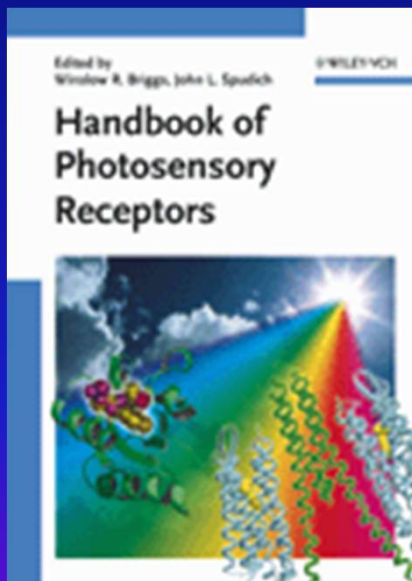


2) Úloha modrého světla ve vývoji a růstu rostlin

- a) Fotobiologie reakcí zprostředkovaných modrým světlem
- b) Fotoreceptory
- c) Přenos signálu



Briggs WR, Spudich JL (eds) (2005)
Handbook of Photosensory
Receptors, Wiley-VCH



Schäfer E, Nagy F (eds) (2006)
Photomorphogenesis in Plants
and Bacteria, 3rd ed., Springer



Whitelam GC, Halliday KJ (eds) (2007)
Light and Plant Development
Blackwell Publishing

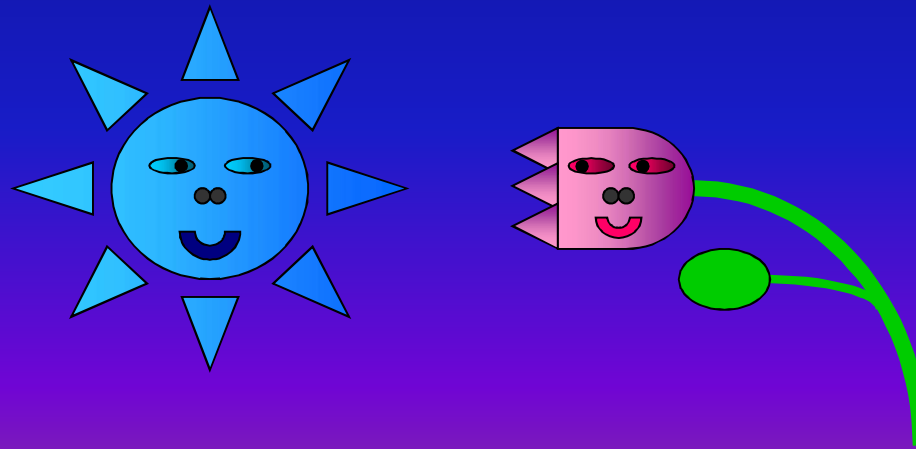
Martin Fellner

Laboratoř růstových regulátorů
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

a) Fotobiologie reakcí zprostředkovaných modrým světlem

Fotosyntéza – přijímané světlo slouží jako zdroj chemické energie

Fototropismus - světlo je přijímáno jako signál; specifická reakce k modrému světlu; růst směrem ke světlu



Reakce rostlin k modrému světlu (400 – 500 nm)

- 1) Fototropismus
- 2) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu
- 3) Aktivace genové exprese
- 4) Stimulace otevírání průduchů

Stimulace syntézy chlorofylu a karotenoidů

Fototaxe

Stimulace pohybu jádra

Pohyb mitochondrií

Změna polohy listů

Heliotropická reakce květů

Stimulace plochosti listů

Reakce rychlé - sekundy (elektrické jevy na membráně)

Reakce pomalé - minuty, hodiny (stimulace biosyntézy pigmentů)

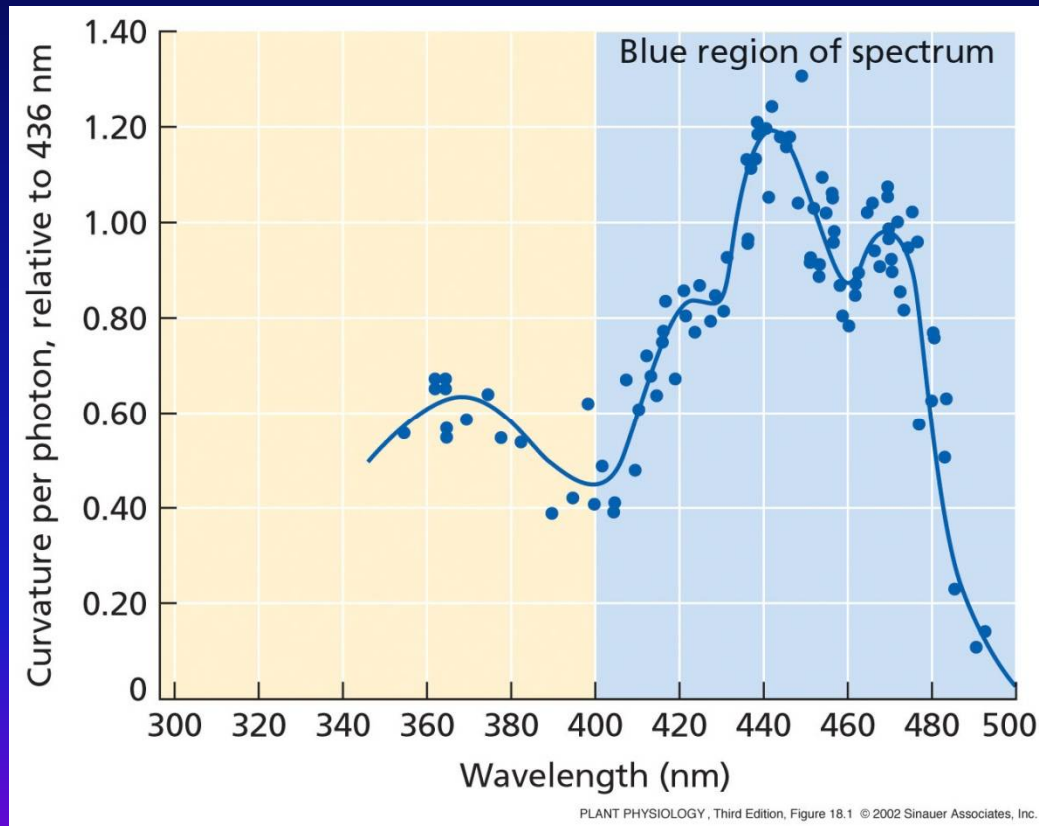
Modré světlo je absorbováno specifickými receptory modrého světla, ale také fytochromy a chlorofylem



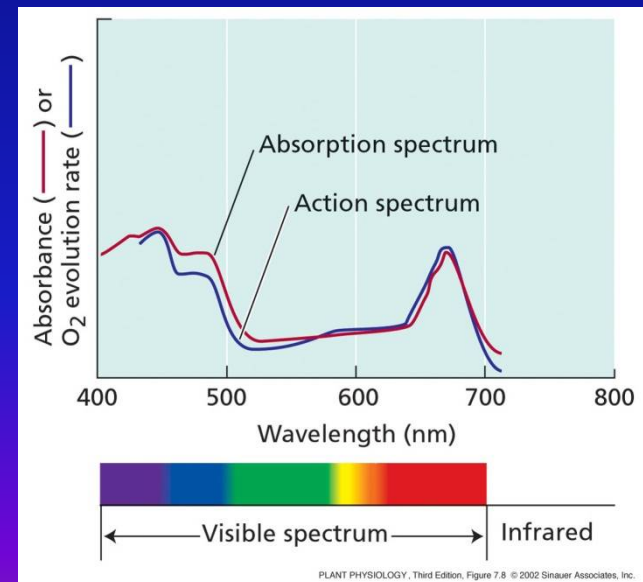
Jak odlišit specifické reakce k modrému světlu?

- 1) Modré světlo nemůže být nahrazeno červeným světlem**
- 2) Reakce není reverzibilní FR**
- 3) Akční spektrum a jeho srovnání s absorpčním světlem**

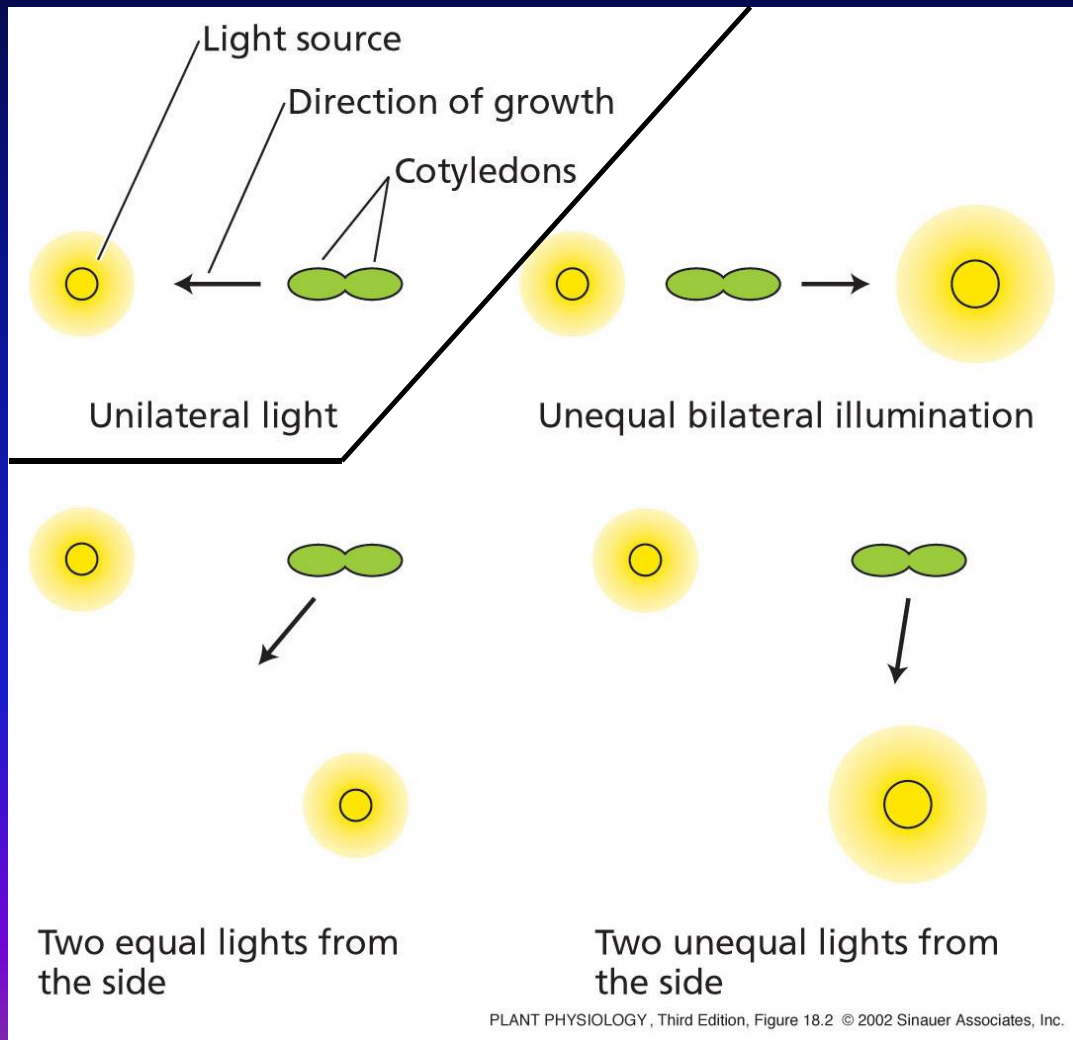
Akční spektrum - graf, který vyjadřuje závislost intenzity pozorované reakce na vlnové délce světla



Akční spektrum pro fototropismus

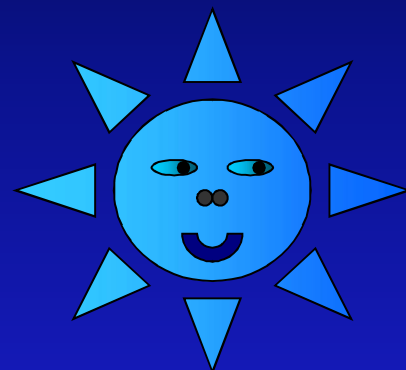
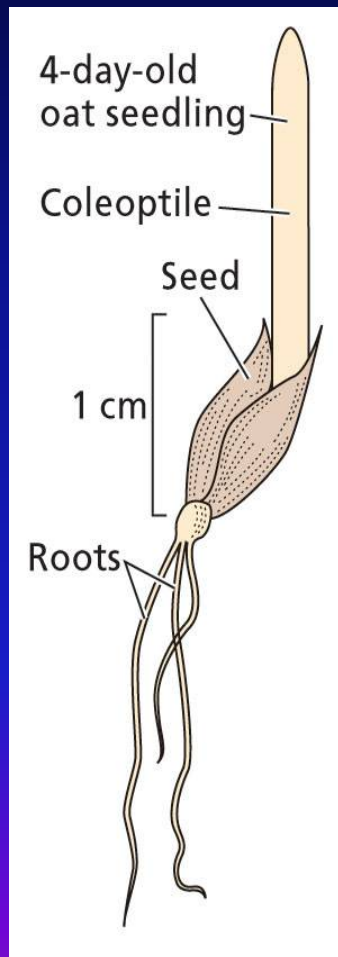


