elem)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogén-aktivált protein kináz)
MAK2	mitogen-activated protein kinase-2 (mitogén-aktivált proteinkináz 2)
N.S.	nonsignificant (nem szignifikáns)
O/N	over night (egy éjszakán át)
PBS	phosphate buffered saline (foszfát által pufferelt sóoldat)
PCR	polimerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PER	period (period fehérje)
PEST	proline-, glutamic acid-, aspartic acid-, serine- and threonine-rich sequence (prolinban, glutaminsavban, aszparaginsavban, szerinben és treoninban gazdag szekvencia)
PEX	protein extraction (fehérje feltáró)
PKA	protein kinase A (proteinkináz A)
PMSF	fenilmethansulfonil-fluoride (fenilmetánszulfonil-fluorid)
PP1	protein phosphatase 1 (protein foszfatáz 1)
PP2A	protein phosphatase 2A (protein foszfatáz 2A)
PP4	protein phosphatase 4 (protein foszfatáz 4)
PRD4	period 4 (period 4)
QA	quinic acid (kinasav)
RAB	RAS-associated binding protein (RAS-asszociált kötőfehérje)
RAN	RAS-related nuclear protein (RAS-hoz hasonló magi fehérje)
RAS	rat sarcoma virus (patkány szarkóma vírus)
RBD	RAS-binding domain (RAS-kötő domén)
RCO-1	regulator of conidiation 1 (konidizációt szabályozó fehérje 1)
REV-ERB	reverse strand of erythroblastosis oncoprotein (erythroblastosis oncoprotein fordított szála)
RGB-1	B regulatory subunit of type 2A protein phosphatase

	(proteinfoszfataz 2A B-típusú regulátoros alegysége)
RHO	RAS-homolog (RAS-homológ)
RIP	repeat induced point mutation (ismétlődés által indukált pontmutáció)
ROR	retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor (retinsav-receptorhoz hasonló árva magi receptor)
ROS	reactive oxygen species (reaktív oxigén származékok)
RT	room temperature (szobahő)
SDS	sodium-dodecyl-sulfate (nátrium-dodecil-szulfát)
sFRQ	short FRQ (rövid FRQ)
SDS-PAGE	sodium-dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (nátrium-dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)
SOD	superoxide-dismutase (szuperoxid-diszmutáz)
TBS	tris-buffered saline (tris által pufferelt sóoldat)
TEMED	tetramethylethylene-diamine (tetrametil-etilén-diamin)
TP	total protein (összfehérje)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane (tris-(hidroximetil)-aminometán)
TTFL	transcription translation feedback loop (transzkripció-transzlációs visszacsatolási hurok)
VVD	vivid protein (vivid fehérje)
WC-1	white collar 1 protein (white collar 1 fehérje)
WC-2	white collar 2 protein (white collar 2 fehérje)
WCC	white collar complex (white collar komplex)
ZT	Zeitgeber time (Zeitgeber idő)
8-Br-cAMP	8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-bromoadenozin 3',5'-ciklikus monofoszfát)

1. Bevezetés (irodalmi háttér)

A cirkadián ritmus egy endogén oszcillátor által vezérelt időmérő rendszer, amely lehetővé teszi az élőlények számára, hogy élettani működéseiket a környezet ciklikusan változó tényezőihez igazítsák. A ritmusos működés pontos beállítását számos szinkronizáló hatás segíti, melyek közül az egyik legfontosabb a tápanyagkínálat. A molekuláris oszcillátor ugyanakkor eltérő szubsztrátszintek mellett is közel állandó sebességgel működik (1), biztosítva ezzel a 24 órához közeli periódust. A metabolikus változások hatásainak kompenzálása tehát alapvető követelménye a változó tápanyagkínálat mellett működő robusztus ritmusnak. Ha a ritmus zavart szenved (pl.: váltott műszakban történő munkavégzés, vagy ún. szociális jetlag esetén), olyan patológiás folyamatok indulhatnak el, melyek számos népbetegség —köztük a metabolikus zavarra visszavezethető obesitas és a kettes típusú diabetes mellitus— kialakulásához vezethetnek (2-4). A metabolizmus és a cirkadián ritmus folyamatai kölcsönösen hatnak egymásra, evolúciós előnyt biztosítva mindazon élőlények számára, melyekben e két rendszer összehangoltan működik. A metabolizmus és a cirkadián óraműködés közötti kapcsolat fontosságát egyre több klinikai és kísérletes adat támasztja alá, azonban a kölcsönhatás pontos mechanizmusa máig nem teljesen feltérképezett (5).

Az azonban ismert, hogy a sejteknek a metabolikus környezet változásaira adott reakcióiban a RAS-mediálta jelátvitel központi szerepet tölt be. Továbbá, a legtöbb élőlényben megtalálhatók különböző RAS izoformák, melyek számos, a cirkadián ritmussal és a metabolizmussal is összefüggésbe hozható folyamatban játszanak szerepet (6-11). Emellett kísérletes és bioinformatikai adatok is alátámasztják, hogy az onkogén RAS fehérjék kiemelt jelentőséggel bírnak a rákos sejtek cirkadián ritmuszavarának kialakulásában (12).

A génekészlet egy meghatározó hányadának expressziója a cirkadián ritmus szabályozása alatt áll. Ez teszi lehetővé a sejtfunkciók ritmusos működését, és egyben elősegíti a változó környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodást is. Arról azonban kevés adat áll rendelkezésre, hogy a molekuláris óra hogyan reagál azokra a kihívásokra, amelyeket e tényezők szélsőséges mértékű megváltozása, mint például a hosszabb ideig tartó tápanyaghiány idéz elő.

Munkám során a *Neurospora crassa* cirkadián modellszervezetben vizsgáltam a RAS2 fehérjének a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában betöltött szerepét, valamint a molekuláris óra komponenseinek és így a cirkadián időmérésnek a hosszan tartó glükózmegvonáshoz történő alkalmazkodásban betöltött szerepét.

1.1. A cirkadián ritmus

Az élő szervezetek legtöbb biokémiai folyamata valamilyen meghatározott ritmus szerint zajlik. A ritmusos folyamatok egy része a Föld forgásának következményeként ciklikusan változó környezeti tényezőkhez való alkalmazkodás nyomán alakult ki (13). Ezen folyamatok szabályozásáért felel a cirkadián ritmus, amely egy sejtszintű endogén oszcillátor által vezérelt időmérő rendszer. Ez a belső időmérő rendszer számos gén ritmusos kifejeződésének szabályozása által lehetővé teszi, hogy az organizmus életműködése már a környezeti feltételek megváltozása előtt úgy módosuljon, hogy az a változásra fel tudjon készülni, így elősegítve a hatékonyabb alkalmazkodást. A jobb alkalmazkodóképesség pedig evolúciós előnyt jelent. Ennek következtében az óramechanizmus minden filogenetikai szinten jelen van (13, 14). Az óraműködés lehetővé teszi a hatékonyabb energiafelhasználást azáltal, hogy hozzájárul az anabolikus és katabolikus folyamatok időbeli elkülönítéséhez (15). Emberben cirkadián oszcillációt mutat többek között bizonyos hormonok szintje (pl. kortizol vagy melatonin), a testhőmérséklet, a vérnyomás vagy a szívfrekvencia (16).

Az egyik legfontosabb ritmusosan változó környezeti tényező a fény, és ennek megfelelően az egyik legfontosabb természetes ritmus a nappalok és éjszakák szabályos váltakozásához illeszkedő napi ritmus (17, 18). Cirkadián ritmusnak a hozzávetőlegesen 24 órás periódussal bíró, környezeti hatások segítsége nélkül is önfenntartó biológiai ritmusokat hívhatjuk (19, 20). A cirkadián ritmus meghatározó tulajdonsága továbbá, hogy periódusa a külső, természetes vagy mesterséges környezet által diktált jelekhez (Zeitgeber-ekhez) igazodik, fázisa pedig átállítható (20-22). Természetes környezetben az óra periódusa a Föld forgásának következtében 24 órára szinkronizálódik. A legjelentősebb hatással bíró Zeitgeber-ek a fény mellett a hőmérséklet és a tápanyagkínálat (23). A cirkadián ritmus definíciójának további kritériuma, hogy a ritmus állandó körülmények között is fennmaradjon. Ilyenkor „szabadon futó” ritmusról beszélhetünk, amelynek periódusa szintén cirkadián, azaz megközelítőleg 24 óra.

(Emberben ez az érték 25, egérben 23, *Neurospora crassa*-ban pedig 22,5 óra körül mozog. (21, 22)) A cirkadián ritmus a tápanyagellátás, valamint a környezet hőmérsékleti változásai ellenére is közel azonos periódussal működik, képes kompenzálni e hatásokat (23).

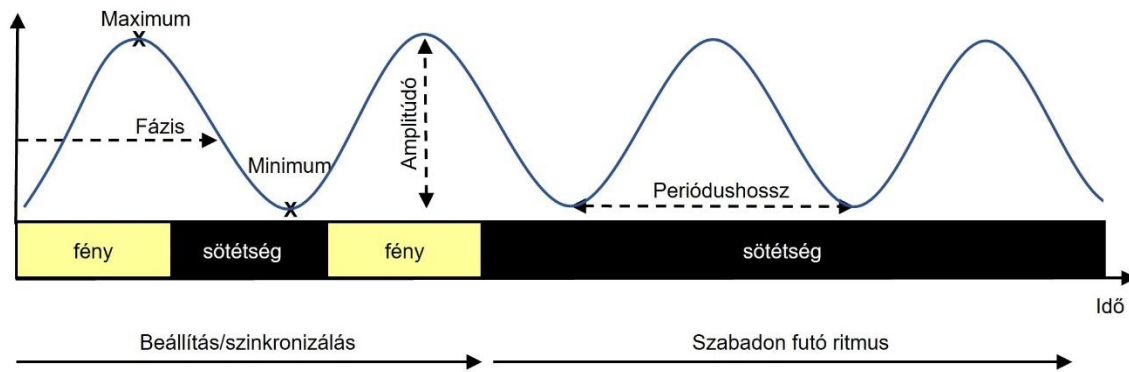
1.1.1. A cirkadián ritmus legfontosabb paraméterei

A ritmusosan változó környezeti faktorok élőlényekre gyakorolt hatását, valamint a ritmus és az időmérő rendszer működési mechanizmusát a kronobiológia nevű tudományág vizsgálja (13). Az alábbiakban a kronobiológiában használatos legfontosabb fogalmak kerülnek bemutatásra, melyeket az 1. ábra szemléltet.

Biológiai ritmusnak tekinthetünk bármely, az élő rendszerben lejátszódó folyamatot, mely többnyire szinuszgörbével közelíthető ritmikus ismétlődést mutat. Periódusuk alapján megkülönböztethetünk ultradián (24 óránál rövidebb), cirkadián (megközelítőleg 24 óra hosszú) és infradián (24 óránál hosszabb) ritmusokat (24).

Egy adott vizsgálati paraméter oszcillációjának legfontosabb jellemzői a periódus, a fázis és az amplitúdó. A periódus (τ) az egy teljes ciklus alatt eltelt időt adja meg. A fázis (Φ) megmutatja, hogy egy tetszőleges kiindulóponthoz képest a cirkadián cikluson belül hol tartózkodik a rendszer. Külső tényező hatására a fázis „késhe”, vagy „siethe” a referencia értékhez képest. A vizsgált paraméter minimum („nadír”) és maximum („zenit”) értéke közötti különbséget az amplitúdó adja meg (23, 25).

A ritmus analízise szempontjából két alapvető folyamatot különböztethetünk meg: vagy a szervezet belső, ún. „free run”, vagyis szabadon futó ritmusát vizsgáljuk, amelyet állandó körülmények mellett figyelhetünk meg, vagy pedig változó (mesterségesen beállított, vagy természetes) körülmények között az ún. „entrained”, azaz beállított ritmust vizsgáljuk (23). Az első esetben a cirkadián időmérést az ún. cirkadián idővel (circadian time - CT) jellemezzük. A CT0-tól CT12-ig terjedő időszak a szubjektív nappal, a CT12-től CT24-ig tartó időszak pedig a szubjektív éjszaka (23, 25).



1. ábra: A cirkadián ritmus jellemző paramétereit. Az ábrán egy tetszőleges vizsgálati paraméter idő függvényében történő változása látható, melyen a cirkadián ritmust jellemző legfontosabb fogalmak kerültek bemutatásra. Az időtengelyen a beállító szakasz során a mesterséges fény-sötétség ciklusok láthatók, majd ezt követően az élőlény belső órája által szabályozott szabadon futó ritmus látható, ahol már a szubjektív időmérés érvényesül.

A cirkadián ritmusok vizsgálata során rendkívül fontos szerepe van a „Zeitgeber”-eknek, azoknak a környezeti faktoroknak, melyek lehetővé teszik a ritmus környezettel való szinkronizálását (23). A ritmus beállítását, környezeti faktorokhoz történő igazítását „entrainment”-nek nevezik, melynek során a szubjektív idő (az élőlény belső ideje) az objektív időhöz (a külső környezet által meghatározott időhöz) igazodik. Ez a folyamat gyakran a ritmus fázisának megváltozásával jár és ez teszi lehetővé az élőlény számára a külvilág változásaihoz történő alkalmazkodást (23). Változó körülmények között vizsgált ritmus esetén az órát átállító utolsó hatást, jellemzően fény vagy hőmérsékleti változást követően eltelt időt Zeitgeber időnek (Zeitgeber time - ZT) nevezzük (23, 25). Konceptió szerint a fény-ciklus kezdetének vagy a hőmérséklet megemelése időpontját jelöljük ZT0 időponttal, és a ZT0-hoz viszonyítva adjuk meg a fázis értékét.

1.2. A molekuláris oszcillátor

Az eukarióta szervezetekben zajló folyamatok ritmusát egy központi időmérő rendszer, az ún. „molekuláris oszcillátor” vezérli. A molekuláris oszcillátort egymással kölcsönhatásban álló pozitív és negatív visszacsatolású hurkok hálózata alkotja, melynek központjában egy vagy több óraféherje ritmikus expressziója áll. Az endogén oszcillátor bemenetét a fent említett Zeitgeber-ek képezik, kimenetét pedig valamilyen mérhető ritmusos paraméter (pl.: hormonszint, testhőmérséklet vagy spóráképzés (21, 26-28)).

A cirkadián ritmus belső időmérő mechanizmusát elsőként *Drosophila melanogaster* modellen írták le: Michael Rosbash és Jeffrey Hall 1988-ban közölte elméletét a negatív visszacsatolású transzkripció-transzlációs hurok (transcription translation feedback loop - TTFL) működéséről, valamint azonosította a fő oszcillátor fehérjét. Miután bebizonyosodott, hogy a legtöbb magvas sejt cirkadián időmérésének hasonló az alapmechanizmusa, felfedezésükért 2017-ben Michael Young-gal közösen Nobel-díjban részesültek.

A molekuláris oszcillátor hatékony működését a transzkripció-transzlációs negatív visszacsatolású hurkok mellett számos szabályozó fehérje segíti (13). Az önfenntartó TTFL fő komponensei a pozitív és negatív faktorok. A pozitív faktor elősegíti a negatív faktor (oszcillátor fehérje) génjének transzkripcióját, majd a transzlációt követően a negatív faktor mennyisége folyamatosan növekszik. Amikor elér egy meghatározott szintet, a pozitív faktorra gyakorolt gátló hatása érvényesülni kezd, ezzel együtt pedig saját transzkripciójának aktivációja csökken. Ennek következtében bizonyos idő elteltével nem képződik több negatív faktor, bomlása azonban folyamatos, így amint szintje elér egy alsó küszöböt, a pozitív faktor felszabadul a gátlás alól, és a ciklus kezdődik előlről (13). A két aktiváció között eltelt idő megközelítőleg 24 óra.

A molekuláris oszcillátor működési mechanizmusának megértéséhez nagyban hozzájárultak a *Drosophila melanogaster*-en és az általunk is modellként alkalmazott *Neurospora crassa* fonalas gombán végzett genetikai és molekuláris biológiai vizsgálatok.

1.3. *Neurospora crassa*, a cirkadián ritmus modellorganizmusa

A cirkadián ritmus, valamint a metabolizmus kulcsfolyamatai az élővilágban nagyfokú konzerváltságot mutatnak (25), munkánk során ezért modellorganizmusként az egyik legalaposabban jellemzett molekuláris órával rendelkező szervezetet (20, 21, 29-33), a *Neurospora crassa* fonalas gombát választottuk (2. ábra).



2. ábra: *Neurospora crassa* szilárd táptalajon tenyésztve. Az ábrán a *N. crassa* vad típusának (*wt*) állandó világosban, szilárd táptalajon tenyésztett kultúrája látható.

Az *Ascomycota* törzsbe tartozó vörös kenyérpenész színét karotinoid tartalmának köszönheti, melynek szintje fény vagy egyéb stresszhatásra megemelkedik, ezzel antioxidáns védőfunkciót biztosítva a gombának. Nevét („*Neurospora*”) az aszkospórák felszínén található, neuronokra hasonlító barázdáltságáról kapta. A természetben trópusi és szubtrópusi régiókban fordul elő (34). Számos előnyös tulajdonsága lehetővé tette, hogy a kronobiológia kedvelt eszközevé váljon már a cirkadián ritmus kutatásának hajnalán, a XX. század második felétől kezdődően (35-37). A cirkadián vizsgálatok mellett az „egy gén-egy enzim” elmélet kidolgozása során is fontos modell volt, továbbá számos új epigenetikai és genetikai géncsendesítési folyamat megismerésében is szerepet játszott (35, 38, 39). Edward Tatum és George Well Beadle munkáját 1958-ban fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjjal ismerték el (35). A teljes *N. crassa* genom 2003 óta ismert (40), melynek komplexitása a *Drosophila* modellével mérhető össze (29, 41).

A *N. crassa* előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy nem patogén, fenntartásának nincsenek speciális követelményei, így költséghatékonyan és gyorsan tenyészthető (34). Transzformációja rendkívül hatékony (29), új génhianyos törzsek megfelelő technika alkalmazásával hetek alatt létrehozhatók (42) és a legtöbb molekuláris biológiai módszer is nagy hatékonysággal alkalmazható a vele való munka során (29, 43, 44). Mivel életciklusának nagy része haploid, a genetikai analízisek kivitelezése is egyszerűbb, hiszen a recesszív tulajdonság megjelenik az utódokban, így a genotípus és fenotípus közötti összefüggés közvetlenül vizsgálható. Életciklusának vegetatív és ivaros ciklusában számos eltérő sejttípus differenciálódik, ezek jellegzetes változatai

megfigyelhetők a morfológiai mutánsokban. Különböző gyűjteményekben csaknem tízezer törzs férhető hozzá a kutatócsoportok számára (40, 45).

A *N. crassa* életciklusa nagy részében haploid. A haploid vegetatív spórából germinációt követően kialakul a hifákból álló vegetatív micélium. A vegetatív micéliumok kétféle vegetatív spórát (konídiumot) képezhetnek, a többmagvú makrokonídiumot, amely légmicéliumokból alakul ki és az egymagvú mikrokonídiumot. Mindkét típusú vegetatív szaporítóképlet képes szétszóródni és a vegetatív ciklust megismételni. Az ivaros szaporodáshoz különböző ivarú (mating type) kolóniákra van szükség. A nőivarú reproduktív képletek az ún. protoperitéciumok, a hímivarú képletek pedig lehetnek mikro- vagy makrokonídiumok, illetve hifák. A különböző ivarú képletek találkozását követően a sejtmagok összeolvadnak, diploid zigótát alkotva meiotikusan majd mitotikusan osztódnak, így a protoperitéciumból kialakult termőtestben (peritéciumban) létrejön a haploid aszkospóra. Az aszkuszokban található aszkospórák germinációt követően micéliumot, ezzel pedig egy új telepet képeznek (46).

Bizonyos hatásokra a micélium légmicéliumokat képezhet, amelyek ivartalan spórákká, ún. makrokonídiumokká szegmentálódnak. E konídiumok jellegzetes élénk narancssárga színűek karotinoid pigment tartalmuk miatt, és erősen hidrofóbok (21). Ez a konídiumtermelési folyamat napi szinten szabályozott és intenzitása közvetlenül hajnal előtt maximális. A *N. crassa* konidizációs ritmusa, vagyis az időben ritmikus vegetatív spóráképzése, és annak analízise játszott igazán jelentős szerepet abban, hogy a *N. crassa* a cirkadián kutatások egyik kiemelkedő modelljévé váljon (20, 29, 47, 48). E módszer segítségével azonosították a központi órakomponensek többségét, és a legtöbb cirkadián ritmus mögött álló alapmechanizmus megértéséhez is nagymértékben hozzájárult (21). A folyamat monitorozása az ún. „race tube” vagy „futtatócsöves” kísérletek során lehetővé teszi továbbá a genetikai módosítások vagy farmakológiai manipulációk cirkadián oszcillátor kimenetére gyakorolt hatásának tanulmányozását (20, 29, 48). (Anyagok és Módszerek fejezet 5.3.1. alfejezet) A kísérlet nagy előnye, hogy a konidizáció, vagyis a ritmus kimenete a legtöbb esetben szabad szemmel is megfigyelhető. Erre leginkább a RAS-1 aktiváló mutációját hordozó *bd* (band) törzs alkalmas (48-50), amely nevét éppen a naponta keletkező konídiumcsomók által a futtatócsövön létrehozott sávokról kapta. A kronobiológiai kísérletek során ezért gyakran *bd* háttérben hozzák létre az új törzseket (20). Nemcsak *bd* háttérben jöhet létre azonban ritmikus konidizáció, hanem a táptalajhoz

adott specifikus komponensek, így például a ROS (Reactive Oxygen Species – Reaktív Oxigén Származékok) termelését elősegítő menadion vagy H_2O_2 hatására is (50). Szemmel látható konidizáció hiányában is működhet az endogén oszcillátor, erre bizonyíték az óragének és az azokról kifejeződő fehérjék ritmikus expressziója (50).

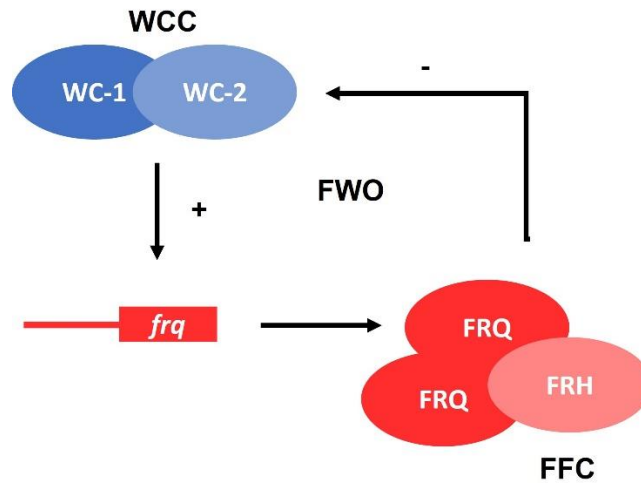
A ritmus követésének másik kedvelt eszköze a luciferáz riporter rendszer, melynek segítségével nagy áteresztőképességgel (high throughput) vizsgálható valós időben a promóter aktivitás és az óra által szabályozott gének (*ccg* – clock-controlled genes) expressziója (18, 44, 51-53).

Munkánk során a *N. crassa*-t modellorganizmusként alkalmazva arra törekedtünk, hogy megértsük, hogyan is működik együtt a komplex expressziós rendszerek időbeli szabályozását lehetővé tevő cirkadián ritmus és a metabolizmus.

1.4. A *Neurospora crassa* cirkadián oszcillátora

A *N. crassa* cirkadián oszcillátorát 1959-ben fedezték fel: Pittendrigh és munkatársai a vegetatív spóráképzésben időfüggő mintázatokat figyeltek meg (13, 47). A konidizációs ritmusról később megállapították, hogy egyike a cirkadián ritmus által szabályozott kimeneti paramétereknek. Az első felfedezés óta eltelt időben a *N. crassa* molekuláris oszcillátora vált az egyik legalaposabban jellemzett molekuláris órává (21, 54). A cirkadián oszcillátor működésének alapja a *N. crassa* esetében is egy önszabályozó transzkripciós-transzlációs negatív visszacsatolású hurok. A *N. crassa* órájának központi pozitív eleme a White Collar-1 (WC-1) és White Collar-2 (WC-2) GATA-típusú transzkripciós faktorokból álló heterodimer White Collar Complex (WCC) (32, 55), legfontosabb negatív eleme pedig a Frequency (FRQ) fehérje. Mivel az óra pozitív és negatív faktorának szabályozását elsősorban a foszforiláció teszi lehetővé, az oszcillátor további fontos szabályozói a kinázok és foszfatázok, valamint az exoszóma komponensek és a kromatin státuszt szabályozó faktorok (56-61). A FRQ és a White Collar fehérjék által létrehozott önszabályozó rendszer a FRQ-White Collar Oszcillátor (FWO) (3. ábra), amelynek működése számos magasabb rendű eukarióta szervezet oszcillátorával homológ, ami lehetővé tette a *N. crassa* cirkadián modellorganizmusként történő alkalmazását (32). A molekuláris oszcillátor bemeneti paraméterei jellemzően a környezeti faktorok, amelyek segítik annak pontos beállítását, kimeneti paraméterei pedig

a ritmusos élettani folyamatok, melyek szabályozása többek között a *ccg*-k expressziójának WC-1 általi szabályozásán keresztül történik.



3. ábra: A *N. crassa* központi oszcillátorának sematikus modellje. Az óra pozitív faktora a WC-1 (white collar 1) és a WC-2 (white collar 2) transzkripciósfaktorokból álló WCC (white collar complex). A WC-1 elősegíti az óra negatív faktora, a FRQ (frequency) transzkripcióját. Transzlációt követően a FRQ önmagával és az FRH-val (FRQ-interacting RNA helicase) komplexet képez (FFC – FRQ-FRH complex), amely elősegíti a WCC gátlását annak foszforilációján keresztül. A WCC gátlása az új FRQ-szintézis gátlását eredményezi, a meglévő FRQ alakok pedig a nap előrehaladtával fokozatosan bomlanak. Amikor a FRQ szintje egy kritikus szint alá csökken, a WCC felszabadul a gátlás alól és a körülbelül 22,5 órás ciklus előlről kezdődik.

Fény hatására, vagy változó körülmények között a WCC a *frq* gén promóterén található ún. „Clock-box”-hoz (C-box) kötődve aktiválja annak átírását (62-64). A FRQ fehérje expressziója a szubjektív éjszaka folyamán nő, majd önmagával és a FRQ-et stabilizáló FRH-val (FRQ-interacting RNA helicase – FRQ-vel kölcsönható RNS helikáz) kapcsolódva megalkotja az FFC-t (FRQ-FRH komplex) (57, 65). A *frq* RNS szintje a szubjektív reggel során a legmagasabb, a fehérje szintje azonban késleltetve, mintegy 4-6 óra elteltével éri csak el a maximális értéket (66). A transzkripció és transzláció közötti késés pontos mechanizmusa nem ismert, azonban valószínűsíthetően komplex szabályozás eredménye, ugyanis fényindukció során ez az időtartam egy órára csökken (67). A szubjektív nappal során az FFC átmenetileg kölcsönhat a WCC-szel a sejtmagban

és foszforilációját elősegítve inaktíválja azt. Az inaktív WCC a magot elhagyva átmenetileg a citoszolban dúsul fel (53, 68). A hiperfoszforilált WCC kevésbé kötődik a C-boxhoz, így ekkor a *frq* RNS és a FRQ protein szintézise is gátolt. A nap folyamán a FRQ számos foszforilációs lépésen megy keresztül, a szubjektív este során egyre inkább hiperfoszforilálttá válik. A FRQ foszforilációjában kiemelt szerepe van a CKIa-nak (casein kinase Ia – kazein kináz Ia), mellyel a fehérje a többi kinázzal ellentétben egy stabil komplexet képez a FRQ-CKIa interakciós doméneken (FCD) keresztül (69). A citoszolikus hiperfoszforilált FRQ elősegíti az inaktív WCC feldúsulását a citoszolban. A nap előrehaladtával a FRQ CKIa-val alkotott kölcsönhatása megszűnik (70-72), majd a szubjektív éjszaka során kölcsönhatásba lép az ubikvitin ligáz FWD-1-gyel (F-box/WD-40 repeat containing protein - F-box/WD-40 ismétlődést tartalmazó fehérje), amely elősegíti a fehérje ubikvitinációját és proteoszóma útvonalon keresztüli lebontását (73, 74). Miután a FRQ szintje a sejtmagban ismét alacsony lesz, a negatív visszacsatolás megszűnik, a WCC felszabadul a gátlás alól, az aktív alakok belépnek a sejtmagba és a ciklus ismét előlről kezdődik. Ez az önszabályozó negatív visszacsatolású hurkon alapuló mechanizmus a transzkripció és a transláció precíz időzítésével, az összetett poszttranszlációs módosításokkal és az egyes komponensek különböző sejtalkotókban való lokalizációjával teszi lehetővé a WCC aktivitás, valamint a *frq* RNS és fehérjeszintek cirkadián (~22 órás) oszcillációját (70-72, 75). A WC-1 fehérje pedig azon túl, hogy a FRQ transzkripcióját szabályozza, elősegíti a *ccg*-k átírását is, amelyek a kimeneti paraméterek ritmikus működését eredményezik.

A fő TTFL-on kívül számos aloszcillátor rendszert is leírtak a *N. crassa* cirkadián ritmusával kapcsolatban: a citoszolikus FRQ elősegíti a WC-1 mennyiségének stabilitását és a WC-2 transzkripcióját. Ez egy, a negatív visszacsatolású hurokkal kapcsolatban álló pozitív visszacsatolású hurkot alkot, amely a negatív visszacsatoláshoz képest 6-12 óra különbséggel működik (62, 71, 76). Ebből következik, hogy a WC-1-szintekben megjelenő ritmicitás a FRQ általi szabályozás eredménye (30, 77). A FRQ és a WC-1 kölcsönhatása, valamint minden további aloszcilláció a rendszer robusztusságának fenntartása miatt fontos. A WC-1 továbbá saját expresszióját is támogatja transzkripciós szinten (78, 79), valamint negatívan befolyásolja a WC-2 expresszióját, a WC-1 ugyanakkor nem stabil a WC-2 hiányában (80, 81).

A FWO alkotók valamelyikét nem kifejező mutáns törzsekben is leírtak ritmikus viselkedést, ami arra enged következtetni, hogy léteznek további, FRQ-nélküli oszcillátor (FRQ-less oscillator - FLO) rendszerek is *N. crassa*-ban (66, 82). A FLO rendszerekkel kapcsolatban konidizációs (59, 66, 83, 84, 97), molekuláris és biokémiai ritmust (85-89) is leírtak, melyek során a periódus jellemzően cirkadián tartományban mozgott. Ezek a ritmikus működések azonban jellemzően csak valamilyen speciális táptalaj-összetétel (pl. farnezollal, geraniollal, koffeinnel vagy menadionnal történő kiegészítés (90, 91)), vagy mutáció mellett (91-94) vizsgálhatók, és a cirkadián ritmus definíciójának kritériumait sem teljesítik minden esetben, ugyanis számos FLO nem mutat hőmérsékleti kompenzációt, vagy nem vizsgálták ennek a mechanizmusnak a jelenlétét. A FLO-k molekuláris működéséről jelenleg még keveset tudunk, eddig többek között a *prd-1*, *prd-2* és *UV90* (95, 96) gének termékeit írták le lehetséges FLO komponensekként.

A molekuláris oszcillátor az emlős rendszerekben is a *N. crassa*-ban megfigyeltekhez hasonlóan működik. Az oszcillátor pozitív komplexe a CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput - cirkadián mozgásszervi kimeneti ciklusokat szabályozó fehérje) és BMAL1 (brain and muscle arnt-like protein-1 - agy és izom eredetű arnt-szerű fehérje-1) fehérjékből álló heterodimer, mely transzkripció faktor tulajdonsága révén elősegíti a negatív faktorok (PER (period) és CRY (cryptochrome)) expresszióját (29, 30). Egy másik szabályozó körben a CLOCK/BMAL1 komplex elősegíti a Rev-Erb (reverse strand of erythroblastosis oncoprotein - erythroblastosis oncoprotein fordított szála) és ROR (retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor - retinsav-receptorhoz hasonló árva magi receptor) magreceptorok expresszióját, amelyek visszahatnak (a Rev-Erb gátló, a ROR serkentő (31, 32) módon) a pozitív faktorra. Emlős rendszerekben, így emberben is hierarchikus az óraműködés: a szuprakiazmatikus magban található a szervezet központi órája és az egyes szervekben, szervrendszerekben úgynevezett perifériás órák működnek.

1.4.1. A *Neurospora* cirkadián oszcillátorának elemei

1.4.1.1. Az óra pozitív faktora, a white collar komplex (WCC)

A white collar komplex alkotói a WC-1 és a WC-2 fehérjék. A WC-1 fehérjét először az 1960-as években írták le. A fehérje nevét a WC-1 hiányos törzs fenotípusáról kapta, melynek micéliuma fehér, konídiuma viszont normális pigmentációt mutat (97). A WC-

1 és a WC-2 PAS domént tartalmazó transzkripciós faktorok (98), melyek a sejtmagban találhatóak (99, 100). A PAS-domént először a *Drosophila* period (PER) óraféhrjében, egy emlős transzlokátorban (ARNT), valamint a *Drosophila* „single-minded“ (SIM) fehérjében írták le. Az egyes fehérjék kezdőbetűiből alkották meg a mozaikszót (101, 102). A PAS-domének az órakomponensek más fehérjékkel való kapcsolódását teszik lehetővé (13, 103).

A WC-1 fehérje, a WCC limitáló komponense 1167 aminosavból áll, 3 PAS domént tartalmaz, míg a WC-2 530 aminosavból áll és egy PAS-domént tartalmaz (99, 100). A PAS doméneken kívül GATA típusú, „cink ujj“ DNS-kötő helyeket felismerő domének is megtalálhatóak a WC fehérjék egyes génszakaszain. A két fehérje struktúrája közel 50%-ban, szekvenciájuk pedig 26%-ban azonos (30). A két fehérje közötti kapcsolat a WC-1 PASC doménjén, valamint a WC-2 PAS doménjén keresztül jön létre (80, 81).

A cirkadián ciklus során az inaktív WCC a citoszolban defoszforilálódik, majd bejut a sejtmagba. Ott aktiválja a *frq* transzkripcióját, majd foszforilálódik, és visszakerül a citoplazmába (53, 104). A fehérjék FRQ-függő foszforilációját a kazein-kináz-1a (CK-Ia), valamint a kazein-kináz-II (CK-II) (73) végzi, defoszforilációjáért pedig a protein foszfatáz-2A (PP2A) és a protein foszfatáz-4 (PP4) felel a citoszolban. A PP4 általi defoszforiláció elősegíti a komplex sejtmagba való bejutását (30), a PP2A általi defoszforiláció pedig fokozza annak aktivitását (105).

A WC-1 fehérje különlegessége, hogy kék fény érzékelésére képes fotoreceptorként is működik, ezért az óra fény stimulusra adott válaszában igen fontos szerepet tölt be (99, 106). LOV doménje (Light Oxygen Voltage sensing domain – fény oxigén feszültség érzékelő domén) a FAD (flavin-adenin-dinukleotid) kromofórhoz kötődik, amely a kék tartományban (450nm) mutat maximális elnyelést (107) és képes a fényenergiát kémiai energiává alakítani (100, 106).

1.4.1.2. Az óra negatív faktora, a frequency fehérje (FRQ)

A *frq* mutáns törzsek fenotípusát 1973-ban írta le Feldman és Hoyle (48). A fehérjét először Dunlap és munkatársai klónozták 1986-ban, majd felfedezték, hogy expressziója ciklikusan oszcillál (108-110). Többek között ez a felfedezés is hozzájárult a *N. crassa* cirkadián órája iránti megnövekedett érdeklődés kialakulásához (66, 110).

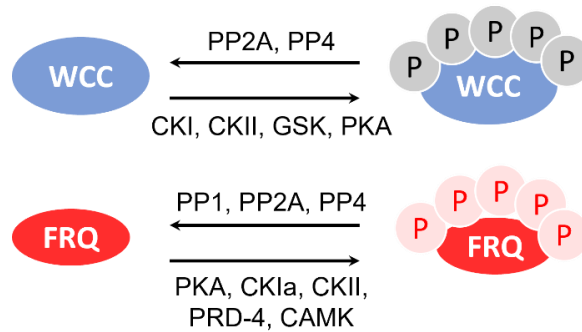
A FRQ fehérje egy foszfoprotein, legfontosabb szerepe a cirkadián oszcillátorban a WCC aktivitásának szabályozása (65, 77, 111), mellyel ön maga termelődésére is hat (64, 98). A foszforiláció, mint poszttranszlációs módosítás a *N. crassa* molekuláris oszcillátorának egyik kulcseleme az óra pontos működésének kialakításában (75, 112, 113). Az óraféhrjék közül a jelenleg ismert modell szerint a FRQ foszforilációjának szabályozása a legkomplexebb (75, 112), több, mint 100 szerin és threonin oldalláncon foszforilálódhat (70, 112, 113).

A FRQ fehérje szerkezetét tekintve IDP (intrinsically disordered protein – belsőleg rendezetlen fehérje) (23), tehát nincs stabil harmadlagos szerkezete, a pontos konformáció kialakításáért a nap folyamán meghatározott időzítés szerint folyamatosan változó poszttranszlációs módosulások felelnek (70). Ez a precízen szabályozott mechanizmus lehetővé teszi többek között azt is, hogy a FRQ napszaktól függően más és más interakciós partnerrel lépjen kölcsönhatásba (112).

A foszforiláció befolyásolja a fehérje aktivitását: hipofoszforilált formája aktív a negatív visszacsatolásban a sejtmagban, hiperfoszforilált alakja pedig a citoszolban a WCC-et inaktív formában stabilizálja (75, 114). A FRQ foszforilációját szabályozó egyik fontos komponens a CKIa, amely az FFC-hez kötődve foszforilálja a FRQ-et, ezáltal csökkentve annak magi akkumulációját és elősegítve ubikvitinációját, majd a proteoszóma útvonalon keresztüli bomlását (115). A CKIa mellett a CKII is foszforilálja a FRQ-et (60, 116), ez a kölcsönhatás azonban kevésbé ismert, feltételezhető, hogy a CKII által végzett foszforilációs lépések a hőmérsékleti kompenzáció során játszanak fontos szerepet (59) (116). A kazein-kinázokon kívül leírták a PKA (protein kinase A – protein kináz A) (117), a ckeckpoint kináz 2 homológ PRD-4 (period-4), és a CAMK-1 (calcium/calmodulin-dependent kinase – kalcium/kalmodulin-dependens kináz) (118) FRQ szabályozásban betöltött szerepét is. A kinázok elsődleges célpontjai többek között az ún. PEST-domének (57). A FRQ defoszforilációjában a PP1 (protein phosphatase 1 – protein foszfatáz 1), a PP2A és a PP4 játszanak szerepet (30, 57, 65, 74, 119).

A FRQ szerkezetét tekintve fontos szerepe van még az N-terminálison található CC (coiled-coil - tekercselt tekercs) régiónak, amely a homodimer képződésben játszik szerepet (33, 62). A FRQ fehérje továbbá a cirkadián ritmus hőmérsékleti kompenzációjában is központi szerepet játszik (120-122).

A központi órakomponensek legfontosabb szabályozóit a 4. ábra foglalja össze.



4. ábra: A központi órakomponensek és legfontosabb szabályozóik. A pozitív (WCC) és a negatív (FRQ) faktor aktivitását foszforilációs állapotuk nagyban befolyásolja. A WCC foszforilációjáért elsősorban a CKI (casein kinase I - kazein-kináz I), CKII (casein kinase II - kazein-kináz II), GSK (glycogen synthase kinase - glikogén-szintáz-kináz) és PKA (protein kinase A – proteinkináz A), defoszforilációjáért pedig a PP2A (protein phosphatase 2A – proteinfoszfátáz 2A) és a PP4 (protein phosphatase 4 – proteinfoszfátáz 4) felelnek. A FRQ foszforilációját elsősorban a PKA, CKIa, CKII, PRD-4 (period-4) és CAMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase - kalcium/kalmodulin-dependens protein kináz), defoszforilációját pedig a PP1 (protein phosphatase 1 – proteinfoszfátáz 1), PP2A és PP4 enzimek végzik.

1.4.2. A fény hatása a *N. crassa* oszcillátorának működésére

A cirkadián ritmus egyik legfontosabb Zeitgeber-e a fény. Állandó világosban nem jár az óra, egyensúlyi állapotban van. Állandó sötétben az endogén oszcillátor határozza meg a periódust, míg fény-sötétség ciklusokban (LD-ben) úgy módosul az óra működése, hogy a periódust a külső körülmények állítják be.

Az óra fény általi átállításának molekuláris alapja *N. crassa*-ban a *frq* fényindukált transzkripciója, amely a fázis előretolódásához vagy késéséhez is vezethet (73). Amikor a szubjektív éjszaka során érkezik a fényhatás, a *frq*-szint relatív korai emelkedése az óra fázisának előretolódását okozza, azaz az óra egy későbbi időpontra megfelelő működésre áll át. Ezzel szemben, ha a fény a szubjektív alkonyat táján éri az órát, amikor a *frq*-szintek már csökkennek, a *frq* expresszió fény-indukált növekedése visszaállítja az órát egy korábbi időpontra, vagyis az oszcillátor késleltetve lesz (21, 98). A *frq*

fényindukciójának alapja a promóterében található két fény-reszponzív elem (light-responsive element - LRE), amelyekhez képes kapcsolódni a WCC (106).

A *N. crassa* fő fotoreceptora a kék fényre érzékeny WC-1 (81, 106), amely LOV doménjéhez kapcsoltn FAD-ot tartalmaz kromofórként. Fény hatására a kromofór kovelensen köt a LOV doménhez és egy nagyméretű fotoaktivált WCC (laWCC – light activated WCC – fényaktivált WCC) hiperkomplex képződik (81, 123), amely elősegíti több LRE-t tartalmazó gén, így a *frq* és önmaga (*wc-1*) transzkripcióját is (32, 99, 100, 111, 124-130), és így megtörténik a fényhatás cirkadián oszcillátorra történő átvitele, ami fázismódosító hatású lehet. Ez a folyamat a WC-1-szintje szempontjából is lényeges, mert biztosítja a fényaktiváció során (részben a FRQ hatására) instabillá váló WC-1 pótlását (131). A WC-1 sokkal gyorsabb turnover-t mutat világosban, mint sötétben, - egyrészt a fényaktivált és hiperfoszforilált WC-1 gyorsabban bomlik (76, 103), másrészt a *wc-1* fényindukciója hozzájárul a WC-1 készlet gyors feltöltéséhez. Mindezen folyamatok biztosítják, hogy a WC-1-szintek stabilak maradjanak állandó világosban.

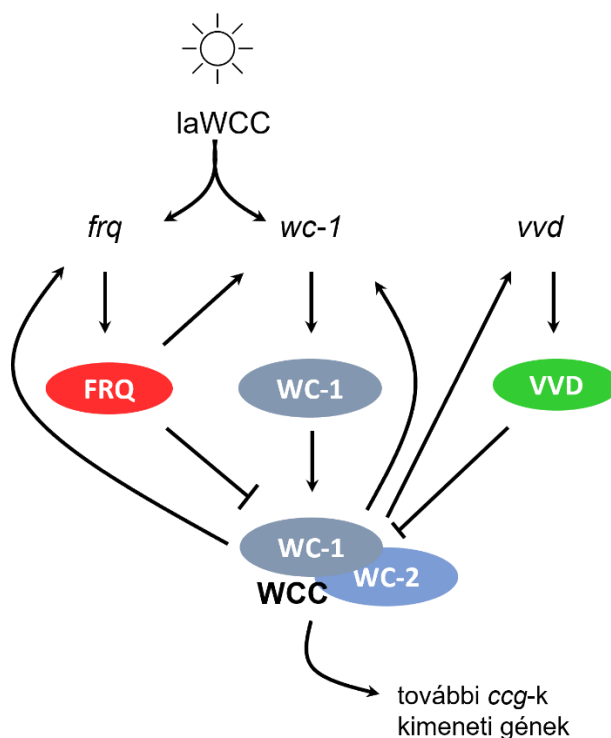
Amennyiben a fényhatás folyamatosan fennáll, a WCC fényaktivációja következtében állandó a *frq* transzkripció. Ennek eredménye, hogy állandó világosban konstans magas *frq* RNS és FRQ fehérje szinteket detektálhatunk - a fehérje és RNS oszcillációja és ezáltal a cirkadián időmérés ilyenkor szünetel (54, 67). Világos-sötét tranzíciót követően a *frq*-szintek gyorsan csökkennek, majd a sötét periódus második felében a *frq*-szintek ismét elkezdnek emelkedni a WCC újbóli aktivációjának következtében, és az időmérés újraindul.

A fényindukció igen gyors szabályozást tesz lehetővé: többek között a *frq* és a későbbiekben bemutatott *vvd* RNS-szintek már 15-30 perccel a fényindukció kezdete után elérik maximum értékeiket (30, 127). Mivel azonban a fényválasz az óra szabályozása alatt áll, a hasonló intenzitású fényjelek a szubjektív reggel során a leghatékonyabbak, amikor a természetes fotoperiódus világos fázisa is elkezdődne (111, 132). Ezt a jelenséget az óra kapuzó hatásának nevezzük.

A kék fény érzékelés és a fotoadaptáció második legfontosabb faktora a vivid (VVD) fehérje, amely a különböző fényintenzitások közötti differenciálásban segíti az óraműködést (130, 132). A szintén LOV domént tartalmazó kis méretű fehérje kifejeződését a WCC szabályozza, expressziójához szükség van a WCC jelenlétére (130,

132-134). A fotoadaptációt egy olyan mechanizmus teszi lehetővé, melynek során a VVD egy további negatív visszacsatolású hurkon keresztül gátolja a WCC fényaktivációját, vagyis lehetővé teszi, hogy tartós megvilágítás esetén is tranziens legyen a fényválasz (130, 133, 135, 136). Fény-sötétség transzfert követően a VVD-szintje gyorsan lecsökken, 12 óra elteltével pedig már alig detektálható. (130, 132). A VVD emellett közvetíti az információt a világos periódusból, így „molekuláris memóriaként” védi az órát a sötét fázis során fellépő zavaró (kis intenzitású vagy rövid ideig tartó) fényhatásoktól (pl. holdfény telihold idején), ezáltal hozzájárul a ritmus stabil működéséhez (55, 130).

A fény molekuláris órára kifejtett hatását az 5. ábra mutatja be.



5. ábra: A fény hatása az órakomponensekre. A *N. crassa* fő fotoreceptora a WC-1, amely fényaktivációt követően elősegíti az LRE-t (light responsive element – fény-reszponzív elem) tartalmazó gének, így a *frq* és önmaga átírását. A FRQ elősegíti a gyorsan bomló fényaktivált WC-1 utánpótlását. A fotoadaptáció kulcseleme a VVD fehérje, amelyet a WCC szabályoz.

Az óra fény általi szabályozásának pontos működése azonban még mindig nem teljesen ismert, valószínűsíthetően számos további posztranszkripciós módosítás is hozzájárul az óraműködés fény által történő beállításának mechanizmusához.

1.4.3. A hőmérséklet, mint Zeitgeber

A fény mellett a hőmérséklet szintén kiemelten fontos Zeitgeber. Entrainment során a hőmérséklet emelkedésével a FRQ expressziója fokozódik, ez elősegíti a WCC foszforilációját és inaktivációját, az óra tehát a szubjektív reggel állapotába kerül. Alacsonyabb hőmérséklet esetén pedig a FRQ mennyiség csökkenésével az óra a szubjektív alkonyat időpontjába kerül (137).

Noha a fázis a fentiek szerint átállítható hőmérsékleti hatásokra, a periódus ezzel szemben kompenzált, vagyis a környezeti hőmérséklet viszonylag széles tartományban történő változása mellett is állandó a szabadon futó cirkadián ritmus periódusa. Ez különösen figyelemre méltó, tekintve, hogy a hőmérséklet emelkedésével párhuzamosan a biokémiai reakciók sebessége jelentős mértékben nő, ami az óraműködés egészének gyorsulásához vezetne. A reakciók hőmérsékletfüggése az ún. Q10 értékkel jellemezhető, amely a 10°C hőmérséklet növekedés során bekövetkező reakciósebesség növekedés mértékét jelöli. Ez általában 2-4 közötti érték, a cirkadián ritmusok esetében azonban csupán 0,8-1,2 között mozog (138).

A hőmérsékleti kompenzáció mechanizmusa kevésbé feltérképezett, mint az óra fényre adott válaszában a folyamatok. Ugyanakkor Pittendrigh már 1957-ben leírta, hogy *Drosophila* esetében a ritmus hőmérséklettől független (28). Ismert, hogy a hőmérséklet a molekuláris óra több komponensére is hat és a hatások eredője vezet a kompenzációhoz (139, 140). Az összetett folyamat egyik kulcseleme a negatív órakomponens hőmérsékletfüggő alternatív splicing-ja (20, 21). Az mRNS érés során IFRQ (long FRQ – hosszú FRQ) és sFRQ (short FRQ – rövid FRQ) alakok keletkeznek. A két alak mintegy száz aminosavban, valamint stabilitásában és posztranszlációs módosításaiban is különbözik egymástól (114, 121, 122). Magasabb hőmérsékleten (25-28°C) fokozott FRQ expresszió mellett az IFRQ alak jelenléte dominál (120), míg alacsonyabb hőmérsékleten (18-21°C) csökkent FRQ expresszió mellett az sFRQ relatív szintje magasabb (120-122). Így tehát a *frq* átlagos expressziós szintje és a *frq* ritmus amplitúdója is hasonló marad és alacsony hőmérsékleteken, - csupán az egyes alakok aránya változik. Szintén

magyarázhatja a ritmus hőmérséklettel szembeni kompenzációját az a mechanizmus, miszerint a *frq* RNS translációja magasabb hőmérsékleten intenzívebben zajlik, ezzel szemben a FRQ fehérje nukleáris transzportjának intenzitása csökken. A két, egymást kompenzáló folyamat eredményeként a negatív visszacsatolásban a FRQ mennyisége állandó lesz (141). A hőmérsékleti kompenzációban továbbá fontos szerepet játszik a FRQ CKII általi foszforilációja (59, 142), valamint a VVD fehérje is (143). Annak ellenére, hogy a ritmus hőmérsékleti kompenzációjának több elemét is leírták, a pontos működés megismeréséhez további vizsgálatok szükségesek.

1.4.4. A tápanyagkínálat, mint Zeitgeber

A tápanyagkínálat megváltozása is fontos Zeitgeber a molekuláris óra számára (144-147), ugyanis a fázist a hőmérséklethez és a fényhez hasonlóan képes átállítani. Az emlős sejtkultúrák oszcillátorműködésének szinkronizálásához gyakran alkalmaznak például ún. glükóz, vagy szérumsokkot. Ugyanakkor a tápanyagszintek esetében is igaz, hogy a periódus eltérő metabolikus környezet mellett is állandó marad, vagyis az óra képes a metabolikus hatások kompenzálására (148), így alkalmazkodva a környezetben előforduló változatos szubsztrátszintekhez. Noha a metabolizmus és a cirkadián óra közötti szoros összefüggést már szinte az összes eukarióta szervezeti szinten leírták (149, 150), az, hogy a molekuláris időmérés hogyan is képes a tápanyagszintek változását kompenzálni, csak részben ismert.

A *N. crassa* ritmus metabolikus kompenzációjának elsőként azonosított faktorát, a CSP-1 fehérjét (conidial separation protein-1 – konídium szerparációt elősegítő fehérje-1) Sancar és munkatársai 2012-ben írták le (1). A CSP-1 fehérjét az élesztőben alaposan jellemzett glükózra adott válaszreakciók segítségével azonosították, és megállapították, hogy ez a fehérje az óraműködésben is szerepet játszik (1). A CSP-1 funkcióját tekintve egy transzkripciós represszor, amely nagyjából 800 gén expresszióját szabályozza *N. crassa*-ban (151). Magas glükózkoncentráció mellett, amikor fokozott a transzkripció és transláció sebessége, a megnövekedett mennyiségben kifejezett CSP-1 gátolja a WC-1 transzkripcióját, így annak translációs rátája ugyan nő, az RNS szintje azonban csökken. Ez a mechanizmus biztosítja, hogy a WC-1 fehérje mennyisége és ezáltal a periódus állandó legyen eltérő glükózsintek esetén is (1, 151). Sancar és munkatársai kimutatták

továbbá, hogy a CSP-1 által szabályozott rendszer a glükóz mellett a fruktóz és a szacharózsintek változására is hasonlóan reagál.

A *Neurospora* óra metabolikus szabályozásának további faktora a PRD-1 (period-1) ATP-függő RNS helikáz, amely nagyfokú rokonságot mutat azokkal az élesztő és humán fehérjékkel, melyek a transzkripcióban és az RNS metabolizmusban játszanak szerepet (152). A *prd-1* mutáns periódusa a tápanyagszint emelésével párhuzamosan nő, szemben a vad típusával, amely arra enged következtetni, hogy a törzsben nem működik a metabolikus kompenzáció (152, 153).

A transzkripció korepresszor RCO-1 (regulator of conidiation 1 – konidizációt szabályozó fehérje 1) is szerepet játszik a cirkadián időmérés metabolikus kompenzációjában: a *Arco-1* törzsben magas glükózsintek esetén rövidebb lesz a periódus, mint a vad típusban (154).

Az RCO-3-ról, egy, a glükóztranszporterekkel nagy hasonlóságot mutató fehérjéről is leírták, hogy fontos szerepet tölt be a *Neurospora* óra glükózfüggő szabályozásában (155). Az *rco-3* mutációja számos gén fényre adott transzkripciós válaszát módosítja és a fotoadaptáció megváltozásához vezet anélkül, hogy a WC-1 mennyiségét és szabályozását jelentősen befolyásolná. Az RCO-3 minden bizonnyal a glükózérzékelés és a fény szabályozás közötti kapcsolat egyik központi eleme, így többek között ez a fehérje is hozzájárul a különböző környezeti jelek integrálásához a transzkripció megfelelő szabályozásának érdekében (155).

A cirkadián ritmus metabolikus kompenzációját emlősökben feltehetően a REV-ERB nukleáris receptor és transzkripciós represszor funkciókat is betöltő proteinek biztosítják (144, 156). Ezek a fehérjék szekvenciájukban azonban nem, mindössze funkciójukban hasonlítanak a *N. crassa* órakomponenseire.

A metabolizmus és az óraműködés között kétirányú a kapcsolat. Ahogy láttuk, a tápanyagkínálat fontos Zeitgeber az óra számára, másrésztől viszont számos metabolikus folyamatot éppen a cirkadián óra irányít (például: (157)). Ezért tehát nem meglepő, hogy az emberi szervezetben azok a körülmények, melyek során a cirkadián ritmus nem működik megfelelően, - úgy mint a váltott-műszakban történő munkavégzés vagy a jetlag,- együtt járnak a metabolikus zavarok, például az elhízás, a metabolikus szindróma vagy a kettős típusú cukorbetegség kialakulásának fokozott rizikójával (158).

A metabolizmus és az óra kapcsolatának egy sok kihívást tartalmazó speciális esete, amikor a tápanyagok nem, vagy csak nagyon korlátozott mértékben állnak rendelkezésre az élőlény számára. Az alacsony tápanyagszintekhez való alkalmazkodás során a metabolikus folyamatok és a változó környezeti tényezők (mint például a fény-sötétség vagy a hőmérsékleti változások) összehangolása különösen nehéz feladat. Ismert, hogy a glükózszenvek számos jelátviteli útvonalat, valamint a transzkripciót, a translációkat és a fehérje turnover-t is befolyásolják az organizmusokban (1, 159), vagyis olyan folyamatokat, amelyek esetében a TTFL alapú cirkadián óra számára nagy kihívást jelent az állandó periódussal való működés.

N. crassa-ban a rövid távú (0-16h) glükózmegvonás kompenzációs mechanizmusok létrejöttéhez vezet transzkripciós és poszttranszkripciós szinten, amelyek lehetővé teszik a fő óraférfék expressziójának állandó szinten tartását, ezáltal biztosítva a periódus állandóságát (152-154).

A szűkös tápanyagkínálathoz való alkalmazkodás kulcsfontosságú tényezői a tápanyagraktárak hatékony felhasználása és a metabolizmus szigorú kontrollja, aminek a belső időmérés környezeti változásokkal való összehangolása alapvető feltétele lehet.

A metabolikus folyamatok változó környezeti körülmények mellett történő pontos szabályozása növeli az energiafelhasználás hatékonyságát, ezért tehát a pontos endogén időmérés minden bizonnyal alapvető követelménye a tápanyagmegvonáshoz történő sikeres alkalmazkodásnak.

1.5. A cirkadián ritmus kimenete

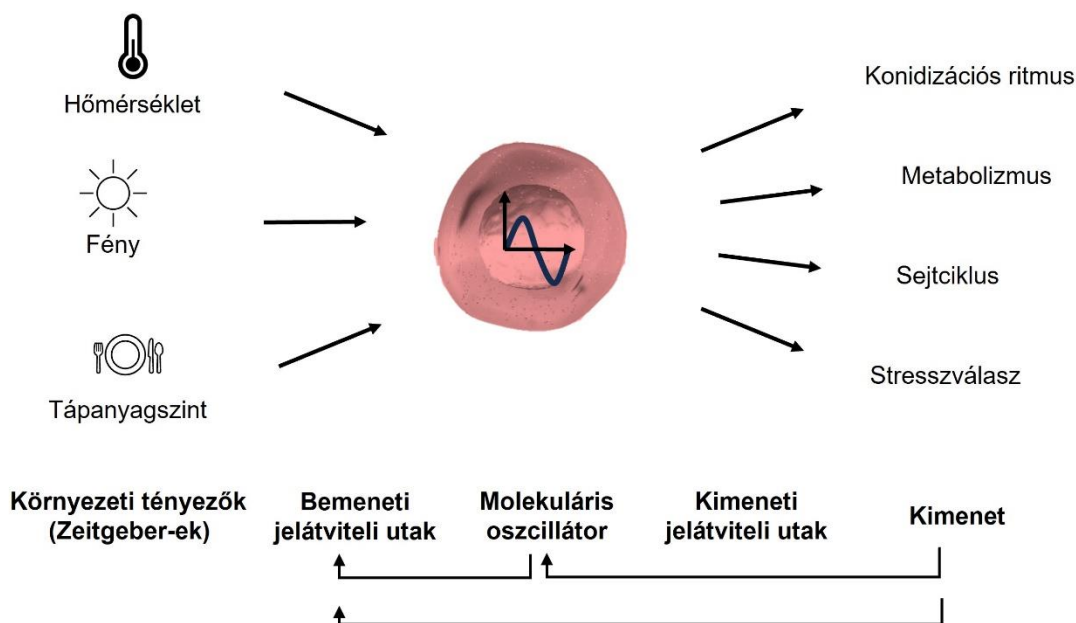
A cirkadián óra kimeneti útvonalai közvetítik a molekuláris oszcillátortól a különböző sejtfunkciók irányába az időméréssel kapcsolatos információkat és ezáltal segítenek az élettani ritmusok létrehozásában.

Az elmúlt évtizedek során számos *ccg*-t azonosítottak, valamint leírták azokat a molekuláris mechanizmusokat, melyek segítségével az oszcillátor képes bizonyos gének szűkös szabályozására.

Bell-Pedersen és munkatársai microarray vizsgálatok segítségével mintegy 1400 gén vizsgálata során azt találták, hogy 145 esetben ritmikus az expresszió, ami arra utal, hogy más organizmusokhoz hasonlóan *N. crassa* esetében is a genom mintegy 10%-a áll

cirkadián szabályozás alatt (86). Az azonosított gének által kódolt fehérjék a sejt biokémiai folyamatainak széles körében játszanak szerepet, úgy mint a jelátvitel, a fejlődés, a metabolizmus vagy a stresszválasz. Három gén esetében *frq*-hiányos törzsben is ritmikus expressziót mutattak ki, ami arra utal, hogy FLO is szerepet játszik a szabályozásban. Egy genomszintű analízis segítségével, melynek során a fényaktivált WCC célpontjait szerették volna feltárni, lehetséges WCC-kötő helyek százait azonosították többek között számos transzkripciós faktoron, melyek közül több az óra fontos kimeneti faktorának bizonyult (128). Így például a CSP-1, amely által szabályozott gének számos esetben ritmikus expressziót mutatnak. Ezek a gének jellemzően az éjszaka során érik el maximális szintjüket és a metabolizmus szabályozásában játszanak fontos szerepet (1). Egy genetikai szűrővizsgálat rámutatott továbbá a MAPK cirkadián szabályozásban betöltött szerepére is. A MAPK útvonal szerepet játszik többek között az ozmotikus stressz szabályozásában, az ivaros fejlődésben, a konídiumok integritásának fenntartásában, valamint a különböző fungicidekre mutatott érzékenység kialakulásában (160, 161). Ennek az útvonalnak két fontos szabályozója a MAPK-kináz és a hisztidin-foszfotranszferáz, melyek expressziója szintén cirkadián oszcillációt mutatott transzkripciós szinten (162).

Amint azt a fenti adatok is mutatják, noha a WCC számos kimeneti gén közvetlen aktivátora, a központi óra alapvető sejtfunkciókra gyakorolt hatását a WCC számos esetben csak közvetett módon, más szabályozó útvonalakon keresztül irányítja. A cirkadián ritmus működésének vázlatos modelljét a 6. ábra mutatja be.



6. ábra: A cirkadián ritmus működésének vázlatos modellje. A külső környezetből származó ingerek (ún. Zeitgeber-ek) az óra bemeneti jelátviteli útvonalain keresztül fejtik ki hatásukat a központi endogén oszcillátorra. A megváltozott óraműködés a kimeneti jelátviteli utak közvetítésével az egyes sejtfunciók megváltozott működését eredményezi. Ez lesz az óra kimenete, amely visszahathat mind a központi oszcillátorra, mind pedig a bemeneti jelátviteli utakra. A molekuláris oszcillátor a bemeneti jelátviteli utak működésére is hatással van.

1.6. A RAS fehérjecsald

A monomer kis G-fehérjék (GTPázok) családjába tartozó RAS fehérjék számos jelátviteli folyamatban játszanak kulcsszerepet. Molekuláris kapcsolókként lehetővé teszik, hogy egy extracelluláris szignál génexpresszióbeli változást eredményezzen (163).

A RAS fehérjék legfontosabb eleme az ún. G-domén, amely a nukleotid-kicserélő és a GTP-áz aktivitásért felel. Ezen belül öt, a GTP/GDP kötésért felelős motívum található (G1- G5), és itt található a működéshez szükséges Mg^{2+} is. A GTP általi aktiváció hatására a G2 és G3 ún. „switch” (kapcsoló) motívumokban konformációváltozás történik. Ennek köszönhető a RAS fehérjék molekuláris kapcsolóként való elnevezése, amely elnevezés a funkcióra és a szerkezetre is utal egyben (163). A „bekapcsolt” állapotnak a GTP-kötött konformáció számít, a „kikapcsoltnak” pedig a GDP-kötött. Funkcióját tekintve a RAS fehérje tehát egy kis G-fehérje, amely az ún. nagy G-fehérjék G_{α} alegységével mutat

rokonságot. A monomer G-fehérjék szabályozásában alapvető szerepet játszanak a GAP és GEF aktivitással rendelkező fehérjék. A GEF (guanine nucleotide exchange factor – guanin nukleotid kicserélő faktor) GDP-GTP cserén keresztül aktiválja a RAS fehérjét (164). A GAP (guanine nucleotide activating protein – guanin nukleotid aktiváló fehérje) pedig a RAS GTP-áz funkciójának aktiválásán keresztül inaktiválja a fehérjét (164). A kis G-fehérjék kötődhetnek továbbá ún. adaptor molekulákhoz (pl. arfaptin) vagy másodlagos hírvivő rendszerekhez (pl. adenilát-cikláz) is (164). Az ún. RAS-kötő domén (RAS binding domain - RBD) számos effektoron megtalálható és többnyire a fehérje „switch” régiójához köt. A RAS fehérjék a sejten belül jellemzően a sejtmembránhoz kötődnek prenilációs és palmitoilációs módosulásaik révén (165).

A legtöbb élőlényben egyszerre többféle RAS izoforma expresszálódik. Noha az őket szabályozó faktorok, és az általuk szabályozott effektor molekulák többnyire azonosak, számos kísérletes adat támasztja alá a különböző RAS izoformák funkcionális specificitását (6). A fehérjecsalád öt fő csoportra osztható szekvencia, szerkezet és funkció alapján: RAS, RHO (RAS-homolog - RAS-homológ), RAN (RAS-related nuclear protein - RAS-hoz hasonló magi fehérje), RAB (RAS-associated binding protein - RAS-asszociált kötőfehérje) és ARF (ADP-ribosylation factor - ADP-ribozilációs faktor) alcsoportokra (166). A RAS fehérjecsalád tagjai általában a sejtprolifерációs folyamatok szabályozásában vesznek részt, a RHO család tagjai a morfológiai változásokban, a RAN fehérjék a nukleáris transzportfolyamatokban, a RAB és az ARF alcsoportok pedig a vezikuláris transzportban játszanak szerepet (167). A RAS alcsoport tagjai számos sejtjelelendítés útján szabályozói, szerepet játszanak többek között a anyagcserében, sejtprolifерációban, adhézióban, differenciációban, az onkogén transzformációban, az aktin citoskeletális integritásának kialakításában, az apoptotikus folyamatokban, a növekedésért és osztódásért felelős gének transzkripciójában szerepet játszó MAPK (mitogen-activated protein kinase – mitogén-aktivált proteinkináz) útján aktiválásában és a sejtek migrációjában - olyan folyamatokban, amelyek a cirkadián ritmussal mind kapcsolatban állnak (7, 8). E fehérjék hibás működése gyakran malignus daganatok kialakulásához vezet (168). Egyre növekvő mennyiségű adat áll rendelkezésre különböző szervezetekben a RAS-mediált útjak és a cirkadián ritmus közötti kapcsolatról: ismert, hogy néhány emlős szövetben a RAS fehérjecsalád expresszióját a cirkadián óra szabályozza (9, 10, 169-172) és funkcionális elemzés is bizonyítja, hogy a

RAS/MAPK útvonal cirkadián kimenetként szolgálhat, illetve képes modulálni a cirkadián óra hatásait (11, 173-177). *N. crassa*-ban a *band (bd)* törzsben jelenlevő RAS1 aktiváló mutáció kifejezettebb konidizációs ritmust eredményez, a WC-1 fényindukált transzkripciója fokozottabb (50), a konidizáció fázisa pedig érzékenyebb a hőmérsékleti változásokra, mint a vad típus esetében (54). A RAS GTP-ázok magasabb rendű szervezetekben is minden bizonnyal szerepet játszanak az óra szabályozási folyamataiban, e mechanizmusok molekuláris alapja azonban számos esetben még feltérképezetlen. Ismert azonban, hogy *Drosophila*-ban a CLOCK/CYCLE pozitív faktor aktivitását a RAS fehérje szabályozza (178). Egerekben a dexametazon indukálta RAS fehérje (DEXRAS1) feltehetően a cirkadián óra input faktoraként szolgál (179-182). Továbbá kísérletes adatok és bioinformatikai analízisek is azt valószínűsítik, hogy az onkogén RAS fehérjék is szerepet játszanak a cirkadián óra rákos sejtekben bekövetkező diszregulációjában (12). Végül pedig, a RAS jelátvitel hatással van a cirkadián órára a szuprachiasmikus magban egerekben, és legalábbis részben az ERK és a GSK útvonalon hatva finomhangolja a cirkadián periódust (183).

Emberben a RAS alcsalád legismertebb képviselői a HRAS, KRAS és NRAS fehérjék. Az első két fehérje génjét két rákkeltő vírussal, a Harvey-szarkóma vírussal és a Kirsten-szarkóma vírussal kapcsolatos tanulmányok során azonosította Scolnick és munkatársai (184). Az NRAS-t pedig humán neuroblasztóma sejtekből izolálta Weiss és Wigler (185). A humán daganatos megbetegedések mintegy negyede esetében mutatható ki permanens RAS-aktiváció, egyes kórfarmákban (pl. pancreas carcinoma, colorectalis carcinoma) az előfordulás gyakorisága pedig elérheti a 90%-ot is (186). A terápiában ezért a RAS inhibitorok alkalmazása kiemelt jelentőséggel bír.

A RAS fehérjéknek tehát az egész élővilágban -az egyszerűbb eukariótáktól kezdve (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*) egészen az emlős sejtekig- központi szerepe van a sejtek növekedésében, proliferációjában és a metabolizmusban.

1.6.1. A RAS2 szerepe a glükózérzékelésben péklesztőben és *N. crassa*-ban

A RAS fehérjék funkciói élesztőben jól ismertek, az emlős sejtek RAS fehérjeihez hasonlóan péklesztőben is elengedhetetlen szerepet játszanak a sejt növekedésében (187-189). Munkánk szempontjából kiemelt jelentőségű a glükózérzékelésben, valamint a különböző glükózsintekhez történő adaptációban betöltött szerepük (190).

Természetes körülmények között a növekedés és a fejlődés szabályozásának legfőbb faktora az állandóan változó tápanyagkínálat. A sejtek számára a legfontosabb szén- és energiaforrás általában a glükóz (191). Az élesztő glükózérzékelése rendkívül bonyolult folyamat, számos jelátviteli útvonal kap benne szerepet. Egyik központi eleme, a RAS-függő útvonal legalább száz gén transzkripcióját szabályozza és elősegíti, hogy a sejtfunkciók alkalmazkodni tudjanak a metabolikus környezet változásaihoz (192, 193). A fő glükózrepressziós útvonal felelős továbbá a légzés intenzitásának csökkentéséért, a glükoneogeneziséért, valamint az alternatív cukrok transzportjáért és katabolizmusáért glükóz tartalmú közegben történő kultiválás során (191). A gyorsan fermentálható cukrok (glükóz, fruktóz, mannóz) érzékeléséért pékélesztőben alapvetően két rendszer felelős: egy G-protein-kapcsolt receptorrendszer és a kevésbé ismert glükózfoszforilációs hexózkínázrendszer (191). Az utóbbi útvonal glükózérzékelő mechanizmusa még nem teljesen ismert, de az útvonal további folyamatai alaposan karakterizáltak. A glükóz hexóztanszportereken keresztül jut be az élesztőgombába, majd foszforilálódik, így glükóz-6-foszfát keletkezik (194). A szignál adenilát-cikláshoz (Cyr1) való eljuttatása feltehetően a RAS2 (195), vagy a Cdc25 (cell-division cycle 25 - sejtosztódási ciklus 25), ill. az IRA (inhibitory regulator of the Ras/cAMP pathway - a RAS/cAMP útvonal gátló hatású szabályozója) fehérjék által történhet (187, 196). Ahhoz azonban, hogy glükóz hatására cAMP-szint (cyclic adenosine monophosphate - ciklikus adenosin-monofoszfát) emelkedés következzen be, a glikolízis kezdeti lépéseinek lezajlására, mindenképp előtte a fent említett glükózfoszforilációra van szükség. Ismert továbbá, hogy a glikolízis, mint pH csökkenéssel járó folyamat, aktiválja a RAS2 fehérjét (196).

A *N. crassa* RAS2 fehérje szerkezetében és funkciójában is homológiát mutat a pékélesztőben leírt RAS2 fehérjével. Szerepet játszik többek között a fonalas gomba proliferációs folyamataiban és morfológiájának kialakításában. Más gombafajokban a RAS fehérjék tehetősek felelőssé továbbá a patogenitás szabályozásáért is. *Neurospora*-ban az élesztőhöz hasonlóan két RAS gén található (197), a *ras-1* (198) és a *ras-2* (199) gének. A *ras-1* gén hiánya letális a gomba számára (50). A RAS2 egyik lehetséges szabályozója a pékélesztő Cdc25 fehérje *Neurospora* homológja, amely feltételezett RasGEF-ként található meg az adatbázisokban. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a RAS-aktiváció emelkedett celluláris ROS-szintekhez vezet, *Neurospora*-ban az emelkedett ROS-szintek pedig fokozott differenciálódást, ivartalan spóra képzést és karotinoid-szintézist

eredményeznek (200, 201). Kana-uchi és munkatársai 1997-ben egy RAS-homológ (NC-ras2) létrehozásán keresztül vizsgálták a RAS-függő jelátviteli útvonalak szerepét a *N. crassa* morfológiájában (199). Munkájuk során azt találták, hogy a korábban leírt *smco7* mutációhoz hasonló fenotípus (a sejtfalszintézis defektusa, lassú növekedés és csökkent konidizáció) figyelhető meg az NC-ras2 gén bázisdelécióit tartalmazó mutációja esetében is. A *Neurospora* Genome Project során a *ras2* génhányos törzsben ugyanezeket a fenotípus jegyeket azonosították (203).

Amint az a fejezetben korábban bemutatásra került, a RAS2 fehérje élesztő homológja kulcsszerepet játszik a glükózérzékelésben. Laboratóriumunkban előkísérleteink során azt láttuk, hogy a *ras2* *N. crassa* mutáns cirkadián fenotípusa eltér a vad típustól. Mivel az élesztő és a *Neurospora* hasonló RAS fehérjéket expresszálnak (208) és a *Neurospora* óra molekuláris szinten alaposan jellemzett, a *Neurospora* így megfelelő eszközt jelenthet ahhoz, hogy a RAS-jelátvitelnek a cirkadián óra metabolikus szabályozásában betöltött szerepét vizsgáljuk.

Mivel az óraműködés és a metabolizmus számos kulcsfolyamata evolúciósan konzervált (13, 25), az alacsonyabb rendű élőlényekben, így az élesztőben és *Neurospora*-ban leírtak a metabolizmus és a cirkadián ritmus kapcsolatának modelljeiként hozzájárulhatnak a folyamat emlős szervezetben való megértéséhez is.

2. Célkitűzések

Munkánk során a *Neurospora crassa* cirkadián ritmusa és a metabolizmus közötti kapcsolat vizsgálata volt a célunk:

2.1. A RAS2 fehérje szerepének vizsgálata a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában

- A $\Delta ras2$ törzs cirkadián fenotípusának jellemzése.
- A metabolikus környezet megváltozására adott fenotípus szintű válasz vizsgálata.
- A molekuláris oszcillátor jellemzése a $\Delta ras2$ törzsben. Az órakomponensek expressziós szintjének, foszforilációs állapotának és szubcelluláris lokalizációjának elemzése.
- A RAS2 jelátvitel és az óra közötti kapcsolat vizsgálata.

2.2. A cirkadián ritmus szerepének vizsgálata a tápanyagkínálat jelentős megváltozása esetén

- A központi oszcillátor működésének jellemzése tápanyaghiány esetén.
- A hosszantartó tápanyagmegvonásra adott transzkriptom szintű válasz jellemzése.
- Egyes jelátviteli utak szerepének vizsgálata az óra tápanyagmegvonáshoz való adaptációjában.
- A működőképes cirkadián óra szerepének vizsgálata az éhezéssel történő regeneráció során.

3. Módszerek

3. 1. A kísérletek során alkalmazott *N. crassa* törzsek

A munkánk során vad típusként alkalmazott FGSC #2489, #1858 (*bd*) és #6103 (*wt, his-3*) számú törzseket a legnagyobb *N. crassa* törzsgyűjteménytől, a Fungal Genetics Stock Center-től (FGSC - (<http://www.fgsc.net/>)) rendeltük. A $\Delta wc-1$ (202) törzset Prof. Michael Brunner laboratóriumától kaptuk. Kísérleteinkhez felhasználtuk továbbá a *frq*¹⁰ (FGSC #7490) (66, 69), *frq*⁹ (FGSC #7779) (66, 69), $\Delta ras2$ (FGSC #12467) (42) és *rgb-1* (FGSC #8380) (203) törzseket.

A *wt, frq-luc* törzset témavezetőm hozta létre korábban (78). A $\Delta ras2, frq-luc$ törzs létrehozásához elsőként a $\Delta ras2, his-3$ törzset állítottuk elő a *wt, his-3* (FGSC #6103) és a $\Delta ras2$ (FGSC #12467) törzsek keresztezésével, amit az FGSC weboldalán közzétett protokollnak megfelelően végeztünk (<http://www.fgsc.net/neurospora/NeurosporaProtocolGuide.htm>). Ezt követően a kodon-optimalizált luciferáz szekvenciát tartalmazó *pBM60-pfrq-luc-trpC* plazmidot (Prof. Michael Brunner ajándéka (51, 56, 157) elektroporációval (204) integráltuk a $\Delta ras2, his-3$ törzs *his-3* lokuszába.

A $\Delta ras2, cpc-1-ras2$ törzs létrehozásához a *cpc-1-Flag-Strep-ras2* konstrukciót két lépésben állítottuk elő. *N. crassa* genomi DNS-t alkalmazva templátként polimeráz láncreakció (PCR) segítségével felszaporítottunk egy fragmentumot, amely a *ras2* kódoló szekvenciáját és egy hozzá N-terminálisan kapcsolódó *Strep*-tag-et tartalmazott. Ezt az *XbaI* és a *HindIII* hasítóhelyek közé építettük a *p3XFlag-CMV-7.1*TM vektorban (Sigma-Aldrich #E7533). Ez a konstrukció templátul szolgált a következő PCR-hez, amelynek terméke a *ras2* kódoló régióját, ehhez N-terminálisan kapcsolódó két *Flag*-tag-et és egy *Strep*-tag-et tartalmazott. Ezt a konstrukciót *AscI-SpeI* hasítóhelyeket használva beépítettük a *pcpc-1-vvd-Strep* konstrukcióba, ami a *vvd-Strep* régió *Flag(2x)-Strep-ras2* régióra történő cseréjét eredményezte. Ezt a konstrukciót végül a $\Delta ras2, his-3$ törzs *his-3* lokuszába integráltuk. A *pcpc-1-vvd-Strep* konstrukciót egy korábbi tanulmány keretében hozták létre laboratóriumunkban (130). A *cpc-1-Flag-Strep-ras2* létrehozása során alkalmazott oligonukleotidokat az 1. táblázat, a kísérletek során alkalmazott *N. crassa* törzseket és azok tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A *cpc-1-Flag-Strep-ras2* létrehozása során alkalmazott oligonukleotidok

A <i>cpc-1-Flag-Strep-ras2</i> létrehozása során alkalmazott oligonukleotidok (5'-3')	
<i>Strep-ras2</i> Forward:	AAAATCTAGATGGAGCCACCCCCAGTTCGAGAAG GGCGGTGCCATGGTGGGGAACAAACAGGTG
<i>Strep-ras2</i> Reverse:	AAAAAAGCTTACTAGTTCATATAATCAAACACTT TCCACG
<i>2xFLAG-Strep-ras2</i> Forward:	AAAAGGCGCGCCCAACATGTACAAAGACGATG ATGACAAAGATTACAAGGATGACGACGATAAGG CCGGTGGATGGAGCCACCCCCAGTTCG

2. táblázat: A kísérletek során alkalmazott *N. crassa* törzsek és jellemzőik

Törzs neve	Törzs eredete	Mutáció/Módosítás	Mutáció/Módosítás funkcionális következménye
<i>wt</i>	FGSC #2489	-	-
<i>wt (bd)</i>	FGSC #1858	A természetben is előforduló törzs, amely a RAS1 aktiváló mutációját tartalmazza (86).	A konidizációs ritmus kifejezettebb, a WC-1 fényindukált transzkripciója fokozottabb (51), a konidizáció fázisa pedig érzékenyebb a hőmérsékleti változásokra, mint a vad típus esetében (55).
<i>wt, his-3</i>	FGSC #6103	A <i>his-3</i> gén pontmutációja.	Hisztidin auxotrófia.
$\Delta wc-1$	Prof. Michael Brunner	A <i>wc-1</i> gén RIP (repeat induced point	Funkcionális génhányos törzs, nem képződik <i>wc-1</i> RNS és fehérje. A <i>wc-1</i>

	munkacsoportja (112).	mutation - ismétlődés által indukált pontmutáció) mutációja.	hiányában nem működik a törzsben a molekuláris oszcillátor és így a cirkadián ritmus.
<i>frq</i> ¹⁰	FGSC #7490	Célzott géndeléción a <i>frq</i> génbe történő hygromycin kazetta beépítése által (66, 69).	A nullmutáció eredménye, hogy a FWO nem működőképes a törzsben.
<i>frq</i> ⁹	FGSC #7779	Bázispár deléción a <i>frq</i> génben, amely korai stop-kodont eredményez (66, 69).	A <i>frq</i> RNS átírása végbemegy a törzsben, így a <i>frq</i> promóter aktivitása vizsgálható. Ugyanakkor a FRQ-nek csupán egy rövid alakja fejeződik ki, amely nem funkcióképes (nem vesz részt sem a pozitív, sem pedig a negatív visszacsatolásban).
$\Delta ras2$	FGSC #12467	A <i>ras2</i> gén deléciónja (42).	A <i>ras2</i> funkcióvesztése.
<i>rgb-1</i>	FGSC #8380	Az <i>rgb-1</i> gén RIP mutációja (203).	Funkcionális génhányos törzs, nem képződik RNS és fehérje.
<i>wt, frq-luc</i>	Prof. Michael Brunner munkacsoportja (78).	A luciferáz gén expresszállása a <i>frq</i> promóter szabályozása alatt.	A <i>frq</i> promóter aktivitás valós időben követhető <i>in vivo</i> luciferáz assay során.
$\Delta ras2, his-3$	A törzset a dolgozatban leírt kísérletek	A $\Delta ras2$ és a <i>wt, his-3</i> törzsek keresztezését követően a szelektált	A <i>ras2</i> funkcióvesztése és hisztidin auxotrófia.

	során hoztuk létre.	törzsek a fent részletezett $\Delta ras2$ és a <i>his-3</i> mutációt is hordozzák.	
$\Delta ras2$, <i>frq-luc</i>	A törzset a dolgozatban leírt kísérletek során hoztuk létre.	A <i>frq</i> promóter szabályozása alatt álló luciferáz expresszió, $\Delta ras2$ háttérben.	A <i>frq</i> promóter aktivitás valós időben követhető <i>in vivo</i> luciferáz assay során a <i>ras2</i> funkcióvesztése mellett.
$\Delta ras2$, <i>cpc-1-ras2</i>	A törzset a dolgozatban leírt kísérletek során hoztuk létre.	A $RAS2_{FLAG}$ expressziója a <i>cpc-1</i> promóter szabályozása alatt $\Delta ras2$ háttérben.	A $\Delta ras2$ funkcióvesztésének helyreállítása.

3.2. Új törzs létrehozásához szükséges DNS modifikáció lépései

3.2.1. Polimeráz láncreakció

A rendelkezésünkre álló templátról polimeráz láncreakció segítségével szaporítottuk fel a továbbiakban használni kívánt DNS szekvenciát. A reakciók során a Hybaid PCR Express HBPX110 Thermal Cycler készüléket, valamint a HotStar HiFidelity Polymerase Kit-et (Thermo Scientific #202602) használtuk a leírásnak megfelelően. A keletkezett DNS fragmentumokat 1%-os agaróz gélen detektáltuk.