1) Fototropismus – asymetrický růst směrem ke světlu

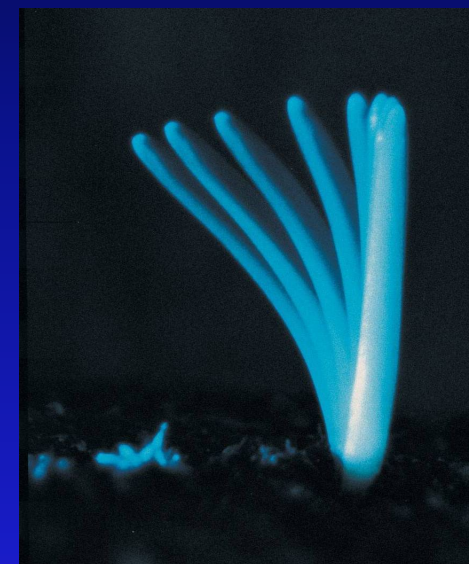


- houby
- kapradiny
- vyšší rostliny

Koleoptile (coleoptile) – modifikované listy u jednoděložných



Auxinový gradient



Zakřivení koleoptile

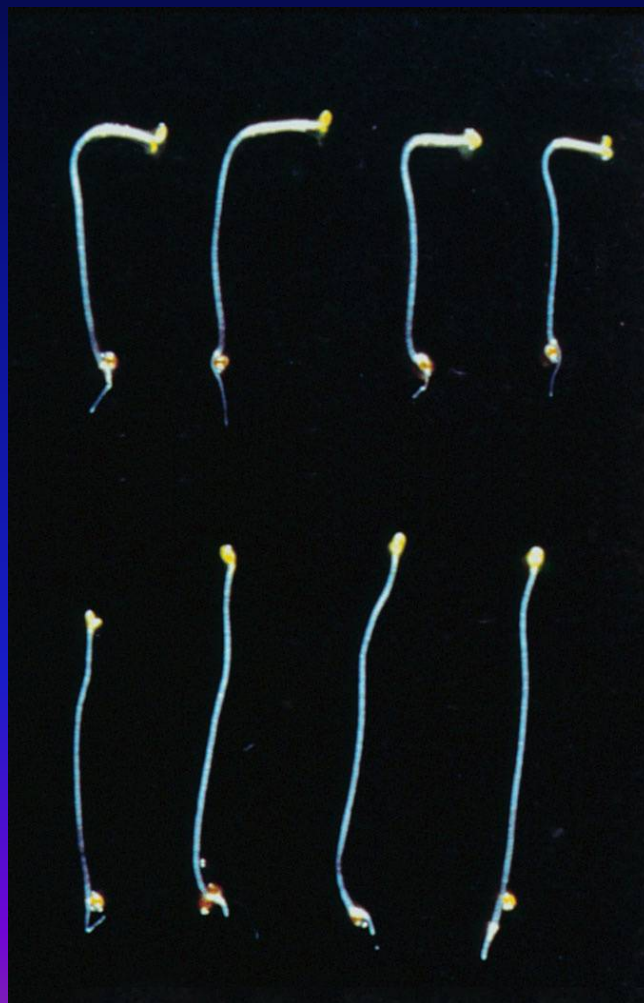
Auxin stimuluje růst buněk více na zastíněné než na ozářené straně koleoptile => zakřivení růstu

~ 180 minut

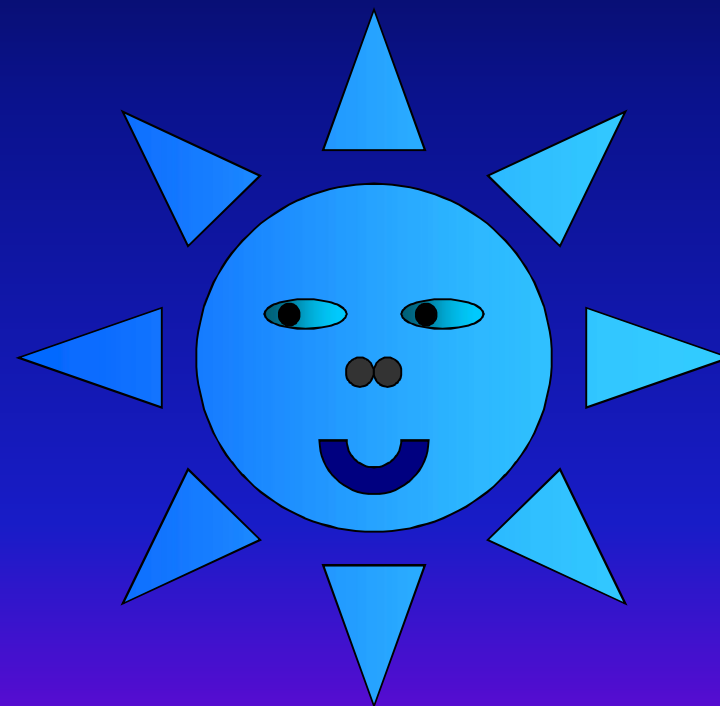


Arabidopsis mutant *phot1* s defektem ve fototropismu

WT

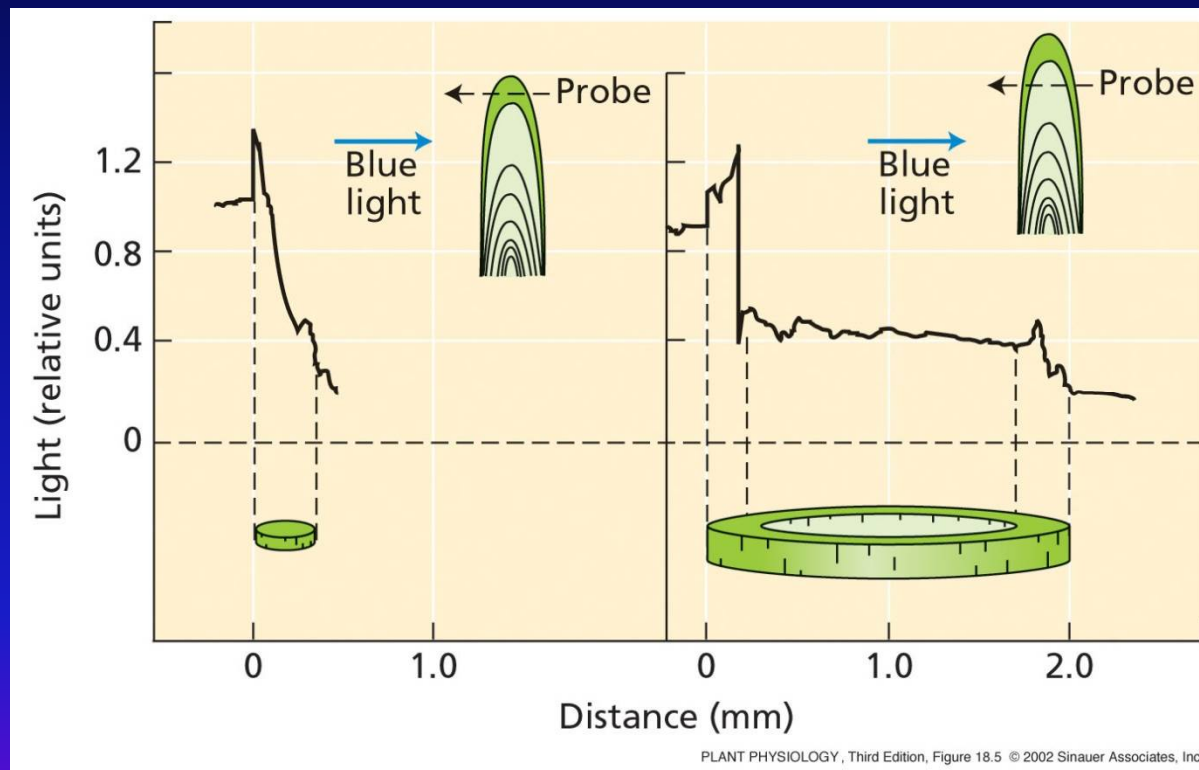


phot1



Jak rostliny vnímají směr světelného signálu?

Množství světla v jednotlivých částech pletiva (fotogradient) je převáděn do nerovnoměrné distribuce auxinu v pletivu.

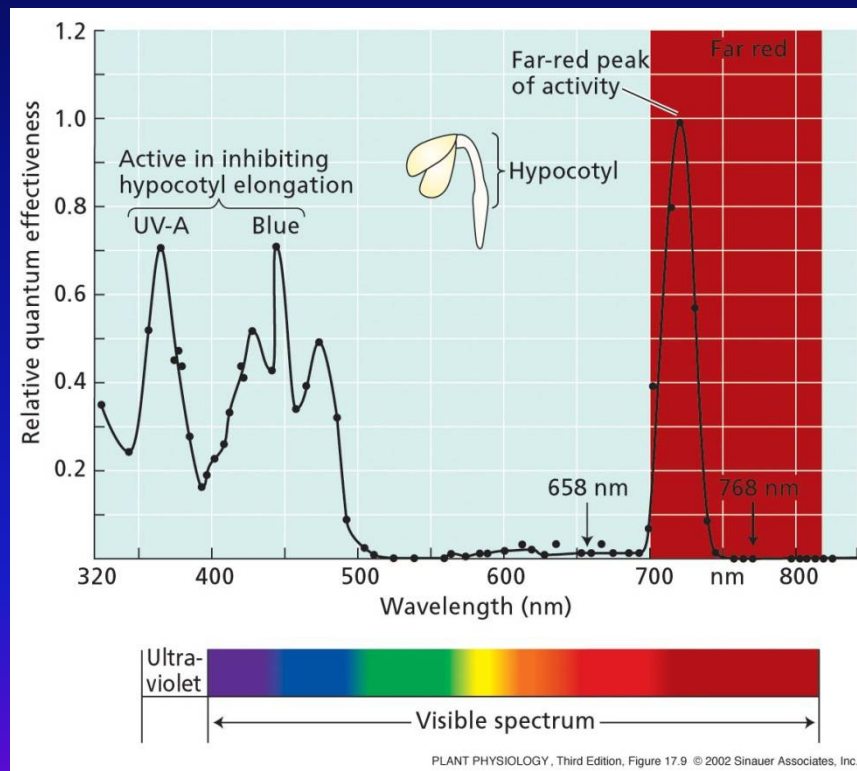


Místo příjmu světla a místo prodloužení (= zakřivení)

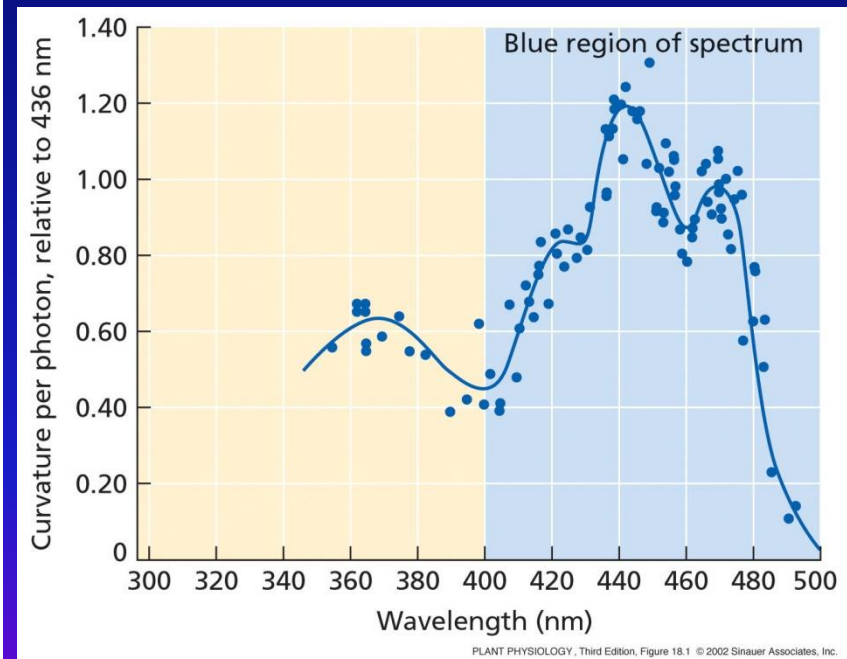
Pro fototropickou reakci hypokotylu je klíčová pouze vrchní prodlužovací část hypokotylu, a to v endodermálních, kortikálních a epidermálních buňkách. Místo příjmu signálu je totožné s místem fototropické reakce.

2) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu

Klíčení → **Proniknutí z půdy** → **Fotomorfoenní reakce = inhibice růstu**



Akční spektrum pro inhibici růstu etiolovaných rostlin



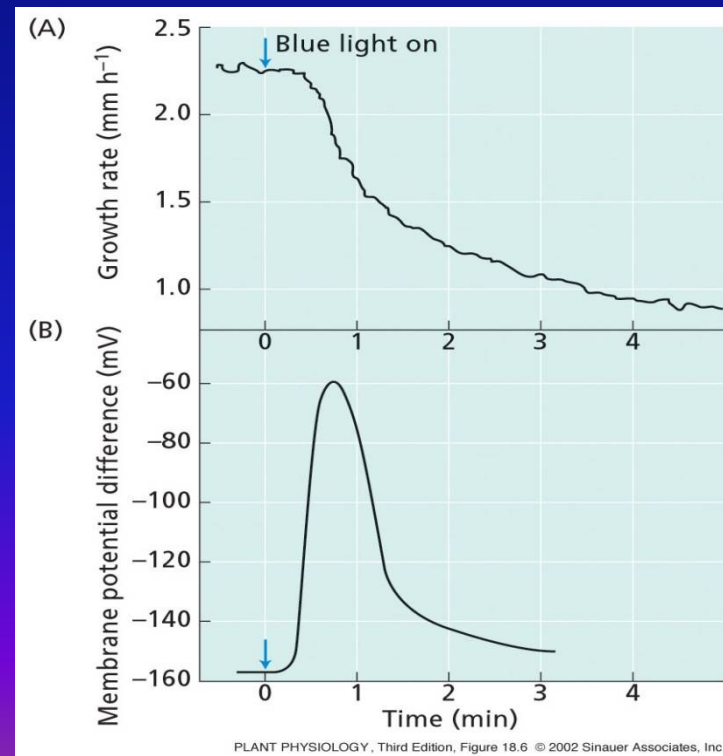
Akční spektrum pro fototropismus

Experimentální možnosti oddělení inhibice růstu zprostředkované fytochromem od inhibice zprostředkované specifickými receptory modrého světla

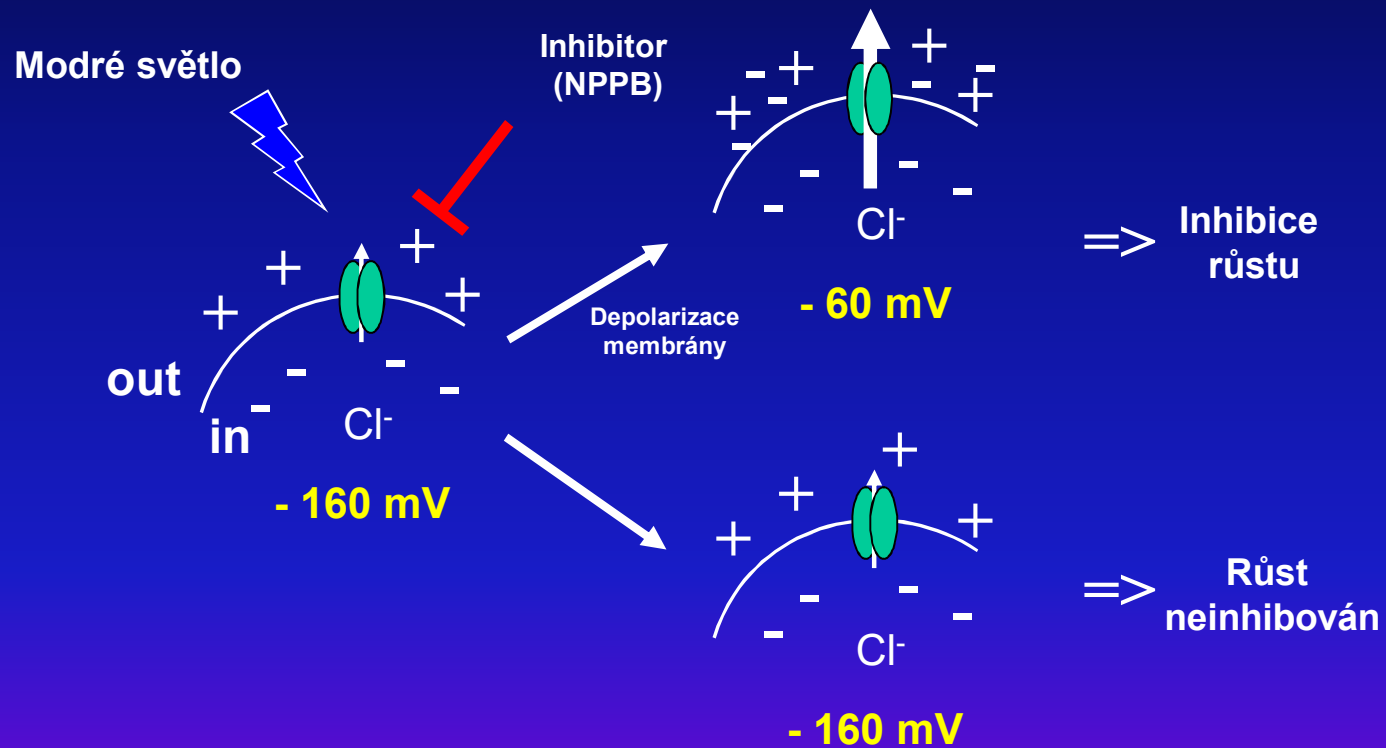
1) Aplikace silného žlutého světla => saturevaná inhibice růstu ~ 50%, stabilní Pr:Pfr. Následná aplikace slabého modrého světla => další inhibice růstu specificky zprostředkovaná fotoreceptory pro modré světlo.

2) Změna v rychlosti růstu hypokotylu zprostředkovaná fytochromy ~ 8 – 90 minut; změna růstu zprostředkovaná fotoreceptory pro modré světlo ~ 15 – 30 sekund

3) Modré světlo indukuje depolarizaci membrány, která předchází inhibici růstu. Depolarizace je způsobena aktivací Cl⁻ kanálů.



Aniontové kanály zprostředkují inhibici růstu modrým světlem



3) Aktivace genové exprese

Modré světlo indukuje expresi genů, které kódují proteiny zapojené v řadě morfologických procesů.

a) Geny regulované **nespecificky** modrým světlem

- Gen pro enzym chalcone syntázu, zapojený v biosyntéze flavonoidů
- Gen, kódující protein vážící chlorofyl *a* a *b*.
- Gen pro subjednotku chloroplastového enzymu rubisco (ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase)
- Gen *AthH2* primárně exprimován v expandujících a diferencujících se buňkách; kóduje membránový protein schopný transportovat molekuly vody = aquaporin (vodní kanál; water channel); regulován i ABA

b) Geny specificky regulované modrým světlem

Gen *SIG5* specificky regulovaný modrým světlem; hraje regulační roli v transkripci chloroplastového genu *psbD-BLRP* (*Blue Light Responsive Promoter*), který kóduje D2 podjednotku PSII reakčního centra.

SIG5 hraje roli v toleranci rostlin k osmotickému stresu tím, že indukuje opravy PSII

Dalších 5 genů skupiny *SIG* je aktivováno nesespecificky modrým i červeným světlem

c) Gen pro fotoreceptory CRY1 a PHOT1, 2 jsou regulovány modrým světlem

Modré světlo zvyšuje jak množství mRNA, tak i proteinu CRY1. Promoter genu *CRY1* nese cis-acting sekvence reagující k modrému světlu. Informací o expresi fototropinů je málo.

4) Stimulace otevírání průduchů (stomat)

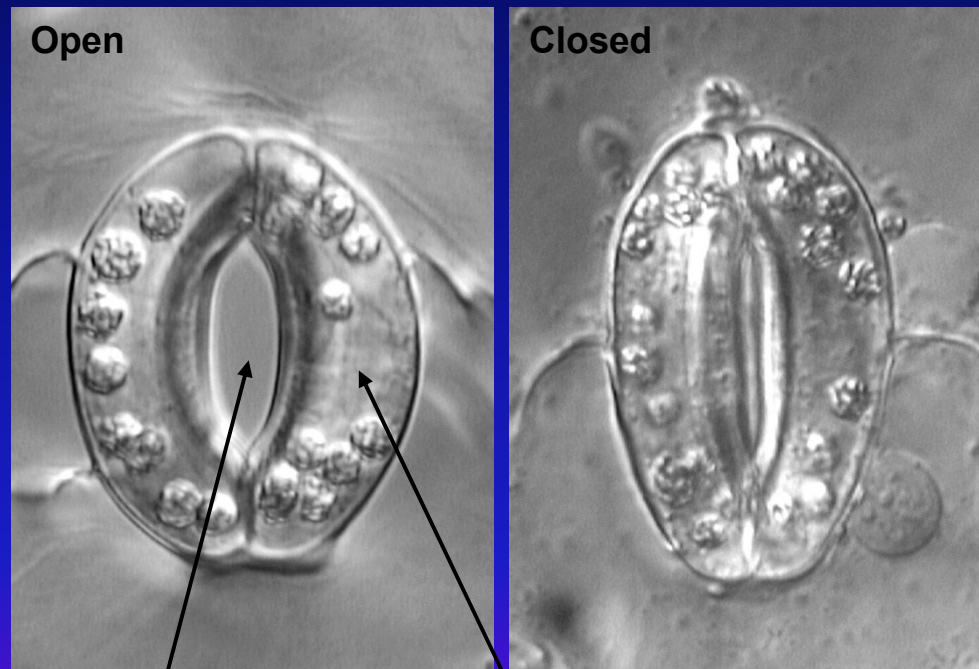
Průduchy hrají hlavní regulační roli ve výměně plynů v listech

Průduchy – modelový objekt pro studium reakcí k modrému světlu:

- reakce stomat k modrému světlu je rychlá a zvratná
- reakce stomat k modrému světlu je pozorovatelná po celý život rostliny
- signální dráha spojující místo příjmu modrého světla s průduchy je dobře prostudována

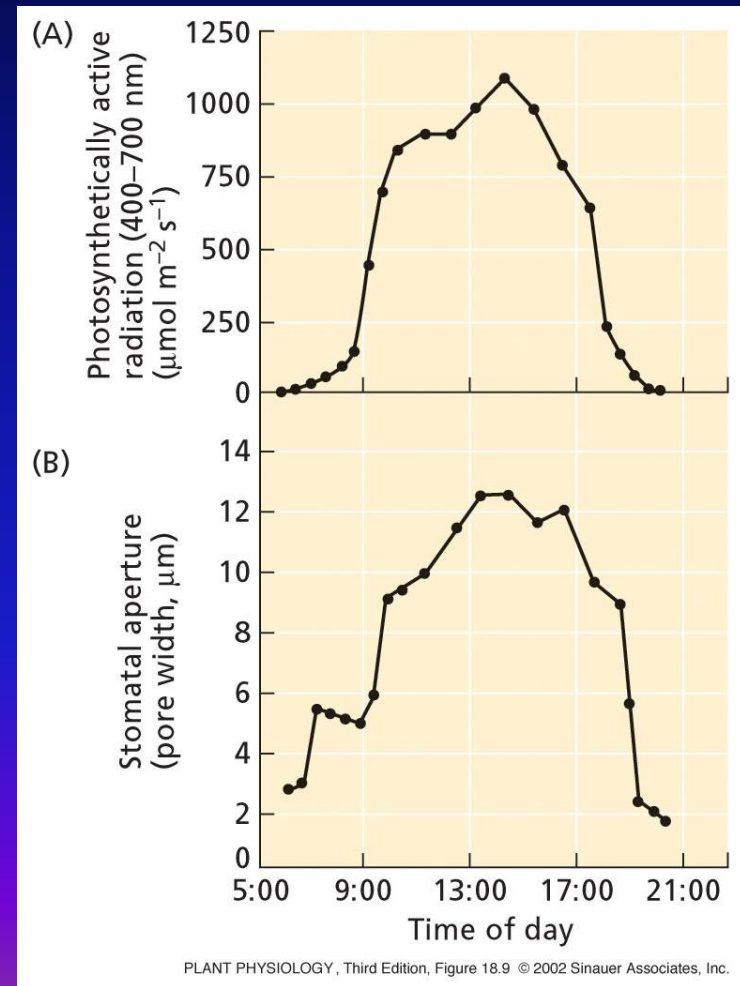
Světlo je dominantní faktor regulující otevírání a zavírání stomat dopadem na epidermální buňky listu.

Průduchy se otevírají při dosažení určité úrovně intenzity světla a zavírají se, když intenzita světla klesá.



Pór

Svěrací buňky
(guard cells)



DCMU (dichlorophenyl dimethylurea) – inhibitor fotosyntetického elektronového transportu – částečně inhibuje otevírání průduchů indukované modrým světlem



Fotosyntéza v chloroplastech svěracích buněk hraje roli ve světlem indukovaném otevírání stomat

+

Nefotosyntetická složka stomatální reakce ke světlu

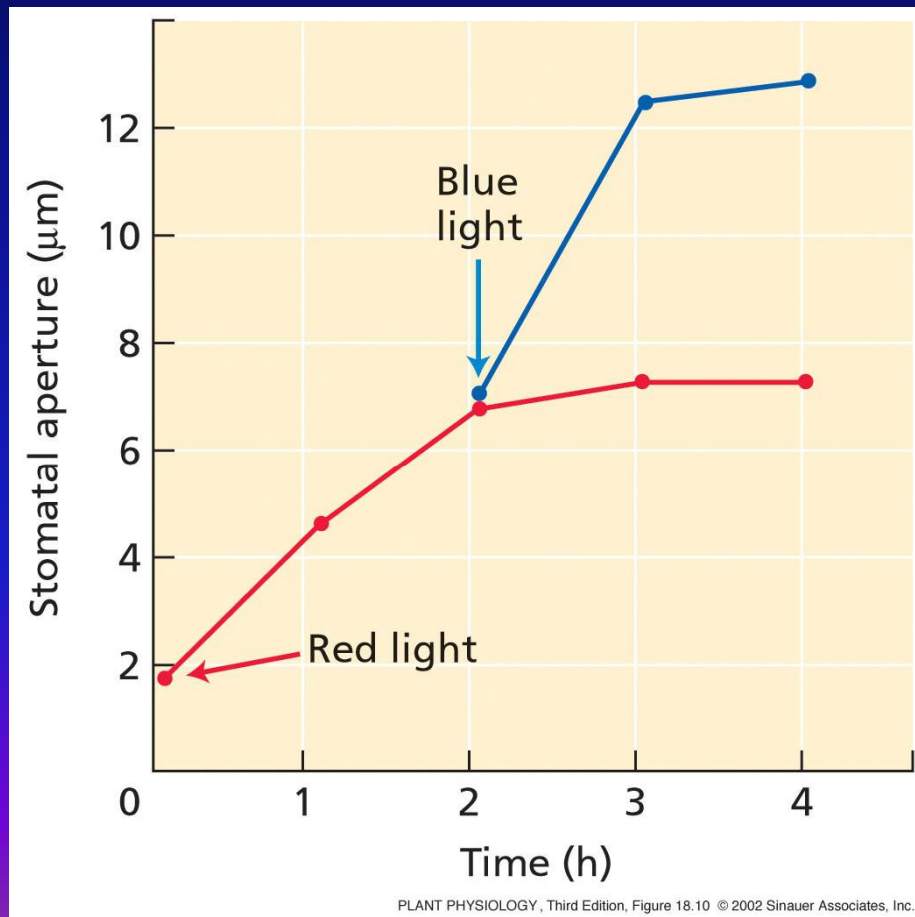


Světlo aktivuje dvě výrazné reakce svěracích buněk:

- fotosyntézu v chloroplastech svěracích buněk
- specifickou reakci k modrému světlu

Specifická stomatální reakce

Modré světlo způsobuje současně fotosyntetickou a specifickou nefotosyntetickou reakci

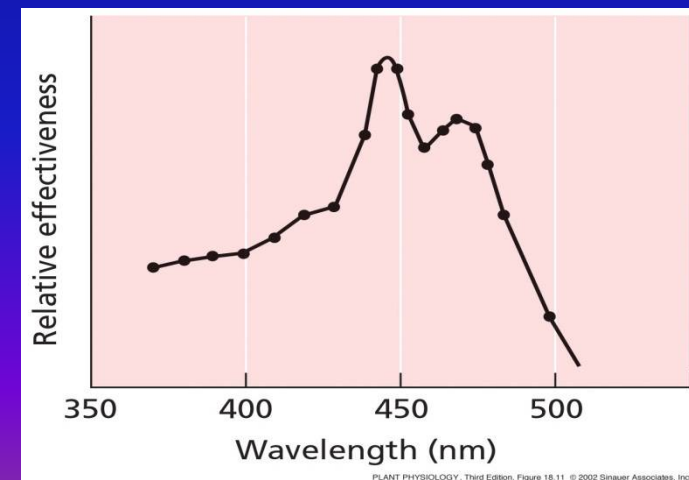


1) Saturace fotosyntetické reakce silným červeným světlem => částečné otevření stomat

2) Aplikace slabého modrého světla



Další, nefotosyntetické, otevření stomat vyvolané modrým světlem



Modré světlo indukuje zvětšování protoplastů izolovaných ze svěracích buněk průduchů



Světlo je opravdu vnímáno svěracími buňkami

Odhalení mechanismu fungování svěracích buněk, tj. otevírání a zavírání průduchů



Modré světlo indukuje proud iontů do buňky a akumulaci organických roztoků => zvýšení osmotického tlaku v buňce => čerpání vody do buňky => zvětšování protoplastů = svěracích buněk => vytvoření štěrbin = otevření průduchu



Modré světlo



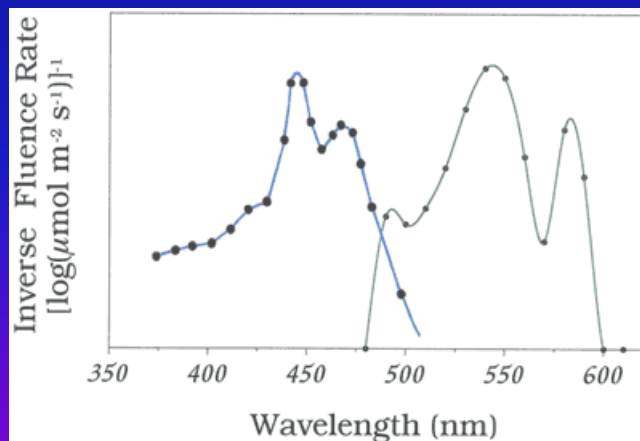
Otevírání průduchů indukované modrým světlem může být blokováno působením zeleného světla

Zelené světlo bylo považováno za „safe light“ – nevyvolává fyziologické reakce

Frechilla S (2000) Plant Cell Physiol 41: 171-176 – zelené světlo inhibuje otevírání průduchů indukované modrým světlem.

**Plná reverze: modré světlo $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
zelené světlo $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$**

Talbott et al. (2002) Amer J Bot 89: 366-368 – fotoreverze pozorovaná u jiných druhů rostlin



Akční spektrum pro blue/green reverzibilitu

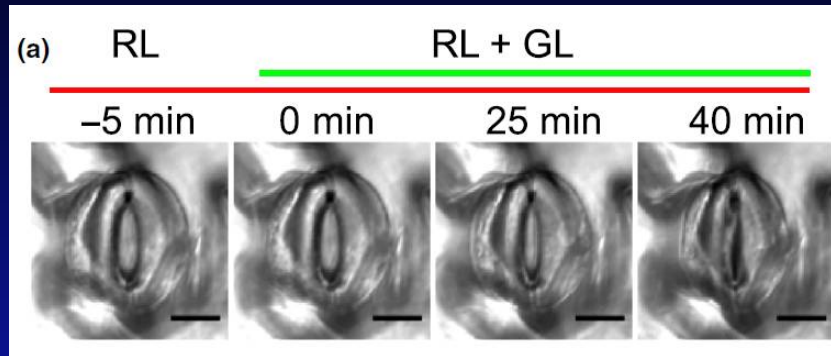
Mechanismus ?:

1) Nezávislý receptor pro zelené světlo – interaguje s receptorem pro modré světlo

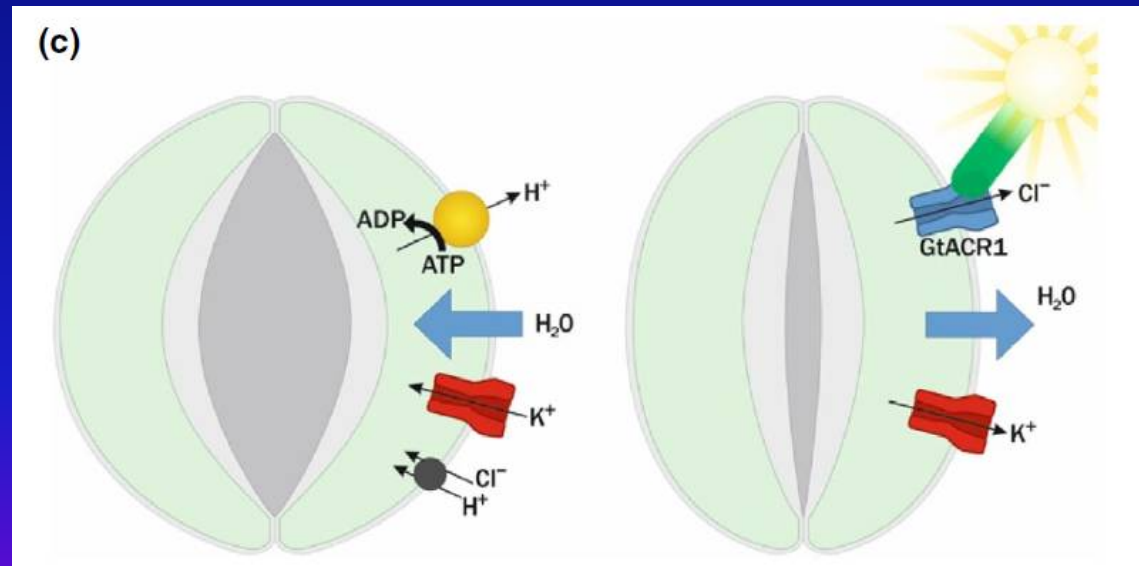
2) Fotoizomerizace receptoru modrého světla – fyziologicky neaktivní - po absorpci modrého světla přeměněn na formu fyziol. aktivní, která absorbuje světlo zelené. Tato forma absorbuje zelené světlo, které mění receptor zpět na formu neaktivní, absorbující modré světlo.

UPDATE 2022

Jones JJ et al. (2022) New Phytologist 236: 1237-1244



Zelené světlo (GL) aktivuje Cl^- kanál GtACR1 \Rightarrow transport Cl^- z buňky \Rightarrow depolarizace membrány svěřací buňky \Rightarrow únik K^+ a H_2O \Rightarrow smrštění buňky \Rightarrow zavírání průduchů.

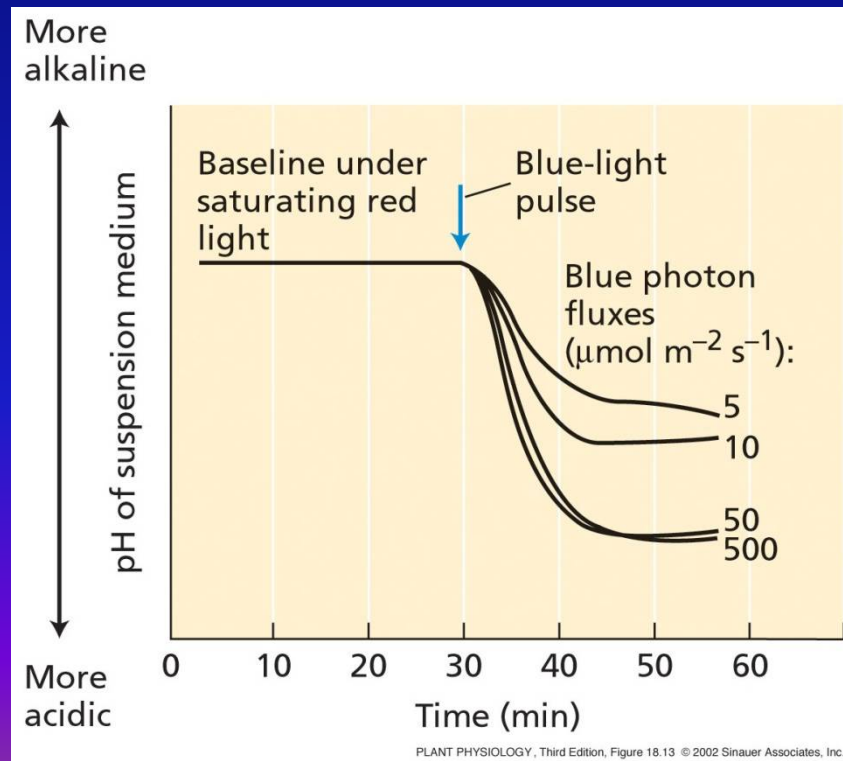


Zelené světlo může uzavírat průduchy i v podmínkách, kdy je současně stimulováno otevírání průduchů červeným světlem. Je tedy možné, že zelené světlo usměrňuje stomatální transpiraci a spotřebu vody.

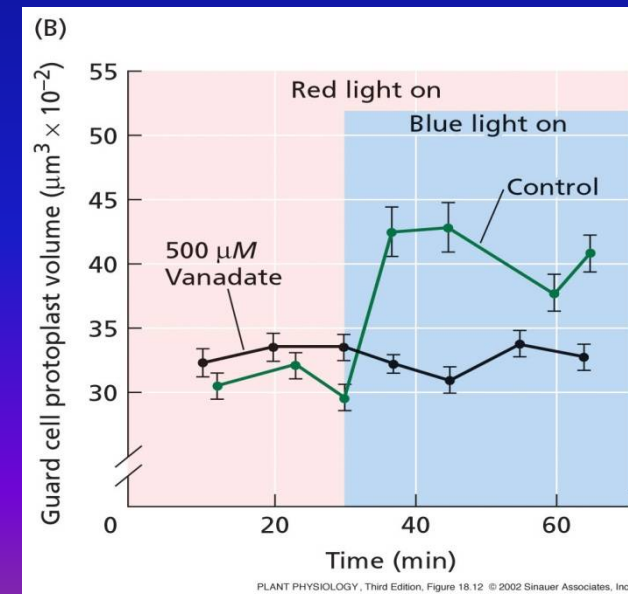
Mechanismus otevírání průduchů indukovaného modrým světlem – aktivace protonové pumpy (H^+ -ATPase)

Po ozáření protoplastů svěřacích buněk modrým světlem se pH okolního média snižuje, prostředí se okyseluje.