3.2.2. Fragmentum izolálás

A PCR reakcióelegyet a Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (#A9281) kit segítségével tisztítottuk. A munka során az útmutatóban foglaltak szerint jártunk el.

3.2.3. Restrikciós emésztés

A restrikciós emésztést Thermo Scientific restrikciós enzimekkel végeztük a gyártó leírásának megfelelően.

3.2.4. Ligáció

A ligáció során a Thermo Scientific T4 DNA Ligase (#EL0011) enzimet használtuk az útmutatóban leírtaknak megfelelően.

3.2.5. $\Delta H5a$ sejtek hősokk transzformációja

A laboratóriumban korábban előállított kompetens *Escherichia coli* $\Delta H5a$ sejteket a -80°C -os mélyhűtőből kivéve 5-10 percig jégen inkubáltuk, majd $3\mu\text{l}$ ligálási reakcióelegyet adtunk hozzájuk, mellyel további 30 percig inkubáltuk őket. Ezt követően 1 percre 42°C -os hősokknak tettük ki a sejteket, majd másfél perc jégen való inkubálás után, $800\mu\text{l}$ 42°C -on előmelegített SOC médiumban 30 percig 37°C -on rázattuk a mintákat. (A SOC médium 100ml-enként 2g triptont, 0,5g élesztő kivonatot, 0,02 ml 5M koncentrációjú nátrium-hidroxid oldatot, 0,05g nátrium-kloridot, 1ml 250 mM koncentrációjú kálium-kloridot és 2ml 1M koncentrációjú glükóz oldatot tartalmazott.) Ezután 2 percig 2300g erősséggel centrifugáltuk a mintákat, majd a pelletet $50\mu\text{l}$ felülúszóban szuszpendáltuk. Az így kapott szuszpenziót 50mg/ml amplicillint tartalmazó LB táptalajon szélesztettük, majd 37°C -on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. (Az LB táptalaj 100ml-enként 1,5g agart, 1g triptont, 0,5g élesztő kivonatot, 0,5g nátrium-kloridot, valamint $100\mu\text{l}$ 1N koncentrációjú nátrium-hidroxid oldatot tartalmazott.)

3.2.6. Plazmid DNS izolálás

A transzformálás eredményeként kapott baktériumpázsitról hat telepet oltottunk le egyenként 4 ml, ampicillint tartalmazó (50 mg/ml) LB tápoldatba, majd egy éjszakán keresztül 37°C -on rázva növesztettük őket. Másnap a baktériumsuszpenzióból plazmid DNS-t izoláltunk a Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0503) segítségével az útmutatóban leírtaknak megfelelően. Az izolált plazmid DNS konstrukció ellenőrzése restriktív emésztést követően agaróz gélelektroforézis segítségével történt, 1%-os agaróz gélen.

3.2.7. Plazmid DNS előkészítése elektroporációhoz

A kívánt plazmid konstrukció *N. crassa*-ba történő transzformálásához nagy mennyiségű DNS-re van szükség, ezért elsőként $\Delta H5a$ sejtekben felszaporítottuk a plazmid DNS-t, majd a DNS-t a NucleoBond PC100 Midiprep Kit (Macherey-Nagel #740573) segítségével izoláltuk a gyártó leírásában foglaltaknak megfelelően. Az izolálást követően restriktív

emésztéssel linearizáltuk a plazmidot, majd 1%-os preparatív agaróz gélen történő futtatást követően a Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (#A9281) kit segítségével tisztítottuk. A DNS-t ezután 1/10 térfogatnak megfelelő nátrium-acetát (3M, pH 5,2) és két és félszeres térfogatú abszolút alkohol hozzáadása után -20 °C-on egy éjszakán keresztül precipitáltuk, majd másnap 16 100 g erősséggel centrifugáltuk 30 percen keresztül. Ezt követően 250 µl 70%-os etanollal mostuk és 37 °C-on nyitott kupakkal szárítottuk. Végül 15 µl nukleáz mentes vízben oldottuk és a minta koncentrációját Nanodrop One[®] mikrovolumetrikus spektrofotométer segítségével határoztuk meg 230, 260 és 280nm-en. A DNS minőségét optimálisnak tekintettük, amennyiben az A260/A280 és az A260/A230 hányados 1,8 feletti értéket vett fel.

3.2.8. *N. crassa* transzformálása elektroporációval

A *N. crassa* elektroporációval történő transzformálása során a génkonstrukció a *his-3* lokuszba épül be, ugyanis a transzformálni kívánt plazmid tartalmazza a *hisztidin-3* gén szekvenciáját, melynek egy része a recipiens gombatörzsben hiányzik, ezért az csak auxotróf módon, hisztidinnel kiegészített táptalajon képes nőni. Amennyiben a szekvencia beépült a törzsbe, az hisztidin hiányában is életképes marad, így a transzformáció után minimál táptalajon történő tenyésztés során lehetővé válik a sikeresen transzformált törzsek szelekciója.

A transzformációt megelőzően a *his-3* génhányos gombatörzset egy hétig növesztettük hisztidinnel kiegészített szilárd táptalajon. Ezt követően 50ml 1M szorbitol oldattal lemostuk a micéliumokat a táptalajról. Szűrést követően a konídiumot tartalmazó szorbitol szuszpenziót 1860 g-vel 5 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, majd a mosási lépést további két alkalommal ismételtük. A harmadik mosási lépést követően az üledéket a centrifugacső oldalán visszamaradt szorbitolban szuszpendáltuk és 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe pipettáztuk. A jégen előhűtött mikrocentrifuga csövekbe 60 µl konídium szuszpenziót és 3 µg DNS-t pipettáztunk. Öt perc jégen történő inkubálást követően a szuszpenziót áttöltöttük a jégen hűtött elektroporációs küvettákba (Bio-Rad #1652082), majd 600 Ohm, 1,5 kV és 25 µF paraméterekkel transzformáltuk a sejteket Bio-Rad Gene PulserTM készülékkel. A konídium szuszpenziót ezt követően 500 µl jégen hűtött 1 M szorbitollal mostuk ki a küvettákból és mikrocentrifuga csövekbe töltöttük, majd az 50 °C-os vízfürdőben melegen tartott „top” (felső) (205) agarba keverve a szilárd

„bottom” (alsó) agar lemezekre szélesztettük. (A top médium 100ml-enként 18,2g szorbitolt, 2ml ötvenszeres töménységű Vogel's oldatot, 3g agart és 10ml FIGS oldatot tartalmazott. A bottom médium 100ml-enként 2ml ötvenszeres töménységű Vogel's oldatot, 1,5g agart, 0,3g arginint és 10ml FIGS oldatot tartalmazott. A FIGS oldat 100ml-enként 20g szorbózt, 0,5g fruktózt és 0,5g glükózt tartalmazott.) A lemezeket ezt követően 2-3 napig 30 °C-on inkubáltuk sötétben (204).

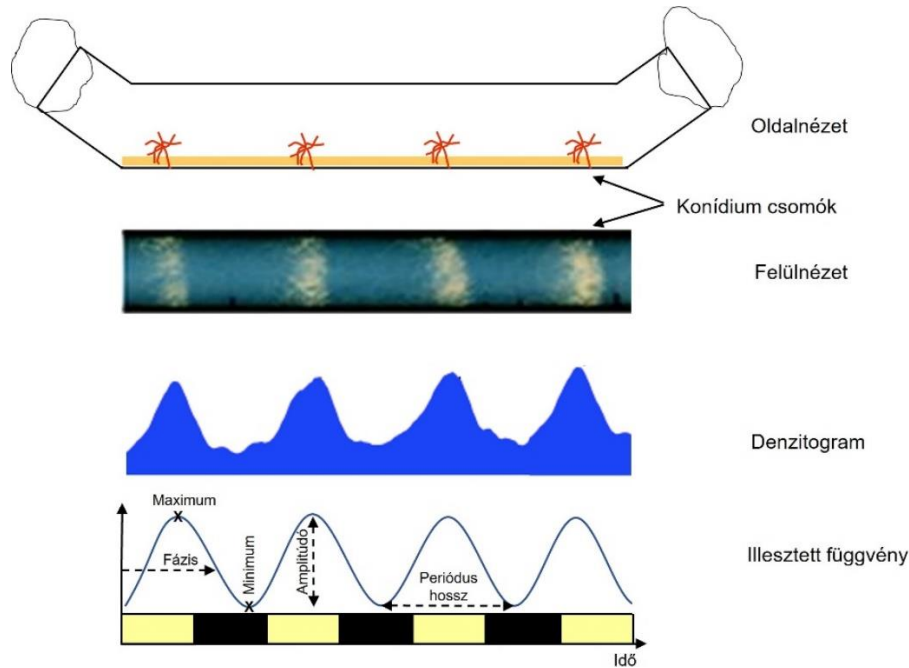
3.3. *N. crassa* tenyésztése szilárd táptalajon

A törzseket ferdeagaron növesztve tartottuk fenn. A ferdeagar médium 100ml-enként 2g agart, 2g glükózt, 2ml ötvenszeres töménységű Vogel's oldatot és 50 µl 0,1 mg/ml koncentrációjú biotint tartalmazott.

3.3.1. Race Tube analízis

A vizsgálat során egy mindkét végén hajlított üvegcsőbe, szilárd táptalajra oltottuk le a vizsgálni kívánt törzset a futtatócső egyik végére (56). A race tube médium 100ml-enként 3,2g agart, 2ml ötvenszeres töménységű Vogel's oldatot, 50 µl 0,1 mg/ml koncentrációjú biotint és 0,17g arginint tartalmazott. (A standard race tube médiumtól való eltérést az egyes kísérleteknél jelöltük.) A csöveket a kísérlet célja szerint beállított körülmények között inkubáltuk: konstans világos (LL), konstans sötét (DD), vagy fény-sötétség ciklusokban (LD), 25°C-on, illetve 30°C-on. Ez idő alatt a cső egyik végére leoltott telep közel lineáris növekedési sebességgel növekszik a leoltási helytől távolodva a futtatócső másik vége irányába. E növekedés a cirkadián oszcillátor szabályozása alatt áll. A szubjektív éjszaka során a hifák légmicéliumokká alakulnak, melyek konídiumot termelnek, az idő és a növekedés előrehaladtával azonban a szubjektív nappal és a kora este során keletkező micéliumok nem fognak differenciálódni (21). Így végül a kultúra naponta egyszer jellegzetes morfológiájú vegetatív szaporítóképlet együttest, ún. konídiumcsoportot képez. A kísérlet ideje alatt a növekedési frontot bizonyos időközönként jelöltük, ezáltal meghatározhatóvá vált a növekedési sebesség. A napok során képződött konídiumcsoportok időbeli eloszlása pedig megalkotja a konidizációs ritmust, amely a molekuláris óra egy jól vizsgálható kimeneti paramétere. A konidizációs ritmus segítségével tehát következtetni tudunk a vizsgált törzs cirkadián tulajdonságaira és ezáltal molekuláris órájának működésére. A paraméterek pontos meghatározásához a cső denzitometriás képét a ChronOSX 1.0.7[®] szoftver (Till Roenneberg, Ludwig-

Maximilians-Universität München) segítségével értékeltük ki. A szoftver függvényt illeszt a denzitogramra, majd ennek segítségével meghatározza a fázist és a periódust (54). Az analízisből a kísérlet első napját kihagytuk, ugyanis ez idő alatt történik meg az óra környezeti tényezőkhöz való szinkronizációja. A race tube analízis sematikus ábrázolása a 7. ábrán látható.



7. ábra: A race tube analízis vázlatos rajza ((21, 56) alapján) A felső panelen a szilárd táptalajjal töltött üvegcsőre oltott *N. crassa* tenyészet sematikus ábrázolása látható. A szinkronizációt (pl. fény-sötétség transzfert) követően a kultúrákat a kívánt környezeti tényezőknek megfelelően inkubáljuk több napon keresztül. A növekedési frontot meghatározott időközönként jelöljük. A második panelen a *bd* törzzsel végzett race tube kísérlet képe látható. A harmadik panelen a race tube denzitometriás képe, az alsó panelen pedig az erre illesztett függvény látható.

3.4. *N. crassa* tenyésztése folyékony kultúrában

A folyékony kultúrákat Minitron inkubátorokban (INFORS, Svájc) tenyésztettük a jelzett hőmérsékleten (25°C vagy 30°C), 90 rpm rázatás mellett. A tenyésztés során alkalmazott fényviszonyokat az egyes kísérleteknél részletezzük. A Vogel's médiumot (206) 0,5% L-argininnel, 10 ng/ml biotinnal és a feltüntetett mennyiségű glükózzal egészítettük ki. A standard folyékony médium 2% glükózt tartalmazott. A csökkentett tápanyagtartalmú médium glükóz tartalma 0,01% volt. A hosszantartó tápanyagmegvonás hatásait vizsgáló

kísérletekhez először egybefüggő micélium rétegeket növesztetünk Petri csészében, szobahőmérsékleten, állandó sötétségben, normál tápoldatban két nap alatt. Ebből az egybefüggő rétegből ezután azonos méretű korongokat vágunk ki, steril desztillált vízzel mostuk, majd folyékony médiumot tartalmazó Erlenmeyer-lombikokba helyeztük őket (207, 208). Ezt követően 25°C-on és 90 rpm-mel történő rázás mellett növesztettük a kultúrákat. A tenyésztéshez legalább 150 ml folyékony médiumot alkalmaztunk kultúránként annak érdekében, hogy a glükózkoncentrációt igyekezzünk feleslegben, így közel állandó szinten tartani az inkubáció ideje alatt. Ilyen körülmények között a kezdeti korongokból gömb formájú kultúrák képződtek a kísérlet első napja során.

A megfelelő inkubációs idő eltelté után betakarítottuk a mintákat. Ennek során a kultúrákat vákuum szivattyú segítségével leszűrtük, majd mikrocentrifuga-csővekben, folyékony nitrogénben megfagyasztottuk, és a felhasználásig -80°C-os mélyhűtőben tároltuk őket.

3.5. Teljes sejtlizátum készítése

A korábban lefagyasztott micéliumot folyékony nitrogénnel hűtött kerámia mozsárban porrá őröltük, majd szintén folyékony nitrogénben hűtött mikrocentrifuga csövekbe töltöttük. A PEX (protein extraction – fehérje feltáró) oldat proteáz inhibitorokat (PMSF (1 mM): Ser-proteáz inhibitor, Leupeptin (5 µg/ml): Cys-, Ser-, Thr-proteáz inhibitor és Pepstatin (10 µg/ml): aszpartil-proteáz-inhibitor), valamint protein foszfatáz inhibitor koktélt (PhosSTOP – Roche #4906845001) tartalmazott. Továbbá 100ml-enként 10ml glicerint, 10ml 0,5 M koncentrációjú Hepes oldatot (pH= 7,4), 6,85ml 2 M koncentrációjú nátrium-klorid oldatot, valamint 1 ml 0,5 M koncentrációjú EDTA oldatot (pH=8,0) tartalmazott. A feltáró oldatból a minta mennyiségének megfelelő térfogatot (100 - 600 µl) pipettáztunk a korábban dörzsmozsárban homogenizált micéliumra, majd 30 percig jégen inkubáltuk, közben öt percenként röviden vortexelve kevertük. A fél óra letelte után 4°C-on 10 percig 9240 g nagyságú erőterben centrifugáltuk, majd a felülúszót új mikrocentrifuga csövekbe töltöttük. Ezt újabb centrifugálás követte (4°C, 30 perc, 23654 g). A fehérjeizolátum koncentrációját Nanodrop One[®] mikrovolumetrikus spektrofotométer segítségével határoztuk meg 280 nm-en. A fehérjemintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd felhasználásig -80°C-os mélyhűtőben tároltuk (61).

3.6. Szubcelluláris frakcionálás

A fehérjék nukleusz és citoszol közötti megoszlásának vizsgálatához a Luo és munkatársai által leírt frakcionálási módszert alkalmaztuk (209) néhány módosítással. A puffer térfogatokat 1/10-re csökkentettük és a nukleusz és a citoszol elválasztását lehetővé tevő centrifugálási lépés paramétereit 8800 g-re, 2 percre és 4°C-ra módosítottuk. (A kísérlethez használt „A oldat” 100 ml-enként 18,2 g szorbitolt, 7 g ficollt, 5 ml 1 M koncentrációjú Tris oldatot (pH=7,5), 1 ml 0,5 M koncentrációjú magnézium-acetát oldatot, 2 ml 0,25 M koncentrációjú EGTA oldatot (pH=8,0), 300 µl 1 M koncentrációjú kalcium-klorid oldatot és 300 µl 1 M koncentrációjú DTT (dithiothreitol) oldatot tartalmazott. A kísérlethez használt „B oldat” 100 ml-enként 8 g glicerint, 2,5 ml 1 M koncentrációjú Tris oldatot (pH=7,5), 1 ml 0,5 M koncentrációjú magnézium-acetát oldatot és 2 ml 0,25 M koncentrációjú EGTA oldatot (pH=8,0) tartalmazott. A „Strep-grádiens oldat” 100 ml-enként 34,25 g szacharózt, 8 g glicerint, 2,5 ml 1 M koncentrációjú Tris oldatot (pH=7,5), 1 ml 0,5 M koncentrációjú magnézium-acetát oldatot, valamint 100 µl 1 M koncentrációjú DTT oldatot tartalmazott.)

A *Δras2* törzzsel végzett kísérletek során a citoszolból 450 µg, a nukleáris frakcióból pedig 300 µg lizátumot töltöttünk a zsebekbe. Az RGB-1 (B regulatory subunit of type 2A protein phosphatase - proteinfoszfátáz 2A B-típusú regulátoros alegysége) fehérjét citoszólikus markerként (53) alkalmaztuk. A hosszantartó glükózmegvonás hatását vizsgáló kísérletek során egységesen 500 µg fehérje került felvitelre az egyes frakciókból. A mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) módszerrel analizáltuk.

3.7. Fehérjeszeparálás SDS-PAGE módszerrel

A fehérjék molekulatömeg szerinti szeparálásához SDS-poliakrilamid gélelektroforézist alkalmaztunk. A felső, koncentráló gél, 0,5 ml akrilamid/bisz-akrilamid (29:1) oldatot, 0,5 ml akrilamid (40%) oldatot, 4,6 ml bidesztillált vizet, 0,35 ml 1 M koncentrációjú Tris oldatot (pH=6,8), valamint 58,5 µl 10%-os SDS oldatot tartalmazott. Az alsó, szeparáló gél esetében 5,11 ml bidesztillált vízhez 3,58 ml akrilamid/bisz-akrilamid (29,8:0,2) oldatot, 5,54 ml 1 M koncentrációjú Tris oldatot (pH=8,8) és 144,25 µl 10%-os SDS oldatot adtunk. Az akrilamid polimerizációját ammónium-perszulfát (APS) és Temed (tetrametil-etilén-diamin) hozzáadásával segítettük elő.

A polimerizációs idő leteltével a gélt futtatókádba helyeztük, és a zsebeket kialakító fésű eltávolítása után a megfelelő fehérjepreparátumokat minta pufferrel elegyítve, 95°C-on való 5-10 perces inkubálást követően a zsebekbe töltöttük. (A minta puffer 800 µl 10%-os SDS oldatot, 400 µl glicerint, 250 µl β-merkaptó-etanolt, 200 µl 1 M koncentrációjú Tris oldatot (pH=6,8), 4 µg brómfenolkéket és 250 µl bidesztillált vizet tartalmazott.) Az áramerősség állandó értéken tartása mellett (6 mA) a kívánt felbontás eléréséig futtattuk a mintákat. (Az elektroforézis puffer literenként 28,6 g glicint, 6,5 g Tris-t, valamint 10 ml 10%-os SDS oldatot tartalmazott.)

3.8. Western-blot

A gélelektroforézist leállítva a gélt blot-pufferbe áztattuk, amely literenként 11,25 g glicint, 2,42 g Tris-t, 200 ml metanolt, valamint 8 ml 10%-os SDS oldatot tartalmazott, a félszáraz blottoló készülék (PerfectBlue Semi Dry-Electroblotter, Peqlab) fegyverzeteit a blot-pufferrel nedvesítettük, majd ráhelyeztük a már korábban pufferbe áztatott szűrőpapírt (Thermo Scientific™ #88615) és a nitrocellulóz membránt (Bio-Rad #1620094). A membránra ráhelyeztük a gélt, majd egy újabb réteg szűrőpapírt. Ezt követően a negatív pólust a rétegekre helyezve és ráerősítve beállítottuk a blottolás paramétereit (2,5 h 350 mA (konstans) 12 V 300 W), majd elindítottuk a futtatást (61).

3.9. Fehérjék immundetektálása

Miután a gélről a nitrocellulóz membránra blottoltuk át a fehérjemintákat, a membránon jelen lévő fehérjemennyiség egyenletességét (összfehérje – total protein -TP) ún. Ponceau S (Sigma #A40000279) azofesték segítségével tettük láthatóvá. (A Ponceau S oldat 100 ml-enként 100 mg Ponceau S azofestéket és 5 ml ecetsavat tartalmazott.)

Miután az azofestéssel megfestett membrán képét digitálisan rögzítettük, a festék eltávolítása érdekében 10 percig egyszeres töménységű Tris által pufferelt oldatban (TBS – Tris-buffered saline) áztattuk a membránt. Ezt követően a membrán aspecifikus kötőhelyeinek blokkolásához 1xTBS-ben oldott, zsírtalanított tejpor (Sigma #70166) 5%-os oldatában 45 percig inkubáltuk a membránt szobahőmérsékleten. Majd szintén 5% TBS-tej oldatban inkubáltuk az elsődleges, majd a másodlagos antitestekkel a membránt a 3. táblázatban feltüntetett paraméterek szerint.

3. táblázat: A kísérletek során alkalmazott antitestek és alkalmazási körülményeik

Célfehérje	Elsődleges antitest	Inkubáció paramétere	Másodlagos antitest	Inkubáció paramétere
FRQ	anti-FRQ (egér, monoklonális) (57)	1:5000 2h RT	kecske anti-egér IgG (H/L):HRP (Bio-Rad #1706516) (poliklonális)	1:5000 O/N 4°C
WC-1	anti-WC-1 (nyúl, poliklonális) (61)	1:10000 O/N 4°C	kecske anti-nyúl IgG (H/L):HRP (Bio-Rad #1706515) (poliklonális)	1:5000 2h RT
WC-2	anti-WC-2 (nyúl, poliklonális) (79)	1:10000 O/N 4°C	kecske anti-nyúl IgG (H/L):HRP (Bio-Rad #1706515) (poliklonális)	1:5000 2h RT
FLAG	anti-FLAG (egér, monoklonális) (Sigma Aldrich #F3165)	1:10000 2h RT	kecske anti-egér IgG (H/L):HRP (Bio-Rad #1706516) (poliklonális)	1:5000 O/N 4°C
RGB-1	anti-RGB-1 (nyúl, poliklonális) [55]	1:10000 O/N 4°C	kecske anti-nyúl IgG (H/L):HRP (Bio-Rad #1706515) (poliklonális)	1:5000 2h RT

Az egyes inkubációs lépéseket követően 3x10 percig 1xTBS oldatban mostuk a membránt. A fokozott kemolumineszcencia (enhanced chemiluminescence - ECL) elvén történő detektálást a másodlagos ellenanyaghoz kötött torma-peroxidáz (horseradish peroxidase - HRP) teszi lehetővé. A reakció során az enzimhez kemilumineszcens szubsztrátot (luminolt [1,25mM]), erős oxidáló ágensként 0,01% hidrogén-peroxidot, valamint a fényemissziót fokozó ún. „enhancer” vegyületet, 0,2 mM kumarinsavat tartalmazó 100 mM Tris-HCl (pH=8,5) oldatot adunk. A fényemisszióknak köszönhetően a fehérjék röntgenfilmen detektálhatók.

A fehérjeszintek elemzéséhez a röntgenfilmek digitalizált képének denzitometrállását az ImageJ szoftverrel (210) végeztük. Amennyiben szükséges volt, a denzitás értékek esetében a felvitt mennyiségben előforduló eltéréseket a Ponceau S festés megfelelő molekulásúly magasságában mért denzitás értékeinek segítségével korrigáltuk (211). Az ábrákon reprezentatív Western-blotok kerültek bemutatásra. A felvitt összfehérje mennyiséget a legtöbb esetben a Ponceau S festés segítségével ellenőriztük. (TP: total protein – összfehérje)

3.10. A GST-AC-RBD és a RAS2^{FLAG,STREP} fehérjék interakciójának vizsgálata

A RAS2 fehérje és az adenilát-cikláz közötti kölcsönhatás vizsgálatához *Escherichia coli* sejtekben fejeztük ki az adenilát-cikláz RAS-kötő doménjét (RBD – RAS-binding domain), melyhez N-terminálisan Glutathion-S transzferázt (GST-t) kapcsoltunk. Ehhez az adenilát-cikláz RAS-kötő doménjét (749-828 aminosavak) kódoló genomi régiót PCR segítségével felszaporítottuk, majd a terméket a *pGEX4T-1* vektor (GE Healthcare Life Sciences #100759) *BamHI* és *EcoRI* hasító helyei közé építettük.

Az így kapott *pGEX-ac-rbd* plazmiddal transzformáltuk a kompetens sejteket, majd indukáltuk a fehérje kifejeződését. Az indukcióhoz friss kultúrákat oltottunk le ampicillint tartalmazó (100 µg/ml) Luria Bertani (LB) médiumba (OD₆₀₀=0,1), melyeket 37 °C-on tovább növesztettünk, amíg a 600 nm-en mért optikai denzitás elérte a 0,5 értéket. Ezt követően 0,1 mM IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid) hozzáadásával egy éjszakán át 15 °C-on indukáltuk a fehérje termelődését. (Az LB médium összetétele az agart leszámítva megegyezik az 5.2.5. fejezetben leírt LB táptalaj összetételével.)

Ezt követte az *E. coli* sejtek feltárása és a fehérje izolálása. A baktérium sejtek feltárásához elsőként 10 percig 1871 g nagyságú erőterben centrifugáltuk a szuszpenziót.

Majd lízis pufferben felszuszpendáltuk az üledéket és jégen 5x40 másodpercig tartó ultrahangos szonikálással tártuk fel a sejteket. Az egyes lépések között 1 perc szünetet tartottunk annak érdekében, hogy ne melegedjen fel túlságosan a szuszpenzió. Ezután 15 perc centrifugálás következett 16100 g nagyságú erőterben, 4 °C-on. Mivel az expresszált fehérje jelentős része zárványtestbe (inclusion body – IB) került, annak kioldása érdekében 0,2 % Na-szarkozilt tartalmazó IB-pufferben (1 mM koncentrációjú EDTA-val és 0,1 mM PMFS-sel kiegészített PBS puffer) szuszpendáltuk az üledéket. A felülúszót megtartottuk, majd egy újabb 15 perces, 16100 g-vel történő centrifugálás után a mintákat 12 %-os SDS-PAGE gélen futtattuk 50 V feszültség érték mellett a koncentráló, majd 100 V feszültség érték mellett a szeparáló gélben. A fehérjéket Coomassie blue festéssel tettük láthatóvá. (A Coomassie festék oldat 100 ml-enként 30 ml metanolt, 6 ml ecetsavat, valamint 1,6 g Coomassie brilliant blue R-250 festéket tartalmazott.)

Miután a festéssel megbizonyosodtunk a fúziós fehérje jelenlétéről, azt a lizátumból glutation-agaróz gyöngy (Sigma Aldrich #G4510) segítségével tisztítottuk a gyártó ajánlásának megfelelően. Ezután háromszori, TBS-ben történő mosást követően 30 mg *N. crassa* fehérje lizátumot adtunk a gyöngyök és a baktérium sejtekből származó fehérje szuszpenzió keverékéhez, 1,5 ml térfogatban. A mintákat egy órán át inkubáltuk 4 °C-on állandó forgatás mellett. Újabb háromszori TBS-sel történő mosást követően a fehérjéket SDS mintapuffer segítségével 10 percig 95 °C-on történő inkubáció során eluáltuk a gyöngyről, majd SDS-PAGE-t követően Western blot segítségével detektáltuk a GST-AC-RBD fúziós fehérjéhez kapcsolt RAS2 fehérjét.

3.11. RNS izolálás

A mintákat az 5.5. fejezetben leírtak szerint homogenizáltuk folyékony nitrogén segítségével dörzsmozsárban. 50 mg homogenizált micéliumhoz 500 µl TriReagent® oldatot (Sigma Aldrich #93289) pipettáztunk elszívófülke alatt. Ezután Eppendorf Thermomixer compact készülékben 850 rpm-mel rázattuk a mintákat 25 °C-on 5 percig. Ezt követően 100 µl kloroformot adtunk a mintákhoz, majd újabb rázás következett 25 °C-on 5 percig 850 rpm-mel. E lépés során az extrahált RNS a felső, vizes fázisba kerül. Ezután 12000 g nagyságú erőterben 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk a mintákat, a felülúszóból óvatosan leszívtunk 250 µl-t, és ugyanennyi izopropanolt pipettáztunk hozzá

egy új mikrocentrifuga csőben, ezzel denaturálva az RNS-t. Ezt követően 25 °C-on 10 percig rázattuk a mintákat 850 rpm-mel, majd 12000 g nagyságú erőterben 15 percig 25°C-on centrifugáltuk azokat. A felülúszó leöntését követően 800 µl -20 °C-os 70 %-os etanolt adtunk hozzájuk, vortexeltük őket, majd 8500 g nagyságú erőterben 4 °C-on 5 percig centrifugáltuk. A mosási lépést további két alkalommal ismételtük, majd a visszamaradó csapadékot 37 °C-on 15 percig szárítottuk. 45 µl RNáz-mentes vizet és 1µl RNáz inhibitor (Ribolock Rnase Inhibitor [40 U/µl] Thermo Scientific #EO0382) adtunk a csapadékhoz, és 55 °C-on 10 percig 850 rpm-mel rázva feloldottuk az RNS-t. A minták koncentrációját Nanodrop One[®] készülékkel határoztuk meg. Az RNS minőségét optimálisnak tekintettük, amennyiben az A260/280 hányados 2,0 feletti, valamint az A260/230 hányados 1,8 és 2,2 közötti értékeket vett fel. A mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3.12. cDNS szintetizálás

A reverz-transzkripciót a QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (QIAGEN #205314) segítségével végeztük. 1 µg RNS-ből szintetizáltunk cDNS-t DNáz kezelést követően, a gyártó útmutatásai szerint. A mintákhoz 40 µl RNáz-mentes és RNáz inhibitor tartalmazó vizet adtunk, majd felhasználásig -20 °C-on tároltuk őket.

3.13. Valós idejű kvantitatív polimeráz lánreakció

A transzkript-szinteket valós idejű kvantitatív PCR (qPCR) módszerrel határoztuk meg hidrolízis próba, illetve SYBR Green interkaláló festék segítségével LightCycler[®] 480 készüléken. A mérés során a gyártó által javasolt reakció elegyeket alkalmaztuk (LightCycler[®] 480 Probes Master, Roche, #04887301001 és LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master, Roche, #04707516001) a leírásnak megfelelően. A cDNS mintákból 2,5 µl-t pipettáztunk a 96-lyukú lemez egyes well-jeibe, majd ehhez a megfelelő génre vonatkozó oligonukleotidokat tartalmazó reakcióelegyből 7,5 µl-t adtunk.

A kísérletek során alkalmazott oligonukleotidokat a 4. táblázat tartalmazza. Mintánként három ismétléssel dolgoztunk. A lemezre ezt követően optikai fóliát ragasztottunk, 1000 g erősséggel egy percig centrifugáltuk, majd a LightCycler[®] 480 készüléken elindítottuk a megfelelő programot. A C_t értékek meghatározását a LightCycler Relative Quantification Software segítségével a második derivált maximumának meghatározásával végeztük. Az expresszió relatív kvantifikálása során a vizsgálni kívánt

gén kifejeződésének szintjét minden esetben egy ún. háztartási gén szintjéhez viszonyítottuk. A keletkezett termék (R) relatív mennyisége az alábbi képlet segítségével számítható ki: $R = 2^{-(Ct_{target}-Ct_{referencia})}$

4. táblázat: A qPCR mérések során alkalmazott oligonukleotid szekvenciák

Gén neve	Hidrolízis próbával végzett mérések során alkalmazott oligonukleotid szekvenciák (5'-3')		
	Forward/Felső	Reverse/Alsó	Hidrolízis próba
<i>wc-1</i>	ACCTCGCTGTCC TCGATTTG	TGCTGGGCCTCT TTCAACTC	[6-FAM]CCGTCCGAC ATCGTGCCGG[TAMRA]
<i>wc-2</i>	AGTTTGCACCC AATCCAGAGA	AGGGTCGAAGCC ATCATGAAC	[6-FAM]AGTCGCCTT TCTGCCAG[TAMRA]
<i>ccg-2</i>	GCTGCGTTGTCG GTGTCAT	GGAGTTGCCGGT GTTGGTAA	[6-FAM]AATGTGGTG CCAGCGTCAAGTGCT G[TAMRA]
<i>al-2</i>	ACCTGGCCAATT CGCTCTTT	GACAGAAGGAGT ACAGCAGGATCA	[6-FAM]CTGGTCGAC TCCGCATT[TAMRA]
<i>vvd</i>	ACGTCATGCGCT CTGATTCTG	AAAAGCTTCCGA GGCGTACA	[6-FAM]CGACCTGAA GCAAAAAGACACGC CA[TAMRA]
<i>ras2</i>	GCACTTCGTCGA AACCTATG	CTCTAGCATGCA TGCTTGAC	[6-FAM]CCACTATCG AGGACTCCTACAGG AAAC[TAMRA]
<i>act</i>	AATGGGTCGGGT ATGTGCAA	CTTCTGGCCCAT ACCGATCA	[6-FAM]CAGAGCTGT TTCCCTTCCATCGT TGGT[TAMRA]
<i>frq</i>	TTGTAATGAAAG GTGTCC GAAGGT	GGAGGAAGAAGC GGAAAACA	[FAM]ACCTCCCAA TCTCCGAACTCGC CTG[TAMRA]
<i>gna-3</i>	ATATCCTCACTT GACACAAGCC	CGGAGTCTTTAA GGGCGTTATT	[6-FAM]TCCAACATC CGTCTCGTGTTTGCT [TAMRA]
<i>sarA</i>	TGGTTGTGGTCT TGGTTCTAC	TGGCAACGCGAT CATTCT	[6-FAM]ATATCCTTT CCAACCTCGGCCTG C[TAMRA]
<i>tfc-1</i>	CGATTTGATCCC TCCTCCTAAC	GGGCTGATTTC TTGGTGTA	[6-FAM]ATGAGCTTG CCCTTCCAATACGGT [TAMRA]
Gén neve	A SYBR green interkaláló festékkel végzett mérések során alkalmazott oligonukleotid szekvenciák (5'-3')		
	„Forward/Felső”		„Reverse/Alsó”
<i>aga-1</i>	CAGTGTCAAGAAGCTGGTCTA C		TGCCGTGCTTGTCAATGT
<i>gln-1</i>	GCAACACGTCCTCACTACTT		GATTGTTGATTCTGACGCCATTT

<i>gdh-1</i>	AGAGCAGATGAAGCAAGTCA AG	CGTCGATGCCAAGCTCATTAT
<i>con-10</i>	CTGGCACTGGTAACGACAA	GCAATTTTCGCGCTGTTTCT
<i>flf</i>	GGCAGCGATAACTCGTGAA	AAGAAGGCGTAGCATGTGAA
<i>pect</i>	CTTGGGTATATCACCGCCTTG	CTCCCGAAGGCACATTGTTA
<i>tca-3</i>	CTCAGCTCCTACAACCGTAAC	GATGGACATGGCAACAACAAG
<i>coldh</i>	TCTTGGATGAGCGCCTTAAC	AGAGCGGTTCGAATAAGTGTG

Mivel a korábban háztartási génként alkalmazott *aktin* szintje hosszantartó tápanyagmegvonás során jelentős mértékben csökkent, irodalmi adatok alapján (212) újabb háztartási gén jelölteket választottunk, majd kísérleti körülményeink mellett vizsgáltuk ezek szintjének változását. Azt találtuk, hogy a legkisebb varianciát egy G_{α} alegységet kódoló gén, a *gna-3* mutatja. A C_t értékek a 5. táblázatban találhatók.

5. táblázat: Az *aktin* expressziós szintje csökken hosszantartó glükózmegvonás esetén.

A kísérlet körülményeinek leírása a 35. ábránál található. A gének C_t értékeit qPCR segítségével határoztuk meg. (n=3, \pm SEM) Az utolsó sorban az RNAseq alapján számított expressziós szintek aránya (*wt* 0,01%/2%) látható.

	<i>act</i>	<i>gna-3</i>	<i>tfc-1</i>	<i>sarA</i>
C_t (<i>wt</i> 2%)	18,34 \pm 0,047	24,04 \pm 0,046	26,94 \pm 0,027	20,61 \pm 0,053
C_t (<i>wt</i> 0,01%)	20,81 \pm 0,021	24,43 \pm 0,082	27,51 \pm 0,372	21,93 \pm 0,191
RNAseq (0,01%/2%)	0,73	1,01	1,07	0,82

3.14. RNS szekvenálás és adatelemzés

Az RNS szekvenáláshoz a mintákat folyékony kultúrában növesztettük standard körülmények, illetve glükózmegvonás mellett 12-12 órás fény-sötétség ciklusban 48 órán keresztül. A mintákat (n=4) ZT12 időpontban takarítottuk be. RNS-t preparáltunk a TriReagent[®] (Sigma Aldrich #93289) izoláló oldat segítségével az 5.11. pontnak megfelelően. DNáz kezelést követően az RNS minőségét Nanodrop[™] One[®] spektrofotométerrel, Qubit[™] 4.0 fluoriméterrel (Invitrogen) és Agilent TapeStation 4150 rendszer segítségével ellenőriztük. A könyvtár készítést (PE-100 könyvtár) és a szekvenálást a BGI Genomics végezte. A szekvenálás minőségellenőrzését, a térképezést,

az indexálást és a duplikátumok ellenőrzését, a kvantifikálást és az analízist laboratóriumunk együttműködő partnere végezte. A szekvenálás minőségellenőrzése a FastQC (213) felhasználásával történt. A térképezés a STAR (214) illesztőprogram segítségével az Ensembl *Neurospora crassa* genom adatai alapján (*Neurospora crassa*.NC12.48) történt (215). Az indexáláshoz és a duplikátumok ellenőrzéséhez pedig a samtools eszköztárát alkalmazták (216). Ezt követően a kvantifikálás a HTSeq-count (217) segítségével történt. A differenciált expressziós analízist a DESeq2 (218) csomag alkalmazásával végezték R nyelven (R Core Team, 2020). (Az RNS szekvenálás nyers adatai az alábbi adatbázisban férhetőek hozzá: <https://doi.org/10.5061/dryad.t4b8gtj4p>) Az RNS szekvenálás eredményének ellenőrzéséhez 9 gén expressziós szintjét vizsgáltuk qPCR segítségével (47. ábra, 7. táblázat).

3.15. *In vivo* luciferáz assay

A *frq* promóter ritmicitását *in vivo* luciferáz assay segítségével vizsgáltuk. E vizsgálat során a luciferáz enzim (firefly - szentjánosbogárból származó luciferáz) génje a *frq* promótert követően került beépítésre a megfelelő törzsekben, így a promóter aktiválódása esetén a luciferáz gén átíródik és a keletkező enzim oxidálja a táptalajhoz adott szubsztrátot, a biolumineszcens D-luciferint (Promega #E1602). A reakció eredményeként bekövetkező fényemissziót detektáljuk. A fényintenzitás-idő függvény segítségével a *frq* promóter aktivitása szenzitíven monitorozható.

A kísérlet során a megfelelő táptalajt (amely Vogel's oldatot, 0.025 % glükózt, 0.025 % fruktózt, 0.5 % szorbózt, 1 % agarózt, 10 ng/ml biotint és 150 mM luciferint tartalmazott) és gombatorzset tartalmazó 96-lyukú lemezt 30 °C-on inkubáltuk egy napig sötétben, majd egy napig világosban. Ezt követően a luminométerbe (POLARstar® Omega – BMG Labtech) helyezve (fény-sötétség transzfer) 4-5 napon keresztül detektáltuk a lumineszcenciát. A mérési időpontok fél óránként követték egymást 4 s integrációs idővel. A mérés végeztével az adatokat Excel fájlba importáltuk, majd transzformáltuk - levontuk az alapvonalat és az első nap adatait elhagytuk az ekkor tapasztalható hirtelen lumineszcencia csökkenés miatt, melynek oka a *frq* promóter aktivitásának csökkenése fény-sötétség transzfer hatására (55). Az adatok további elemzése és a periódus meghatározása a ChronOSX 1.0.7.® programmal zajlott.

3.16. PP2A aktivitás mérés

A PP2A aktivitást a Promega Serine/Threonine Phosphatase Assay System (#V2460) segítségével végeztük a leírásnak megfelelően. Minden reakció 10 µg fehérjét tartalmazott és 20 percig zajlott szobahőmérsékleten.

3.17. A kísérletek során alkalmazott számítógépes programok és statisztikai módszerek

A race tube kísérletek kiértékeléséhez a ChronOSX 1.0.7[®] programot használtuk. A kísérletek statisztikai értékelését Microsoft 365 (Excel) programmal, valamint a Statistica 13 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végeztük. A luciferáz assay során a berendezés szoftverét, a Reader Control és a MARS Data Analysis programokat használtuk. A qPCR során a C_t értékeket a LightCycler Relative Quantification Software-rel számítottuk. A hatásokat szignifikánsnak tekintettük, amennyiben a p érték kevesebb volt, mint 0,05. (n.s. – nonsignificant (nem szignifikáns) A szignifikancia szinteket az alábbiak szerint jelöltük: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.) A hibavonalak az átlag szórását (\pm SEM) jelölik.

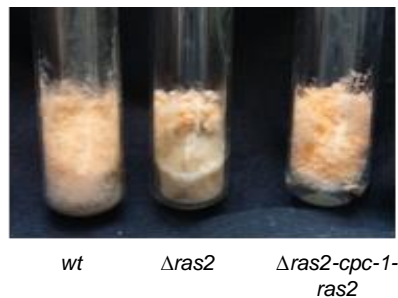
4. Eredmények

Munkánk során a *N. crassa* cirkadián ritmusának metabolikus változásokra adott választát vizsgáltuk. Elsőként a RAS jelpályának az óra metabolikus kompenzációjában betöltött szerepét tanulmányoztuk, majd azt vizsgáltuk, hogy hosszantartó glükózmegvonás esetén hogyan változik meg az óraműködés.

4.1. A RAS jelpálya szerepet játszik a *Neurospora* óra metabolikus kompenzációjában

4.1.1. A RAS2 befolyásolja a konidizációt *N. crassa*-ban

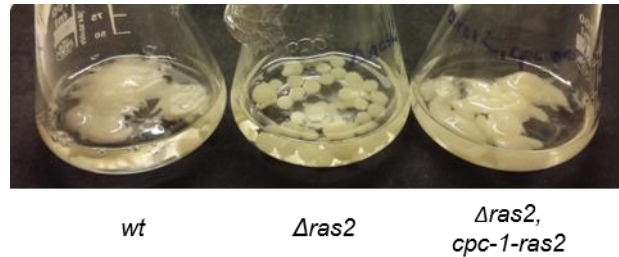
Annak érdekében, hogy a cirkadián ritmus és a RAS2 által mediált jelátviteli útvonal közötti lehetséges kapcsolatot tanulmányozzuk, elsőként fenotípus szinten vizsgáltuk a *ras2* génhányos törzs cirkadián tulajdonságait. A $\Delta ras2$ törzset (FGSC #12467) a *Neurospora* Genom Projekt során hozták létre (42) és fenotípusa hasonlóan bizonyult a korábban leírt *smc07* mutánsához (199): ferdeagaron a $\Delta ras2$ kevesebb légmicéliumot képez, mint a *wt* és ennek megfelelően kevesebb konídiumot is termel, amely -amint az a 8. ábrán is látható-, elsősorban a táptalaj felső részén helyezkedik el. Annak megerősítésére, hogy valóban a *ras2* gén hiánya eredményezte a $\Delta ras2$ törzs morfológiai defektusait, létrehoztunk egy törzset, amely $\Delta ras2$ háttérben expresszálja a RAS2 FLAG epitóppal jelölt változatát, és az expresszió a *cpc-1* promóter szabályozása alatt áll. A $\Delta ras2, cpc-1-ras2$ törzs a *wt*-hoz hasonló fenotípust mutatott szilárd táptalajon (8. ábra).



8. ábra: A $\Delta ras2$ törzs növekedési fenotípusa jelentősen különbözik a *wt*-tól és a RAS2_{FLAG} fehérje $\Delta ras2, cpc-1-ras2$ törzsben való expressziója visszaállítja a *wt* fenotípust. Az ábrán a jelölt törzsek reprezentatív mintái láthatók ferdeagaron.

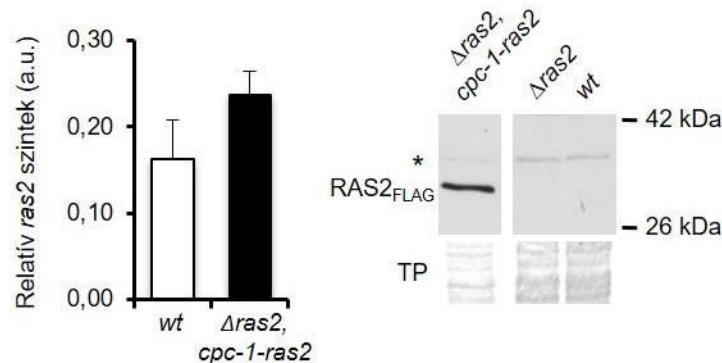
A génhányos törzs morfológiája folyékony médiumban is eltért a vad típustól: a $\Delta ras2$ lassabban nőtt, mint a *wt* és kisebb telepek formájában képzett micéliumot a vad típusban

megfigyelhető, egybefüggő micéliumtömeeggel szemben. A $\Delta ras2, cpc-1-ras2$ törzs a *wt*-hoz hasonló fenotípust mutatott folyékony médiumban is (9. ábra).



9. ábra: A *ras2* génhianyos törzs morfológiai jellemzői folyékony médiumban. A kultúrák minimál tápoldatban, állandó világosban (LL) nőttek.

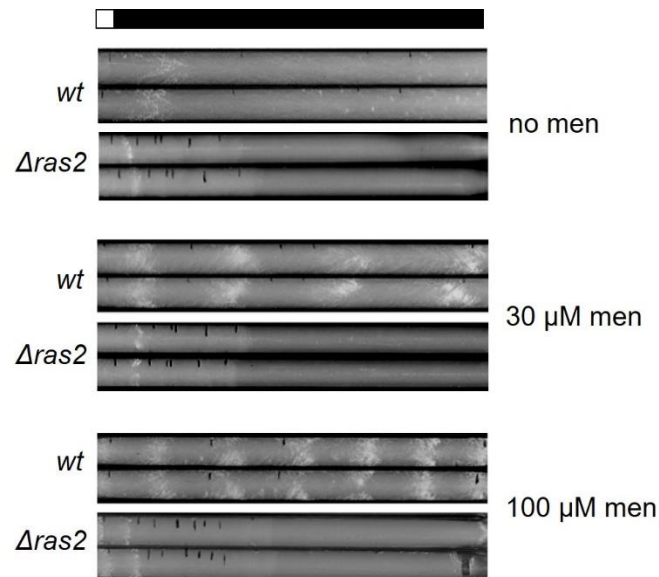
Amint az a 10. ábrán is látható, a $\Delta ras2, cpc-1-ras2$ törzsben a *wt*-hoz hasonló volt a *ras2* RNS-szint, továbbá a törzs teljes sejtlizátumában sikerült a várható molekulatömeg magasságában (29,5kDa) kimutatni a fehérjét az anti-FLAG antitesttel, míg a protein szignál nem volt látható sem a $\Delta ras2$ törzsből, sem pedig a *wt*-ből készített lizátumokban.



10. ábra: A FLAG epitóppal jelölt RAS2 expressziója $\Delta ras2$ háttérben. Baloldali panel: *ras2* RNS-szintek a jelölt törzsek ferdeagar kultúráiban. A *ras2* RNS-szintek az *aktin* RNS-szintekhez viszonyítva kerültek meghatározásra qPCR segítségével. A $\Delta ras2$ törzsben *ras2* RNS nem volt detektálható. (n=4, \pm SEM) Jobboldali panel: A jelölt törzseket folyékony kultúrában, konstans világosban (LL) növesztettük. A teljes sejt extraktumot Western-blot segítségével analizáltuk, anti-FLAG antitestet alkalmazva. *: specifikus jel; TP: total protein.

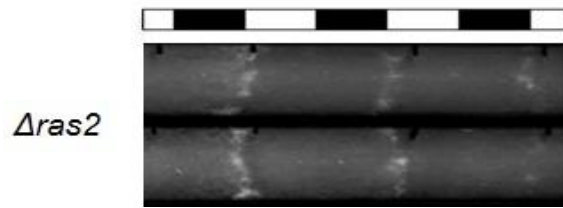
A RAS2_{FLAG} expressziója megszüntette a génhianyos törzsben megfigyelt morfológiai defektusokat, ami arra utal, hogy a fúziós fehérje funkcionálisan aktív és a megváltozott morfológia valóban a *ras2* defektus következménye volt (8. és 9. ábra).

A *N. crassa* cirkadián tulajdonságainak jellemzése legegyszerűbben konidizációs ritmusának vizsgálatán keresztül történhet. Ehhez a $\Delta ras2$ törzset race tube assay segítségével vizsgáltuk állandó körülmények között. Az *smco7* mutánséhoz hasonlóan (199) a $\Delta ras2$ is csökkent növekedési sebességet mutatott a *wt*-hoz képest. Az irodalmi adatoknak megfelelően (50, 55) a *wt* nem mutatott konidizációs ritmust minimál táptalajon, azonban a reaktív oxigén származékokat generáló menadion jelenlétében fenntartott konidizációt figyelhettünk meg. Ezzel szemben a $\Delta ras2$ törzsben nem volt megfigyelhető konidizáció még magas menadion koncentráció (100 μ M) alkalmazása mellett sem, ami azt valószínűsíti, hogy a *ras2* deléciója hatással van a ritmusos kimenetre (11. ábra).



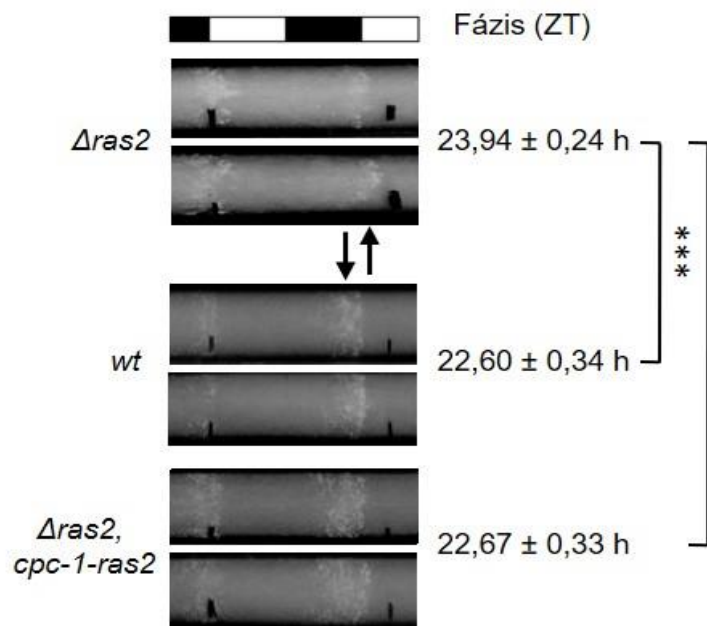
11. ábra: A menadion nem indukál konidizációs ritmust a $\Delta ras2$ törzsben állandó sötétben. A *wt* és a $\Delta ras2$ törzseket a feltüntetett mennyiségű menadionot tartalmazó futtatócsövekre oltottuk, majd két napig állandó világosban inkubáltuk őket. Ezt követően sötétbe helyeztük a csöveket. Az első fekete vonal a növekedési frontot jelöli az LD tranzíció időpontjában. Az ábrán reprezentatív race tube-ok láthatók.

Mivel a változó körülmények általában elősegítik a konidizációs ritmus kialakulását (54), a race tube kultúrákat 12 órás fény-sötétség ciklusokban inkubáltuk a továbbiakban. Amint az a 12. ábrán is látható, ilyen körülmények között a $\Delta ras2$ törzs is több napig tartó fenntartott konidizációs ritmust mutatott.



12. ábra: A $\Delta ras2$ fenntartott konidizációs ritmust mutat L/D12 körülmények között. A $\Delta ras2$ törzs konídiumaival leoltott futtatósöveket 12 órás fény-sötétség ciklusokban inkubáltuk. A fekete vonalak a növekedési frontnak felelnek meg, melyet naponta jelöltünk a világos fázis alatt.

Amikor azonban a konidizáció fázisát alaposabban vizsgáltuk (13. ábra) és összehasonlítottuk a *wt*-sal, szignifikáns késést figyeltünk meg a $\Delta ras2$ törzs fázisában, ami arra utal, hogy a RAS2 aktivitása változó körülmények között is befolyással van az óraműködésre.

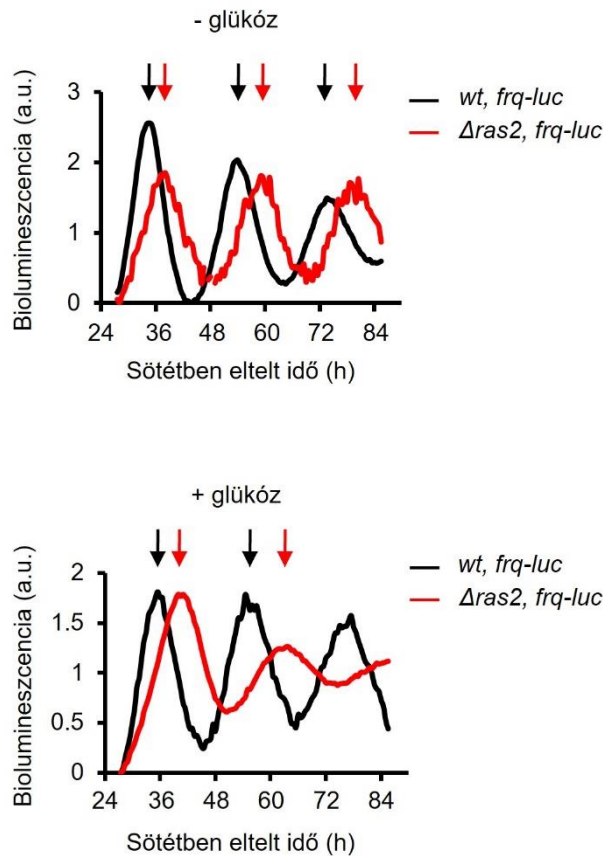


13. ábra: A $\Delta ras2$ törzsben késik a fázis változó körülmények között. A futtatósövekre leoltottuk a $\Delta ras2$, a *wt*, és a $\Delta ras2, cpc-1-ras2$ törzseket, majd 12 órás fény-sötétség ciklusokban inkubáltuk őket. Annak érdekében, hogy a konídiumok pozíciója könnyebben összehasonlítható legyen, a képeket úgy igazítottuk, hogy a napi növekedési távolságok az ábrán hasonlóak legyenek az egyes törzsek esetében. Reprezentatív race tube-ok kerültek ábrázolásra. A konidizáció maximumának átlagos fázisát határoztuk meg. (n=7 (*wt*), 18($\Delta ras2$), 14($\Delta ras2, cpc-1-ras2$), \pm SEM)

A $\Delta ras2$, *cpc-1-ras2* törzsben a konidizáció fázisa hasonló volt a vad típusban megfigyelhetőhöz, ami arra utal, hogy a RAS2_{FLAG} mutáns háttérben való expressziója ún. fenotípus menekítést eredményez.

4.1.2. A RAS2 szerepet játszik a cirkadián ritmus glükózkompenzációjában

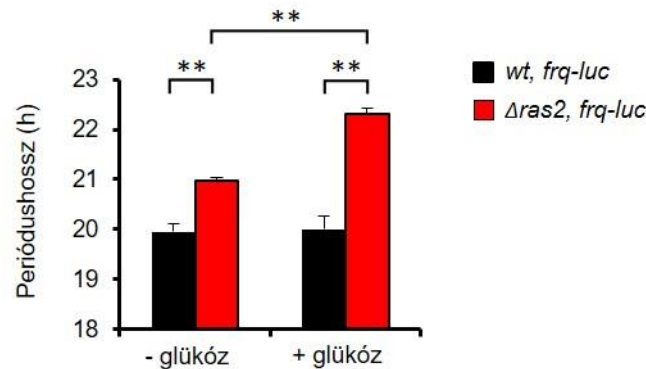
Annak érdekében, hogy részletesebben tudjuk vizsgálni a *ras2* hiányának az óraműködésre gyakorolt hatását, létrehoztunk egy újabb $\Delta ras2$ törzset, amelyben a luciferáz expressziója a *frq* promóter szabályozása alatt áll. Az első kísérletek során glükózt nem tartalmazó médiumot alkalmaztunk, és a *frq* promóter aktivitásának ritmusát állandó sötétben követtük (14. ábra, felső panel).



14. ábra: A RAS2 glükózfüggő módon szabályozza a cirkadián ritmust. A *ras2* mutáció hatással volt a *frq* promóter aktivitás oszcillációjának robusztusságára és periódusára is. Glükóz hiányában (felső panel) vagy jelenlétében (alsó panel) vizsgáltuk a jelölt törzseket *in vivo* luciferáz assay segítségével. A luciferáz aktivitás időfüggő változását egy reprezentatív kísérlet párhuzamos mintáiból (10-

14 minta) származó átlagolt görbéként ábrázoltuk. A fekete és a piros nyilak a fázis napi maximumát jelölik, rendre a *wt, frq-luc* és a $\Delta ras2, frq-luc$ törzsekben.

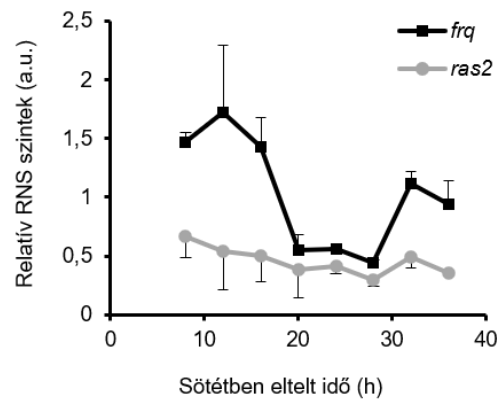
A $\Delta ras2$ törzsben szignifikánsan hosszabb volt a cirkadián periódus, mint a kontrol törzsben, ami arra enged következtetni, hogy a RAS2 által mediált jelátvitel kölcsönhatásban áll a molekuláris órával (15. ábra).



15. ábra: A cirkadián periódus a $\Delta ras2$ törzsben glükózra érzékeny és hosszabb, mint a *wt*-ban. A biolumineszcencia időfüggő változásait a jelölt törzsekben a 14. ábránál bemutatottak szerint határoztuk meg és a periódust a Chrono program segítségével számítottuk. (n=22-28, \pm SEM, kétszemponos ANOVA, post-hoc teszt: Tukey HSD)

Amint az a korábbi adatok alapján várható volt (1), glükóz hozzáadására a vad típusú törzs ritmusának sem robusztussága, sem pedig periódusa nem változott (14. ábra, alsó panel; 15. ábra). Ezzel szemben a *ras2* génihiányos törzsben az amplitúdó fokozatos csökkenése volt megfigyelhető, emellett ekkor a periódus több, mint két órával volt hosszabb, mint a *wt* esetében. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az oszcillátor működés glükózzal szembeni kompenzációjához szükség van a működőképes RAS2 fehérjére.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a *ras2* expressziója a cirkadián óra szabályozása alatt áll-e a vad típusban. Amint az a 16. ábrán is látható, amíg a *frq*-szintek ritmikus változást mutattak mintáinkban, a *ras2* mRNS nem oszcillált, ami arra utal, hogy a *ras2* *N. crassa*-ban nem *ccg*.



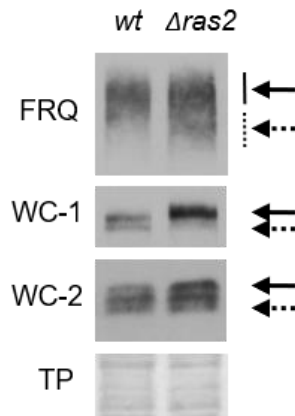
16. ábra: A *ras2* expressziója nem ritmikus. A *wt* törzs folyékony kultúráit fénytől való átmenet során szinkronizáltuk, majd a mintákat a jelölt időpontokban takarítottuk be DD-ben. A *frq* (feketével jelölve) és a *ras2* (szürkével jelölve) RNS-szinteket az *aktin* RNS-szel szemben határoztuk meg qPCR segítségével. (n=3, ±SEM)

4.1.3. A *ras2* mutáció a molekuláris óra komponenseinek expresszióját és foszforilációját is megváltoztatja

A következő kísérletek során a fő órakomponensek expresszióját és foszforilációs állapotát hasonlítottuk össze a *wt*-ban és a $\Delta ras2$ -ben. A központi órafelhérjék - FRQ, WC-1 és WC-2 - elektroforetikus mobilitása azok foszforilációs állapotától függ, vagyis a foszforiláció a kisebb elektroforetikus mobilitással rendelkező fehérjealakok felhalmozódásához vezet (103, 114). Fontos megjegyezni, hogy az órakomponensek aktivitása korrelál foszforilációs állapotukkal, a negatív visszacsatolásban a hipofoszforilált nukleáris FRQ lesz aktív, amely hozzájárul a WCC foszforilációjához, ezáltal inaktivációjához (71).

Mivel az *in vivo* luciferáz assay eredményei azt valószínűsítették, hogy a *ras2* mutációnak az óraműködésre gyakorolt hatása glükóztól függ, a *Neurospora*-t további kísérleteink során glükózt tartalmazó standard médiumban növesztettük. Állandó világosban (LL) csupán minimális különbséget láttunk a FRQ fehérje szintjeiben, azonban a hipofoszforilált FRQ alakok nagyobb arányban jelentek meg a $\Delta ras2$ törzsben, mint a *wt*-ban (17. ábra). A $\Delta ras2$ törzsben a WC-1 fehérje szintjei magasabbak voltak, mint a *wt* esetében, és főként hiperfoszforilált formában voltak jelen. Noha a WC-2 expresszió

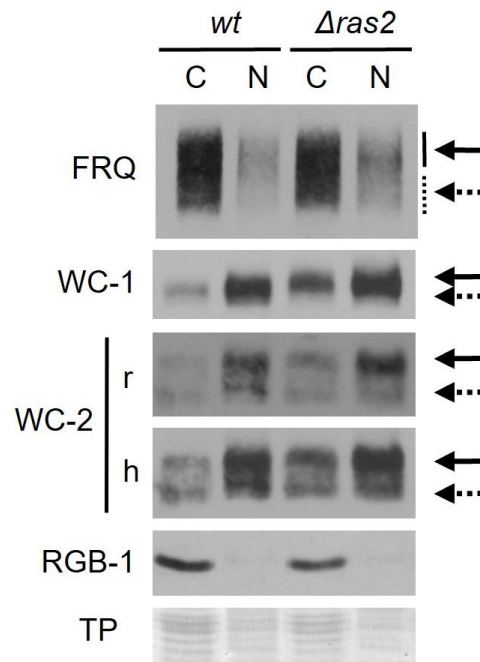
szintje hasonló volt a két törzsben, valamennyivel nagyobb arányban detektáltunk hiperfoszforilált alakokat a $\Delta ras2$ törzsben a *wt*-hoz képest (17. ábra).



17. ábra: A molekuláris óra komponenseinek expressziója eltérést mutat a $\Delta ras2$ törzsben a *wt*-hoz képest. A RAS2 a FRQ és a WC fehérjék expressziójára és foszforilációs állapotára is hatással van LL-ben. A jelölt törzseket állandó világosban növesztettük folyékony kultúrában 3 napig. A teljes sejt lizátumot Western-blot módszerrel analizáltuk. A folytonos és a szaggatott vonallal jelölt nyilak rendre a hiper- és a hipofoszforilált fehérje alakokat jelölik. TP: total protein.

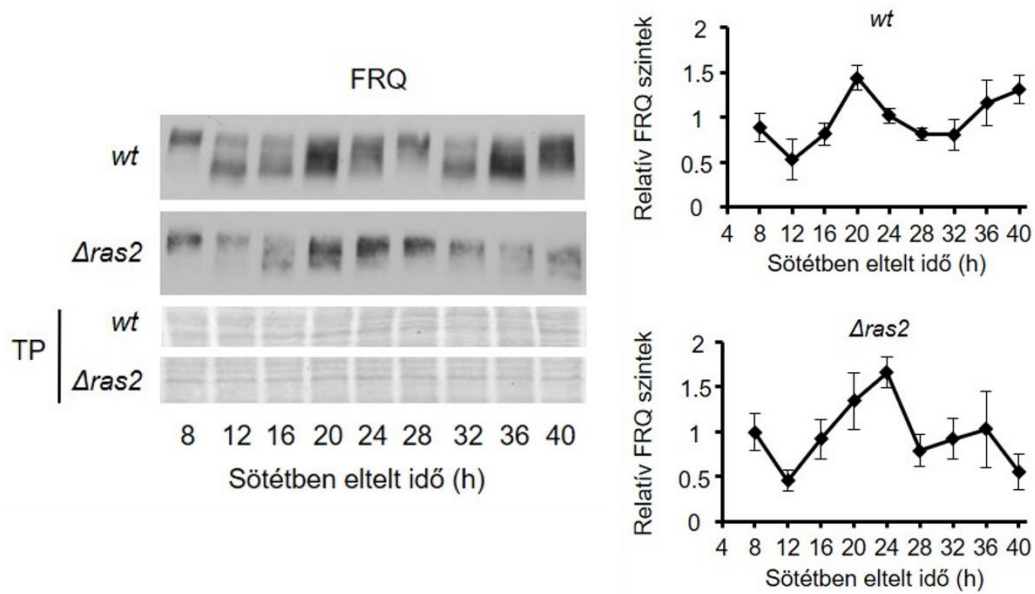
Annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk a *ras2* mutáció hatását a molekuláris órára, a következőkben szubcelluláris frakcionálást végeztünk és a citoszolban valamint a sejtmagban vizsgáltuk az órafehérjék expresszióját (18. ábra).

A hipofoszforilált FRQ alakok nagyobb arányban voltak jelen a nukleuszban a $\Delta ras2$ -ben, mint a *wt*-ban. Összhangban azzal, hogy a hipofoszforilált FRQ nagyobb aktivitással képes elősegíteni a WCC-foszforilációt, mindkét WC fehérje esetében a hiperfoszforilált formák domináltak a $\Delta ras2$ magi frakciójában. Továbbá, jelentős WC-1 mennyiséget detektáltunk a mutáns citoszol frakciójában, ami arra utal, hogy a WC-1 többlet a $\Delta ras2$ -ben főként inaktív citoszolikus formában van jelen.



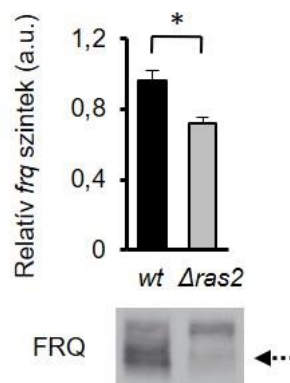
18. ábra: Az órakomponensek szubcelluláris megoszlása eltérést mutat a $\Delta ras2$ törzsben a *wt*-hoz képest. A törzseket a 17. ábra esetében leírtaknak megfelelően növesztettük. Szubcelluláris frakcionálást követően a citoszolikus (C) és a nukleáris (N) frakciókat Western-blottal analizáltuk. A folytonos és a szaggatott vonallal jelölt nyilak rendre a hiper- és a hipofoszforilált fehérje alakokat jelölik. Az RGB-1-et citoszolikus markerként alkalmaztuk (53). A WC-2 esetében hosszú (h) és rövid (r) expozíciót is mutatunk. TP: total protein.

A molekuláris oszcillátor további vizsgálatának céljából a FRQ expressziót állandó sötétben (DD) növesztett kultúrákban vizsgáltuk. Mindkét törzs esetében megfigyelhető volt a FRQ-szintek oszcillációja az első napon (19. ábra), azonban a $\Delta ras2$ törzsben későbbi időpontban láttuk a FRQ jelek maximumát, mint a *wt*-ban, ami molekuláris szinten is az óra fázisának késésére utal a mutáns törzsben.



19. ábra: A *FRQ* oszcillációja eltérő a *wt*-ban és a $\Delta ras2$ -ben. A *wt* és a $\Delta ras2$ kultúrákat az ábrán jelölt sötétben eltöltött időpontokat követően takarítottuk be és a fehérje expressziót Western-blottal elemeztük. TP: total protein. (baloldali panel) A *FRQ*-specifikus jeleket denzitometráltuk és az adott kísérlet összes mintájából számított átlagra normalizáltuk őket. ($n=4$, $\pm SEM$) (jobboldali panel)

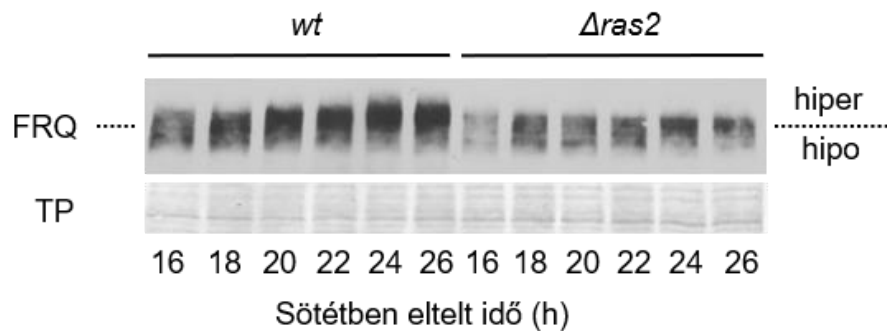
Az óraműködés fázisának késését jól tükrözi az alacsonyabb *frq* RNS-szint is DD12-ben, valamint, hogy az újonnan szintetizált, hipofoszforilált *FRQ* alakok is jelentősen kisebb mennyiségben detektálhatók ekkor a $\Delta ras2$ törzsben, mint a *wt*-ban (20. ábra).



20. ábra: A *frq* RNS expresszió csökkent mértékű és a *FRQ* főként hiperfoszforilált formában van jelen a $\Delta ras2$ törzsben a DD12 időpontban. A DD12 időpontban betakarított kultúrákból RNS-t (felső panel) és fehérje extraktumot (alsó panel) készítettünk. ($n=4$, $\pm SEM$, két mintás t-próba) A fehérjeszinteket Western blot

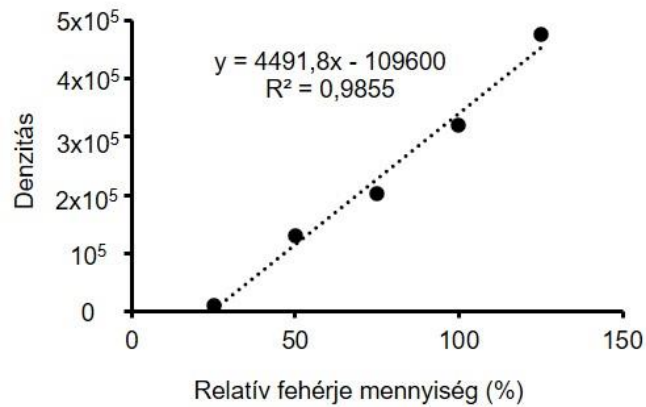
segítségével elemeztük. A szaggatott vonal az újonnan szintetizálódott hipofoszforilált FRQ alakokat jelöli.

Míg a *wt*-ban a FRQ szintje és foszforilációs állapota kifejezett oszcillációt mutatott a második cirkadián ciklus során is, addig a $\Delta ras2$ törzsben a fehérje mennyiségében és foszforilációs állapotában egy kevésbé kifejezett ritmust láttunk (19. ábra). Mivel *wt*-ban az újonnan szintetizálódott FRQ a DD16 időponttól kezdődően fokozatosan foszforilálódik, a jelenség alaposabb vizsgálatára a DD16 és DD26 közötti időintervallumban mind a FRQ expressziós szintjeit, mind pedig foszforilációs állapotát nagyobb időbeli felbontásban elemeztük (21, 23. ábra).



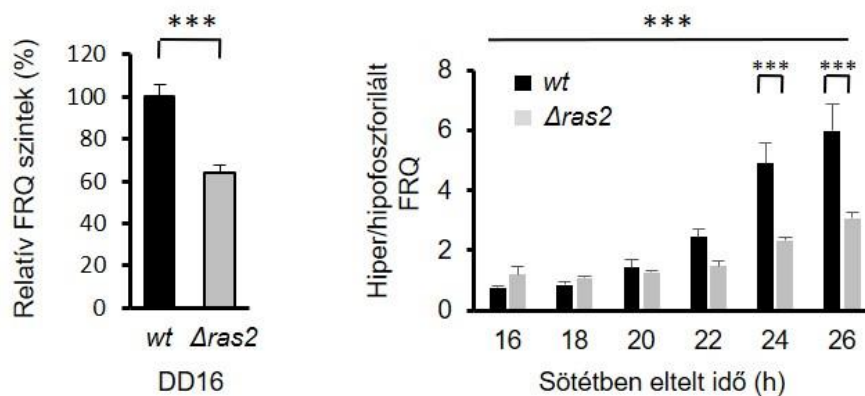
21. ábra: A *RAS2* hatással van a FRQ foszforilációjára állandó sötétségben. A kísérlet kivitelezése a 19. ábra esetében leírtak szerint történt. A szaggatott vonal a FRQ elektroforetikus mobilitásának középpontját jelöli a *wt*-ban DD16 időpontban. A fehérje szignálok a szaggatott vonal felett és alatt rendre hiper- és hipofoszforilált fehérje alakoknak tekintettük minden időpontban. TP: total protein.

A FRQ-szintek a $\Delta ras2$ törzsben alacsonyabbak voltak, mint a *wt*-ban (21. ábra). Ahhoz, hogy megbecsüljük a FRQ-szinteket a $\Delta ras2$ törzsben a *wt*-hoz képest, egy kalibrációs egyenest készítettünk, melynek során növekvő mennyiségű (25%-125%) *wt* fehérje extraktumot vittünk fel a géltre és meghatároztuk a FRQ-szinteket DD16 időpontban, amikor az újonnan szintetizálódott FRQ mennyiség már mindkét törzs esetében jól detektálható (22. ábra).



22. ábra: Kalibrációs egyenes a FRQ fehérjeszintek összehasonlítására a *wt* és a $\Delta ras2$ törzsben. A fehérje géltre növekvő mennyiségű (25%-125%) *wt* fehérje extraktumot töltöttünk és Western blot segítségével elemeztük. Meghatároztuk a FRQ-specifikus fehérje jelek denzitását, melyre lineáris regresszióval egyenest illesztettünk.

Szignifikánsan alacsonyabb FRQ expressziót figyeltünk meg a $\Delta ras2$ lizátumokban a *wt*-hoz képest. Továbbá, míg a *wt*-ban a FRQ fokozatosan és folyamatosan a hiperfoszforilált alakok irányába tolódott, a $\Delta ras2$ -ben ez az eltolódás lassabb volt és a fehérje nagymértékben foszforilált alakjai még DD26-nál sem jelentek meg (21, 23. ábra).

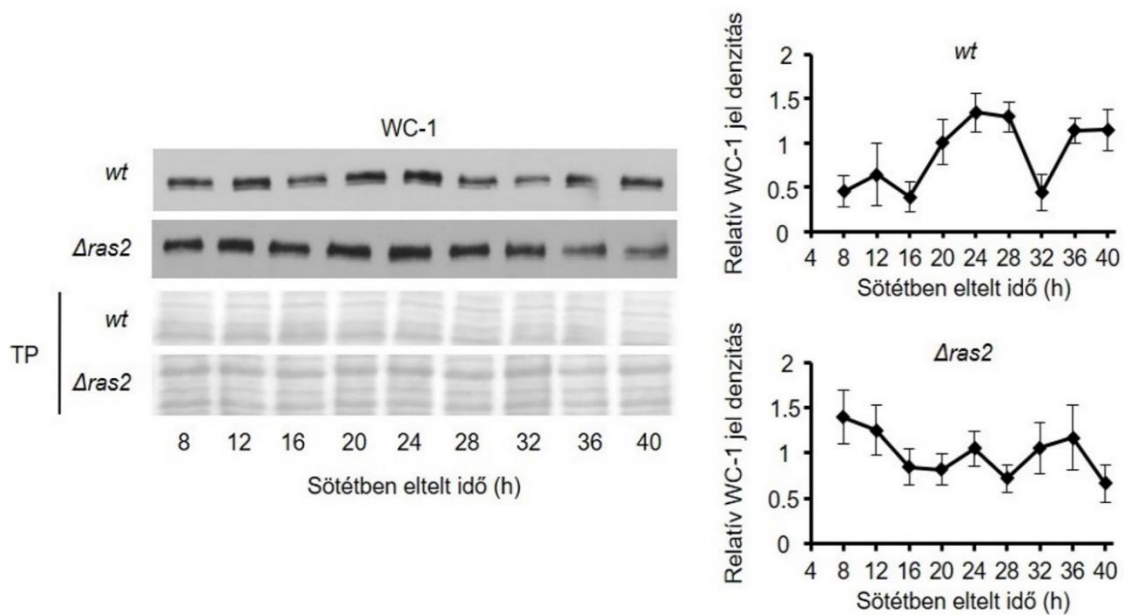


23. ábra: A FRQ expresszió és foszforiláció kvantifikálása. Baloldali panel: A DD16 időpontban a 22. ábránál leírt kalibrációs egyenes segítségével meghatározott FRQ-szintek láthatók a *wt*-ban és a $\Delta ras2$ törzsben. A 100% a *wt* mintákban mért átlagos FRQ-szinteknek felelt meg. (n=4, \pm SEM, kétmintás t-próba) Jobboldali panel: A hiper- és hipofoszforilált FRQ alakokat (ld. 21. ábra)

denzitometrálassal kvantifikáltuk és a hiper- és hipofoszforilált fehérje alakok hányadosait ábrázoltuk a jelölt időpontokban a *wt* és a $\Delta ras2$ törzsekben. ($n=3$, $\pm SEM$, faktoriális ANOVA (két faktor: idő: ismétléses, törzs: ismétlés nélküli, szignifikáns idő*törzs kölcsönhatás), post-hoc teszt: Tukey HSD teszt).

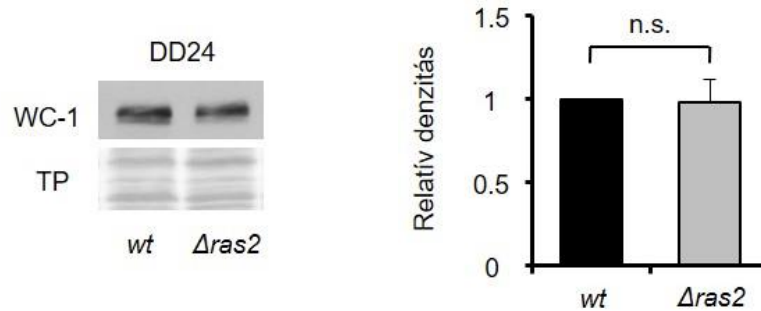
A hipo- és hiperfoszforilált FRQ alakok aránya jelentős különbséget mutatott a két törzs között az idő függvényében (szignifikáns idő x törzs kölcsönhatás, ismétléses kétszemponos ANOVA) (23. ábra, jobboldali panel). Eddigi eredményeink alapján tehát azt láttuk, hogy a RAS2 hiánya állandó körülmények között is hatással van a FRQ foszforilációra.

Irodalmi adatok szerint a WC-1 expresszió ritmusa a legtöbb esetben nem olyan robusztus, mint ami a FRQ esetében megfigyelhető (62, 220). Kísérleteink során a WC-1 szintje időfüggő változást mutatott a *wt*-ban, és a fázis első minimum és maximum időpontjai is hasonlóak voltak a korábban leírtakhoz (62, 76). Ezzel szemben a $\Delta ras2$ törzsben a WC-1 fehérjeszintek időbeli alakulását nem találtuk ritmikusnak (24. ábra).



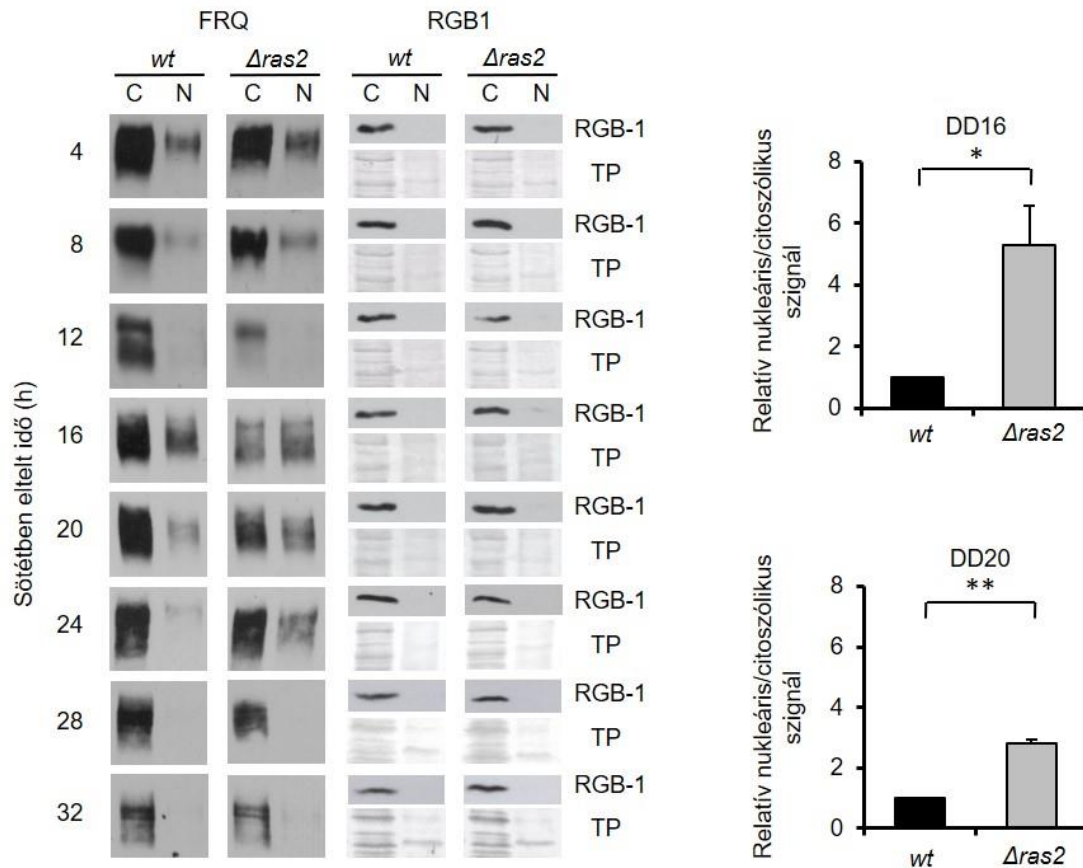
24. ábra: A WC-1 expressziójának időbeli változása állandó sötétben *wt*-ban és $\Delta ras2$ -ben. A kísérletet (baloldali panel), valamint a WC-1 expresszió időfüggő változásának elemzését (jobboldali panel) a 19. ábránál leírtak szerint végeztük. ($n=3-6$, $\pm SEM$) TP: total protein.