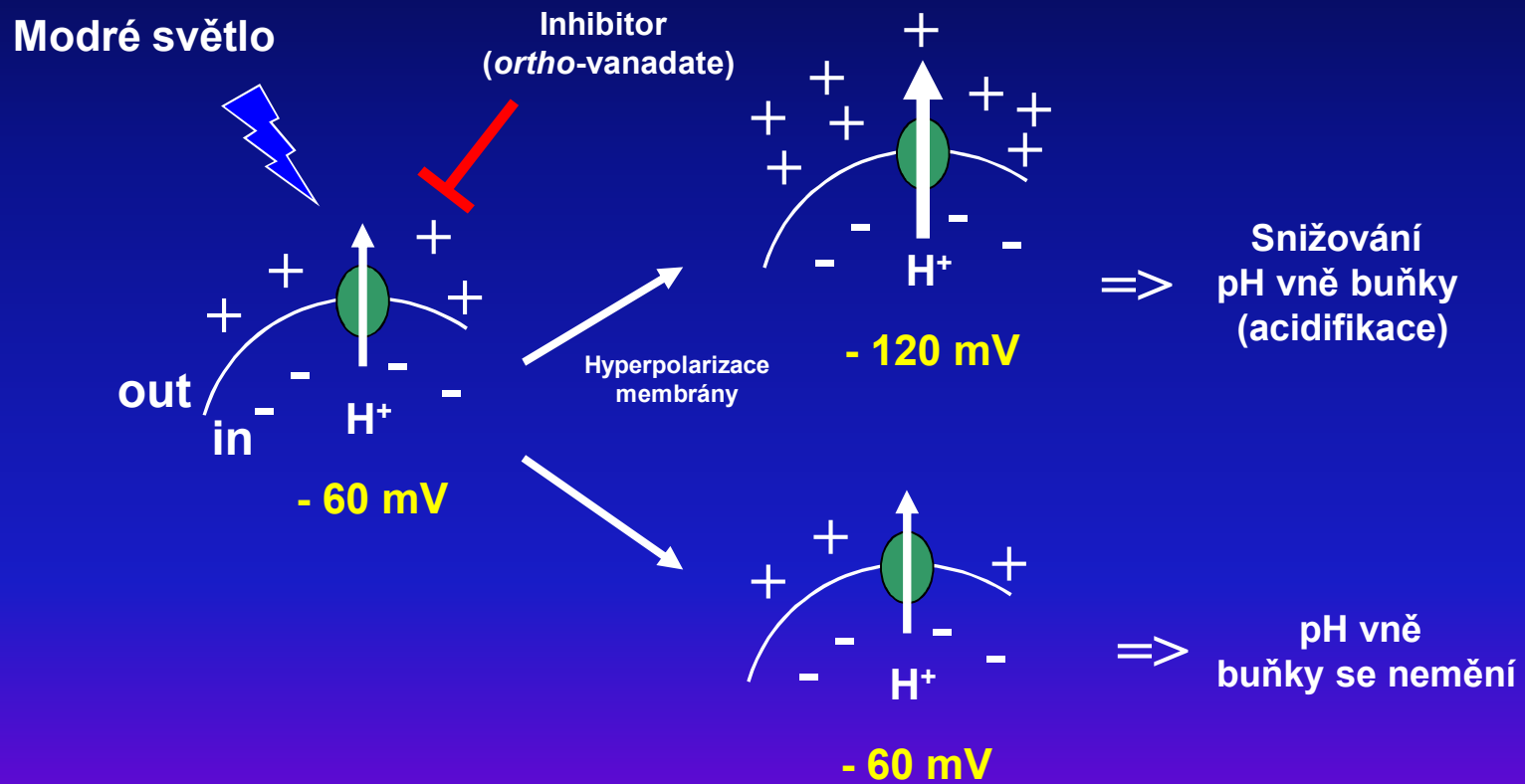
Acidifikace může být blokována aplikací CCCP (blokátor tvorby pH gradientu) nebo vanadatem (inhibitor protonové pumpy)



Acidifikace je způsobena aktivací protonové pumpy modrým světlem



Aktivace protonové pumpy modrým světlem

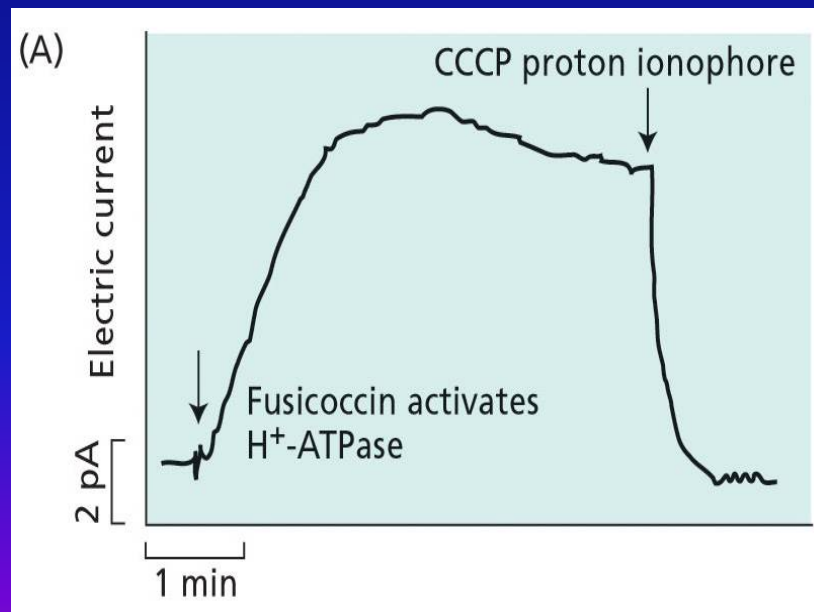


Aktivace protonové pumpy a další elektrické změny membrány se měří pomocí patch-clamp metod

Taiz L, Zeiger E (2010) Plant Physiology. 5th Edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts

<http://5e.plantphys.net/article.php?ch=6&id=50>

Houbový toxin fusicoccin – aktivátor protonové pumpy => aktivuje proud přes membránu, který může být inhibován CCCP.



- 1) Fusicoccin stimuluje pumpování protonů i otevírání stomat
- 2) CCCP inhibuje fusicoccinem indukované otevírání stomat

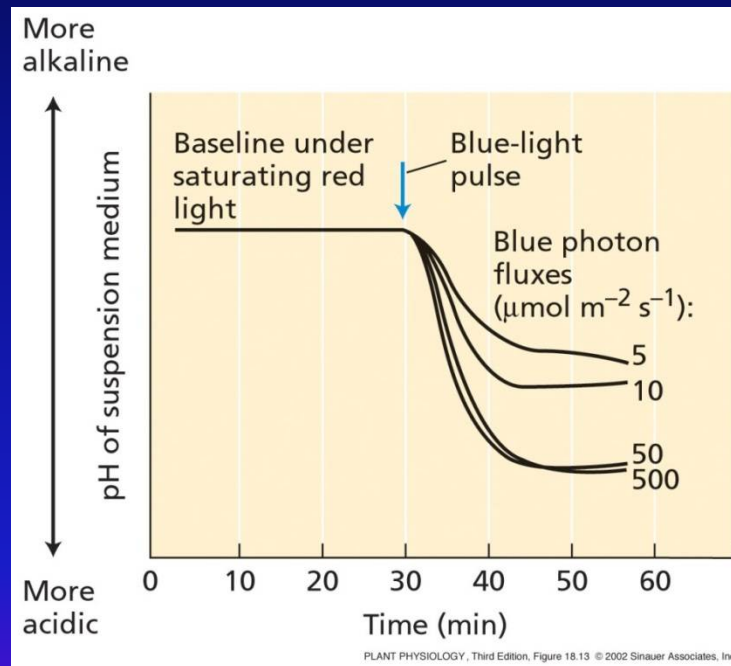


Jasně spojení mezi pumpováním protonů a otevíráním stomat

Zvýšení pumpování protonů a velikost otevření stomat jsou úměrné množství fotonů modrého světla dopadajících na list



Reakce stomat funguje jako senzor fotonů



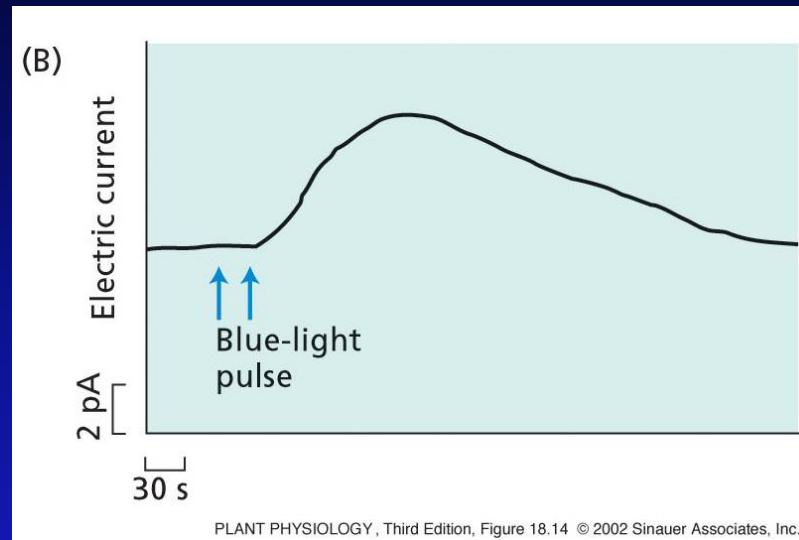
UPDATE 2014

Wang Y et al. (2014) PNAS 111: 533-538

Transgenní rostliny *Arabidopsis* s overexprimovanou H^+ -ATPasou ukazují zvýšené světlem-indukované otevření průduchů.



Reakce indukované modrým světlem mají některé důležité vlastnosti:



- 1) Maximální amplitudy reakce je dosaženo až za několik minut → modré světlo nejprve konvertuje neaktivní formu receptoru na formu aktivní
- 2) Reakce přetrvává i po vypnutí světelného signálu → při absenci světla se aktivní forma receptoru mění zpět na formu neaktivní
- 3) Výrazná doba lag fáze → doba požadována pro přenos signálu od receptoru k protonové pumpě a pro vytvoření gradientu

Modré světlo reguluje osmotický stav svěracích buněk aktivací protonové pumpy a stimulací syntézy organických látek

1908 – Francis Ernest Lloyd – hypotéza „škrob-cukr“: turgor svěracích buněk je regulován osmotickými změnami, které jsou následkem konverze škrobu na cukr.

1960 – objev změn v koncentraci K^+ - moderní teorie osmoregulace pomocí K^+ a jiných iontů

Otevřené průduchy:

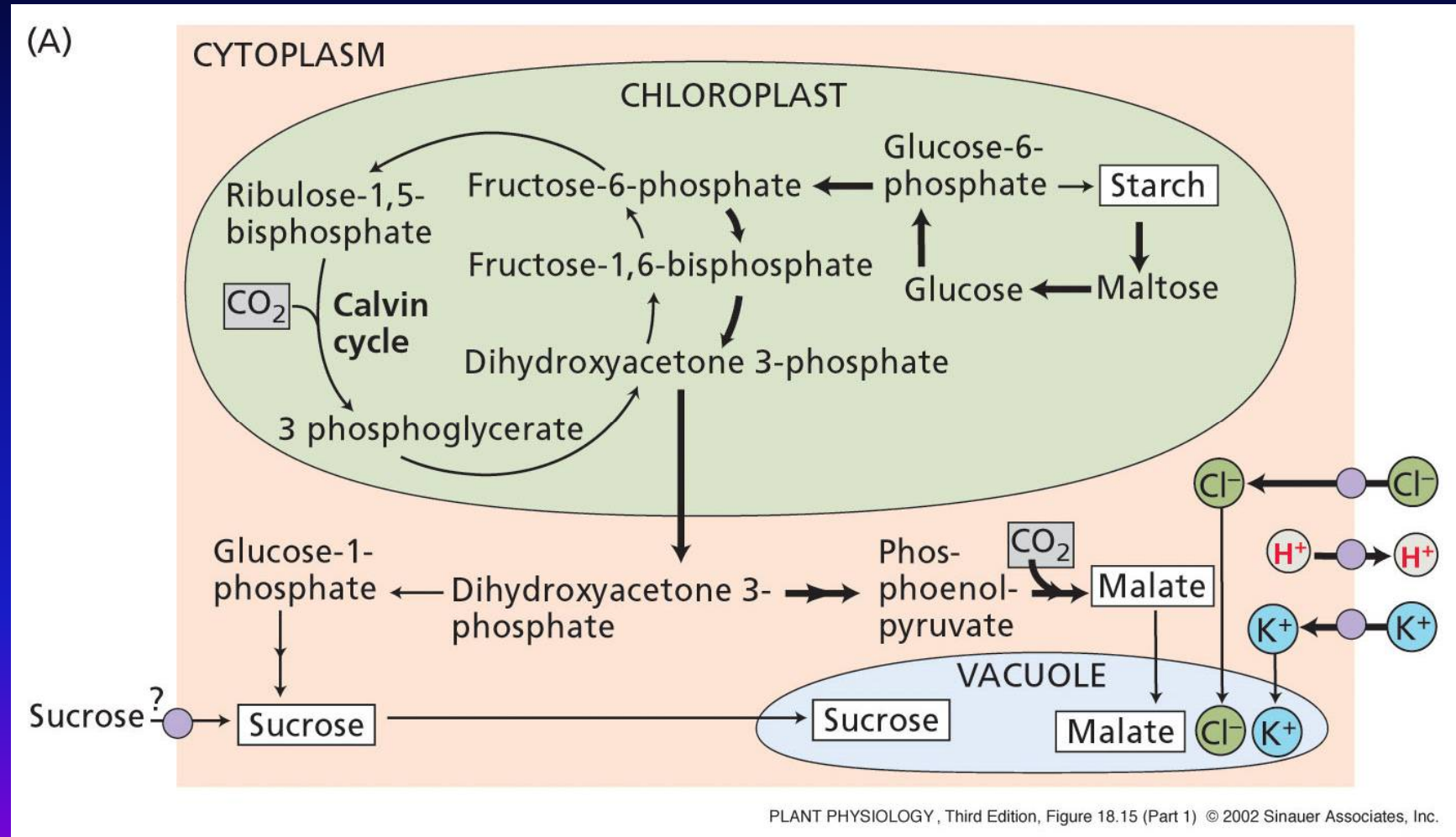
Koncentrace K^+ 400 - 800 mM \longrightarrow Balance pomocí Cl^- a malátu²⁻

Společně s K^+ , jsou dovnitř buňky transportovány Cl^- pomocí sekundárního transportního mechanismu řízeného gradientem elektrochemického potenciálu H^+ generovaného protonovou pumpou.

Malát²⁻ je syntetizován v cytozolu v metabolické cestě hydrolýzy škrobu. Obsah malátu se snižuje při zavírání průduchů.