Ez a különbség is arra utal, hogy a mutánsban kevésbé robusztus a molekuláris óra működése, mint a vad típus esetében. DD24 időpontban összehasonlítottuk a WC-1-szinteket, azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a *wt* és a $\Delta ras2$ között (25. ábra).



25. ábra: A WC-1-szintek hasonlóak a vad típusban és a $\Delta ras2$ -ben állandó sötétben. A jelölt törzsek kultúráit DD24 időpontban takarítottuk be, majd a fehérje mintát Western bloton elemeztük. TP: total protein. (Baloldali panel.) A WC-1-specifikus jeleket denzitometráltuk, majd elemeztük. A $\Delta ras2$ minták jel denzitás értékei ugyanazon kísérlet *wt* mintáira lettek normalizálva. (Jobboldali panel.) (n=4, \pm SEM, egymintás t-próba)

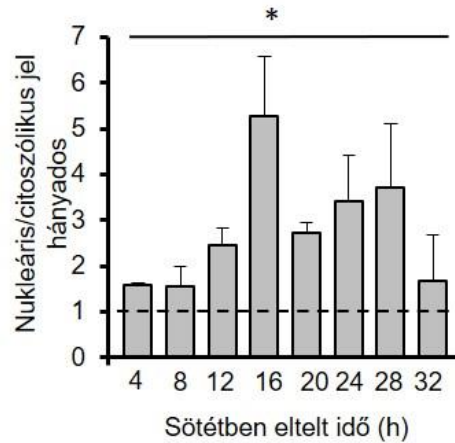
Mivel a FRQ foszforilációs állapota a fehérje nukleáris akkumulációját is befolyásolhatja, egy cirkadián cikluson keresztül elemeztük a citoszólikus és a nukleáris FRQ frakciókat a *wt*-ban és a *ras2* génhányos törzsben (26. ábra).



26. ábra: A *RAS2* szerepet játszik a nukleáris *FRQ*-szintek szabályozásában állandó sötétben. A *wt* és a $\Delta ras2$ kultúrákat a jelölt időpontokban takarítottuk be. Citoszólíkus (C) és nukleáris (N) frakciókat preparáltunk és a *FRQ*-szinteket Western bloton vizsgáltuk. Az *RGB-1*-et citoszólíkus markerként detektáltuk. *TP*: total protein. (Baloldali panel.) *DD16* és *DD20* időpontokban nukleáris/citoszólíkus szignál hányadosokat számítottunk. A $\Delta ras2$ minták értékeit az ugyanazon a Western-bloton vizsgált *wt* kontrol minták hányadosaira normalizáltuk. (Jobboldali panel.) (n=3-4, \pm SEM, egymintás t-próba)

Az LD tranzíciót követő nyolc órában mindkét törzsben hasonló mértékű *FRQ*-szint csökkenést figyelhattunk meg mindkét sejtkompartimentum esetében. A magban a *FRQ* a *wt*-ban *DD16* időpontban érte el a maximumát, majd gyors csökkenésnek indult a korábban leírt kinetikának megfelelően (209). Összhangban a megkésett *FRQ* szintézissel, a citoszólíkus fehérjeszintek lassabban emelkedtek a $\Delta ras2$ esetében, mint a *wt*-ban, és a fehérje a sejtmagban is eltérően viselkedett. A nukleáris *FRQ* szintek *wt*-ban *DD16* után megfigyelhető gyors csökkenésével szemben a $\Delta ras2$ törzsben még *DD24*-

ben is jelentős mennyiségű FRQ volt detektálható. Ennek a különbségnek a mennyiségi elemzéséhez meghatároztuk a nukleáris/citoszólikus FRQ jel hányadosokat. Mind DD16-ban, mind pedig DD20-ban szignifikánsan magasabb értékeket figyelhettünk meg a $\Delta ras2$ törzs esetében, mint a *wt*-ban (26. ábra). Emellett a teljes vizsgált időszakra vonatkozó statisztikai elemzés szignifikáns törzs-hatást mutatott (27. ábra).



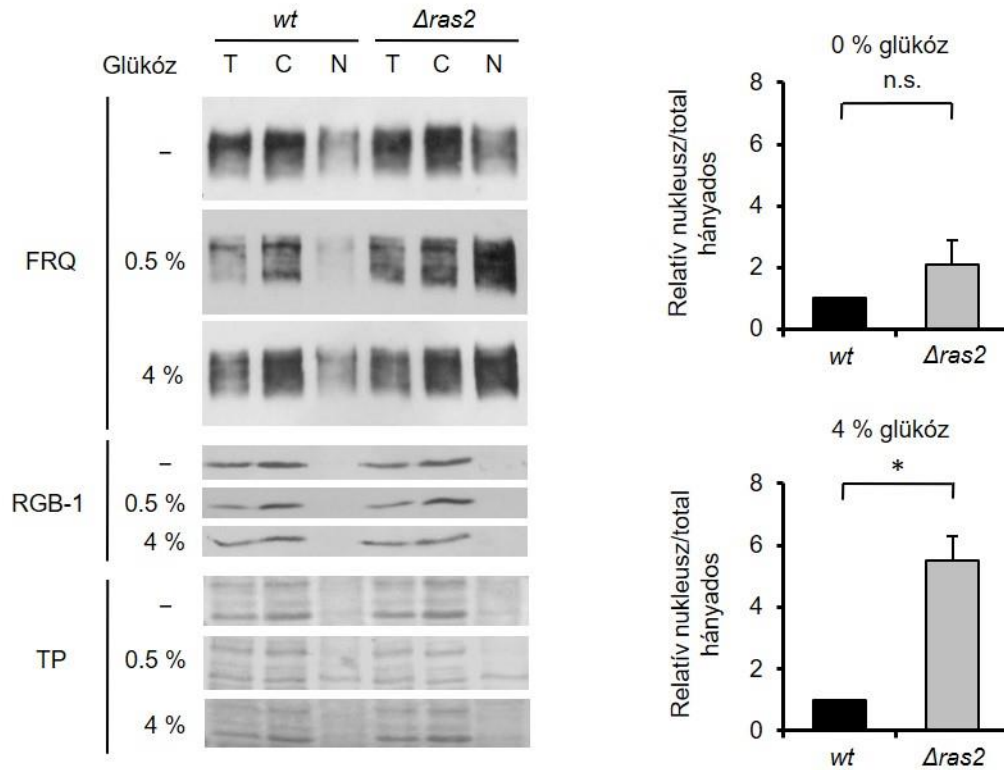
27. ábra: A FRQ nukleusz és citoplazma közötti megoszlása különbözik a *wt*-ban és a $\Delta ras2$ -ben állandó sötétben. A kísérletet a 26. ábránál leírtaknak megfelelően végeztük. A jelintenzitást kvantifikáltuk a sejtmagban és a citoszolban és a nukleáris/citoszólikus arányt vizsgáltuk. Az ábrán a $\Delta ras2$ hányados értékei láthatóak, melyeket a *wt* minták (szaggatott vonallal jelölve) kontroll értékeire normalizáltunk. Amikor szükséges volt, a 26. ábrán mutatottnál hosszabb expozíciós idejű Western blotot használtunk a nukleáris FRQ szignálok kvantifikálásához. Kétfaktoros (idő és törzs) ismétléses ANOVA-val a törzs hatást szignifikánsnak találtuk a teljes periódusra. (n=2-5, \pm SEM)

Összességében a fenti adatok azt valószínűsítik, hogy a RAS2 szerepet játszik a FRQ szubcelluláris lokalizációjának szabályozásában állandó sötétségben.

4.1.4. A molekuláris óra glükózra adott válasza a RAS2-től függ

Mivel korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a $\Delta ras2$ törzs cirkadián fenotípusa glükóztól függ, a továbbiakban annak vizsgálatát tűztük ki célul, hogy a FRQ expresszió és annak szubcelluláris megoszlása hogyan változik glükózhozzáadás hatására a $\Delta ras2$ törzsben és a *wt*-ban. A micéliumokat glükózt nem tartalmazó médiumban növesztettük

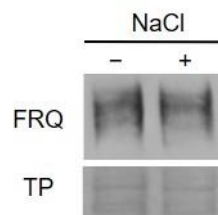
egy éjszakán keresztül állandó világosban, majd különböző koncentrációjú glükózzal kezeltük őket négy órán keresztül (28. ábra).



28. ábra: A FRQ sejtmagban bekövetkező glükózfüggő akkumulációjára hatással van a RAS2. A standard folyékony médiumban, LL-ben növesztett wt és Δras2 törzsek micéliumait először áthelyeztük glükózt nem tartalmazó médiumba. 16 órás inkubációt követően a kultúrákat a feliratnak megfelelően 0,5% vagy 4% glükózzal kezeltük négy órán keresztül. A kezelés nélküli minták kontrollként szolgáltak. A FRQ expressziót a teljes sejt lizátumban (T), valamint a citoszólikus (C) és a nukleáris (N) frakciókban elemeztük Western blot segítségével. Az RGB-1-et citoszólikus markerként detektáltuk. TP: total protein. (Baloldali panel.) A magi frakciók és a teljes lizátum jelintenzitásainak hányadosát képeztük a kezelés nélküli és a 4% glükózzal kezelt minták esetében. A Δras2 törzs értékeit a wt mintában meghatározott kontroll értékekre normalizáltuk. (n=4, ±SEM, egymintás t-próba) (Jobboldali panel.)

Amikor viszonylag alacsony koncentrációjú (0,5%) glükózt alkalmaztunk, a FRQ nagyobb mennyiségben akkumulálódott a Δras2 sejtmagjában, míg a wt-ban a nukleáris

FRQ mennyisége alacsony maradt. Magasabb koncentrációjú (4%) glükóz hozzáadása azonban hatékonyan növelte a hipofoszforilált és ezáltal a teljes FRQ-szinteket a *wt*-ban is. Amikor azonban a fehérje szignálokat kvantifikáltuk, szignifikánsan magasabb FRQ frakciókat detektáltunk a $\Delta ras2$ törzs sejtmagjában, mint a *wt* esetében. Annak kizárására, hogy a magas glükózsintek esetén megfigyelt hatások kialakulásában az ozmotikus változás szerepet játszott a $\Delta ras2$ törzs esetében, megismételtük a kísérletet a glükóz helyett azonos ozmotikus koncentrációjú NaCl hozzáadásával. A NaCl nem befolyásolta a nukleáris FRQ-szinteket a $\Delta ras2$ -ben (29. ábra).



29. ábra: Az ozmotikus változások nem érintik a nukleáris FRQ-szinteket a $\Delta ras2$ törzsben. A $\Delta ras2$ kultúrákat 16 órán keresztül LL-ben, glükózt nem tartalmazó médiumban inkubáltuk, majd 100 mM NaCl-dal (+), vagy vívőanyaggal (H_2O , -) kezeltük 4 órán keresztül. Ezt követően szubcelluláris fracionálást végeztünk és a nukleáris FRQ frakciókat Western blot technikával elemeztük. TP: total protein.

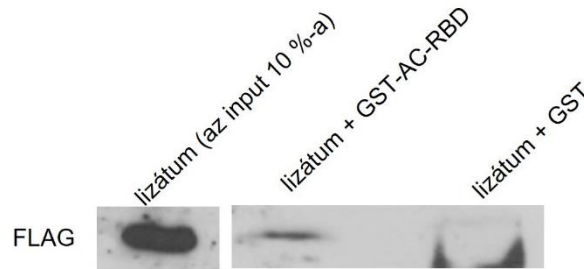
Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a glükózra adott válasz esetén a RAS2 fontos szerepet játszik az oszcillátor fehérje nukleáris szintjeinek szabályozásában.

4.1.5. A RAS2 és a cirkadián óra közötti jelátviteli útvonal elemzése

A RAS2-ről korábban leírták, hogy mind a MAPK kaszkádot, mind pedig az AC-függő útvonalat szabályozza pékélesztőben (220-222). A kaszkád MAPK komponensét a Kss1 képviseli élesztőben (223, 224). A *N. crassa* Kss1 ortológ MAK2 (mitogen-activated protein kinase 2 - mitogén-aktivált proteinkináz 2) aktív formáinak szintjét korábban vizsgálták laboratóriumunkban, azonban a foszfo-MAK2-szintek nagy változatosságot mutattak a független kultúrák összehasonlításakor, így konzisztens, törzs-specifikus különbséget nem sikerült kimutatni (225).

Mivel korábbi adatok alapján a RAS2 aktiválja az adenilát-cikláz élesztőben (192), a következő kísérletek során annak vizsgálatát tűztük ki célul, hogy a RAS2 fehérje hasonló módon lép-e kölcsönhatásba az adenilát-ciklázal *Neurospora*-ban is. Létrehoztunk egy

E. coli törzset, amely az adenilát-cikláz RAS-kötő doménjét és egy GST-t tartalmazó fúziós fehérjét expresszált. A fúziós fehérjét glutation agaróz gyöngyhöz kapcsoltuk, majd a szuszpenziót a $\Delta ras2-cpc1-ras2$ lizátumával inkubáltuk, amely a RAS2 FLAG epitóppal jelölt változatát tartalmazta. A RAS2_{FLAG} gyengén, de specifikusan kötődött a gyöngyhöz, ami arra utalt, hogy a RAS2 az adenilát-cikláz interakciós partnere lehet (30. ábra).



30. ábra: A RAS2 és az adenilát-cikláz RAS-kötő doménjének *in vitro* interakciója.

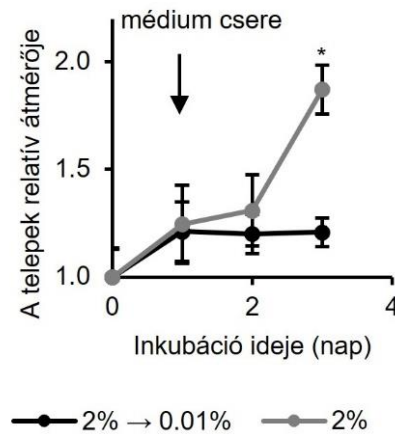
A glutation-agaróz gyöngyökhöz GST-t vagy GST-AC-RBD-t kötöttünk és RAS2_{FLAG}-et tartalmazó *N. crassa* extraktummal inkubáltuk. Az eluált fehérje mintákat Western blot segítségével elemeztük.

Annak alátámasztására, hogy a RAS2 fehérje valóban az adenilát-cikláz útvonalon keresztül hat az órára, a laboratórium munkatársai egy cAMP analóg, a 8-Br-cAMP (8-Bromoadenosine 3',5' cyclic monophosphate - 8-bromoadenozin 3',5'-ciklikus monofoszfát) hatását vizsgálták a $\Delta ras2$ törzsbén, melynek jelenléte részlegesen visszaállította a cirkadián óra megváltozott működését és a FRQ glükózfüggő nukleáris akkumulációját a mutánsban (225). Mindez megerősítette, hogy a RAS2 a cAMP által mediált útvonalon keresztül kapcsolódik a molekuláris órához.

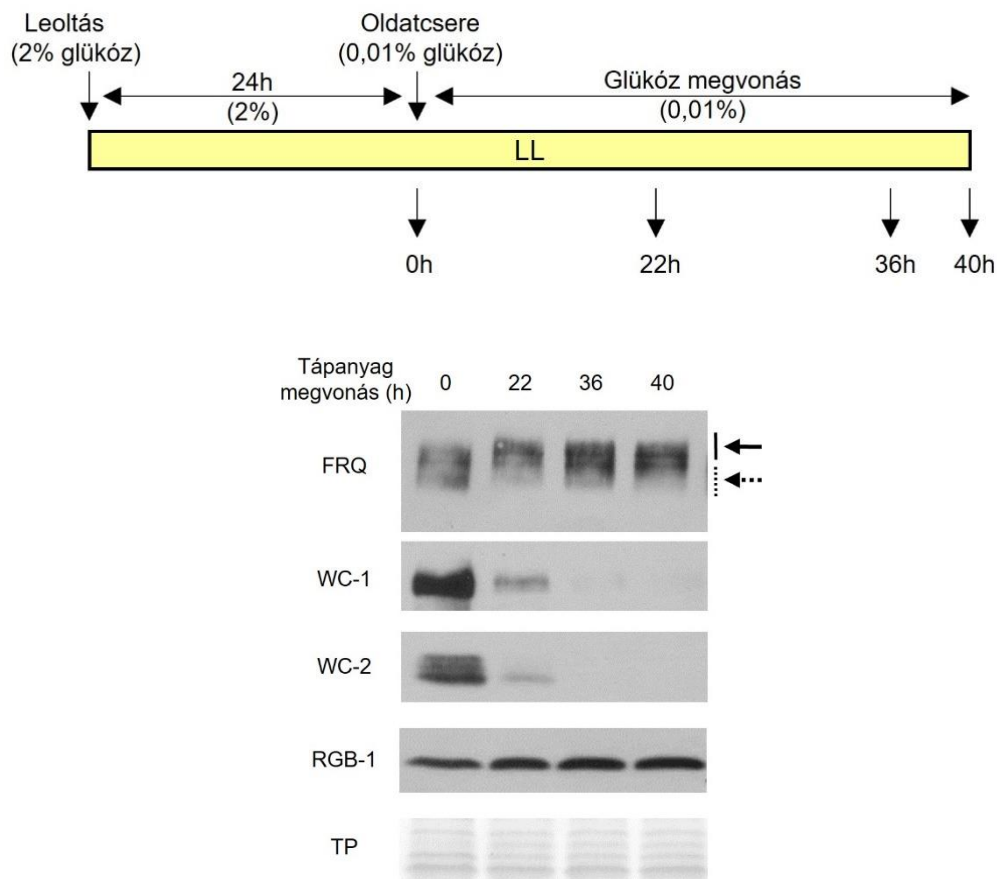
4.2. A hosszan tartó tápanyagmegvonáshoz való alkalmazkodás a cirkadián óra molekuláris átszerveződéséhez vezet

4.2.1. Glükózmegvonás hatására megváltozik a központi órakomponensek szintje

Annak vizsgálatára, hogy a hosszan tartó tápanyagmegvonás hogyan érinti az óraműködést, az egy napig világosban, 2% glükózt tartalmazó folyékony médiumban növesztett *wt Neurospora* kultúrákat 0,01%, vagy 2% glükózt tartalmazó friss médiumba helyeztük, majd mértük a micéliumok növekedését. A tápoldatcserét követően a növekedés gyakorlatilag megállt az alacsony glükóztartalmú tápközegben (31. ábra), a központi óra komponenseinek kifejeződése pedig karakterisztikusan megváltozott (32. ábra).

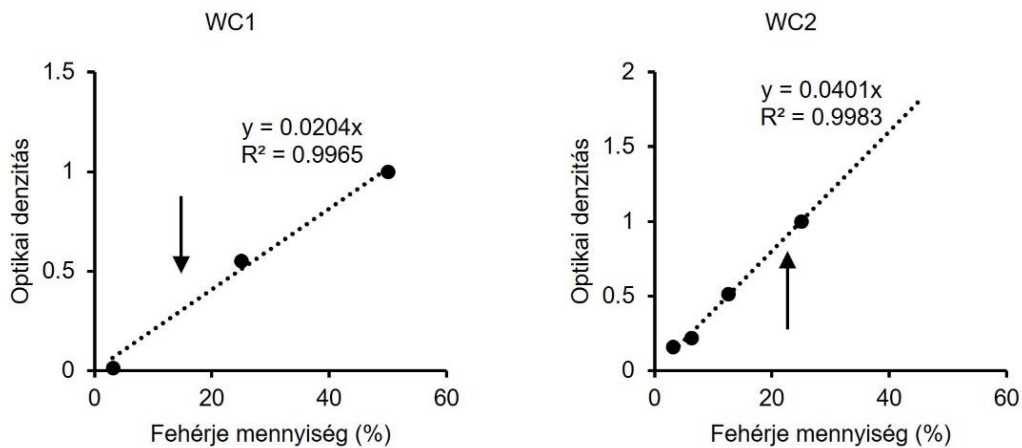


31. ábra: *A Neurospora* növekedése „megáll” alacsony tápanyagtartalmú közegben. Normál - 2% glükózt tartalmazó - folyékony tápoldatban történő, 24 órán át tartó tenyésztést követően a micélium korongokat friss, 2% vagy 0,01% glükózt tartalmazó médiumba helyeztük. A telepek átmérőjét naponta mértük. A nyíl a médiumcsere időpontját jelzi. (n=3, ismétléses ANOVA; szignifikáns törzs-kezelés kölcsönhatás; post-hoc analízis: Fisher LSD teszt)



32. ábra: *Felső panel:* A glükózmegvonás kísérlet sematikus ábrája. A kultúrákat 24 órán keresztül 2% glükózt tartalmazó tápoldatban tenyésztettük, majd a micélium korongokat friss, 0,01% glükózt tartalmazó oldatba helyeztük. Ez jelentette a 0 időpontot. A mintákat 0h, 22h, 36h és 40h éhezést követően takarítottuk be. *Alsó panel:* A glükózmegvonás hatással van az órakomponensek sztöchiometriájára. A teljes sejt lizátumokat Western blot technikával elemeztük. Az RGB-1 (a PP2A egyik regulátoros alegysége, melynek expressziója változatos körülmények mellett is közel állandó), illetve a Ponceau S festés jelentette a töltéskontrollt. Folytonos és szaggattott vonallal, illetve nyíllal jelöltük rendre a hiper, illetve a hipofoszforilált fehérjealakok elhelyezkedését.

Mind a WC-1, mind pedig a WC-2-szintek esetében gyors csökkenés volt megfigyelhető a glükózmegvonást követően. Annak érdekében, hogy meg tudjuk becsülni a WC-szintek csökkenésének mértékét, kalibrációt készítettünk a Western blot jelerősségre és azt találtuk, hogy 40 óra tápanyagmegvonás után a WC-1 és a WC-2-szintek az eredeti szintek rendre ~15% és ~20%-ának feleltek meg (33. ábra).

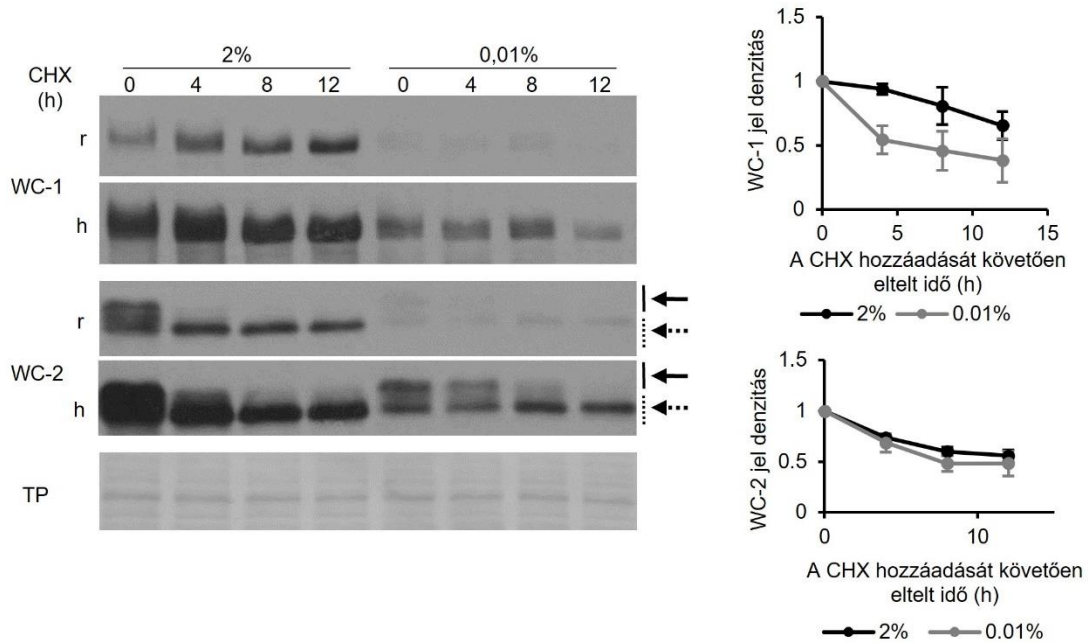


33. ábra: A WCC expressziós szintek kalibrációja. A WC-1 (baloldali panel) és a WC-2 (jobb oldali panel) specifikus jeleket denzitometrállással elemeztük és a mérési pontokra kalibrációs egyenest illesztettünk. A fehérjegélekre a 2% glükóztartalmú médiumban tenyésztett *wt* kultúrák lizátumainak növekvő mennyiségét (3,13%-25%) töltöttük és Westen blot technika segítségével elemeztük. A nyilak a pozitív órakomponensek mennyiségét jelölik az alacsony glükóztartalmú médiumban tenyésztett *wt* kultúrák lizátumaiban.

A FRQ expresszió ezzel szemben relatív állandó maradt a médiumcserét követően, viszont egy, a fehérje hiperfoszforilációjára jellemző mobilitásbeli eltolódás volt megfigyelhető (32. ábra).

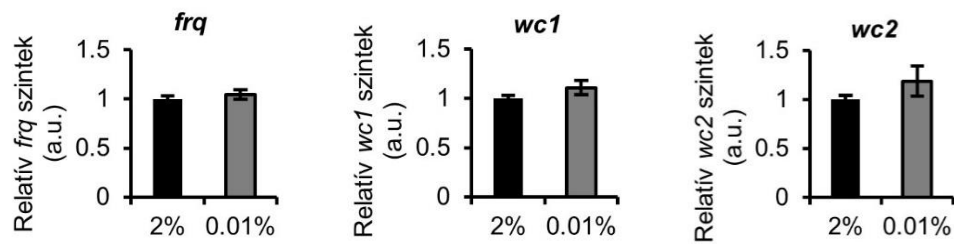
Mivel a hiperfoszforilált FRQ csökkent mértékű negatív visszacsatolást eredményez a WCC-en (71), azt valószínűsítettük, hogy a tápanyagmegvonás által indukált FRQ foszforiláció a WCC aktivitás fokozódásához és ezáltal bomlásának gyorsulásához vezethet (53, 226, 227). Ezért a translációs inhibitor cikloheximiddel (CHX) kezelt kultúrákban követtük a WC-szintek változását annak érdekében, hogy a WCC aktivitást meg tudjuk becsülni (34. ábra).

Adataink alapján a WC-1 gyorsabb bomlása legalább részben szerepet játszhat az alacsony WCC-szintek kialakulásában az éhező sejtekben.



34. ábra: A hosszantartó glükózmegvonás kis mértékben csökkenti a WC-1 stabilitását. A kiindulási kísérleti körülményeink megegyeztek a 32. ábra esetében leírtakkal. 40 óra glükózmegvonást követően 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú CHX-et adtunk a médiumhoz (0 időpont). A mintákat a CHX hozzáadását követően a jelölt időpontokban takarítottuk be. Baloldali panel: A teljes sejt extraktumokat Western blot technika segítségével elemeztük. A folytonos és szaggatott nyilak rendre a WC-2 hiper- és hipofoszforilált alakjait jelölik. (r: rövid expozíció, h: hosszú expozíció, TP: total protein) Jobboldali panel: A fehérje jeleket densitometrállással számszerűsítettük. (Az értékeket a 0 időpontra normalizáltuk.) (n=5, $\pm\text{SEM}$)

Konstans világosban a WCC folyamatosan elősegíti a *frq* és a *wc-1* transzkripcióját. Noha a WCC-szintek szignifikáns mértékben különböztek a standard és a tápanyaghiányos körülmények között, a *frq*, a *wc-1* és a *wc-2* RNS-szintek hasonlóan bizonyultak mindkét körülmény esetében (35. ábra). Ez olyan kompenzációs mechanizmus révén lehetséges, amely vagy állandó szinten tartja az aktív WCC mennyiségét, vagy pedig stabilizálja a *frq* RNS-t alacsony tápanyag-ellátottság esetén.

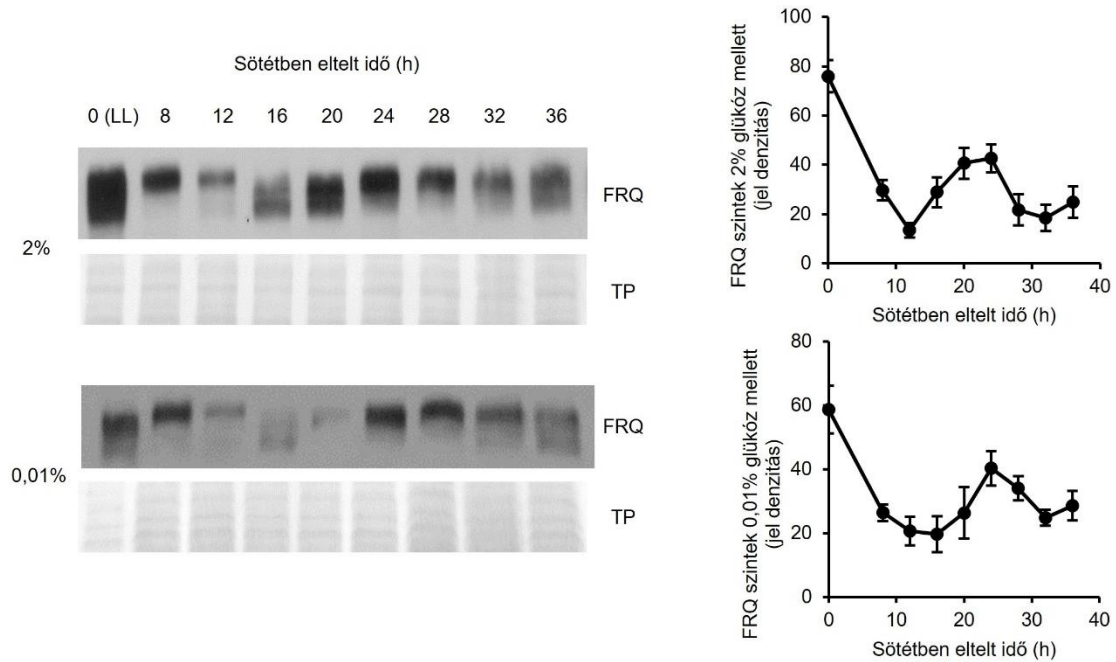


35. ábra: A *frq*, *wc-1* és *wc-2* RNS-szintek hasonlóak standard és alacsony glükóztartalmú médiumban. A *wt* törzs micéliumait standard folyékony kultúrákban tenyésztettük 24 órán keresztül világosban, majd friss, 2% vagy 0,01% glükózt tartalmazó tápoldatban inkubáltuk őket további 40 órán keresztül. Az RNS-szinteket a standard médiumban nőtt *wt* kultúrákban mért értékekre normalizáltuk. (n=9-22, \pm SEM, kétmintás t-próba; n.s.)

Fény-sötétség (LD) transzfert követően a *frq* transzkripció nagymértékben gátolt és így a *frq*-szintekben bekövetkező változások az RNS degradációjának sebességét tükrözik (57, 114). A munkacsoportunkban végzett kísérletek során az LD transzfer hatására bekövetkező *frq* RNS-szint csökkenés nem mutatott glükózfüggést, azaz a csökkent glükózkoncentráció nem befolyásolta a *frq* RNS stabilitását (242).

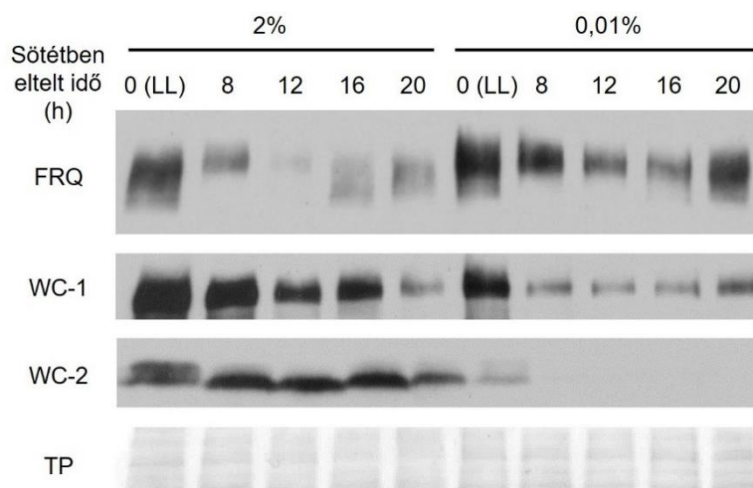
Noha a FRQ- és a WCC-szintek kölcsönösen függenek egymástól, mintáinkban ezen fehérjék szintje nem arányosan változott tápanyagmegvonás hatására, ami felveti a kérdést, hogy a cirkadián oszcillátor képes-e tovább működni a központi órakomponensek ilyen jellegű megváltozása mellett.

E kérdés megválaszolására az órafehérjék szintjének változását állandó sötétben (DD) vizsgáltuk, amikor az óra szabadon futó, endogén ritmust generál. A FRQ fehérje hasonló mértékű, robusztus oszcillációt mutatott mind a standard, mind pedig a csökkentett glükóztartalmú tápoldatban, számottevő fázis vagy periódus különbség nélkül (36. ábra).



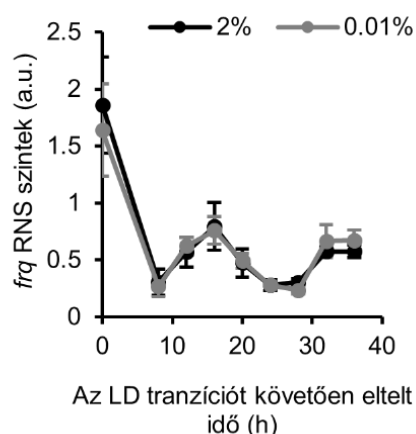
36. ábra: A cirkadián időmérés fenntartott marad glükózmegvonás esetén is. A standard médiumban történő 24 órás inkubációt követően a micéliumokat friss, 2% vagy 0,01% glükózt tartalmazó tápoldatba helyeztük. 24 óra világosban való inkubációt követően a kultúrákat sötétbe helyeztük. A mintákat a jelölt időpontokban takarítottuk be. Baloldali panel: A teljes sejt lizátumokat Westen blot technikával elemeztük. TP: total protein. Jobboldali panel: A FRQ-szinteket denzitometráls segítségével számszerűsítettük. (n=3, \pm SEM)

Azonban amikor az eltérő körülmények mellett növesztett kultúrák fehérje mintáit ugyanazon a gélen vizsgáltuk, tápanyagmegvonás hatására fokozottabb FRQ foszforilációt figyeltünk meg minden időpontban, mint standard körülmények esetében (37. ábra).



37. ábra: A WC-szintek csökkennek és a FRQ hiperfoszforilálttá válik éhezés hatására. A kísérletet a 36. ábra esetében leírtak szerint végeztük. A két tenyésztési körülményből származó kultúrák fehérje extraktumait ugyanazon a gélen elemeztük. TP: total protein.

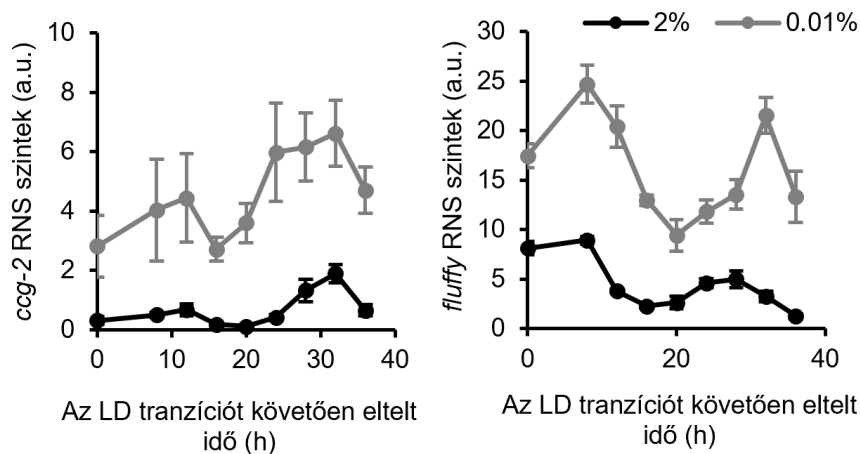
Tehát a glükózmegvonás mind sötétben - szabadon futó ritmus esetén -, mind pedig világosban - amikor az óra dinamikus egyensúlyi állapotban van - a FRQ hiperfoszforilációját eredményezte. Az LL-ben megfigyelhető változásokhoz hasonlóan a WC fehérjék expressziója nagymértékben csökkent DD-ben is glükózmegvonás hatására. Ennek ellenére a *frq* RNS oszcillációjának sem a fázisát, sem pedig a periódusát nem befolyásolta a tápanyagmegvonás (38. ábra), ami megint csak arra utal, hogy a WCC aktivitás hasonló volt a kontroll (2%) esetében megfigyelhetőhöz.



38. ábra: A *frq* oszcilláció glükózmegvonás esetén is fennmarad. A kísérlet körülményei megegyeznek a 36. ábra esetében leírtakkal. Az RNS-szinteket qPCR segítségével határoztuk meg. (n=3-11, \pm SEM, ismétléses ANOVA; n.s.)

Mivel a fentiek alapján az éhezés nem befolyásolja a *frq* bomlását sem, minden bizonnyal egy eddig ismeretlen mechanizmus átállítja a cirkadián óra működését olyan módon, hogy a *frq* oszcillációja és a transzkript-szintek a WCC-szintekben megfigyelhető csökkenés ellenére is glükózkompenzáltak maradnak.

Az óra kimenetének vizsgálata céljából a következőkben két *ccg*, a *ccg-2* és a *fluffy* RNS szintjeinek változását mértük (228-230) (39. ábra).



39. ábra: A cirkadián kimenet ritmusos marad tápanyagmegvonás esetében is. A kísérletet a 36. ábránál leírtaknak megfelelően végeztük. Az RNS-szinteket qPCR segítségével határoztuk meg. (n=3-11, \pm SEM, ismétléses ANOVA; n.s.)

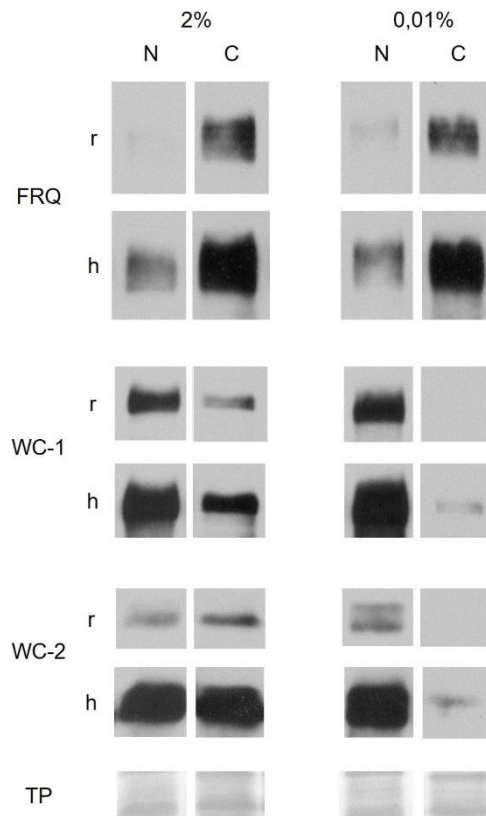
A korábban leírtakkal egybehangzóan a tápanyagmegvonás jelentős mértékű *ccg-2*-szint emelkedést eredményezett. Érdekes módon a *fluffy*-szintek is megemelkedtek tartós tápanyagmegvonás hatására. Továbbá, robusztus oszcillációt detektáltunk mind a *ccg-2*, mind pedig a *fluffy* RNS-szintekben mindkét kísérleti körülmény mellett. Az RNS-szintek maximumát és minimumát az irodalmi adatok alapján várható időpontokban detektáltuk (228) (39. ábra).

Eredményeink tehát azt valószínűsítik, hogy a cirkadián óra a fokozott FRQ foszforiláció és a csökkent WCC-szintek ellenére is robusztusan működik glükózmegvonás esetén és képes fenntartani a kimeneti gének ritmikus kifejeződését is.

Annak érdekében, hogy a WCC fotoreceptor funkcióját is vizsgáljuk különböző tápanyag-ellátottság mellett, a fényindukálható *frq*, *wc-1* és *al-2* gének expressziós szintjeit sötétség-fény (DL) transzfert követően vizsgálták laboratóriumunk munkatársai

(231). A fényindukció hatására bekövetkező kezdeti RNS-szint emelkedés kisebb mértékű volt az éhező kultúrákban, mint a kontrollban, ezzel szemben a fényadaptációt követően kialakuló, "steady-state" szintek hasonlóak voltak mindkét kísérleti körülmény mellett (231). A fényindukció kinetikájában mutatkozó különbség azt valószínűsíti, hogy a WCC fényindukálható hányada csökken, vagy fotoreceptor funkciója kevésbé kifejezett glükózmegvonás esetén.

Az óraféhrjék sejtmag és citoplazma közötti megoszlása szorosan összefügg foszforilációs állapotukkal és aktivitásukkal. Ezért a következőkben szubcelluláris frakcionálást követően hasonlítottuk össze az állandó világosban standard vagy csökkentett glükóztartalmú médiumban növesztett kultúrákból készült mintákat (40. ábra).