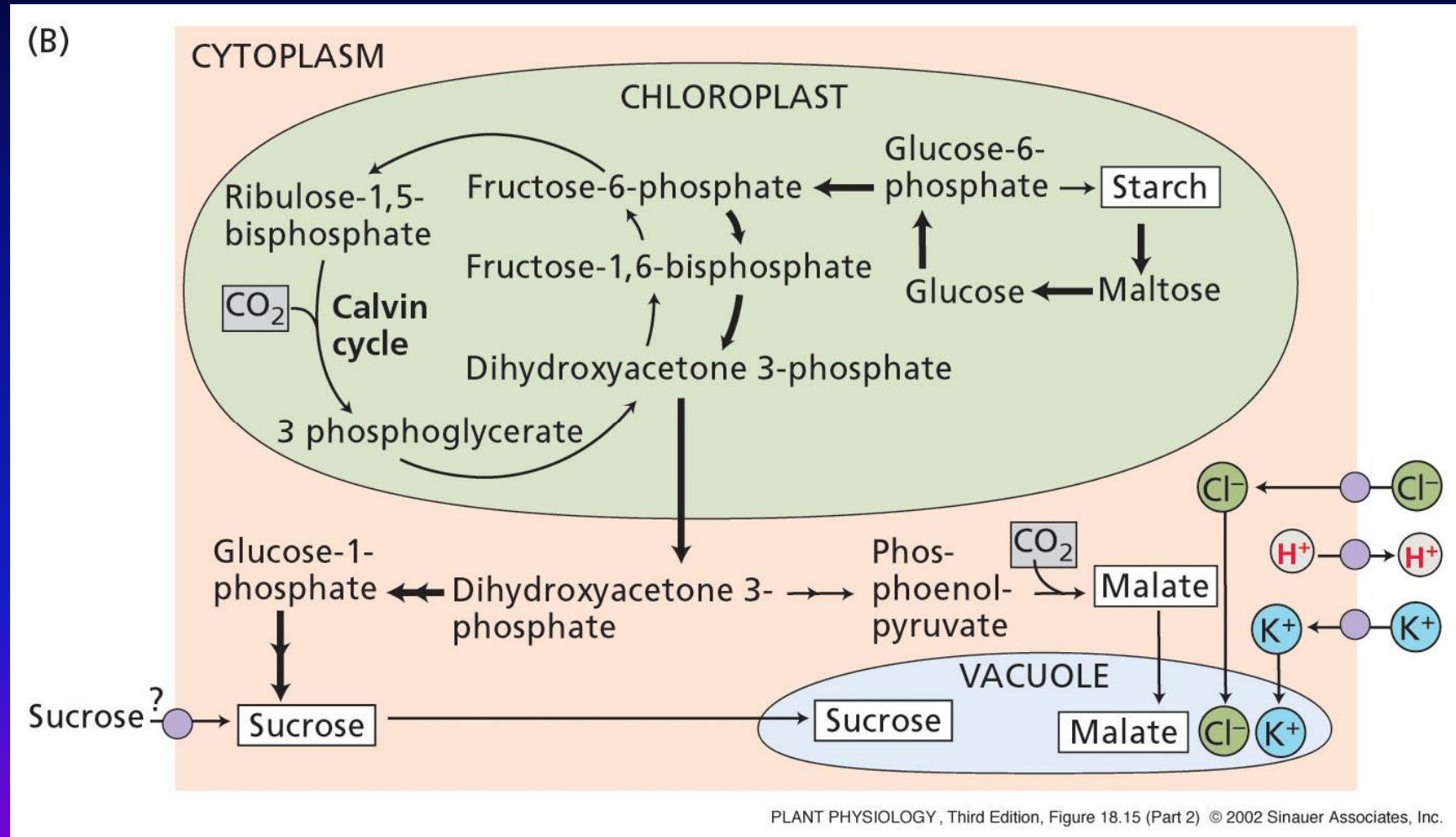
Tři odlišné cesty osmoregulace ve svěracích buňkách

1) Vlivem K^+ , Cl^- , a malátu²⁻ pocházejícího z hydrolýzy škrobu

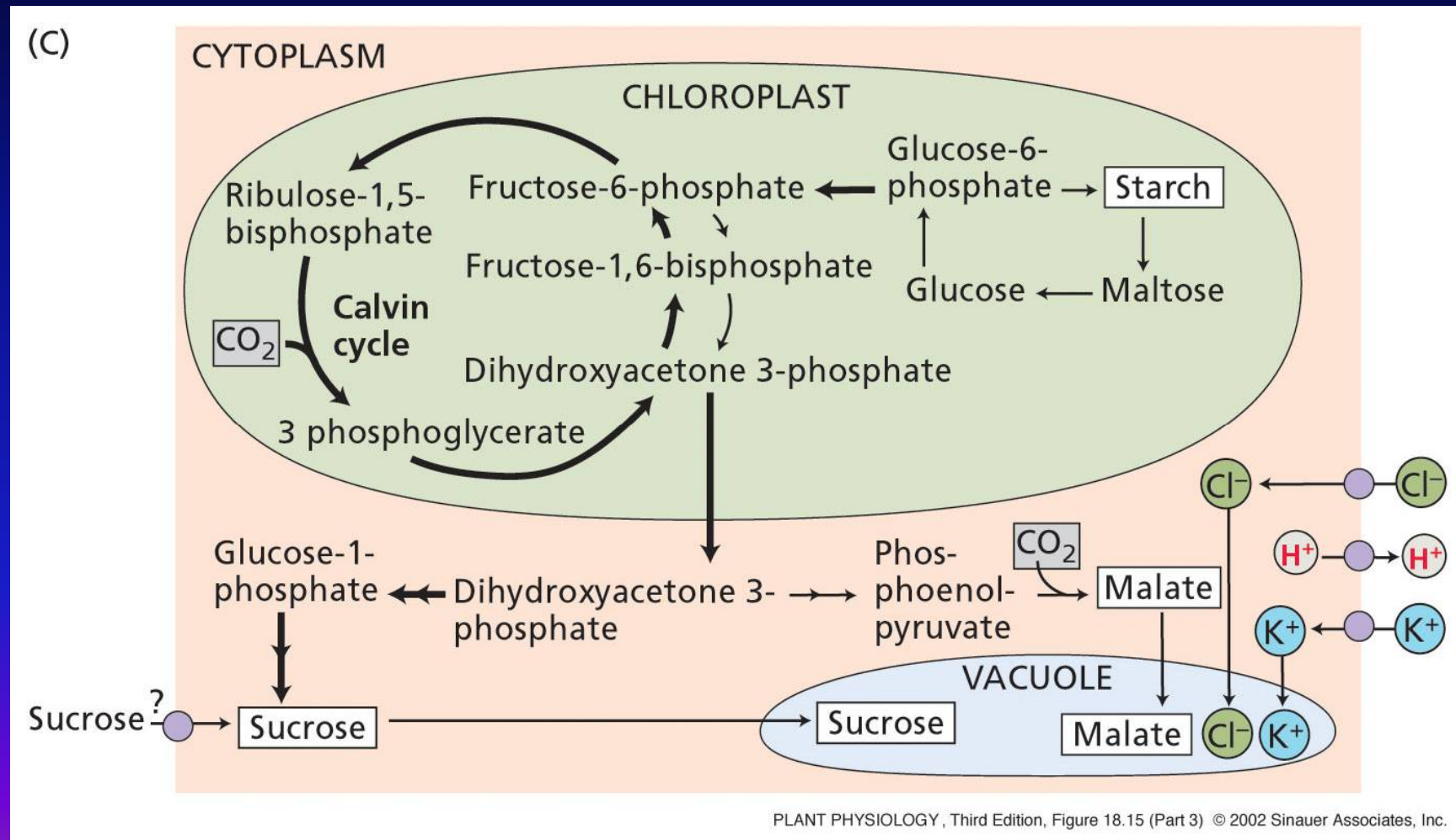


Poznámka – při stresu je malát²⁻ transportován ze svěrací buňky do apoplastu a indukuje zavírání průduchů.

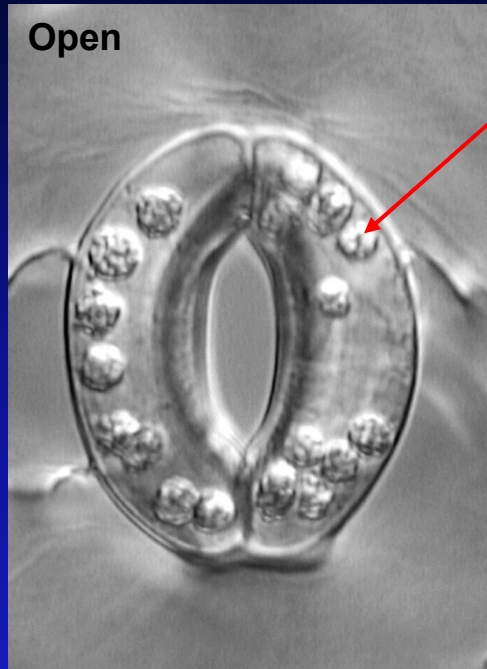
2) Vlivem sacharózy vznikající hydrolyzou škrobu – původní hypotéza „škrob-cukr“



3) Vlivem sacharózy vznikající fotosyntézou (chloroplasty svěřacích buněk či chloroplasty v mezofylových buňkách)



Chloroplasty – obsahují škrobová zrna



Škrob je nerozpustný vysokomolekulární polymer glukózy – není osmoticky aktivní



Hydrolyza škrobu – vznikají rozpustné cukry – osmoticky aktivní



Osmotický tlak ↑ (osmotický potenciál ↓)



Stomata se otvírají

Zavírající se stomata: syntéza škrobu



Osmotický tlak ↓



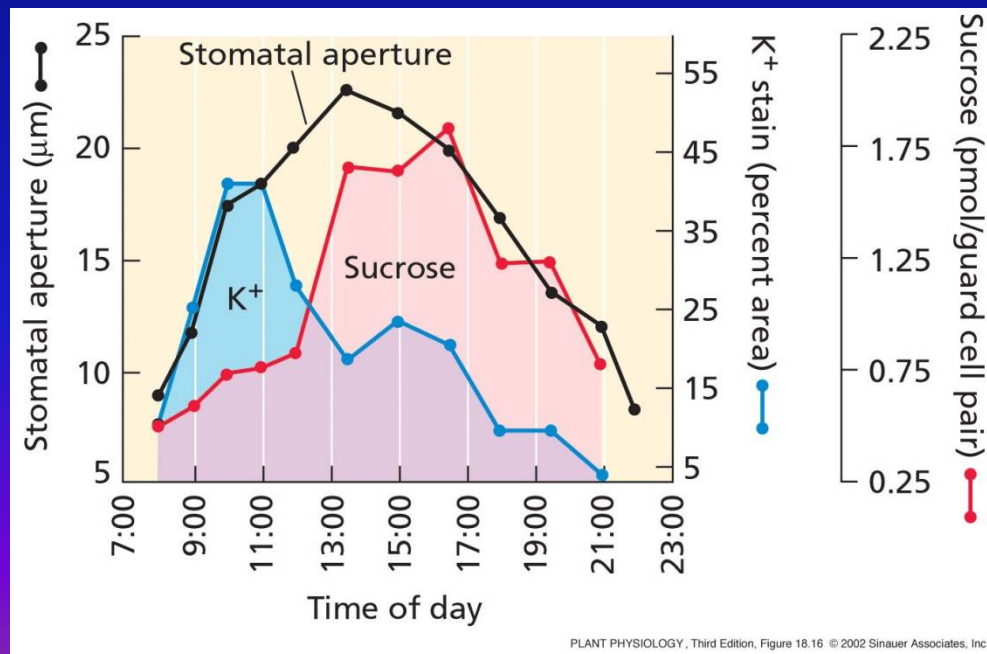
(osmotický potenciál ↑)



Cukr je osmoticky aktivní látka ve svěracích buňkách

Po objevení role K^+ , Cl^- a $malátu^{2-}$ byla „škrob-cukr“ hypotéza částečně opuštěna. Nedávné studie však ukázaly důležitou fázi osmoregulace svěracích buněk s dominantní úlohou cukru.

Studie: K^+ se zvyšuje s otevíráním průduchů brzy ráno; obsah cukru se pomalu zvyšuje. K^+ se snižuje odpoledne, ale otevírání průduchů pokračuje, obsah cukru se dále zvyšuje. Odpoledne se obsah cukru snižuje, což koresponduje se zavíráním průduchů.



Otevírání stomat: nárůst K^+

Zavírání stomat: pokles cukru

POZOR! Update 2018
Lima VF et al. (2018)

Úloha sacharózy během otevírání průduchů nebyla nikdy předtím přímo testována.
Nebyly zodpovězeny 3 základní otázky:

- 1) Je sacharóza schopna indukovat otevření průduchů?
- 2) Je sacharóza spojena s otevřením průduchů indukovaným K^+ a světlem?
- 3) Funguje sacharóza jako osmolyt nebo jako substrát během světlem indukovaného otevírání průduchů?

Update 2018
Medeiros DB et al. (2018) Plant J 94: 583-594



David B Medeiros
Max Planck Institute

- 1) Sacharóza není schopna sama o sobě indukovat otevírání průduchů.
- 2) Přítomnost sacharózy nezvyšuje rychlost otevírání průduchů indukované K^+ a světlem.
- 3) Sacharóza indukuje zavírání průduchů ve vysokých koncentracích (> 10 mM).



Sacharóza během světlem indukovaného otevírání průduchů nefunguje jako osmolyt.

UPDATE 2021
Flütsch S and Santelia D (2021) New Phytologist 230: 1754-1760

Review o současných znalostech metabolismu uhlíku ve svěracích buňkách a jeho vlivu na funkci průduchů.

Základní, dosud nevyřešená otázka týkající se průduchů:

**Je uhlík (tedy cukr), nikoli voda, zdrojem,
který omezuje otevírání průduchů?**

UPDATE 2023

Potkay A and Feng X (2023) New Phytologist 238: 506-528

V biologii existuje dlouhá tradice ptát se „proč“ – rozumět vzorcům forem a chování. Proto ukazujeme, jak formy a chování prospívají organismu, a že pravděpodobně vznikly přirozeným výběrem. Tato tradice vyústila i v modely vodivosti průduchů. Ekofyziologové zatím nenašli shodu o skutečném „cíli (důvodu)“ chování (otevírání/zavírání) průduchů => vzniklo mnoho odlišných modelů. Autoři letos publikovali nejnovější model, který ukazuje nový přístup a může tak pomoci vyřešit nejasnosti podstatu teorie chování průduchů.