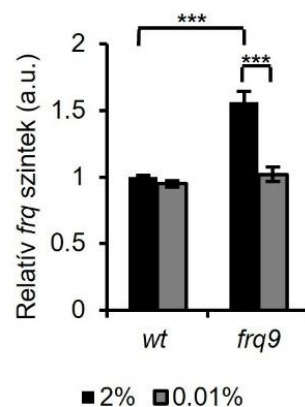


40. ábra: A glükózmegvonás megváltoztatja az órakomponensek sejtalkotók közötti megoszlását. A kísérleti körülmények megegyeztek a 35. ábra esetében leírtakkal. A magi (N) és a citoszólikus (C) frakciókat Western blot technika segítségével elemeztük. (r: rövid expozíció; h: hosszú expozíció; TP: total protein)

Összhangban a korábbi adatokkal (65, 71, 225), standard körülmények között a FRQ nagyrészt a citoszólban volt található, és az eloszlása nem változott jelentősen glükózmegvonás hatására. A WC fehérjék ezzel szemben alig voltak detektálhatók a citoszólban az éhezõ kultúrák esetében, míg a magi frakció a kontrollhoz hasonló maradt. A két körülmény mellett egymással összemérhetõ magi WCC-szintek összhangban vannak a hasonló transzkripciós aktivitással.

4.2.2. Az órakomponensek éhezésre adott válaszában számos modulátor játszik szerepet

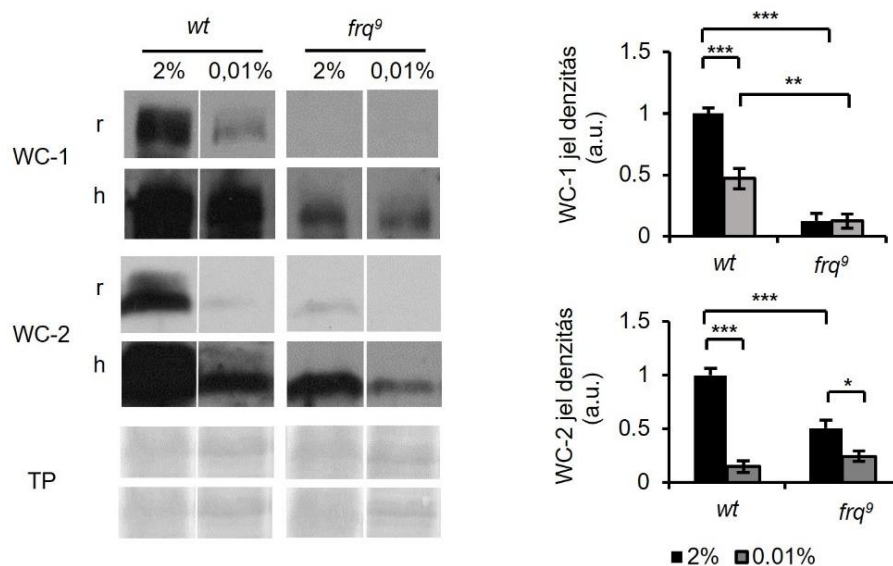
A következõ kísérletek során olyan lehetséges mechanizmusok feltárása volt a célunk, melyek hozzájárulhatnak a TTFL komponensek glükózfüggõ átrendezõdéséhez. Állandó világosban, folyékony médiumban növesztett kultúrákat vizsgáltunk. Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy milyen szerepet játszik a FRQ által közvetített visszacsatolás a WC expresszió és aktivitás tápanyagmegvonásra adott válaszában, a FRQ-hiányos *frq*⁰ törzset vizsgáltuk. A *frq*⁰ törzs elõnye, hogy egy korai stop-kodonnak köszönhetõen csak egy rövid, nem funkcióképes FRQ fejezõdik ki a törzsben, így ez a fehérje nem lesz képes sem a negatív, sem pedig a pozitív visszacsatolásban kifejtteni a szerepét. A törzs további elõnye, hogy a *frq* promóter aktivitása továbbra is követhetõ az RNS-szintek meghatározásával (66, 69).



41. ábra: A *frq*⁰ RNS expresszió érzékeny a glükózmegvonásra. A kísérleti körülmények megegyeznek a 35. ábránál leírtakkal. Az RNS-szinteket a standard médiumban tenyésztett *wt* törzsben mért értékekre normalizáltuk. (n=6, ±SEM, faktoriális ANOVA, szignifikáns törzs*kezelés kölcsönhatás; post hoc analízis: Tukey HSD teszt)

A standard körülmények mellett a *frq*⁰-ben megfigyelhető emelkedett RNS-szinteket a FRQ WCC-re gyakorolt gátló hatásának hiánya eredményezi (61). Azonban, amíg a tápanyagmegvonás nem befolyásolta a *frq*-szinteket *wt*-ban, a *frq*⁰ törzsben csökkent a *frq* RNS mennyisége (41. ábra). A *frq* promóter aktivitásának eltérő viselkedése a *frq*⁰ és a *wt* glükózra adott válaszában azt valószínűsíti, hogy a FRQ által irányított folyamatok is hozzájárulnak a *frq*-szintek kompenzációjához különböző glükózellátottság esetén.

Amikor a fehérjeszintek alakulását vizsgáltuk ebben a két törzsben, azt találtuk, hogy a WC-1-szintek nem változtak szignifikánsan *frq*⁰-ben, míg a WC-2-szintek kis mértékben csökkentek glükózmegvonás hatására (42. ábra). Megjegyzendő, hogy mivel a *frq*⁰-ben a FRQ WCC expresszióra való pozitív hatása hiányzik, a WC-1- és a WC-2-szintek már a kiinduláskor is rendkívül alacsonyak (62, 71), így nehéz a glükóz WCC expresszióra gyakorolt hatását a *wt*-ban tapasztalt változással összehasonlítani.



42. ábra: A *frq*⁰ törzsben a tápanyaghiány kisebb hatással van a WC-szintekre, mint *wt*-ban. A kísérletet a 35. ábránál leírtaknak megfelelően végeztük. A teljes sejt lizátumot Western blot technika segítségével elemeztük. (r: rövid expozíció; h: hosszú expozíció; TP: total protein) (baloldali panel) A WC-1 és a WC-2 fehérjék esetében a jelintenzitást denzitometrállással határoztuk meg. (jobb oldali panel) (n=3, ±SEM, faktoriális ANOVA, szignifikáns törzs*kezelés kölcsönhatás; post hoc analízis: Tukey HSD teszt)

A CKIa óraférféjékre gyakorolt hatása annak FRQ-hez való kapcsolódásától függ, ami az FCD1 (72) és az FCD2 (115) doméneken keresztül jön létre. A CKIa órára kifejtett

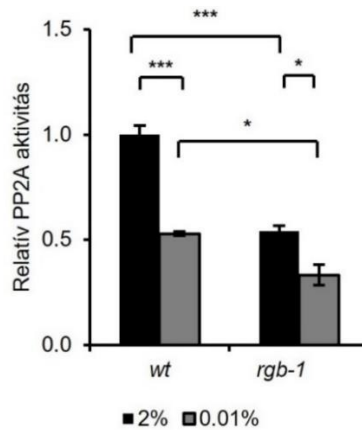
hatása összetett. Hozzájárul a WCC foszforilációjához és ezáltal gátlásához mind DD-ben, mind pedig LL-ben. Emellett a CKIa általi foszforiláció hatására a FRQ egyre kisebb mértékben lesz képes kifejteni hatását a negatív visszacsatolásban, valamint a foszforiláció a FRQ bomlását is indukálni fogja. A CKIa cirkadián órakomponensekre gyakorolt glükózfüggő hatásának vizsgálatához laboratóriumunk munkatársai korábban a *frqΔFCDI-2* törzset vizsgálták (231). Ebben a törzsben a CKIa nem képes a FRQ-hez kötni, így a CKIa-függő foszforiláció és a WCC inaktivációja is zavart szenved a FRQ CKIa interakciós doménjén található mutációk következtében (72). Munkacsoportunk ezen FRQ forma esetében is megfigyelte a tápanyagmegvonás hatására létrejövő mobilitási különbséget (231), ami arra utal, hogy a FRQ glükózhiány indukálta foszforilációja nem függ a CKIa FRQ-vel való interakciójától. A WC-szintekben a két kondíció között megfigyelhető különbség kisebb mértékű volt a *frqΔFCDI-2* törzsben, mint a *wt*-ban (231). Továbbá, a *frqΔFCDI-2* törzsben a *frq* RNS-szintek alacsonyak voltak standard körülmények között és glükózmegvonás hatására kompenzáltak maradtak (231). Mindez arra utal, hogy a CKIa és a FRQ kapcsolódása nem játszik alapvető szerepet a FRQ éhezés-indukálta hiperfoszforilációjában és a *frq* RNS kompenzációjában, viszont a WC-szintek glükózfüggő változására a *frq⁹* törzsben tapasztaltakhoz hasonlóan hatással van ez a FRQ mutáció is.

A PKA szerepet játszik a FRQ és a WC-1 módosításában is (105, 117). Továbbá, korlátozott glükóz-hozzáférhetőség esetén a PKA aktivitás élesztőben és *Neurospora*-ban is csökken (192, 232). Az *mcb* mutánsban a PKA konstitutívan magas aktivitású egy, az enzim komplex regulátoros alegységében található mutáció következtében. A mutánsban a glükózmegvonás nem eredményezte sem a WC-1-, sem pedig a WC-2-szintek csökkenését, továbbá a *frq* RNS-szint sem maradt kompenzált (231). Mindez arra utal, hogy a PKA fontos szerepet játszik abban, hogy a cirkadián óra irányába továbbítsa az információt a csökkenő tápanyagszintekről.

A glikogén-szintáz-kináz (GSK) az éhezésre adott válasz fontos faktora számos organizmusban, így élesztőben is (233) és korábban *Neurospora*-ban is leírták, hogy szerepet játszik a cirkadián periódus finomhangolásában (234). A korábban leírtakkal összhangban (234) a laboratóriumunkban végzett kísérletek is megerősítették, hogy a WC-1 és a FRQ-szintek magasabbak a *gsk* hiányos törzsben, mint a *wt*-ban 2% glükóz jelenlétében (231). Az óra éhezésre adott válaszát részben érintette csak a GSK hiány,

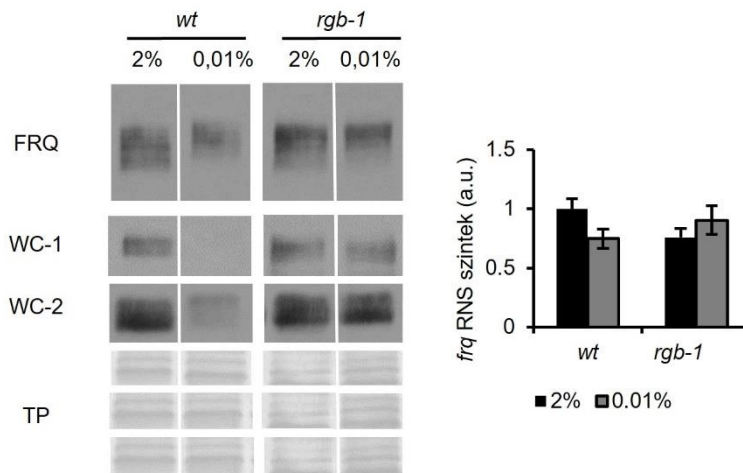
ugyanis amíg a WC-szintek jelentős mértékben csökkentek, a FRQ nem vált hiperfoszforilálttá és a *frq* RNS-szintek kis mértékben csökkentek a *gsk* hiányos törzsben (231). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a GSK hozzájárul a FRQ foszforilációjához éhezés során, azonban ez önmagában nem elegendő ahhoz, hogy a WCC-szintek megváltozását előidézzék.

A PP2A az óraműködés egyik fő szabályozója, mely egyaránt kifejti hatását a FRQ-re és a WCC-re is (42, 55, 71, 72), továbbá aktivitása élesztőben a hozzáférhető glükózszintek változásával párhuzamosan módosul (235). Amint az a 43. ábrán is látható, a tápanyagmegvonás *Neurospora*-ban is csökkenti a PP2A aktivitást, mégpedig az *rgb-1* mutánsra -melyben a foszfatáz komplex egyik regulátoros alegysége nem működőképes-, jellemző szintig.



43. ábra: Glükózhányos állapotban a PP2A aktivitása csökkent mértékű. A kísérletek kivitelezése a 35. ábránál leírtak szerint történt. Meghatároztuk a sejtlizátumok PP2A aktivitását és a kapott értékeket a standard médiumban növesztett *wt* kultúrákban mért értékekre normalizáltuk. (n=3-4, \pm SEM, faktoriális ANOVA, szignifikáns törzs*kezelés kölcsönhatás; post hoc analízis: Tukey Unequal N HSD teszt)

A továbbiakban az *rgb-1* törzsben vizsgáltuk a glükózhány órakomponensekre kifejtett hatását. Míg a *frq* RNS és FRQ fehérjeszintek hasonlóak voltak a *wt*-ban és az *rgb-1* törzsben, a WC fehérjék szintjei nem mutattak csökkenést az éhező *rgb-1* törzsben (44. ábra), amely arra utal, hogy a PP2A hatással van az órakomponensek arányának glükózfüggő megváltozására.



44. ábra: A tápanyagmegvonásra adott válasz a PP2A regulátoros alegységét nem tartalmazó *rgb-1* törzsben eltér a *wt*-ban megfigyelhetőtől. A kísérleteket a 35. ábránál leírtaknak megfelelően végeztük. A teljes sejt extraktumokat Western blot technikával vizsgáltuk. TP: total protein. (baloldali panel) Az RNS-szinteket qPCR segítségével határoztuk meg. Az RNS értékek a standard körülmények között tenyésztett *wt* törzs értékeire lettek normalizálva. (n=9-10, \pm SEM) (jobb oldali panel)

Összességében tehát azt látjuk, hogy számos jelátviteli útvonal játszik szerepet a molekuláris óra működésének glükózfüggő módosításában *N. crassa*-ban, - valószínűleg részben egymással kölcsönhatva.

4.2.3. A glükózmegvonás eltérő módon hat a transzkriptomra a *wt*-ban és a $\Delta wc-1$ -ben

Eredményeink azt mutatták, hogy a WC fehérjék éhezésben bekövetkező jelentős mértékű csökkenése ellenére a WCC aktivitás közel állandó maradt mind LL-ben, mind pedig DD-ben.

Annak érdekében, hogy az éhezés alatt is megtartott WCC aktivitás biológiai jelentőségét vizsgáljuk, RNS szekvenálást végeztünk a *wt* és a $\Delta wc-1$ törzsekben. A mintákat 48 órán keresztül folyékony tápközegben, 12-12 órás sötétség-fény ciklusokban inkubáltuk standard körülmények és tápanyagmegvonás mellett. A mintákat (n=4) ZT12-ben (a világos periódus végén) takarítottuk be. Ezen körülmények között az óra a külső környezeti hatásokhoz igazodva működik („entrained” állapotban van) *wt*-ban, és ZT12-ben a fény-függő gének esetében teljesen fényadaptált állapot várható (236).

A hosszan tartó tápanyagmegvonás a kódoló gének több, mint 20%-ára volt hatásal RNS-szinten. A *wt*-ban a legnagyobb mértékben upregulált gének poliszaccharid bontó enzimek, konidizáció-specifikus fehérjék, valamint monoszaccharid transzporterek voltak, hasonlóan a korábban *Aspergillus niger*-ben leírtakhoz (237). A poliszaccharid bontó enzimek (xilanázok, endoglükánázok) olyan komponensek, amelyek minden bizonnyal növelik az élőlény túlélési esélyeit éhezés során, alternatív tápanyagforrást biztosítva a szervezetnek (239).

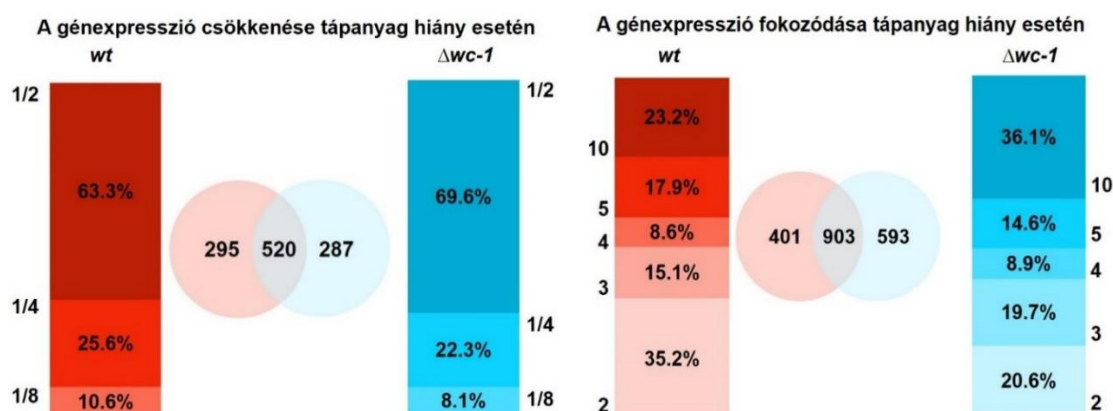
A *wt*-ban glükózmegvonás hatására legnagyobb mértékben upregulálódó 15 gén közül a $\Delta wc-1$ -ben 11 gén esetében kisebb mértékű volt az expresszió fokozódása, vagy nem történt emelkedés. Mindez arra utal, hogy a transzkriptom-szintű adaptáció WCC hiányában megváltozik (6. táblázat).

6. táblázat: A 15 glükózmegvonás hatására legnagyobb mértékben upregulált, annotált gén *wt*-ban. Azokat a géneket, amelyek nagyobb mértékben upregulálódtak *wt*-ban, mint $\Delta wc-1$ -ben félkövéren szedtük.

Azonosító	Név	Upreguláció <i>wt</i> -ban	Upreguláció $\Delta wc-1$ -ben	<i>wt</i> / $\Delta wc-1$ (2%)	Géntermék
NCU02500	<i>ccg-4</i>	281	n.s.	n.s.	óra által szabályozott feromon
NCU07225	<i>gh11-2</i>	254	163	n.s.	xilanáz
NCU08769	<i>con-6</i>	117	88	n.s.	konidizáció specifikus fehérje
NCU05924	<i>gh10-1</i>	96	15	n.s.	xilanáz
NCU00943	<i>tre-1</i>	77	102	n.s.	trehaláz
NCU07325	<i>con-10</i>	70	13	n.s.	konidizáció specifikus fehérje
NCU08189	<i>gh10-2</i>	67	13	n.s.	xilanáz
NCU10055	<i>nop-1</i>	66	58	n.s.	opszin
NCU06905	<i>thnr</i>	65	n.s.	0.01	tetrahydroxinaftalén-reduktáz
NCU08457	<i>eas</i>	49	73	n.s.	hidrofobin
NCU09873	<i>acu-6</i>	39	12	2.9	foszfoenolpiruvát-karboxikináz
NCU10021	<i>hgt-1</i>	35	56	1.4	monoszacharid transzporter
NCU08755	<i>gh3-3</i>	28	38	n.s.	béta-glükozidáz
NCU00762	<i>gh5-1</i>	21	n.s.	n.s.	endoglükánáz
NCU08114	<i>cdt-2</i>	21	11	n.s.	hexóztranszporter

A glükózmegvonás hatására bekövetkező csökkenést elemezve azt találtuk, hogy noha számos gén mutatott szignifikáns csökkenést, csupán azok 2/3-a (520 gén) csökkent mindkét törzsben szignifikáns mértékben (45. ábra). Ez arra utal, hogy a WCC-nek alapvető szerepe van a génexpresszió, illetve az RNS stabilitás szempontjából a hosszútávú glükózmegvonáshoz való megfelelő alkalmazkodásban.

A 45. ábra jobboldali panelén az egyes törzsekben tápanyagmegvonás hatására fokozódó expressziót mutató gének kerültek ábrázolásra.

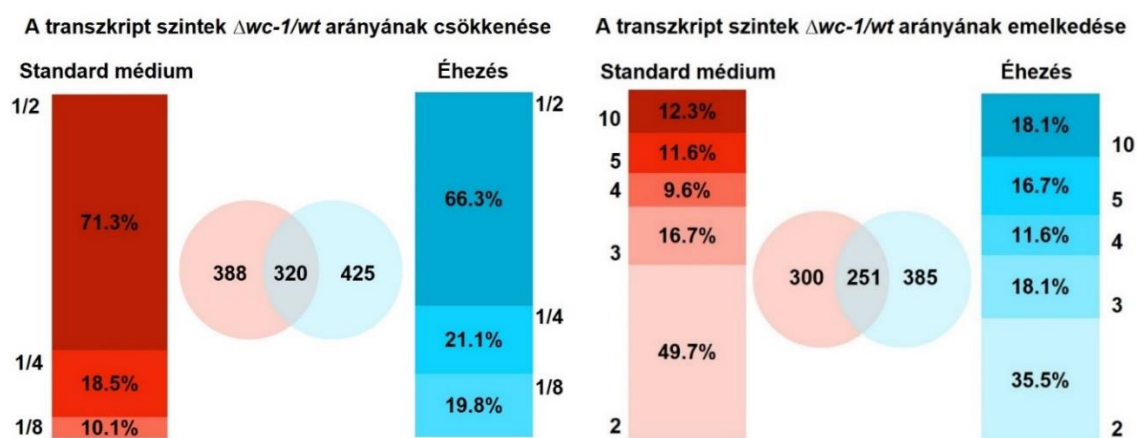


45. ábra: A tápanyagmegvonás hatására bekövetkező expresszió változás *wt*-ban és $\Delta wcc-1$ -ben. A Venn-diagrammokon a csökkenést (baloldali panel), illetve növekedést (jobboldali panel) mutató gének száma látható (*wt* – piros, $\Delta wcc-1$ - kék). Küszöbértéknek a kétszeres szignifikáns változást tekintettük. Az oszlopdiagrammokon az éhezés során bekövetkező génexpresszió csökkenésének (baloldali panel), illetve növekedésének (jobboldali panel) mértéke és megoszlása került bemutatásra a *wt*-ban és a $\Delta wcc-1$ -ben. A függőleges tengelyen a csökkenés (baloldali panel), illetve növekedés (jobboldali panel) mértéke látható, az oszlopdiagramokban található felirat pedig azt mutatja meg, hogy a csökkenő (baloldali panel) vagy növekvő (jobboldali panel) expressziót mutató gének hány százaléka csökkent (baloldali panel), vagy fokozódott (jobboldali panel) a függőleges tengelyen feltüntetett mértékben.

A két törzset összehasonlítva azt látjuk, hogy a *wt*-ban 1304 gén RNS-szintje mutatott legalább kétszeres szignifikáns emelkedést glükózmegvonásra, míg a $\Delta wcc-1$ -ben 1496 RNS upregulálódott (45. ábra). 903 gén esetében láttunk legalább kétszeres emelkedést mindkét törzs esetében (45. ábra). Glükózmegvonás hatására a kódoló gének 13%-a

változott törzs-specifikus módon. Ezeknek a géneknek jelentős hányada játszik szerepet alapvető metabolikus folyamatokban, különös tekintettel az aminosav és zsírsav metabolizmusra, valamint az eizoszóma (a plazmamembránban az endocitózis helyét kijelölő képlet) felépítésére. Elemzéseink rámutattak, hogy a cirkadián óra fő transzkripciós faktorának hiánya alapvető változásokhoz vezet a transzkriptomban glükózmegvonás során. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a WCC számos transzkripciós faktor expresszióját befolyásolja, valamint az alapvető sejtfunkciók szabályozásáért is felel, ezúton pedig további gének kifejeződésére lehet hatással. Ennél fogva nem volt meglepő, hogy a talált több, mint 1300 gén közül csupán 90-ről írták le korábban, hogy a WCC közvetlen célpontja lehet (128, 239).

A fent említett analízis azonban nem nyújt információt a *wt* és a $\Delta wc-1$ RNS-szintjeinek végső különbségéről, csupán a törzs-függő RNS szabályozásban jelen levő eltérésekről szolgáltat adatot. A továbbiakban ezért azokat a géneket elemeztük, amelyek $\Delta wc-1/wt$ aránya csökkenést (46. ábra, baloldali panel) vagy emelkedést (46. ábra, jobboldali panel) mutatott normál vagy glükózhányos körülmények között.



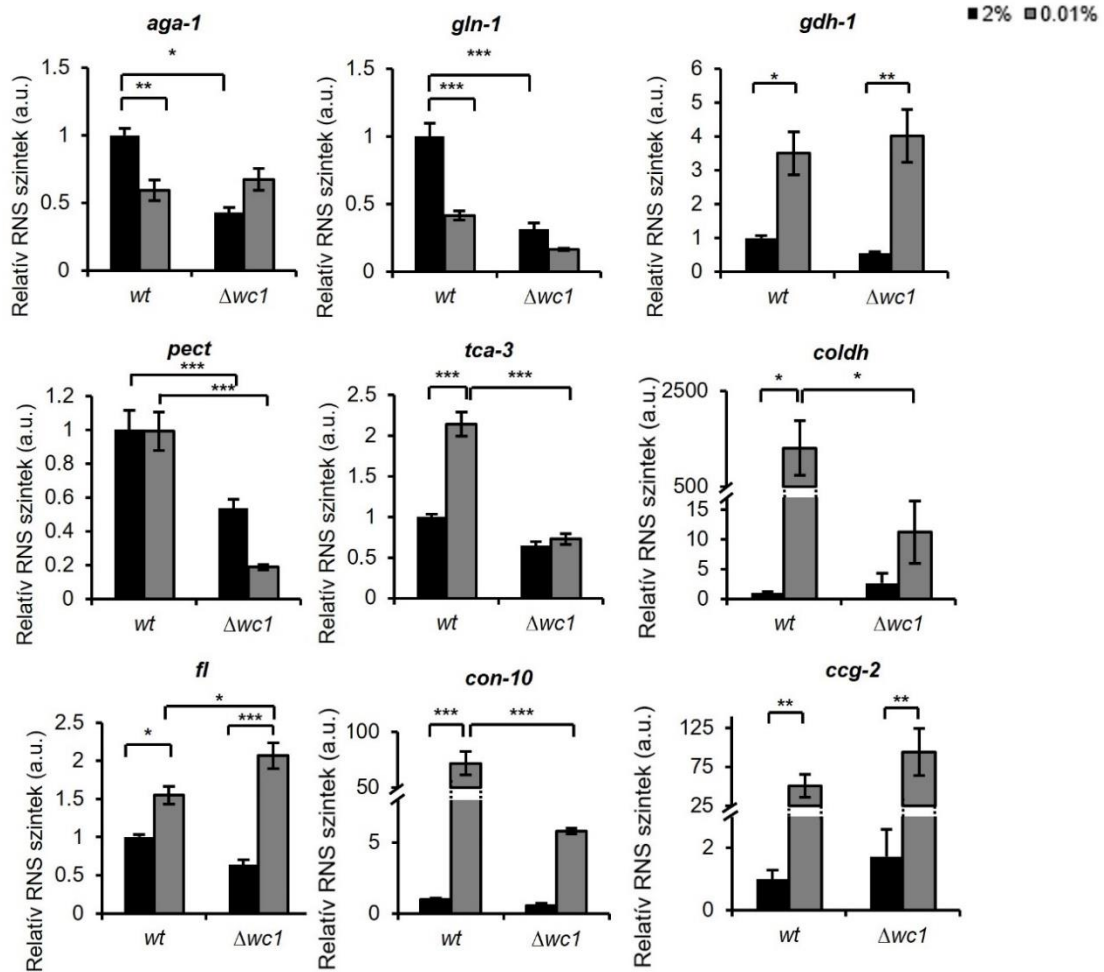
46. ábra: A génexpresszió változásának mértéke $\Delta wc-1$ -ben a *wt*-hoz képest. A Venn-diagrammokon a $\Delta wc-1$ -ben a *wt*-hoz képest alacsonyabb (baloldali panel), vagy magasabb (jobboldali panel) szinten expresszálódó gének száma látható normál (piros) és alacsony glükóztartalmú médiumban (kék). Kétszeres szignifikáns változást tekintettük. Az oszlopdiagrammokon az éhezés során bekövetkező génexpresszió arány csökkenés (baloldali panel) vagy növekedés (jobboldali panel) megoszlása került bemutatásra normál médiumban és tápanyagmegvonás esetén. Az oszlopdiagrammokban található felirat azt mutatja

meg, hogy a $\Delta wc-1/wt$ arányban csökkenést (baloldali panel), vagy fokozódást (jobboldali panel) mutató gének hány százaléka csökkent (baloldali panel), vagy fokozódott (jobboldali panel) a függőleges tengelyen feltüntetett mértékben.

A transzkript-szintek $\Delta wc-1/wt$ arányának összehasonlítása rávilágított, hogy összességében a korábbiakhoz hasonló számú gén expressziója mutatott glükózfüggő különbséget, amely arra utal, hogy a *wc-1* mutáció transzkriptomra gyakorolt hatása nagymértékben függ a tápanyag-ellátottságtól (46. ábra).

Laboratóriumunk munkatársa GO (gén ontológia) elemzés (240) során azt találta, hogy az éhezésre eltérő módon reagáló gének jelentős hányada kulcsfontosságú metabolikus folyamatokban játszik szerepet (231). A glükózmegvonásra adott törzs-függő válasz tekintetében a GO analízis a szénhidrát, aminosav és zsírsav metabolizmusra irányította figyelmünket és a két törzs között további jelentős különbségeket találtunk: a *wt*-ban a kis molekulák és az aminosavak bioszintézisének csökkenése volt jellemző éhezés során, míg a $\Delta wc-1$ -ben az aminosav katabolizmus nőtt és a zsírsavszintézis mérséklődött (231).

Az RNS szekvenálás adatainak qPCR-rel történő validálásához 9 gént választottunk, melyek a szénhidrát vagy aminosav metabolizmusban, illetve a konidizációban játszanak szerepet és feltételezhetően reagálnak a tápanyagszint változására (47. ábra).



47. ábra: A kísérletes validálás megerősítette az RNS szekvenálás eredményeit. Az RNS-szinteket qPCR segítségével határoztuk meg. Az értékeket a standard médiumban növesztett *wt* törzsben mért értékekre normalizáltuk. (*aga-1*: argináz (NCU02333); *gln-1*: glutaminszintetáz (NCU06724); *gdh-1*: NAD-specifikus glutamátdehidrogenáz (NCU00461); *pect*: pektinészteráz (NCU10045); *tca-3*: mitokondriális-akonitáz (NCU02366); *coldh*: kolindehidrogenáz (NCU01853); *fl*: fluffy konídium fejlődésben szerepet játszó fehérje (NCU08726); *con-10*: konidizáció-specifikus fehérje 10 (NCU07325); *ccg-2*: hidrofobin (NCU08457)) (n=4, \pm SEM, faktoriális ANOVA, szignifikáns kezelés hatás (*gdh-1*, *ccg-2*), szignifikáns törzs hatás (242) szignifikáns törzs*kezelés kölcsönhatás (*aga-1*, *gln-1*, *tca-3*, *coldh*, *fl*, *con-10*)).

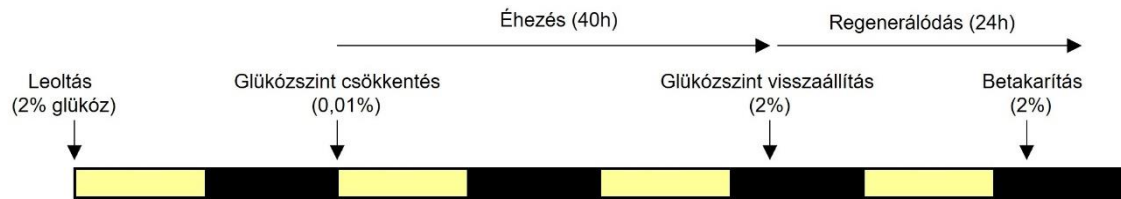
A vizsgált RNS-ek mindkét elemzés során hasonló expressziós arányokat mutattak, amely a transzkriptom elemzés nagyfokú megbízhatóságára utalt (47. ábra, 7. táblázat).

7. táblázat: Az *RNS* szekvenálás és a kísérletes validálás adatainak összehasonlítása a kiválasztott gének expressziója szempontjából. A mérés leírása a 47. ábránál található. (n=4, kétmintás t-próba)

ID	Név	Minta	Változás (RNAseq)	P_{adj}	Változás (qPCR)	P
NCU02333	argináz (<i>aga-1</i>)	<i>wt</i> (0.01%/2%)	0.823393	0.0576	0.6073	0.0271
		$\Delta wc-1$ (0.01%/2%)	2.240553	1.065E-12	1.5609	0.0584
		$\Delta wc-1/wt$ (2%)	0.710738	0.0017	0.4268	0.0045
		$\Delta wc-1/wt$ (0.01%)	1.889453	1.266E-09	1.0972	0.5413
NCU06724	glutaminszintetáz (<i>gln-1</i>)	<i>wt</i> (0.01%/2%)	0.475988	6.725E-18	0.415391	0.0043
		$\Delta wc-1$ (0.01%/2%)	0.761916	0.1045	0.527959	0.0483
		$\Delta wc-1/wt$ (2%)	0.507442	4.530E-07	0.313942	0.0028
		$\Delta wc-1/wt$ (0.01%)	0.793371	0.0394	0.399018	0.0174
NCU00461	NAD-specifikus glutamátdehidrogenáz (<i>gdh-1</i>)	<i>wt</i> (0.01%/2%)	3.321658	2.105E-16	3.531126	0.0331
		$\Delta wc-1$ (0.01%/2%)	7.186952	1.868E-68	7.139931	0.0197
		$\Delta wc-1/wt$ (2%)	0.75745	0.0225	0.563023	0.0054
		$\Delta wc-1/wt$ (0.01%)	1.602065	0.0057	1.138431	0.6459
NCU07325	konidizáció specifikus fehérje 10 (<i>con-10</i>)	<i>wt</i> (0.01%/2%)	70.05014	4.4385E-121	72.287593	0.0088
		$\Delta wc-1$ (0.01%/2%)	13.54775	6.5037E-18	10.24047	2.2E-05
		$\Delta wc-1/wt$ (2%)	0.913622	0.8203	0.568599	0.0831
		$\Delta wc-1/wt$ (0.01%)	0.172141	3.5345E-20	0.080549	0.0107
NCU08726	fluffy – konidizációt elősegítő fehérje (<i>fl</i>)	<i>wt</i> (0.01%/2%)	1.580692	1.425E-05	1.56442	0.0724
		$\Delta wc-1$ (0.01%/2%)	4.56848	1.149E-14	3.295842	0.0036
		$\Delta wc-1/wt$ (2%)	1.034767	0.8160	0.622065	0.0317
		$\Delta wc-1/wt$ (0.01%)	2.915692	5.802E-08	1.310535	0.1231
NCU10045	pektinészteráz (242)	<i>wt</i> (0.01%/2%)	1.114059	0.5946	0.991918	0.9617
		$\Delta wc-1$ (0.01%/2%)	0.486009	3.899E-13	0.352179	0.0075
		$\Delta wc-1/wt$ (2%)	0.830954	0.2165	0.537041	0.0215
		$\Delta wc-1/wt$ (0.01%)	0.354272	1.320E-13	0.190675	0.0059

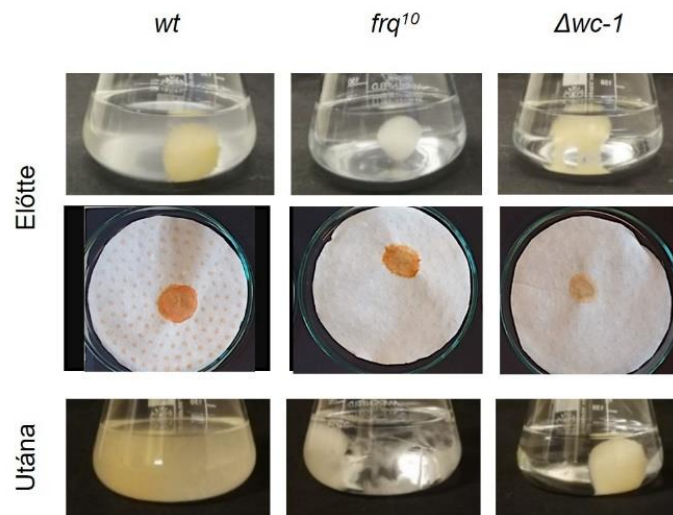
4.2.4. Az éhezésből való hatékony regeneráció feltétele a működőképes óra

A transzkriptom-szintű adataink alapján, amelyek alapvető különbségeket mutattak a tápanyagmegvonáshoz való alkalmazkodásban a *wt* és a $\Delta wc-1$ között, azt feltételeztük, hogy egy jó alkalmazkodó képességgel rendelkező, tápanyaghiányos környezetben növekvő törzs gyorsabban és hatékonyabban tud válaszolni a szénforrás visszaadására, mint egy órahiányos törzs. A következőkben azt szeretnénk volna vizsgálni, hogy a cirkadián óra működése milyen szerepet tölt be ebben a folyamatban. Ehhez glükóz megvonása mellett növesztettünk *wt* és óragén hiányos *frq¹⁰* és $\Delta wc-1$ törzseket fény-sötétség ciklusban, 40 órán keresztül és közvetlenül a glükózsztint eredeti értékre történő visszaállítása előtt, majd 24 órával azt követően mértük a biomassza mennyiségét (48. ábra).



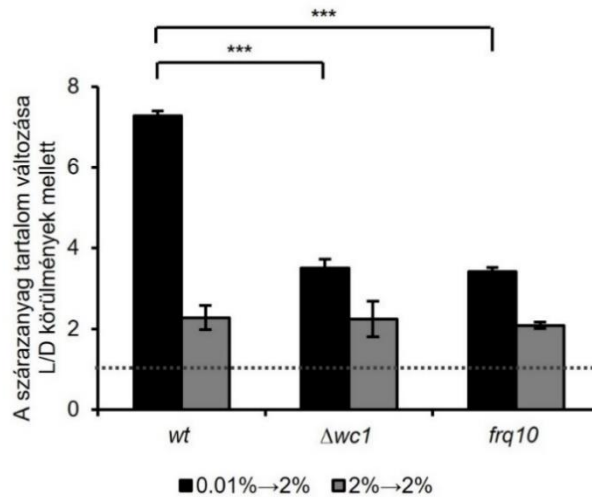
48. ábra: A kísérlet sematikus vázlatja. A *wt* törzs micéliumkorongjait standard folyékony kultúrában tenyésztettük L/D12 körülmények mellett. 24 órát követően a kultúrákat alacsony glükóztartalmú oldatba helyeztük át. 40 óra éhezést követően a médium glükóz tartalmát visszaállítottuk a kiindulási értékre. (A sárga és a fekete szakaszok rendre a világosban és a sötétben eltöltött időt jelölik.)

Megfigyeltük a kísérlet során, hogy a *wt* kultúrák tápoldata zavarossá vált az alacsony glükóztartalmú médiumban történő inkubálás során, míg az óramutánsok esetében tiszta maradt (49. ábra, felső panel). Amikor a médiumot vákuumszűréssel eltávolítottuk, láthatóvá vált, hogy a zavarosságot azok a levált micélium darabok okozták, amelyek így – a központi teleptől távolabbra jutva- glükóz visszaadása esetén képesek voltak a növekedés gyors és hatékony megindítására (49. ábra, középső panel).



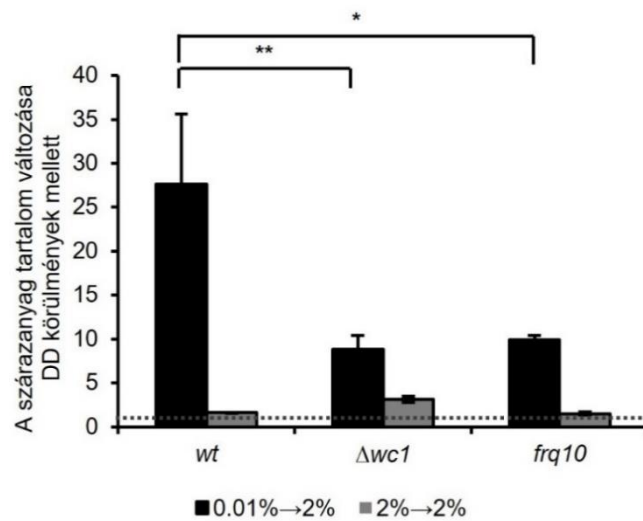
49. ábra: A *wt* és az óramutáns törzsek növekedésének összehasonlítása a glükózsztintek visszaállítását követően. A vákuumfiltrált (középső panel) és a folyadék kultúrákról (felső és alsó panel) a kísérlet ábrán feltüntetett fázisaiban készítettünk képet. (Előtte: glükózsztint visszaállítás előtt, 40 óra éhezést követően; Utána: 24 órával a glükózsztint visszaállítást követően)

Amint az az 50. ábrán látható, a növekedés mértéke, amit a szárazanyag tartalom glükózvisszaadást követő növekedése reprezentál, sokkal kifejezettebb volt a *wt* kultúrákban, mint a *frq¹⁰* és a $\Delta wc-1$ törzsekben, míg a nem éhező kontroll mintákban nem látható a növekedésben törzs-függő különbség.