19. století

Charles a Francis Darwin → Studium fototropismu koleoptile

Počátek 90. let → Identifikace fotoreceptorů

Identifikace genů regulujících fototropismus
a inhibici prodlužovacího růstu

Charakterizace proteinů

b) Fotoreceptory modrého světla:

Kryptochromy (cryptochromes) – inhibice růstu

Fototropiny (phototropins) – fototropismus, pohyb chloroplastů,
otevírání průduchů

Zeaxantin (zeaxanthin) – otevírání stomat

UPDATE 2015

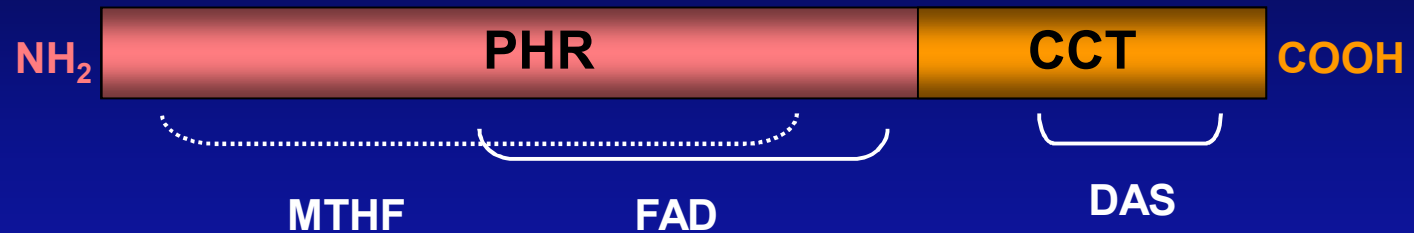
Christie JM et al. (2015) Plant Cell Physiol 56: 401-413

Review o fotoreceptorech.

Kryptochromy (cryptochromes)

Arabidopsis mutant *hy4* – hypokotyl není inhibován modrým světlem

Gen *HY4* => protein, monomer 75 kDa

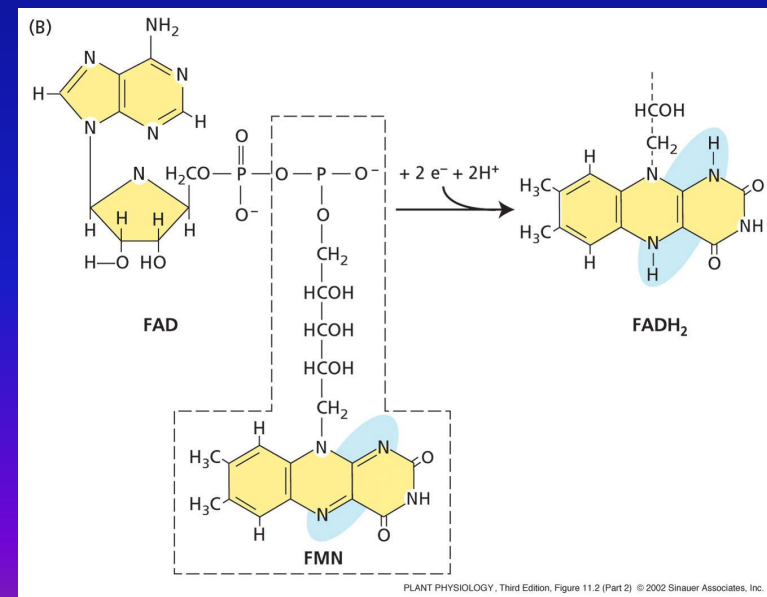


PHR = Photolyase-related doména; N-terminální doména; homologní k DNA fotolyáze; váže dva typy chromoforu:

MTHF = methyltetrahydrofolate (Pterin)

FAD = flavin adenine dinucleotide (Flavin)

CCT = CRY C-Terminus; C-terminální doména – obsahuje 3 motivy: D, A, S – důležité pro buněčnou lokalizaci a mezimolekulární interakci (např. s COP1)



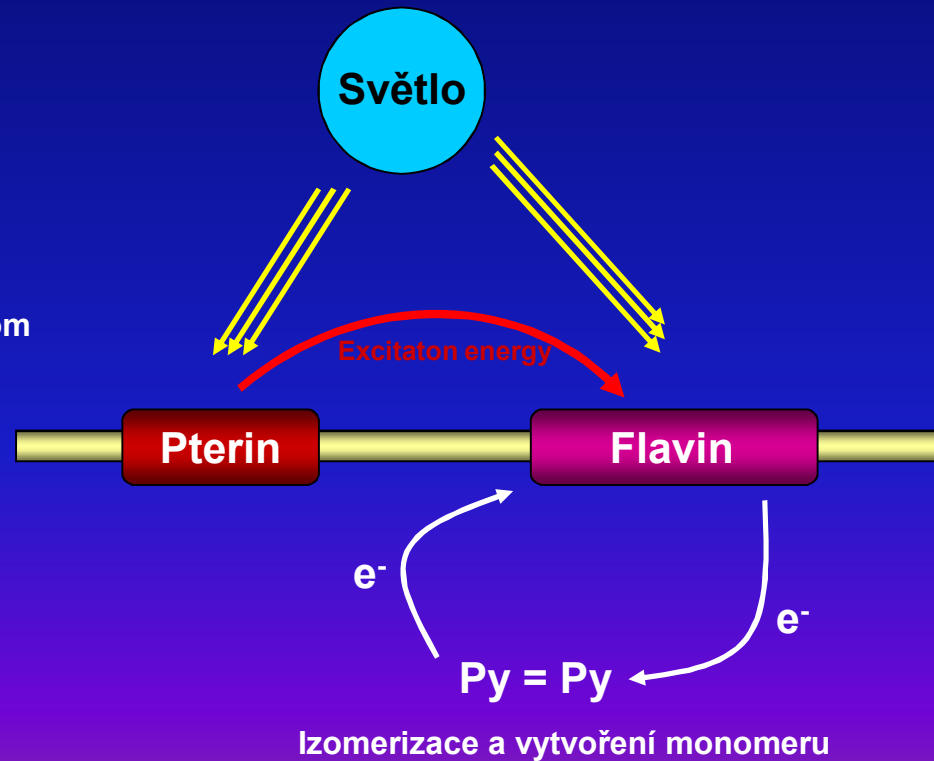
Exprese *HY4* v *Echerichia coli* – chybí fotolyázová aktivita

Fotolyáza – monomer, enzym aktivovaný modrým světlem, který opravuje pyrimidinové dimery vznikající ozářením DNA UV světlem

Pterin – derivát pteridinu, absorbuje světlo, pigment u hmyzu, ryb a ptáků

Fotolyáza je aktivní jako monomer, kdežto kryptochrom je aktivní jako homodimer.

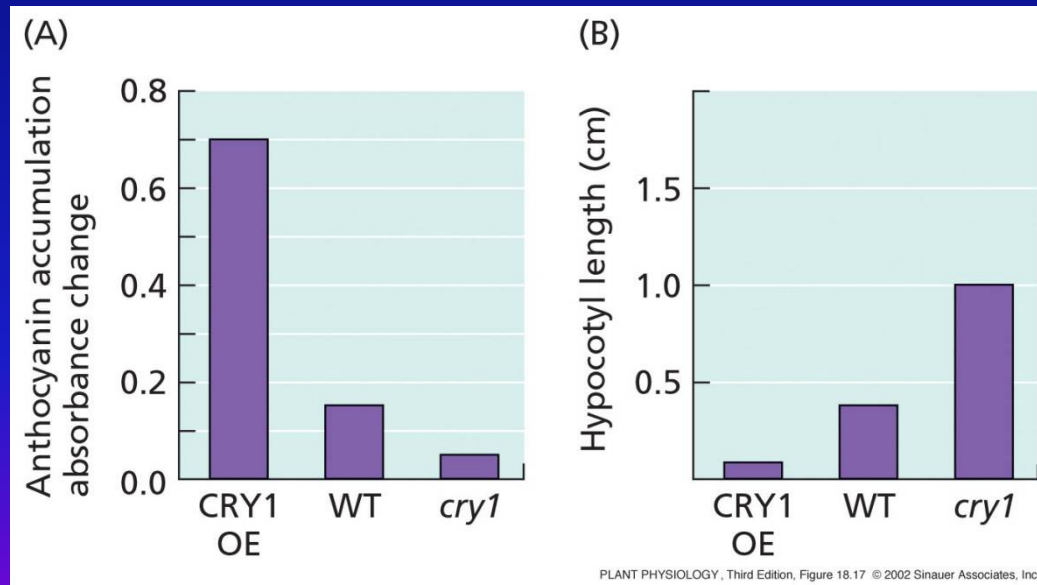
↓
Odlišné funkce těchto proteinů



**HY4 = CRY1 (CRYPTOCHROME 1) – kóduje fotoreceptor modrého svetla;
zprostředkuje inhibici prodlužování indukovanou modrým světlem**

Důkazy:

**- overexpresse CRY1 v transgenních rostlinách => silná inhibice růstu hypokotylu;
nadprodukce antokyaninů**



**CRY1 hraje roli v inhibici
prodlužovacího růstu**

CRY2 (CRYPTOCHROME 2) – homologní s CRY1; na světle nestabilní

Na BL dochází k aktivaci deubiquitináz UBP12 a UBP13, které fyzicky interagují s CRY2 a prostřednictvím deubiquitinace COP1 urychlují jeho degradaci (Lindback et al. 2022).

Transgenní rostliny overexprimující CRY2

- slabá inhibice prodlužovacího růstu modrým světlem
- zvětšený růst děloh indukovaný modrým světlem

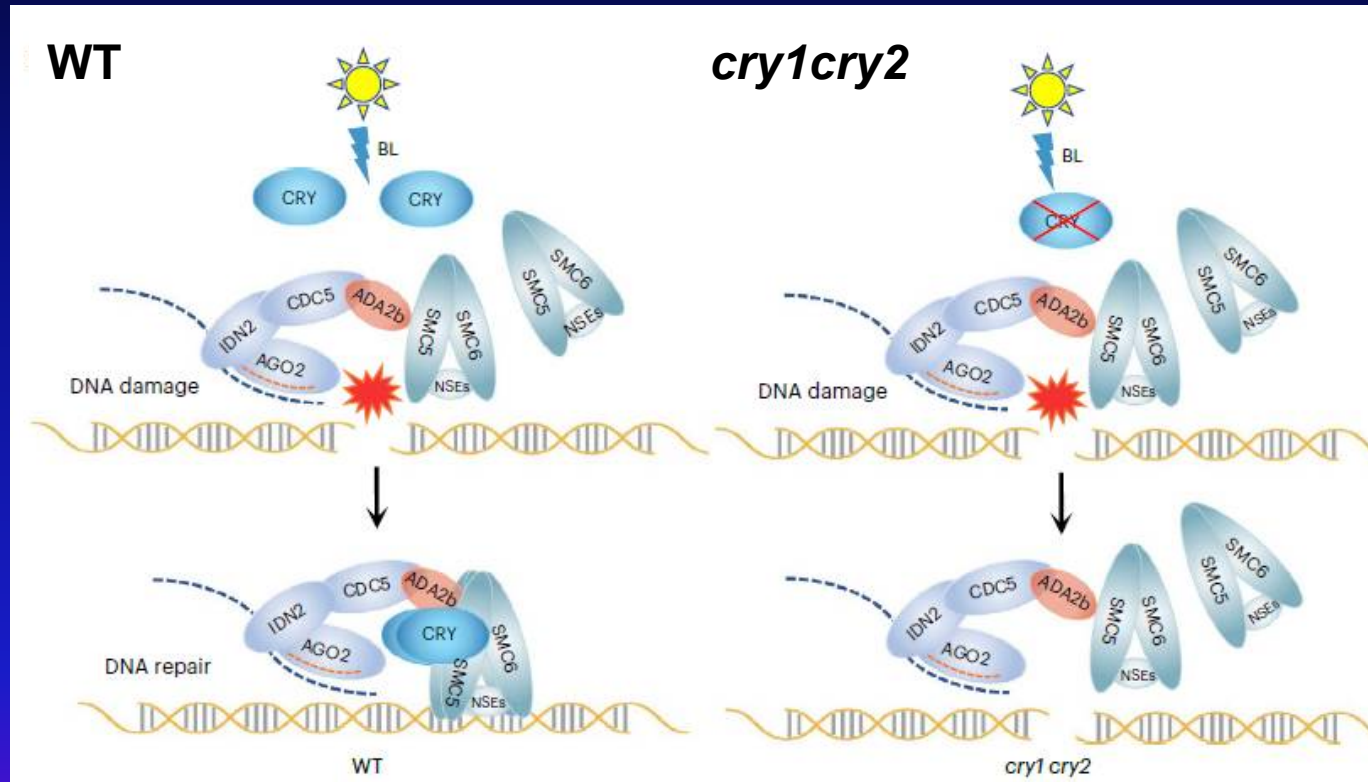
CRY1 a CRY2 – hrají roli v indukci kvetení a denním rytmu

2003 - identifikace genu CRY3 → **Funkce CRY3 ?**

CRY3 patří ke CRY-DASH enzymům s fotolýzovou aktivitou; stabilizuje cyclobutan-pyrimidinové dimery.

Guo T et al. (2023) Nature Plants 9: 1280–1290

Klíčový objev – zapojení kryptochromů a modrého světla v opravě zlomů DNA prostřednictvím ADA2 a SMC5



ADA2b je konzervovaná složka komplexu acetyltransferázy Spt-Ada-Gcn5. ADA2b u *Arabidopsis* a jeho homology u kvasinek a *Drosophily* jsou zapojeny v reakcích na poškození DNA.