50. ábra: A *wt* gyorsabb növekedést mutat a glükózsztint visszaállítását követően *L/D* körülmények mellett, mint az óragén mutáns törzsek. A kísérlet a 48. ábránál leírtak szerint zajlott. A kultúrák szárazanyag tartalmát 24 órával a glükózsztint visszaállítását követően határoztuk meg. Az értékeket a glükózsztint visszaállítása előtti szintekre (szaggatott vonallal jelölve) normalizáltuk. (n=4, \pm SEM, Faktoriális ANOVA, szignifikáns törzs*kezelés kölcsönhatás, post-hoc analízis: Tukey HSD teszt)

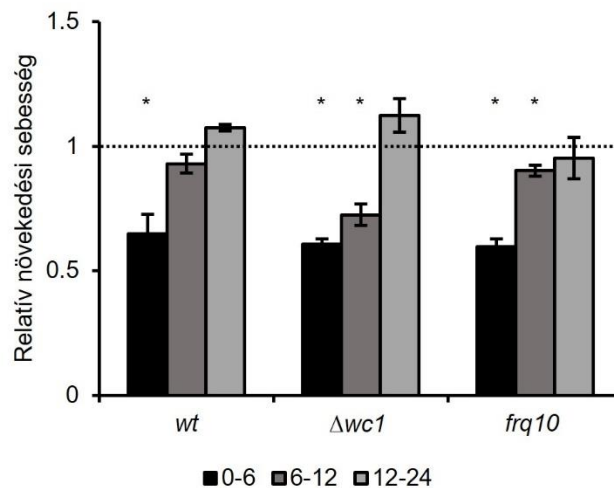
Annak érdekében, hogy a WCC óra funkciójának szerepét önmagában vizsgáljuk, a fenti kísérletet DD körülmények mellett is megismételtük, amikor a WCC nem működhet fotoreceptorként (51. ábra).



51. ábra: A *wt* gyorsabb növekedést mutat a glükózsztint visszaállítását követően DD körülmények mellett, mint az óramutáns törzsek. A kísérlet a 48. ábra esetében leírtaknak megfelelően zajlott a fényviszonyok kivételével: 24 óra világosban történő inkubációt követően a kultúrákat állandó sötétben növesztettük. Az értékeket a glükózsztint visszaállítása előtti szintekre (szaggatott vonallal jelölve) normalizáltuk. (n=3, ±SEM, Faktoriális ANOVA, szignifikáns törzs*kezelés kölcsönhatás, post-hoc analízis: Fisher LSD teszt)

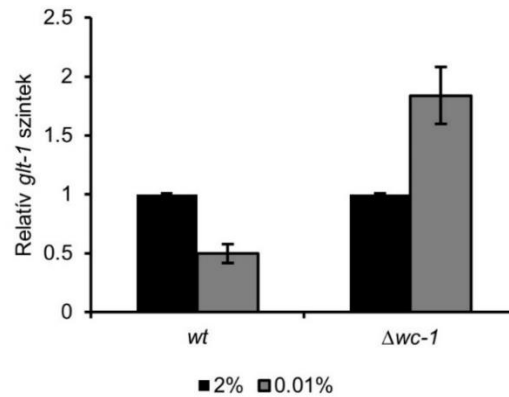
Ilyen körülmények mellett is mind a *frq10*, mind pedig a *Δwc-1* szignifikánsan lassabb növekedést mutatott, mint a *wt*. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a működőképes óra jelenléte hozzájárul a jobb regenerációs képességhez és, hogy a WCC elsősorban központi órakomponensként vesz részt a folyamatban.

Az éhezést követő regenerációt szilárd táptalajon is vizsgáltuk. A növekedési sebességet az alacsony glükóztartalmú médiumból, illetve a normál médiumból a glükózt tartalmazó race tube médiumra történő áthelyezést követően vizsgáltuk (52. ábra). Amíg az éhező *wt* kultúrák növekedési sebessége a nem éhező kontroll minták növekedési sebességét már az első 6 órás periódust követően megközelítette, a *Δwc-1* még a következő periódusban is lassabb volt, és a *frq10*-ben kis mértékű, de szignifikáns lemaradás volt megfigyelhető.



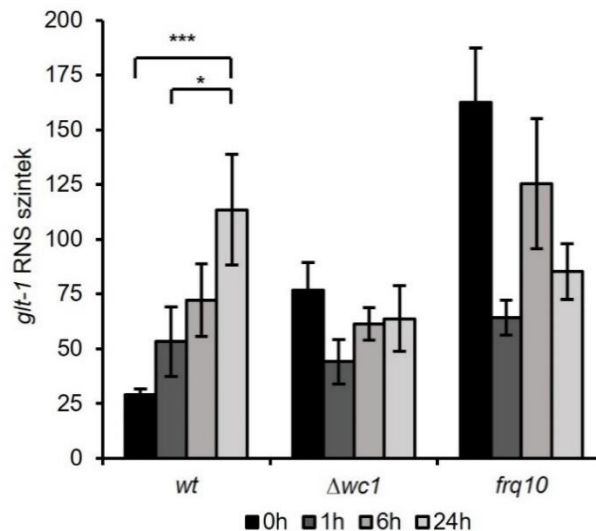
52. ábra: A *wt* szilárd táptalajon is gyorsabb regenerációt mutat, mint a $\Delta wc-1$ és a *frq*¹⁰. A növekedési sebességet az alacsony glükóztartalmú illetve a normál médiumból a glükózt tartalmazó race tube médiumra történő áthelyezést követően vizsgáltuk. A növekedési sebesség három időintervallumban került meghatározásra. Az értékeket a kontroll értékekre (2% glükózt tartalmazó táptalaj, szaggatott vonallal jelölve) normalizáltuk. (n=12, \pm SEM, kétmintás t-próba)

A glükóztranszporterek *Neurospora*-ban is különböző affinitással működnek, ami lehetővé teszi a környezeti glükózsinteknek megfelelő mértékű glükózfelvételt. Amikor a glükózsintek magasabbak, az alacsony affinitású, de nagy kapacitású *glt-1* transzporter expressziója fokozódik, így biztosítva a szénforrás hatékony hasznosítását (242). A transzkriptom-szintű vizsgálatunk rámutatott, hogy a *glt-1*-szintek magasabbak a nem éhező kultúrákban, mint az éhezőkben. A $\Delta wc-1$ -ben ezzel szemben a *glt-1* a tápanyaghiányos körülmények esetén is fokozott mértékű kifejeződést mutatott, ami arra utal, hogy a WCC-nek szerepe van a glükóztranszport tápanyagszintekhez való illesztésében (53. ábra).



53. ábra: A *WC-1* hiánya befolyással van a glükóztranszporter expressziójára az éhezésre adott válasz során. Az ábrán az RNAseq adatokból származó *glt-1*-szintek láthatók. Az értékeket a 2% glükózt tartalmazó kultúrában kapott értékekre normalizáltuk. (n=4, \pm SEM, faktoriális ANOVA, n.s.)

A következőkben a *glt-1* expressziót a regeneráció során vizsgáltuk. *Wt*-ban a *glt-1* RNS-szintek fokozatos növekedést mutattak a glükózsztint 2%-ra történő visszaállításánál. Ezzel szemben a $\Delta wc-1$ -ben és a *frq¹⁰*-ben a *glt-1* expressziója magas volt éhezésben, míg glükóz hozzáadására ez a szint csökkent, vagy nem mutatott változást. Ez arra utal, hogy a transzporter mennyiségének glükózsztintekhez való illesztése zavart szenved, amikor nincs jelen a működőképes molekuláris óra (54. ábra).



54. ábra: A működőképes óra hiánya hatással van a glükóztranszporter expresszió glükózsztintekhez való alkalmazkodó képességére. A kísérletet a 48. ábránál leírtaknak megfelelően végeztük. A mintákat a jelölt időpontokban takarítottuk be a glükózsztint visszaállítását követően és a *glt-1* RNS-szinteket qPCR módszerrel

határoztuk meg. (n=3, \pm SEM, Faktoriális ANOVA, szignifikáns törzs*kezelés kölcsönhatás, post-hoc analízis: Tukey HSD teszt)

Összességében tehát jelentős a különbség az egyes törzsek regeneráció során mutatott viselkedésében, amely arra utal, hogy a változó tápanyagszintekhez való alkalmazkodás hatékonyabb, amikor jelen van a működőképes cirkadián óra a sejtben.

5. Megbeszélés

5.1. A RAS2 fehérje szerepe a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában

Amint az az 1.6. fejezetben részletezésre került, számos indirekt adat utal az óra és a RAS szignalizáció közötti kapcsolat jelenlétére. Mivel a RAS-útvonal számos patológiai folyamat kialakulásában kiemelt jelentőséggel bír és így fontos terápiás célpont, munkánk céljával a RAS-útvonal és az óraműködés közötti lehetséges kölcsönhatás vizsgálatát tűztük ki. Ismert, hogy az emlős RAS fehérje élesztőben való expressziója kompenzálja az endogén RAS-hiányt, ami arra utal, hogy a RAS fehérjék funkcionális konzerváltságot mutatnak az eukarióta szervezetekben (243).

A cirkadián ritmus, valamint a metabolizmus kulcsfolyamatai szintén nagyfokú konzerváltságot mutatnak az élővilágban. Annak vizsgálatára, hogy a RAS2 fehérje szerepet játszhat-e a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában ezért az egyik legalaposabban jellemzett molekuláris órával rendelkező modellszervezetet, a *Neurospora crassa* fonalas gombát alkalmaztuk.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy *Neurospora*-ban a cirkadián periódus hosszabb a $\Delta ras2$ törzsben, mint a *wt*-ban, ami azt valószínűsíti, hogy a RAS2 aktivitása alapvető jelentőségű a cirkadián óra normál működése szempontjából. Továbbá, a vad típussal ellentétben, a $\Delta ras2$ törzsnek mind a periódusa, mind pedig a ritmus robusztussága érzékeny volt glükózra: glükózt tartalmazó médiumban a periódus szignifikánsan megnövekedett és az oszcilláció fokozatosan lecsengett. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a RAS2 által mediált jelátviteli út aktivációja a különböző metabolikus körülmények közötti robusztus óraműködéshez szükséges kompenzációs mechanizmus részét képezi.

A molekuláris órakomponenseknek mind az expressziója, mind pedig a foszforilációs állapota karakterisztikusan megváltozott a *ras2* gén deléciójának következtében. A $\Delta ras2$ törzsben a FRQ hipofoszforilált alakjai - amelyek a leginkább aktívak a negatív visszacsatolásban és elősegítik a WCC-et inaktíváló foszforilációt -, nagyobb mennyiségben voltak jelen, mint a *wt*-ban. Ez összhangban áll azzal, hogy a hiperfoszforilált és így inaktív WCC alakok nagyobb mértékben akkumulálódtak a *ras2* hiányos törzsben.

Egy korábbi tanulmányban a FRQ aktivitását érintő foszforilációs kaszkád sebességét a cirkadián periódus meghatározásának egyik kulcsfaktoraként azonosították (70). Ezt a

modellt adataink is alátámasztják, melyek szerint a FRQ foszforilációja DD-ben késést mutat a $\Delta ras2$ -ben, valamint a cirkadián periódus is hosszabb ebben a törzsben, mint a *wt*-ban.

Adataink alapján azt tartjuk valószínűnek, hogy a RAS2 egy cAMP-függő útvonal szabályozásán keresztül finomhangolja a cirkadián órát. Irodalmi adatok szerint a PKA képes foszforilálni a FRQ-et *in vitro* körülmények között (117), ami arra utal, hogy a FRQ a kináz közvetlen szubsztrátja lehet *in vivo* is. Emellett a PKA fő katalitikus alegységét nem tartalmazó *pkac-1,ko* törzs részben a $\Delta ras2$ törzs fenotípusát mutatja (244, 245): mind a lassabb növekedési sebesség, mind pedig a FRQ oszcilláció fokozatos lecsengése jellemző mindkét törzsben, noha a változások mértéke eltérő. Ugyanakkor RAS2-től független PKA aktivitás is szerepet játszhat a WC fehérjék expressziójának szabályozásában, ugyanis a WCC expresszió különböző módon változik a PKAC-1 és a RAS2 hiányában. Míg a *pkac-1,ko* törzsben a WC fehérjék expressziója alacsony, a $\Delta ras2$ -ben a WC-1-szintek magasabbak LL-ben, DD-ben pedig a *wt*-hoz hasonlóak voltak.

A WC-1 expresszióját fényfüggő és fénytől független mechanizmusok is szabályozzák, poszttranszlációs szinten pedig a FRQ is pozitívan hat rá (71, 76, 78, 99, 131). Az azonban továbbra sem tisztázott, hogy a RAS2 hiánya hogyan befolyásolja ezt a komplex szabályozási rendszert.

A RAS rendszer a cAMP által mediált jelátvitel mellett egy, az emlős Raf/MEK/ERK útvonallal homológ MAPKK útvonalat is aktiválhat különböző gombákban (196, 223). Munkacsoportunk azonban nem talált nyilvánvaló különbséget a MAK2 aktivitásban a $\Delta ras2$ és a *wt* törzsekből származó mintákban (236). Mivel a RAS GTPázok effektoraként az ERK-től különböző MAP kinázokat (Jun amino-terminális kináz (JNK) és p38 kináz) is leírtak magasabb rendű eukariótákban, melyek homológjai jelen vannak *Neurospora*-ban is (197, 246), ezen útvonalaknak a *Neurospora* óra metabolikus szabályozásában betöltött szerepe sem zárható ki. Továbbá, mivel a MAP kinázok általában érzékenyek a sejt metabolikus állapotára (247), a cirkadián óra szabályozásához való hozzájárulásuk függhet a kísérleti körülményektől is.

Míg az irodalmi adatok korábban is valószínűsítették, hogy RAS által mediált útvonalak befolyásolják a cirkadián időmérést különböző organizmusokban, tanulmányunk elsőként

mutatta be, hogy a RAS GTPázok jelenthetik az egyik kapcsolatot a metabolizmus és a molekuláris óra között. Adataink azt valószínűsítik, hogy *Neurospora*-ban a környezetben hozzáférhető glükózszerintektől független, konstans periódusú, robusztus ritmus fenntartásához szükség van a RAS2-re.

Modellünkben a glükózszerintek emelkedése megnövekedett transzlációs sebességhez vezet és ezáltal egyben az újonnan szintetizált, hipofoszforilált FRQ alakok feldúsulását, valamint a RAS2-függő útvonal fokozott aktivitását eredményezi. Ezen útvonal egyik disztális komponenseként a PKA közvetlenül vagy közvetett módon elősegíti a FRQ foszforilációját és ezáltal megakadályozza a negatív visszacsatolásban aktív FRQ alakok magi akkumulációját. Ezzel szemben a *ras2* deléció törzsben glükóz jelenlétében a FRQ nukleuszról való lassabb kitisztulása a WCC hosszabban tartó gátlásához és így a cirkadián periódus meghosszabbodásához és az oszcilláció fokozatos lecsengéséhez vezet.

Azt feltételezzük, hogy a CSP-1 (1) és a PRD-1 (152, 153) mellett a RAS2 is a *Neurospora* óra metabolikus kompenzációjának egyik mediátora. Amíg azonban a CSP-1 hiánya rövidíti a periódust glükóz hatására (1), a *prd-1* és a *ras2* mutációk a periódus hosszabbodását mutatják ilyen körülmények között (152, 153). Míg a CSP-1 a WC-1-szerinteket szabályozza, eredményeink szerint a RAS2 által mediált útvonal elsősorban a FRQ működésére van hatással, mégpedig glükóztól függő módon.

Mindez arra utal, hogy egymással ellentétes hatású és más-más támadáspontú mechanizmusokra van szükség a cirkadián periódus változó metabolikus környezetben való állandó értéken tartásához.

5.2. A hosszantartó glükózmegvonás hatása a molekuláris órára

A természetben az erőforrások gyakran korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre, így az élőlényeknek időről-időre alkalmazkodniuk kell a tápanyag hiányához. Ennek következtében a tápanyaghiányra adott megfelelő metabolikus válasz alapvető evolúciós előny.

A metabolizmus szigorú időbeli szabályozása ilyenkor kiemelt jelentőségű lehet a hatékonyság szempontjából, ezért nagyon fontos kérdés, hogy milyen a belső időmérés ezen körülmények mellett. Tudjuk, hogy a szénforrások hiánya csökkenti a transzkripció

és a transláció sebességét, ami mindenképpen felveti a kérdést, hogy a TTFL alapú molekuláris óra egyáltalán képes-e működni ilyenkor.

Amint arról már számos tanulmány beszámolt, a rövid ideig tartó glükózmegvonás nem érinti a fő órakomponensek expresszióját *Neurospora*-ban, és ezért a fehérjeszintek stabilitását a tápanyag-kompenzáció szempontjából alapvető jelentőségűnek gondolták (1, 152). Kísérleteink első alkalommal mutattak rá, hogy a TTFL képes kulcselemeinek alapvetően megváltozott sztöchiometriája mellett is működni hosszantartó glükózmegvonás esetén, míg eközben az oszcillátor gén expressziója közel változatlan marad. Vagyis, a WC-szintek nagymértékben csökkennek glükózmegvonás hatására, a FRQ pedig hiperfoszforilált lesz, az óra azonban képes a *frq* és a különböző output gének expressziójában a normál periódust fenntartani.

Fontos megjegyezni, hogy elsősorban a citoszolikus WC-szintek mutatnak csökkenést alacsony glükózkoncentráció mellett. A citoszolikus WCC mennyiség a pozitív faktor tartalékként szolgál, amely egy a Zeitgeber-ek (pl. fény) által gyorsan aktiválható készlet (130), és a fényválaszt elemző kísérleteink eredményei alapján is úgy tűnik, hogy ez a tartalék csökken éhezés során (242). A fenntartott magi WCC-szintek viszont biztosítják a cirkadián óra megfelelő működését a tápanyagszint drasztikus csökkenése esetén is.

A hosszútávú éhezés több, mint 2000 génre (a *Neurospora* génkészletének mintegy 20%-ára) volt hatással kísérleteinkben, ami arra utal, hogy a sejtfunkciókban jelentős változások következnek be. Ezen belül több, mint 1300 gén mutatott glükóztól függő különbséget a transzkriptomban a *wc-1* mutációval összefüggésben. Ezek a gének számos sejtfunkciót érintenek, így például a szénhidrát, aminosav és zsírsav metabolizmust. A WCC hiánya jelentős eltolódást eredményezett a centrális karbonmetabolizmus szabályozásában, az aminosav és zsírsav anyagcserében egyaránt. Mindez arra utal, hogy a WCC fontos meghatározója a transzkriptom adaptív újraszervezésének a glükózellátás nagymértékű megváltozása esetén.

Az éhező *wt* kultúrák esetében továbbá precízebb adaptációt figyelhettünk meg a nagy kapacitású glükóztranszporter glükózsztinktól függő kifejezésében, és a *wt* kultúrák L/D (Zeitgeber által vezérelt), valamint DD (szabadon futó) körülmények mellett is gyorsabban nőttek a kiindulási glükózsztint visszaállítása esetén, mint az óra nélküli mutánsok. Mindez arra utal, hogy a működő óra segíti az éhezés utáni regenerációt.

További vizsgálatok lennének szükségesek annak elemzésére, hogy az eltérő tápanyagszintek mellett kifejtett transzkriptom szabályozó hatásért milyen mértékben felel a WCC órakomponens, és milyen mértékben annak fotoreceptor funkciója.

A glükóz hozzáférhetősége hatékony Zeitgeber-nek bizonyult több filogenetikai szinten, így például *Arabidopsis thaliana*-ban, *Drosophila melanogaster*-ben és emlős rendszerekben is (248-250). *Drosophila* esetében az éhezéssel szemben mutatott ellenállóképesség csökkent mértékű volt a *per01* és *tim01* óra mutáns törzsekben (249, 251), amely szintén arra utal, hogy a belső időmérés hozzájárul az extrém metabolikus körülményekhez való alkalmazkodáshoz. Emlősökben a glükózmegvonás nem vizsgálható szervezeti szinten, mivel a vércukorszint egy kritikus koncentráció (emberben 3.2 mmol/l) alatt életveszélyes állapotokhoz vezet. Drasztikus glükózsztint csökkenés azonban helyileg bekövetkezhet, amikor a szövet vérellátása lecsökken. Ezen körülmények következményei sejt kultúrákon is jól modellezhetők. Egér fibroblasztok esetében a PER2 normál amplitúdójú oszcillációja volt megfigyelhető számos nappal a glükózmegvonást követően is, amely a *Neurospora*-ban megfigyelt eredményeinkhez hasonlóan arra utal, hogy az órafunkció emlős sejtekben is megtartott kritikus metabolikus körülmények mellett (252). *Neurospora*-tól eltérő szervezetben azonban továbbra sem áll rendelkezésre adat arról, hogy az éhezés hogyan befolyásolja az óra molekuláris hálózatát.

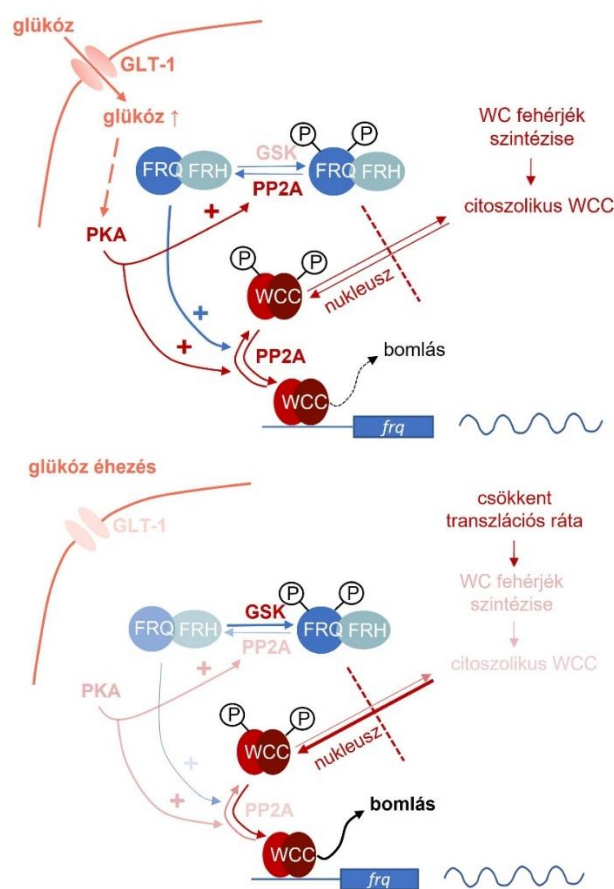
Eredményeink felvetik annak a kérdését, hogy milyen celluláris mechanizmusok vezethetnek a molekuláris óra átszerveződéséhez hosszan tartó glükózmegvonás esetén, és hogy a csökkent WCC-szintek hogyan képesek fenntartani a normál transzkripciós aktivitást.

Mivel a WCC alkotóinak RNS-szintje nem változott glükózmegvonás hatására, poszttranszkripciós mechanizmusok is szerepet játszhatnak a fehérjeszintek csökkentésében. Noha éhezésben a FRQ fehérjeszintek hasonlóak maradtak a normál glükózsztintek mellett detektáltakhoz, a fehérje hiperfoszforilációja gyengítheti a pozitív faktorra gyakorolt negatív visszacsatolást, ami hozzájárulhat a tápanyaghiány alatt lecsökkent transzkripciós/transzlációs ráta kompenzálásához, ugyanakkor egyúttal a WCC gyorsabb lebomlásához is vezethet. A WC-1 fehérje stabilitásának éhezés-függő csökkenése a *wt*-ban és a *frq*⁰ törzsből alátámasztja ezt az elképzelést. A FRQ-függő

visszacsatolás hiánya a WCC-en magyarázhatja, hogy a WCC-szintek miért csak részben érintettek az éhezés által a *frq*⁰ törzsben. Másrészt a *frq*⁰-ben a WC-szintek normál körülmények mellett is alacsonyak, amely felveti annak a lehetőségét, hogy az éhezés azt már nem képes hatékonyan tovább csökkenteni egy bizonyos szinten túl.

Az óra glükózfüggő szabályozása valószínűleg nem korlátozódik a CK1a FRQ-en keresztül kifejtett hatására, mivel a FRQ és a CK1a közötti hibás interakció a *frq* Δ *FCD1-2* törzsben csak részben érinti a WCC-szintek változásait és nem változtatja meg a *frq* RNS-szinteket (242).

A hosszan tartó tápanyagmegvonás jelentős változást okoz a cirkadián óra központi komponenseit érintő jelátviteli utak aktivitásában. Noha ezek az útvonalak számos egyéb folyamatban játszanak szerepet, a *Neurospora* óra szabályozásában korábban leírt szerepük alapján hatásmechanizmusuk beilleszthető egy modellbe, amely leírja, hogy az oszcillátor hogyan szerveződik át glükóztól függő módon (55. ábra).



55. ábra: A negatív visszacsatolásnak és a PKA-, PP2A- és GSK-függő jelátvitelnek a molekuláris óra szabályozásában betöltött szerepét bemutató modell. Felső panel:

magas glükózsintek esetén; alsó panel: hosszan tartó tápanyagmegvonás esetén. Az éhezés csökkenti mind a PKA mind pedig a PP2A aktivitását, a GSK aktivitását ellenben fokozza. A PKA az órakomponensek éhezés által indukált változásainak központi szabályozójaként működik, mivel aktivitásának csökkenése a WCC fokozott aktivitásában és következményes destabilizálódásában nyilvánul meg, ezzel a *frq* transzkripció kompenzálását eredményezi a jelentős mértékben csökkent WC-szintek mellett. A PKA a PP2A-ra is hatással van: a csökkent PP2A aktivitás és a GSK aktivitás ezzel párhuzamos fokozódása éhezésben a FRQ hiperfoszforilálódását eredményezi, amely elősegíti a WCC-re gyakorolt negatív visszacsatolás gyengülését. Az enzimek és a különböző folyamatok magasabb és alacsonyabb szintjeit rendre intenzívebb és kevésbé intenzív színekkel jelöltük.

Kísérleteink alapján a PP2A, a GSK és a PKA is minden bizonnyal szerepet játszik az óra éhezésre adott válaszában. A PP2A glükózérzékeny szabályozó faktorként már régóta ismert volt gomba és emlős sejtekben (253, 254). Kísérleteink során azt találtuk, hogy a glükózéhezés *Neurospora*-ban is csökkenti a PP2A aktivitását. Ismert továbbá, hogy a *Neurospora* órának mind a pozitív, mind pedig a negatív faktorára hatással van a PP2A (61, 119). A tápanyagszint csökkenés esetén létrejövő csökkent PP2A aktivitás hozzájárulhat a FRQ hiperfoszforilációjához, ezzel csökkentve a WCC aktivitásra gyakorolt negatív visszacsatolást. Ezt a hatást azonban antagonizálhatja a WC fehérjék ugyanazon foszfatáz általi kevésbé intenzív defoszforilációja. Az *rgb-1* törzsben, amelyben a PP2A egyik regulátoros alegysége működésképtelen és alacsony az enzimaktivitás, a WC-szintek nem reagálnak a glükózmegvonásra, ami arra utal, hogy a WCC éhezés indukálta expresszió változásához magasabb PP2A aktivitásra van szükség. Az *rgb-1* törzsben megfigyelhető csökkent PP2A aktivitást az éhezés tovább csökkentette, ami megmagyarázhatja a FRQ foszforilációban megfigyelhető kismértékű eltolódást a mutánsban glükózmegvonás hatására.

Az éhezés számos organizmusban a GSK aktivációjához vezet. Munkacsoportunk adatai arra utalnak, hogy a FRQ glükóz hiányában bekövetkező hiperfoszforilációja a GSK-tól is függ (242). Annak megállapítására azonban, hogy a FRQ a GSK közvetlen szubsztrátja-e, további vizsgálatok szükségesek.

Az éhezésben csökkent aktivitást mutató PKA feltehetően mind a cirkadián óra, mind pedig a tápanyagmegvonáshoz való sejtszintű alkalmazkodás központi szereplője lehet (117, 232). A PKA-t a WCC elsődleges foszforilációját végző (ún. priming) kinázként írták le, amely elősegíti a későbbi, a komplex inaktivációjához vezető, CK1 és/vagy CK2 általi foszforilációt. A csökkent FRQ általi negatív visszacsatoláson túl a PKA által gyengített gátlás biztosíthatja, hogy a WCC transzkripció aktivitása éhezésben is megmaradjon mind DD-ben, mind pedig LL-ben. A PKA fokozza továbbá a FRQ stabilitást (117), hatással van a stressz körülmények közötti transzlációs aktivitásra (255, 256), valamint élesztőben aktiválja a PP2A-t (257) és ezen funkciónak köszönhetően minden bizonnyal az órára is hatással van. Következésképp munkacsoportunk megfigyelései az irodalmi adatokkal egybehangzóan arra utalnak, hogy a PKA a cirkadián óra különböző metabolikus körülményekhez való alkalmazkodásának fő szabályozója lehet (55. ábra).

Összességében tehát elmondható, hogy több jelátviteli útvonal tápanyagfüggő aktivitása biztosítja, hogy a WCC transzkripció aktivitása és így a *frq* expresszió és oszcilláció tápanyagkompenzált tudjon maradni.

6. Következtetések

6.1. A RAS2 az óra metabolikus kompenzációjának egy új faktora

1. A RAS2 hatással van a *N. crassa* fenotípusára, hiánya morfológiai defektusokat eredményez. Jelenléte továbbá szükséges a megfelelő konidizációs ritmus fenntartásához, hiányában állandó körülmények között megváltozik a cirkadián kimenet, változó körülmények mellett pedig késik a fázis.

2. A RAS2 szerepet játszik a cirkadián ritmus glükóz kompenzációjában. Hiányában a ritmusos oszcilláció magasabb glükózsintek mellett gyorsan lecseng, a cirkadián periódus pedig fokozatosan hosszabbodik.

3. A RAS2 aktivitása alapvető jelentőségű a cirkadián óra normál működése szempontjából. A $\Delta ras2$ mutáció nem csak a ritmusos kimenetet érinti, hanem a központi oszcillátor működésére is hatással van. A FRQ fehérje oszcillációja kevésbé robusztus, az oszcilláció fázisa pedig késik. A WC-1 ritmusa kevésbé kifejezett.

4. A *ras2* mutáció a molekuláris óra komponenseinek expresszióját, foszforilációs állapotát, valamint szubcelluláris megoszlását is megváltoztatja. A FRQ esetében a negatív visszacsatolásban aktív hipofoszforilált alakok dominálnak. A hipofoszforilált FRQ magi akkumulációja glükóz hozzáadására tovább fokozódik. A WC-1 főként inaktív citoszolikus formában van jelen.

5. A RAS2 eredményeink alapján az adenilát-ciklazon keresztül fejt ki hatását a molekuláris órára.

6.2. A tápanyagmegvonás a molekuláris óra újraszerveződését eredményezi

1. A hosszantartó glükózmegvonás megváltoztatja a központi órakomponensek sztöchiometriáját: míg a FRQ hiperfoszforilált lesz, a citoszolikus WC-1 mennyisége pedig csökken, az órakomponensek RNS-szintjei nem mutatnak változást.

2. A fehérjeszinten megfigyelt jelentős változás ellenére a cirkadián időmérés működőképes marad hosszantartó éhezés esetén is. Az óra negatív faktorának, valamint a kimeneti géneknek az oszcillációja fenntartott.

3. Az órakomponensek éhezésre adott válaszában számos modulátor játszik szerepet, így többek között a FRQ és a PP2A is. A PP2A aktivitása éhezés során csökken. Részben ez eredményezheti a FRQ éhezés során bekövetkező hiperfoszforilációját.

4. Éhezés hatására a kódoló gének több, mint 20%-ának expressziója mutatott változást. Ezek közül 90 gén a WCC közvetlen célpontja lehet. A *wc-1* hiánya jelentős mértékben befolyásolja a transzkriptom éhezés során bekövetkező átszerveződését, a törzsspecifikus változást mutató gének (13%) többsége az aminosav és zsírsav metabolizmusban játszik szerepet.

5. Az éhezésből történő hatékony regeneráció feltétele a működőképes óra jelenléte. Ennek hiányában a glükóztranszporter expressziója nem képes alkalmazkodni a környezet glükózsintjének változásához és a tápanyag újbóli rendelkezésre állása esetén a biomassza növekedése elmarad a normál mértékűtől.

7. Összefoglalás

Az óraműködés metabolikus szabályozásának molekuláris mechanizmusa máig nem teljesen feltérképezett, a folyamat csupán néhány komponensének funkciója ismert (1, 152, 153). Kísérleteink során a RAS2 fehérje e mechanizmusban betöltött szerepének vizsgálatát tűztük ki célul. Eredményeink arra utalnak, hogy a RAS2 fehérje szerepet játszik abban, hogy a molekuláris óra működése változó glükózsintek ellenére is állandó maradjon. Kísérleteink során bemutattuk, hogy a FRQ-nek mind a foszforilációja, mind pedig a mag és citoszol közötti megoszlása függ a RAS2 fehérjétől. Azt valószínűsítjük, hogy a RAS2 egy cAMP-függő útvonalon keresztül hatva köti össze a cirkadián oszcillátort és a glükózérzékelés jelátviteli rendszerét, és ezért a cirkadián periódus tápanyag-kompensációs mechanizmusának egyik fontos faktora.

A transzkripcióban és translációban történő ritmusos fluktuáció a cirkadián óraműködés alapja. Azonban a tápanyag hozzáférhetősége jelentős mértékben befolyásolja a fehérjék translációs rátáját és turnover-t, ami felvetette a kérdést, hogy vajon a cirkadián óra képes-e hosszabb idejű tápanyagmegvonás mellett is működni. Adataink rámutattak, hogy az óra hiánya alapvető változásokhoz vezet a transzkriptom glükózmegvonásra adott válaszában, továbbá gyengébb regenerációs képességet is eredményez. Amikor a transzkriptom éhezésre adott válaszát vizsgáltuk *wt*-ban és $\Delta wcc-1$ -ben, azt találtuk, hogy a WCC-nek jelentős hatása van számos gén tápanyagszinttől függő expressziójára, így például a szénhidrát, aminosav és zsírsav metabolizmus enzimeire és szabályozóira. Továbbá, adataink szolgálnak elsőként bizonyítékkal arra a cirkadián irodalomban, hogy a TTFL akkor is működőképes, mikor kulcselemei a glükózhány hatására széles szöchiometriai határok között mozognak. Adataink azt mutatják továbbá, hogy a *Neurospora* gyorsabban regenerálódik hosszantartó éhezésemből, ha jelen van a működőképes óra, ami a cirkadián ritmus kiemelt jelentőségét támasztja alá a szervezet túlélése és ellenállóképessége szempontjából. Mindezeket összefoglalva tehát a cirkadián ritmus egy új metabolikus kompenzációs mechanizmusát írtuk le, amely a hiperfoszforilált FRQ segítségével a csökkent negatív visszacsatoláson keresztül fejt ki hatását, és amely mechanizmust a PP2A és a PKA útvonalak módosítanak.

Summary

Metabolic regulation of the circadian clockwork and its molecular mechanism is still not completely understood, the role of only its few components are known. (1, 152, 153). Aim of our experiments was to investigate the role of the RAS2 protein in the molecular compensation of the circadian clock. Our results indicated, that RAS2 plays an important role in the maintenance of a stable clockwork in spite of the changing glucose levels. We showed that phosphorylation of FRQ and its distribution between the cell components is dependent on the RAS2 protein. We hypothesized that RAS2 connects the circadian oscillator to glucose sensing, acting via a cAMP dependent pathway. In conclusion, RAS2 seems to be an important factor of the nutrient compensation of the circadian period.

The circadian clockwork is based on the rhythmic fluctuation of the transcription and translation. However, nutrient availability affects the translation rate and turnover of the proteins that raised the question whether the circadian clock is able to function during a long term starvation. Our data highlighted, that lack of the clock resulted in essential changes in the transcriptome response upon glucose withdrawal, furthermore it lead to a weaker recovering ability, as well. When investigating the transcriptome response to starvation in the *wt* and $\Delta wc-1$, we found that WCC has a significant effect on the nutrient-dependent expression of several genes, such as the enzymes and regulators of the carbohydrate, amino acid and fatty acid metabolism. Furthermore, our data provide the first evidence in the circadian literature that TTFL is still able to function even when its key elements show changes between wide stoichiometric ranges due to glucose deprivation. Besides, our data indicate, that *Neurospora* is able to recover faster from long-term glucose starvation, when the functional circadian clock is present. This indicates the importance of the circadian rhythm from the aspect of the fitness and survival of an organism. In summary, we have described a new mechanism of the metabolic compensation of the circadian rhythm, which exerts its effect through a reduced negative feedback with the help of the hyperphosphorylated FRQ, and which mechanism is modified by the PP2A and PKA pathways.

8. Irodalomjegyzék

1. Sancar G, Sancar C, Brunner M. Metabolic compensation of the *Neurospora* clock by a glucose-dependent feedback of the circadian repressor CSP1 on the core oscillator. *Genes Dev.* 2012;26(21):2435-42.
2. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell.* 2002;111(1):41-50.
3. Klerman EB. Clinical aspects of human circadian rhythms. *J Biol Rhythms.* 2005;20(4):375-86.
4. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science.* 2005;308(5724):1043-5.
5. Bellet MM, Sassone-Corsi P. Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 22):3837-48.
6. Castellano E, Santos E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer.* 2011;2(3):216-31.
7. Buday L, Downward J. Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1786(2):178-87.
8. Weeks G, Spiegelman GB. Roles played by Ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms. *Cell Signal.* 2003;15(10):901-9.
9. Duffield GE, Best JD, Meurers BH, Bittner A, Loros JJ, Dunlap JC. Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol.* 2002;12(7):551-7.
10. Takahashi H, Umeda N, Tsutsumi Y, Fukumura R, Ohkaze H, Sujino M, Gijssbertus vdH, Yasui A, Inouye S-IT, Fujimori A, Ohhata T, Araki R, Abe M. Mouse dexamethasone-induced RAS protein 1 gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;110(1):1-6.
11. Williams JA, Su HS, Bernardis A, Field J, Sehgal A. A circadian output in *Drosophila* mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. *Science.* 2001;293(5538):2251-6.

12. Relogio A, Thomas P, Medina-Perez P, Reischl S, Bervoets S, Gloc E, Riemer P, Mang-Fatehi S, Maier B, Schäfer R, Leser U, Herzel H, Kramer A, Sers C. Ras-mediated deregulation of the circadian clock in cancer. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004338.
13. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 1999;96(2):271-90.
14. Hurley J, Loros JJ, Dunlap JC. Dissecting the mechanisms of the clock in *Neurospora*. *Methods Enzymol.* 2015;551:29-52.
15. Sancar C, Sancar G, Ha N, Cesbron F, Brunner M. Dawn- and dusk-phased circadian transcription rhythms coordinate anabolic and catabolic functions in *Neurospora*. *BMC Biol.* 2015;13:17.
16. Johnston JD. Physiological links between circadian rhythms, metabolism and nutrition. *Experimental Physiology.* 2014;99(9):1133-7.
17. Schafmeier T, Diernfellner AC. Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Lett.* 2011;585(10):1467-73.
18. Chen CH, Dunlap JC, Loros JJ. *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet Biol.* 2010;47(11):922-9.
19. Sweeney BM. Circadian rhythms, definition and general characterization. *The molecular basis of circadian rhythms.* 1976:77.
20. Dunlap JC, Loros JJ, Colot HV, Mehra A, Belden WJ, Shi M, Hong CI, Larrondo LF, Baker CL, Chen C-H, Schwerdtfeger C, Collopy PD, Gamsby JJ, Lambregts R. A circadian clock in *Neurospora*: how genes and proteins cooperate to produce a sustained, entrainable, and compensated biological oscillator with a period of about a day. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2007;72:57-68.
21. Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC. The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(1):95-110.
22. Aronson BD, Bell-Pedersen D, Block GD, Bos NP, Dunlap JC, Eskin A, Garceau NY, Geusz ME, Johnson KA, Khalsa SB, Koster-Van Hoffen GC, Koumenis C, Lee TM, LeSauter J, Lindgren KM, Liu Q, Loros JJ, Michel SH, Mirmiran M, Moore RY, Ruby NF, Silver R, Turek FW, Zatz M, Zucker I. Circadian rhythms. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993;18(3):315-33.
23. Dunlap JC, Loros JJ. Making Time: Conservation of Biological Clocks from Fungi to Animals. *Microbiol Spectr.* 2017;5(3).

24. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*. 2001;25(2):85-93.
25. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*. 2005;6(7):544-56.
26. Ishikawa TT, R; Suzuki, S; Saida, Y; Soda, A; Fukushima, R; Yamane, Y;. Daily rhythms of left atrial pressure in beagle dogs with mitral valve regurgitation. *J Vet Intern Med*. 2008.
27. McWatters H, Dunlap JC, Millar AJ. Circadian biology: clocks for the real world. *Curr Biol*. 1999;9(17):R633-5.
28. Pittendrigh CB, VG. An oscillator model for biological clocks. *Rhythmic and Synthetic Processes in Growth*. 1957:75-109.
29. Lakin-Thomas PL, Bell-Pedersen D, Brody S. The genetics of circadian rhythms in *Neurospora*. *Adv Genet*. 2011;74:55-103.
30. Brunner M, Kaldi K. Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol*. 2008;68(2):255-62.
31. Dunlap JC, Loros JJ. How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(6):579-87.
32. Heintzen C, Liu Y. The *Neurospora crassa* circadian clock. *Adv Genet*. 2007;58:25-66.
33. Liu Y, Bell-Pedersen D. Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. *Eukaryot Cell*. 2006;5(8):1184-93.
34. Davis RH. *Neurospora: Contributions of a Model Organism*. Oxford: University Press. 2000.
35. Beadle GW, Tatum EL. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1941;27(11):499-506.
36. Tatum EL. Contributions of Bernard O. Dodge to Biochemical Genetics. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 1961;88:115-8.
37. Perkins DD, Davis RH. *Neurospora* at the millennium. *Fungal Genet Biol*. 2000;31(3):153-67.
38. Ziv C, Yarden O. Gene silencing for functional analysis: assessing RNAi as a tool for manipulation of gene expression. *Methods Mol Biol*. 2010;638:77-100.

39. Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. Gene silencing in worms and fungi. *Nature*. 2000;404(6775):245.
40. Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma L-J, Smirnov S, Purcell S, Rehman B, Elkins T, Engels R, Wang S, Nielsen CB, Butler J, Endrizzi M, Qui D, Ianakiev P, Bell-Pedersen D, Nelson MA, Werner-Washburne M, Selitrennikoff CP, Kinsey JA, Braun EL, Zelter A, Schulte U, Kothe GO, Jedd G, Mewes W, Staben C, Marcotte E, Greenberg D, Roy A, Foley K, Naylor J, Stange-Thomann N, Barrett R, Gnerre S, Kamal M, Kamvysselis M, Mauceli E, Bielke C, Rudd S, Frishman D, Krystofova S, Rasmussen C, Metzenberg RL, Perkins DD, Kroken S, Cogoni C, Macino G, Catcheside D, Li W, Pratt RJ, Osmani SA, DeSouza CPC, Glass L, Orbach MJ, Berglund JA, Voelker R, Yarden O, Plamann M, Seiler S, Dunlap J, Radford A, Aramayo R, Natvig DO, Alex LA, Mannhaupt G, Ebbole DJ, Freitag M, Paulsen I, Sachs MS, Lander ES, Nusbaum c, Birren B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 2003;422(6934):859-68.
41. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(9):2112-6.
42. Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(27):10352-7.
43. Freitag M, Hickey PC, Raju NB, Selker EU, Read ND. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*. 2004;41(10):897-910.
44. Castro-Longoria E, Ferry M, Bartnicki-Garcia S, Hasty J, Brody S. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: dynamics of the clock component frequency visualized using a fluorescent reporter. *Fungal Genet Biol*. 2010;47(4):332-41.
45. Perkins DD, Radford A, Sachs MS. *The Neurospora Compendium*. Academic Press. 2001.
46. Springer ML. Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays*. 1993;15(6):365-74.
47. Pittendrigh CS, Bruce VG, Rosenzweig NS, Rubin ML. A biological clock in *Neurospora*. *Nature*. 1959(184):169.

48. Feldman JF, Hoyle MN. Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics*. 1973;75(4):605-13.
49. Sargent ML, Briggs WR, Woodward DO. Circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol*. 1966;41(8):1343-9.
50. Belden WJ, Larrondo LF, Froehlich AC, Shi M, Chen CH, Loros JJ, Dunlap JC. The band mutation in *Neurospora crassa* is a dominant allele of *ras-1* implicating RAS signaling in circadian output. *Genes Dev*. 2007;21(12):1494-505.
51. Gooch VD, Mehra A, Larrondo LF, Fox J, Touroutoutoudis M, Loros JJ, Dunlap JC. Fully codon-optimized luciferase uncovers novel temperature characteristics of the *Neurospora* clock. *Eukaryot Cell*. 2008;7(1):28-37.
52. Morgan LW, Greene AV, Bell-Pedersen D. Circadian and light-induced expression of luciferase in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*. 2003;38(3):327-32.
53. Schafmeier T, Diernfellner A, Schafer A, Dintsis O, Neiss A, Brunner M. Circadian activity and abundance rhythms of the *Neurospora* clock transcription factor WCC associated with rapid nucleo-cytoplasmic shuttling. *Genes Dev*. 2008;22(24):3397-402.
54. Gyongyosi N, Nagy D, Makara K, Ella K, Kaldi K. Reactive oxygen species can modulate circadian phase and period in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med*. 2013;58:134-43.
55. Gyongyosi N, Kaldi K. Interconnections of reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythm in *Neurospora crassa*. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(18):3007-23.
56. Cha J, Zhou M, Liu Y. CATP is a critical component of the *Neurospora* circadian clock by regulating the nucleosome occupancy rhythm at the frequency locus. *EMBO Rep*. 2013;14(10):923-30.
57. Gorl M, Meroow M, Huttner B, Johnson J, Roenneberg T, Brunner M. A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora crassa*. *EMBO J*. 2001;20(24):7074-84.
58. Guo J, Cheng P, Yuan H, Liu Y. The exosome regulates circadian gene expression in a posttranscriptional negative feedback loop. *Cell*. 2009;138(6):1236-46.

59. Mehra A, Shi M, Baker CL, Colot HV, Loros JJ, Dunlap JC. A role for casein kinase 2 in the mechanism underlying circadian temperature compensation. *Cell*. 2009;137(4):749-60.
60. Pogue AM, Liu Q, Baker CL, Dunlap JC, Loros JJ. The Neurospora checkpoint kinase 2: a regulatory link between the circadian and cell cycles. *Science*. 2006;313(5787):644-9.
61. Schafmeier T, Haase A, Kaldi K, Scholz J, Fuchs M, Brunner M. Transcriptional feedback of Neurospora circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell*. 2005;122(2):235-46.
62. Cheng P, Yang Y, Liu Y. Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the Neurospora circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7408-13.
63. Crosthwaite SK, Loros JJ, Dunlap JC. Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell*. 1995;81(7):1003-12.
64. Froehlich AC, Loros JJ, Dunlap JC. Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5914-9.
65. Cheng P, He Q, He Q, Wang L, Liu Y. Regulation of the Neurospora circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev*. 2005;19(2):234-41.
66. Aronson BD, Johnson KA, Loros JJ, Dunlap JC. Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science*. 1994;263(5153):1578-84.
67. Tan Y, Dragovic Z, Roenneberg T, Meroz M. Entrainment dissociates transcription and translation of a circadian clock gene in neurospora. *Curr Biol*. 2004;14(5):433-8.
68. He Q, Liu Y. Molecular mechanism of light responses in Neurospora: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev*. 2005;19(23):2888-99.
69. Liu X, Chen A, Caicedo-Casso A, Cui G, Du M, He Q, Lim S, Kim HJ, Hong CI, Liu Y. FRQ-CK1 interaction determines the period of circadian rhythms in Neurospora. *Nat Commun*. 2019;10(1):4352.
70. Larrondo LF, Olivares-Yanez C, Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC. Circadian rhythms. Decoupling circadian clock protein turnover from circadian period determination. *Science*. 2015;347(6221):1257277.

71. Schafmeier T, Kaldi K, Diernfellner A, Mohr C, Brunner M. Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes Dev.* 2006;20(3):297-306.
72. Querfurth C, Diernfellner AC, Gin E, Malzahn E, Hofer T, Brunner M. Circadian conformational change of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY triggered by clustered hyperphosphorylation of a basic domain. *Mol Cell.* 2011;43(5):713-22.
73. He Q, Cheng P, Yang Y, He Q, Yu H, Liu Y. FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J.* 2003;22(17):4421-30.
74. Liu Y. Analysis of posttranslational regulations in the *Neurospora* circadian clock. *Methods Enzymol.* 2005;393:379-93.
75. Garceau NY, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC. Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell.* 1997;89(3):469-76.
76. Lee K, Loros JJ, Dunlap JC. Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science.* 2000;289(5476):107-10.
77. Denault DL, Loros JJ, Dunlap JC. WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *EMBO J.* 2001;20(1-2):109-17.
78. Kaldi K, Gonzalez BH, Brunner M. Transcriptional regulation of the *Neurospora* circadian clock gene *wc-1* affects the phase of circadian output. *EMBO Rep.* 2006;7(2):199-204.
79. Neiss A, Schafmeier T, Brunner M. Transcriptional regulation and function of the *Neurospora* clock gene *white collar 2* and its isoforms. *EMBO Rep.* 2008;9(8):788-94.
80. Cheng P, Yang Y, Gardner KH, Liu Y. PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol Cell Biol.* 2002;22(2):517-24.
81. Cheng P, Yang Y, Wang L, He Q, Liu Y. WHITE COLLAR-1, a multifunctional *Neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J Biol Chem.* 2003;278(6):3801-8.

82. Lakin-Thomas PL, Brody S. Circadian rhythms in microorganisms: new complexities. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:489-519.
83. Dragovic Z, Tan Y, Gorl M, Roenneberg T, Mellow M. Light reception and circadian behavior in 'blind' and 'clock-less' mutants of *Neurospora crassa*. *EMBO J.* 2002;21(14):3643-51.
84. Loros JJ, Feldman JF. Loss of temperature compensation of circadian period length in the *frq-9* mutant of *Neurospora crassa*. *J Biol Rhythms.* 1986;1(3):187-98.
85. Christensen MK, Falkeid G, Loros JJ, Dunlap JC, Lillo C, Ruoff P. A nitrate-induced *frq*-less oscillator in *Neurospora crassa*. *J Biol Rhythms.* 2004;19(4):280-6.
86. Correa A, Lewis ZA, Greene AV, March IJ, Gomer RH, Bell-Pedersen D. Multiple oscillators regulate circadian gene expression in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13597-602.
87. de Paula RM, Lewis ZA, Greene AV, Seo KS, Morgan LW, Vitalini MW, Bennett L, Gomer RH, Bell-Pedersen D. Two circadian timing circuits in *Neurospora crassa* cells share components and regulate distinct rhythmic processes. *J Biol Rhythms.* 2006;21(3):159-68.
88. Edgar RS, Green EW, Zhao Y, van Ooijen G, Olmedo M, Qin X, Xu Y, Pan M, Valekunja UK, Feeney KA, Maywood ES, Hastings MH, Baliga NS, Mellow M, Millar AJ, Johnson CH, Kyriacou CP, O'Neill JS, Reddy AB. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature.* 2012;485(7399):459-64.
89. Ramsdale M, Lakin-Thomas PL. sn-1,2-diacylglycerol levels in the fungus *Neurospora crassa* display circadian rhythmicity. *J Biol Chem.* 2000;275(36):27541-50.
90. Granshaw T, Tsukamoto M, Brody S. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: farnesol or geraniol allow expression of rhythmicity in the otherwise arrhythmic strains *frq10*, *wc-1*, and *wc-2*. *J Biol Rhythms.* 2003;18(4):287-96.
91. Lakin-Thomas PL, Brody S. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: lipid deficiencies restore robust rhythmicity to null frequency and white-collar mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):256-61.
92. Lombardi L, Schneider K, Tsukamoto M, Brody S. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: clock mutant effects in the absence of a *frq*-based oscillator. *Genetics.* 2007;175(3):1175-83.

93. Schneider K, Perrino S, Oelhafen K, Li S, Zatzepin A, Lakin-Thomas P, Brody S. Rhythmic conidiation in constant light in vivid mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics*. 2009;181(3):917-31.
94. Yoshida Y, Maeda T, Lee B, Hasunuma K. Conidiation rhythm and light entrainment in superoxide dismutase mutant in *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics*. 2008;279(2):193-202.
95. Li S, Lakin-Thomas P. Effects of *prd* circadian clock mutations on FRQ-less rhythms in *Neurospora*. *J Biol Rhythms*. 2010;25(2):71-80.
96. Li S, Motavaze K, Kafes E, Suntharalingam S, Lakin-Thomas P. A new mutation affecting FRQ-less rhythms in the circadian system of *Neurospora crassa*. *PLoS Genet*. 2011;7(6):e1002151.
97. Perkins DD, Newmeyer D, Taylor CW, Bennett DC. New markers and map sequences in *Neurospora crassa*, with a description of mapping by duplication coverage, and of multiple translocation stocks for testing linkage. *Genetica*. 1969;40(3):247-78.
98. Crosthwaite SK, Dunlap JC, Loros JJ. *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science*. 1997;276(5313):763-9.
99. Ballario P, Vittorioso P, Magrelli A, Talora C, Cabibbo A, Macino G. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J*. 1996;15(7):1650-7.
100. Liu Y. Molecular mechanisms of entrainment in the *Neurospora* circadian clock. *J Biol Rhythms*. 2003;18(3):195-205.
101. Linden H. Circadian rhythms. A white collar protein senses blue light. *Science*. 2002;297(5582):777-8.
102. Belozerskaia TA, Gessler NN. Oxidative stress and cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Mikrobiologiya*. 2006;75(4):497-501.
103. Talora C, Franchi L, Linden H, Ballario P, Macino G. Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J*. 1999;18(18):4961-8.
104. Wang B, Kettenbach AN, Zhou X, Loros JJ, Dunlap JC. The Phospho-Code Determining Circadian Feedback Loop Closure and Output in *Neurospora*. *Mol Cell*. 2019;74(4):771-84 e3.

105. Cha J, Chang SS, Huang G, Cheng P, Liu Y. Control of WHITE COLLAR localization by phosphorylation is a critical step in the circadian negative feedback process. *EMBO J.* 2008;27(24):3246-55.
106. Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC. White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science.* 2002;297(5582):815-9.
107. Lewis JA, Escalante-Semerena JC. The FAD-dependent tricarballylate dehydrogenase (TcuA) enzyme of *Salmonella enterica* converts tricarballylate into cis-aconitate. *J Bacteriol.* 2006;188(15):5479-86.
108. Gardner GF, Feldman JF. The *frq* locus in *Neurospora crassa*: a key element in circadian clock organization. *Genetics.* 1980;96(4):877-86.
109. Loros JJ, Richman A, Feldman JF. A recessive circadian clock mutation at the *frq* locus of *Neurospora crassa*. *Genetics.* 1986;114(4):1095-110.
110. McClung CR, Fox BA, Dunlap JC. The *Neurospora* clock gene frequency shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene period. *Nature.* 1989;339(6225):558-62.
111. Merrow M, Franchi L, Dragovic Z, Gorl M, Johnson J, Brunner M, Macino G, Roenneberg T. Circadian regulation of the light input pathway in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* 2001;20(3):307-15.
112. Baker CL, Kettenbach AN, Loros JJ, Gerber SA, Dunlap JC. Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the *Neurospora* circadian clock. *Mol Cell.* 2009;34(3):354-63.
113. Tang CT, Li S, Long C, Cha J, Huang G, Li L, Chen S, Liu Y. Setting the pace of the *Neurospora* circadian clock by multiple independent FRQ phosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(26):10722-7.
114. Liu Y, Loros J, Dunlap JC. Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):234-9.
115. He Q, Cha J, He Q, Lee HC, Yang Y, Liu Y. CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *Genes Dev.* 2006;20(18):2552-65.
116. Yang Y, Cheng P, Liu Y. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by casein kinase II. *Genes Dev.* 2002;16(8):994-1006.

117. Huang G, Chen S, Li S, Cha J, Long C, Li L, He Q, Liu Y. Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop. *Genes Dev.* 2007;21(24):3283-95.
118. Yang Y, Cheng P, Zhi G, Liu Y. Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY. *J Biol Chem.* 2001;276(44):41064-72.
119. Yang Y, He Q, Cheng P, Wrage P, Yarden O, Liu Y. Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev.* 2004;18(3):255-60.
120. Liu Y, Garceau NY, Loros JJ, Dunlap JC. Thermally regulated translational control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the *neurospora* circadian clock. *Cell.* 1997;89(3):477-86.
121. Colot HV, Loros JJ, Dunlap JC. Temperature-modulated alternative splicing and promoter use in the Circadian clock gene frequency. *Mol Biol Cell.* 2005;16(12):5563-71.
122. Diernfellner AC, Schafmeier T, Merrow MW, Brunner M. Molecular mechanism of temperature sensing by the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 2005;19(17):1968-73.
123. He Q, Cheng P, Yang Y, Wang L, Gardner KH, Liu Y. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science.* 2002;297(5582):840-3.
124. Chen CH, Ringelberg CS, Gross RH, Dunlap JC, Loros JJ. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J.* 2009;28(8):1029-42.
125. Dong W, Tang X, Yu Y, Griffith J, Nilsen R, Choi D, Baldwin J, Hilton L, Kelps K, Mcguire J, Morgan R, Smith M, Case M, Arnold J, Schüttler HB, Wang Q, Liu J, Reeves J, Loganet D. Systems biology of the *Neurospora* biological clock. *IET Syst Biol.* 2007;1(5):257-65.
126. Dong W, Tang X, Yu Y, Nilsen R, Kim R, Griffith J, Arnold J, Schüttler HB. Systems biology of the clock in *Neurospora crassa*. *PLoS One.* 2008;3(8):e3105.
127. Lewis ZA, Correa A, Schwerdtfeger C, Link KL, Xie X, Gomer RH, Thomas T, Ebbole DJ, Bell-Pedersen D. Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* 2002;45(4):917-31.

128. Smith KM, Sancar G, Dekhang R, Sullivan CM, Li S, Tag AG, Sancar C, Bredeweg EL, Priest HD, McCormick RF, Thomas TL, Carrington JC, Stajich JE, Bell-Pedersen D, Brunner M, Freitag M. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. *Eukaryot Cell*. 2010;9(10):1549-56.
129. Linden H, Macino G. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J*. 1997;16(1):98-109.
130. Malzahn E, Ciprianidis S, Kaldi K, Schafmeier T, Brunner M. Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell*. 2010;142(5):762-72.
131. Kozma-Bognar L, Kaldi K. Synchronization of the fungal and the plant circadian clock by light. *Chembiochem*. 2008;9(16):2565-73.
132. Heintzen C, Loros JJ, Dunlap JC. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*. 2001;104(3):453-64.
133. Schwerdtfeger C, Linden H. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J*. 2003;22(18):4846-55.
134. Zoltowski BD, Schwerdtfeger C, Widom J, Loros JJ, Bilwes AM, Dunlap JC, Crane BR. Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science*. 2007;316(5827):1054-7.
135. Schwerdtfeger C, Linden H. Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol*. 2001;39(4):1080-7.
136. Shrode LB, Lewis ZA, White LD, Bell-Pedersen D, Ebbole DJ. *vvd* is required for light adaptation of conidiation-specific genes of *Neurospora crassa*, but not circadian conidiation. *Fungal Genet Biol*. 2001;32(3):169-81.
137. Liu Y, Merrow M, Loros JJ, Dunlap JC. How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science*. 1998;281(5378):825-9.
138. Barrett RK, Takahashi JS. Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock. *J Neurosci*. 1995;15(8):5681-92.
139. Hastings JW, Sweeney BM. On the Mechanism of Temperature Independence in a Biological Clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1957;43(9):804-11.

140. Ruoff P, Zakhartsev M, Westerhoff HV. Temperature compensation through systems biology. *FEBS J.* 2007;274(4):940-50.
141. Tseng YY, Hunt SM, Heintzen C, Crosthwaite SK, Schwartz JM. Comprehensive modelling of the *Neurospora* circadian clock and its temperature compensation. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(3):e1002437.
142. Diernfellner A, Colot HV, Dintsis O, Loros JJ, Dunlap JC, Brunner M. Long and short isoforms of *Neurospora* clock protein FRQ support temperature-compensated circadian rhythms. *FEBS Lett.* 2007;581(30):5759-64.
143. Hunt SM, Elvin M, Crosthwaite SK, Heintzen C. The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 2007;21(15):1964-74.
144. Asher G, Schibler U. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab.* 2011;13(2):125-37.
145. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2133-41.
146. Bray MS, Young ME. Regulation of fatty acid metabolism by cell autonomous circadian clocks: time to fatten up on information? *J Biol Chem.* 2011;286(14):11883-9.
147. Duez H, Staels B. Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J Appl Physiol (1985).* 2009;107(6):1972-80.
148. Johnson CH, Egli M. Metabolic compensation and circadian resilience in prokaryotic cyanobacteria. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:221-47.
149. Eckel-Mahan KL, Patel VR, de Mateo S, Orozco-Solis R, Ceglia NJ, Sahar S, Dilag-Penilla SA, Dyar KA, Baldi P, Sassone-Corsi P. Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell.* 2013;155(7):1464-78.
150. Shi M, Zheng X. Interactions between the circadian clock and metabolism: there are good times and bad times. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013;45(1):61-9.
151. Sancar G, Sancar C, Brugger B, Ha N, Sachsenheimer T, Gin E, Wdowik S, Lohmann I, Wieland F, Höfer T, Diernfellner A, Brunner M. A global circadian repressor controls antiphase expression of metabolic genes in *Neurospora*. *Mol Cell.* 2011;44(5):687-97.
152. Emerson JM, Bartholomai BM, Ringelberg CS, Baker SE, Loros JJ, Dunlap JC. *period-1* encodes an ATP-dependent RNA helicase that influences nutritional

compensation of the *Neurospora* circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(51):15707-12.

153. Adhvaryu K, Firoozi G, Motavaze K, Lakin-Thomas P. PRD-1, a Component of the Circadian System of *Neurospora crassa*, Is a Member of the DEAD-box RNA Helicase Family. *J Biol Rhythms*. 2016;31(3):258-71.

154. Olivares-Yanez C, Emerson J, Kettenbach A, Loros JJ, Dunlap JC, Larrondo LF. Modulation of Circadian Gene Expression and Metabolic Compensation by the RCO-1 Corepressor of *Neurospora crassa*. *Genetics*. 2016;204(1):163-76.

155. Olmedo M, Roenneberg T, Merrow M, Corrochano LM. Glucose sensing and light regulation: A mutation in the glucose sensor RCO-3 modifies photoadaptation in *Neurospora crassa*. *Fungal Biol*. 2018;122(6):497-504.

156. Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, Shin Y, Liu J, Cameron MD, Noel R, Yoo S-H, Takahashi JS, Butler AB, Kamenecka TM, Burris TP. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature*. 2012;485(7396):62-8.

157. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 2001;291(5503):490-3.

158. Baron KG, Reid KJ. Circadian misalignment and health. *Int Rev Psychiatry*. 2014;26(2):139-54.

159. Jona G, Choder M, Gileadi O. Glucose starvation induces a drastic reduction in the rates of both transcription and degradation of mRNA in yeast. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1491(1-3):37-48.

160. Vitalini MW, de Paula RM, Goldsmith CS, Jones CA, Borkovich KA, Bell-Pedersen D. Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18223-8.

161. Vitalini MW, Morgan LW, March IJ, Bell-Pedersen D. A genetic selection for circadian output pathway mutations in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 2004;167(1):119-29.

162. Lamb TM, Goldsmith CS, Bennett L, Finch KE, Bell-Pedersen D. Direct transcriptional control of a p38 MAPK pathway by the circadian clock in *Neurospora crassa*. *PLoS One*. 2011;6(11):e27149.

163. Marshall CJ. Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(2):197-204.

164. Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol.* 2005;15(14):R563-74.
165. Rocks O, Peyker A, Bastiaens PI. Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(4):351-7.
166. Goitre L, Trapani E, Trabalzini L, Retta SF. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Methods Mol Biol.* 2014;1120:1-18.
167. Munemitsu S, Innis MA, Clark R, McCormick F, Ullrich A, Polakis P. Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol Cell Biol.* 1990;10(11):5977-82.
168. Goodsell DS. The molecular perspective: the ras oncogene. *Stem Cells.* 1999;17(4):235-6.
169. Gerstner JR, Vander Heyden WM, Lavaute TM, Landry CF. Profiles of novel diurnally regulated genes in mouse hypothalamus: expression analysis of the cysteine and histidine-rich domain-containing, zinc-binding protein 1, the fatty acid-binding protein 7 and the GTPase, ras-like family member 11b. *Neuroscience.* 2006;139(4):1435-48.
170. Eckel-Mahan KL, Phan T, Han S, Wang H, Chan GC, Scheiner ZS, Storm DR. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence. *Nat Neurosci.* 2008;11(9):1074-82.
171. Hayashi Y, Sanada K, Fukada Y. Circadian and photic regulation of MAP kinase by Ras- and protein phosphatase-dependent pathways in the chick pineal gland. *FEBS Lett.* 2001;491(1-2):71-5.
172. Huang CC, Ko ML, Vernikovskaya DI, Ko GY. Calcineurin serves in the circadian output pathway to regulate the daily rhythm of L-type voltage-gated calcium channels in the retina. *J Cell Biochem.* 2012;113(3):911-22.
173. Ko GY, Ko ML, Dryer SE. Circadian regulation of cGMP-gated channels of vertebrate cone photoreceptors: role of cAMP and Ras. *J Neurosci.* 2004;24(6):1296-304.
174. Ko ML, Liu Y, Dryer SE, Ko GY. The expression of L-type voltage-gated calcium channels in retinal photoreceptors is under circadian control. *J Neurochem.* 2007;103(2):784-92.
175. Ko ML, Liu Y, Shi L, Trump D, Ko GY. Circadian regulation of retinoschisin in the chick retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(4):1615-21.

176. Shimizu K, Okada M, Nagai K, Fukada Y. Suprachiasmatic nucleus circadian oscillatory protein, a novel binding partner of K-Ras in the membrane rafts, negatively regulates MAPK pathway. *J Biol Chem.* 2003;278(17):14920-5.
177. Tsuchiya Y, Minami I, Kadotani H, Todo T, Nishida E. Circadian clock-controlled diurnal oscillation of Ras/ERK signaling in mouse liver. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2013;89(1):59-65.
178. Weber F, Hung HC, Maurer C, Kay SA. Second messenger and Ras/MAPK signalling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription. *J Neurochem.* 2006;98(1):248-57.
179. Bouchard-Cannon P, Cheng HY. Scheduled feeding alters the timing of the suprachiasmatic nucleus circadian clock in *dexras1*-deficient mice. *Chronobiol Int.* 2012;29(8):965-81.
180. Cheng HY, Dziema H, Papp J, Mathur DP, Koletar M, Ralph MR, Penninger JM, Obrietan K. The molecular gatekeeper *Dexras1* sculpts the photic responsiveness of the mammalian circadian clock. *J Neurosci.* 2006;26(50):12984-95.
181. Cheng HY, Obrietan K. *Dexras1*: shaping the responsiveness of the circadian clock. *Semin Cell Dev Biol.* 2006;17(3):345-51.
182. Koletar MM, Cheng HY, Penninger JM, Ralph MR. Loss of *dexras1* alters nonphotic circadian phase shifts and reveals a role for the intergeniculate leaflet (IGL) in gene-targeted mice. *Chronobiol Int.* 2011;28(7):553-62.
183. Serchov T, Jilg A, Wolf CT, Radtke I, Stehle JH, Heumann R. Ras Activity Oscillates in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus and Modulates Circadian Clock Dynamics. *Mol Neurobiol.* 2016;53(3):1843-55.
184. Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(16):4848-52.
185. Marshall CJ, Hall A, Weiss RA. A transforming gene present in human sarcoma cell lines. *Nature.* 1982;299(5879):171-3.
186. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(1):11-22.
187. Hermann-Le Denmat S, Jacquet M. Yeast RAS2 mutations modulating the ras-guanine exchange factor interaction. *FEBS Lett.* 1997;403(1):95-9.

188. Mosteller RD, Park W, Broek D. Analysis of interaction between Ras and CDC25 guanine nucleotide exchange factor using yeast GAL4 two-hybrid system. *Methods Enzymol.* 1995;255:135-48.
189. Crechet JB, Jacquet E, Bernardi A, Parmeggiani A. Analysis of the role of the hypervariable region of yeast Ras2p and its farnesylation in the interaction with exchange factors and adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 2000;275(23):17754-61.
190. Pasula S, Chakraborty S, Choi JH, Kim JH. Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signaling pathway in yeast. *BMC Cell Biol.* 2010;11:17.
191. Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2002;2(2):183-201.
192. Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Van Zeebroeck G, Rubio-Texeira M, Thevelein JM. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(2):254-99.
193. Santangelo GM. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(1):253-82.
194. Beullens M, Mbonyi K, Geerts L, Gladines D, Detremmerie K, Jans AW, Thevelein JM. Studies on the mechanism of the glucose-induced cAMP signal in glycolysis and glucose repression mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 1988;172(1):227-31.
195. Mbonyi K, Beullens M, Detremmerie K, Geerts L, Thevelein JM. Requirement of one functional RAS gene and inability of an oncogenic ras variant to mediate the glucose-induced cyclic AMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1988;8(8):3051-7.
196. Tamanoi F. Ras signaling in yeast. *Genes Cancer.* 2011;2(3):210-5.
197. Borkovich KA, Alex LA, Yarden O, Freitag M, Turner GE, Read ND, Seiler S, Bell-Pedersen D, Paietta J, Plesofsky N, Plamann M, Goodrich-Tanrikulu M, Schulte U, Mannhaupt G, Nargang FE, Radford A, Selitrennikoff C, Galagan JE, Dunlap JC, Loros JJ, Catcheside D, Inoue H, Aramayo R, Polymenis M, Selker EU, Sachs MS, Marzluf GA, Paulsen I, Davis R, Ebole DJ, Zelter A, Kalkman ER, O'Rourke R, Bowring F, Yeadon J, Ishii C, Suzuki K, Sakai W, Pratt R. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(1):1-108.

198. Altschuler DL, Muro A, Schijman A, Almonacid FB, Torres HN. *Neurospora crassa* cDNA clones coding for a new member of the ras protein family. *FEBS Lett.* 1990;273(1-2):103-6.
199. Kana-uchi A, Yamashiro CT, Tanabe S, Murayama T. A ras homologue of *Neurospora crassa* regulates morphology. *Mol Gen Genet.* 1997;254(4):427-32.
200. Yoshida Y, Hasunuma K. Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem.* 2004;279(8):6986-93.
201. Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 2005;13(3):111-8.
202. Bell-Pedersen D, Shinohara ML, Loros JJ, Dunlap JC. Circadian clock-controlled genes isolated from *Neurospora crassa* are late night- to early morning-specific. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(23):13096-101.
203. Yatzkan E, Yarden O. The B regulatory subunit of protein phosphatase 2A is required for completion of macroconidiation and other developmental processes in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* 1999;31(1):197-209.
204. Margolin B, S., Freitag, M., Selker, E. U. . Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genetics Reports.* 1997;44(13).
205. Felson DT, Gross KD, Nevitt MC, Yang M, Lane NE, Torner JC, Lewis CE, Hurley MV. The effects of impaired joint position sense on the development and progression of pain and structural damage in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;61(8):1070-6.
206. Vogel HJ. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am Naturalist.* 1964(98):435-46.
207. Loros JJ, Denome SA, Dunlap JC. Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science.* 1989;243(4889):385-8.
208. Nakashima H, Perlman J, Feldman JF. Cycloheximide-induced phase shifting of circadian clock of *Neurospora*. *Am J Physiol.* 1981;241(1):R31-5.
209. Luo C, Loros JJ, Dunlap JC. Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J.* 1998;17(5):1228-35.
210. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-5.

211. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):250-4.
212. Cusick KD, Fitzgerald LA, Pirlo RK, Cockrell AL, Petersen ER, Biffinger JC. Selection and evaluation of reference genes for expression studies with quantitative PCR in the model fungus *Neurospora crassa* under different environmental conditions in continuous culture. *PLoS One*. 2014;9(12):e112706.
213. Andrews S. A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. *FastQC*. 2010.
214. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.
215. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Marugán JC, Cummins C, Davidson C, Dodiya K, Fatima R, Gall A, Giron CG, Gil L, Grego T, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Martinez JG, Maurel T, McDowall M, McMahon A, Mohanan S, Moore B, Nuhn M, Oheh DN, Parker A, Parton A, Patricio M, Sakthivel MP, Salam AIA, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Sycheva M, Szuba M, Taylor K, Thormann A, Threadgold G, Vullo A, Walts B, Winterbottom A, Zadissa A, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Hunt SE, Iisley G, Kostadima M, Langridge N, Loveland JE, Martin FJ, Morales J, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Trevanion SJ, Cunningham F, Howe KL, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D682-D8.
216. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.
217. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166-9.
218. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.

219. Gai K, Cao X, Dong Q, Ding Z, Wei Y, Liu Y, Liu X, He Q. Transcriptional repression of frequency by the IEC-1-INO80 complex is required for normal *Neurospora* circadian clock function. *PLoS Genet.* 2017;13(4):e1006732.
220. Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(2):300-72.
221. Johnson C, Kweon HK, Sheidy D, Shively CA, Mellacheruvu D, Nesvizhskii AI, Andrews PC, Kumar A. The yeast *Sks1p* kinase signaling network regulates pseudohyphal growth and glucose response. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004183.
222. Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):746-85.
223. Dettmann A, Heilig Y, Valerius O, Ludwig S, Seiler S. Fungal communication requires the MAK-2 pathway elements STE-20 and RAS-2, the NRC-1 adapter STE-50 and the MAP kinase scaffold HAM-5. *PLoS Genet.* 2014;10(11):e1004762.
224. Pandey A, Roca MG, Read ND, Glass NL. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2004;3(2):348-58.
225. Gyongyosi N, Szoke A, Ella K, Kaldi K. The small G protein RAS2 is involved in the metabolic compensation of the circadian clock in the circadian model *Neurospora crassa*. *J Biol Chem.* 2017;292(36):14929-39.
226. Kodadek T. SD, Nalley K. Keeping transcriptional activators under control. *Cell* 2006(127):261-4.
227. Punga T, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. Phosphorylation and ubiquitination of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein-1 in response to DNA binding. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25278-86.
228. Bell-Pedersen D, Dunlap JC, Loros JJ. The *Neurospora* circadian clock-controlled gene, *ccg-2*, is allelic to *eas* and encodes a fungal hydrophobin required for formation of the conidial rodlet layer. *Genes Dev.* 1992;6(12A):2382-94.
229. Kaldenhoff R, Russo VE. Promoter analysis of the *bli-7/eas* gene. *Curr Genet.* 1993;24(5):394-9.

230. Sokolovsky VY, Lauter FR, Muller-rober B, Ricci M, Schmidhauser TJ, Russo VEA. Nitrogen Regulation of Blue Light-Inducible Genes in *Neurospora-Crassa*. *Journal of General Microbiology*. 1992;138:2045-9.
231. Szoke A, Sarkany O, Schermann G, Kapuy O, Diernfellner ACR, Brunner M, Gyongyosi N, Kaldi K. Adaptation to glucose starvation is associated with molecular reorganization of the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Elife*. 2023;12.
232. Li L, Borkovich KA. GPR-4 is a predicted G-protein-coupled receptor required for carbon source-dependent asexual growth and development in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 2006;5(8):1287-300.
233. Quan Z, Cao L, Tang Y, Yan Y, Oliver SG, Zhang N. The Yeast GSK-3 Homologue Mck1 Is a Key Controller of Quiescence Entry and Chronological Lifespan. *PLoS Genet*. 2015;11(6):e1005282.
234. Tataroglu O, Lauinger L, Sancar G, Jakob K, Brunner M, Diernfellner AC. Glycogen synthase kinase is a regulator of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*. 2012;287(44):36936-43.
235. Hallett JEH, Luo XX, Capaldi AP. State Transitions in the TORC1 Signaling Pathway and Information Processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2014;198(2):773-U452.
236. Elvin M, Loros JJ, Dunlap JC, Heintzen C. The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev*. 2005;19(21):2593-605.
237. Nitsche BM, Jorgensen TR, Akeroyd M, Meyer V, Ram AF. The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics*. 2012;13:380.
238. Benocci T, Aguilar-Pontes MV, Zhou M, Seiboth B, de Vries RP. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels*. 2017;10:152.
239. Hurley JM, Dasgupta A, Emerson JM, Zhou X, Ringelberg CS, Knabe N, Lipzen AM, Lindquist EA, Daum CG, Barry KW, Grigoriev IV, Smith KM, Galagan JE, Bell-Pedersen D, Freitag M, Cheng C, Loros JJ, Dunlap JC. Analysis of clock-regulated genes in *Neurospora* reveals widespread posttranscriptional control of metabolic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(48):16995-7002.

240. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc.* 2013;8(8):1551-66.
241. Ben-Ari Y, Brody Y, Kinor N, Mor A, Tsukamoto T, Spector DL, Singer RH, Yaron ST. The life of an mRNA in space and time. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 10):1761-74.
242. Wang B, Li J, Gao J, Cai P, Han X, Tian C. Identification and characterization of the glucose dual-affinity transport system in *Neurospora crassa*: pleiotropic roles in nutrient transport, signaling, and carbon catabolite repression. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10:17.
243. Kataoka T, Powers S, Cameron S, Fasano O, Goldfarb M, Broach J, Wigler M. Functional homology of mammalian and yeast RAS genes. *Cell.* 1985;40(1):19-26.
244. Banno S, Ochiai N, Noguchi R, Kimura M, Yamaguchi I, Kanzaki S, Murayama T, Fujimura M. A catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase, PKAC-1, regulates asexual differentiation in *Neurospora crassa*. *Genes Genet Syst.* 2005;80(1):25-34.
245. Liu X, Li H, Liu Q, Niu Y, Hu Q, Deng H, Cha J, Wang Y, Liu Y, He Q. Role for Protein Kinase A in the *Neurospora* Circadian Clock by Regulating White Collar-Independent frequency Transcription through Phosphorylation of RCM-1. *Mol Cell Biol.* 2015;35(12):2088-102.
246. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene.* 1998;17(11 Reviews):1395-413.
247. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007;26(22):3100-12.
248. Frank A, Matioli CC, Viana AJC, Hearn TJ, Kusakina J, Belbin FE, Wells Newman D, Yochikawa A, Cano-Ramirez DL, Chembath A, Cragg-Barber K, Haydon MJ, Hotta CT, Vincentz M, Webb AAR, Dodd AN. Circadian Entrainment in *Arabidopsis* by the Sugar-Responsive Transcription Factor bZIP63. *Curr Biol.* 2018;28(16):2597-606 e6.
249. Kaasik K, Kivimae S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, Kissel H, Burlingame AL, Shokat KM, Ptáček LJ, Fu YH. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab.* 2013;17(2):291-302.

250. Hirota T, Okano T, Kokame K, Shirotani-Ikejima H, Miyata T, Fukada Y. Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem.* 2002;277(46):44244-51.
251. Schabler S, Amatobi KM, Horn M, Rieger D, Helfrich-Forster C, Mueller MJ, Wegener C, Fekete A. Loss of function in the Drosophila clock gene period results in altered intermediary lipid metabolism and increased susceptibility to starvation. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(23):4939-56.
252. Putker M, Crosby P, Feeney KA, Hoyle NP, Costa ASH, Gaude E, Frezza C, O'Neill JS. Mammalian Circadian Period, But Not Phase and Amplitude, Is Robust Against Redox and Metabolic Perturbations. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(7):507-20.
253. Hughes Hallett JE, Luo X, Capaldi AP. State transitions in the TORC1 signaling pathway and information processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2014;198(2):773-86.
254. Lee HY, Itahana Y, Schuechner S, Fukuda M, Je HS, Ogris E, Virshup DM, Itahana K. Ca(2+)-dependent demethylation of phosphatase PP2Ac promotes glucose deprivation-induced cell death independently of inhibiting glycolysis. *Sci Signal.* 2018;11(512).
255. Barraza CE, Solari CA, Marcovich I, Kershaw C, Galello F, Rossi S, Ashe MP, Portela P. The role of PKA in the translational response to heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185416.
256. Leipheimer J, Bloom ALM, Panepinto JC. Protein Kinases at the Intersection of Translation and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:318.
257. Castermans D, Somers I, Kriel J, Louwet W, Wera S, Versele M, Janssens V, Thevelein JM. Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell Res.* 2012;22(6):1058-77.

9. Saját publikációk jegyzéke

9.1. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Szőke, A., Sárkány, O., Schermann, G., Kapuy, O., Diernfellner, A. C. R., Brunner, M., Gyöngyösi, N. and Káldi, K.: Adaptation to glucose starvation is associated with molecular reorganization of the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Elife* 2023 Jan 10 12:e79765 doi: 10.7554/eLife.79765

Gyöngyösi, N.*, **Szőke, A.***, Ella, K. and Káldi, K.: RAS2 is involved in the metabolic compensation of the circadian clock in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 2017 Sep 8 292(36):14929-14939

* megosztott első szerzős közlemény

9.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó publikáció

Kurilla, A., **Szőke, A.**, Auber, A., Káldi, K. and Silhavy, D.: Expression of the translation termination factor eRF1 is autoregulated by translational readthrough and 3'UTR intron-mediated NMD in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* 2020 Sep 1 doi: 10.1002/1873-3468.13918.

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom a Kronobiológiai Laboratórium vezetőjének és témavezetőmnek, Dr. Káldi Krisztinának, hogy a laboratóriumban való munkámat engedélyezte, valamint irányt mutatott tudományos érdeklődésemnek és végigkísérte MSc, valamint PhD tanulmányaimat. Köszönöm mind a kísérletek elvégzése alkalmával, mind pedig a disszertáció írása során nyújtott önzetlen segítségét, tanácsait és a szemléletformáló beszélgetéseket.

Köszönet illeti az Élettani Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóját, Prof. Dr. Hunyady Lászlót és Prof. Dr. Mócsai Attilát, amiért az intézetben való munkavégzésemet lehetővé tették.

Köszönöm a Doktori Iskola vezetőjének, Prof. Dr. Benyó Zoltánnak, amiért lehetővé tette számomra a PhD képzésben való részvételt. Hálával tartozom a Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének Prof. Dr. Enyedi Péternek, valamint a Celluláris és molekuláris élettan doktori program korábbi és jelenlegi vezetőinek, Prof. Dr. Ligeti Erzsébetnek és Prof. Dr. Hunyady Lászlónak a tanulmányaim során nyújtott segítségükért és tanácsaikért.

Hálával tartozom a labor korábbi és jelenlegi munkatársainak, Südy Ágnes Rékának, Dr. Ella Krisztinának, Dr. Gyöngyösi Norbertnek, dr. Búr Zsófiának, Sárkány Orsolyának és Nagy Ritának szakmai tanácsaikért, iránymutatásaikért, a kísérletek végzése során nyújtott segítségükért, a megfelelő háttér biztosításáért és nem utolsósorban a munka során biztosított kitűnő hangulatért.

Köszönöm továbbá az Élettani Intézet egykori és jelenlegi munkatársainak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért, és hogy biztosítják, hogy az intézet szakmailag és emberileg is kiemelkedő színvonalú kutatóműhely lehessen.

Végül pedig köszönöm Családomnak és Barátaimnak az elmúlt évek során biztosított türelmüket, megértésüket és támogatásukat.