SMC5/6 – Structural Maintenance of Chromosome 5/6 (komplex strukturní údržby chromozomu 5/6)

Fototropiny (phototropins)



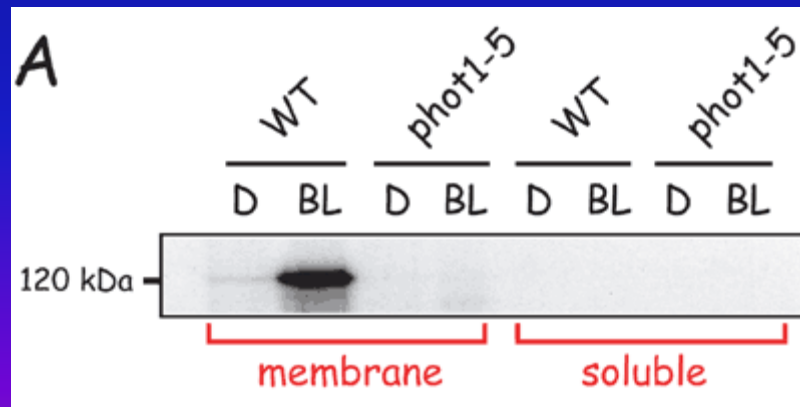
Winslow Russel Briggs († 11.2. 2019)



Austin, TX, 2012

Arabidopsis* mutant *nph1* (*nonphototropic hypocotyl1*) – geneticky nezávislý na *cry1

***nph1* – normálně inhibován modrým světlem; nereaguje fototropicky k modrému světlu; membránový protein 120 kDa není modrým světlem fosforylován**



NPH1 protein – receptor pro fototropismus; autofosforylace indukovaná modrým světlem

NPH1 protein (PHOT1)

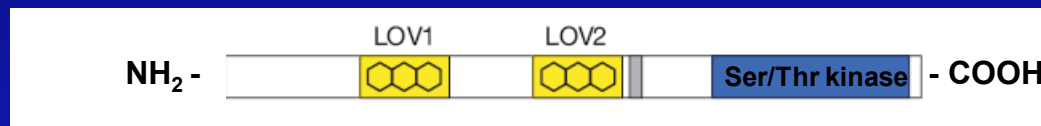


Struktura

(1997-1998)

Struktura PHOT1

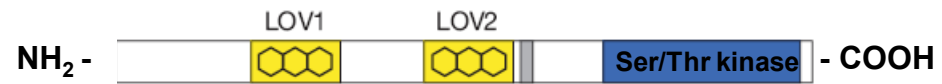
- 966 aminokyselin
- hydrofilní protein; připojený k membráně – mechanismus není znám
- C-terminální část – 11 typických domén v serine/threonine kináze
- N-terminální část – 2 opakující se domény LOV1, LOV2; každá 110 aminokyselin;



LOV – podobná doméně PAS v proteinech regulovaných světlem (Light), kyslíkem (Oxygen; *Escherichia coli*), napětím (Voltage; *Drosophila*, obratlovci)

Fototropin exprimován v buňkách hmyzu: N-terminální část váže chromofor FMN (flavin mononucleotide) v místech LOV1 a LOV2; autofosforylace po expozici modrým světlem – 21 fosforylačních míst

PHOT1 - spektrální charakteristika receptoru pro fototropismus => PHOT1 navržen jako light receptor kináza indukující fototropismus.



PHOT2

- podobný k PHOT1; 29 fosforylačních míst.
- váže FMN a prochází autofosforylací po ozáření modrým světlem

Mutant *phot1*:

- nereaguje fototropicky k modrému světlu $0.01 - 1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- reaguje normálně fototropicky k modrému světlu $1 - 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Mutant *phot2*:

- normální fototropické reakce

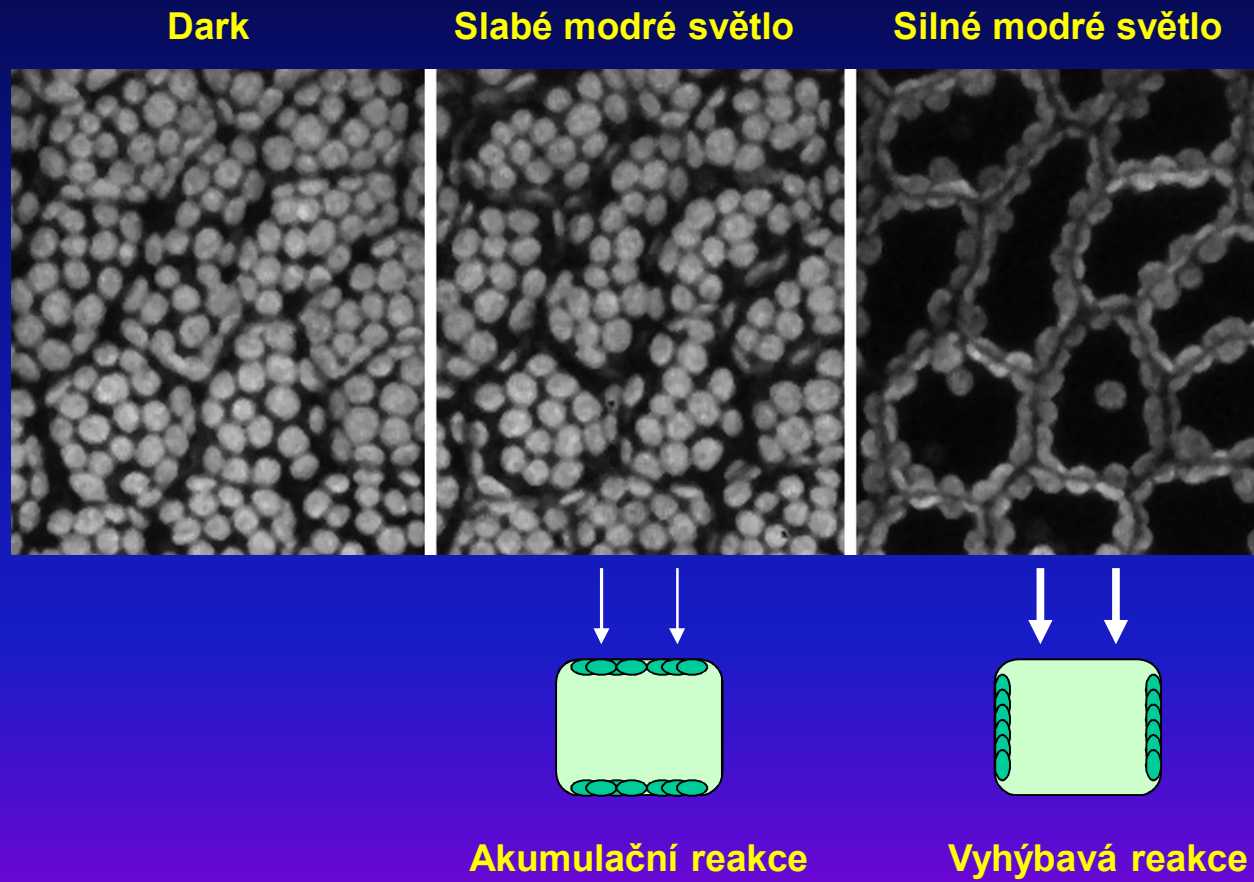
Mutant *phot1/phot2*:

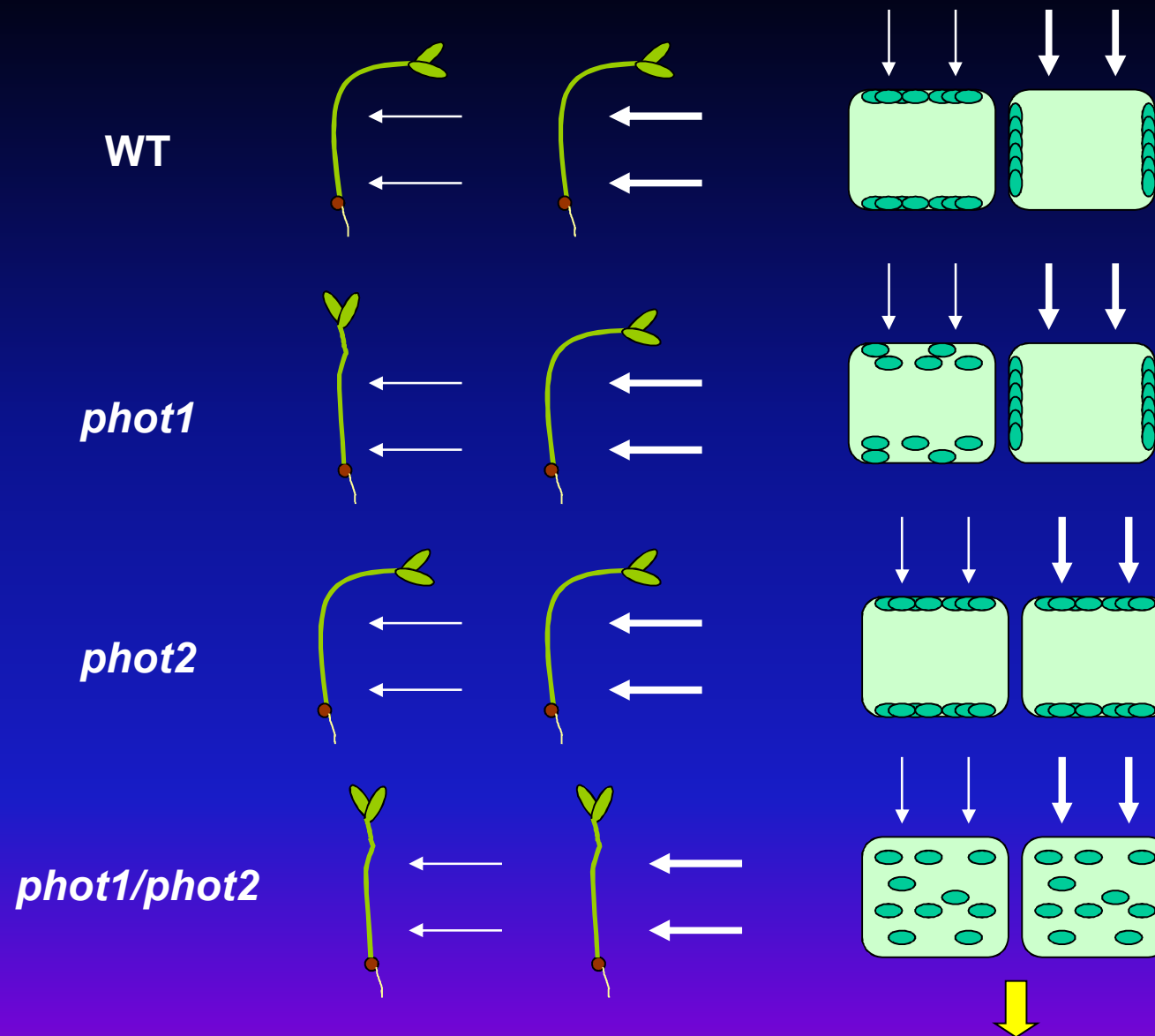
- nereaguje fototropicky k modrému světlu obou intenzit



PHOT1, PHOT2 hrají roli ve fototropismu; PHOT2 funguje při vysoké intenzitě modrého světla

Fototropiny hrají roli v pohybu chloroplastů

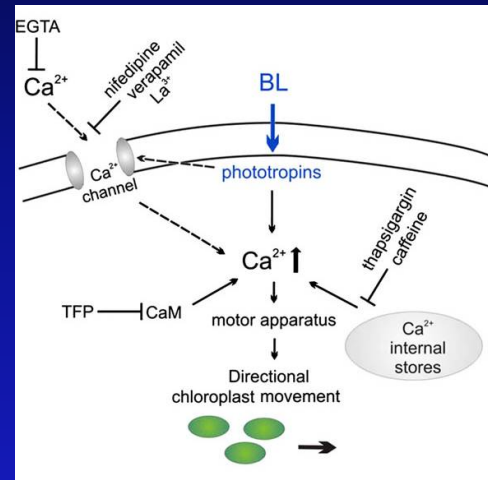
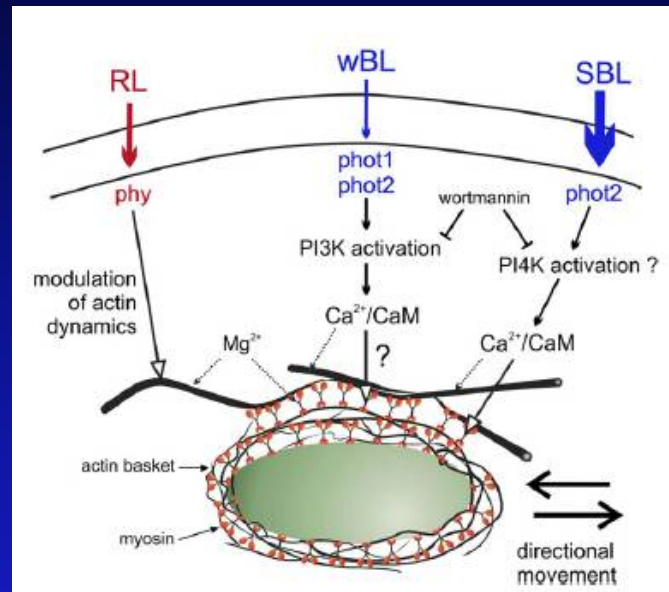




Podle:
Briggs WR, Christie JM (2002) TIPS 7: 204-210

***PHOT2* hraje roli ve vyhýbavé reakci**
Oba geny, *PHOT1* a *PHOT2* hrají roli v akumulární reakci

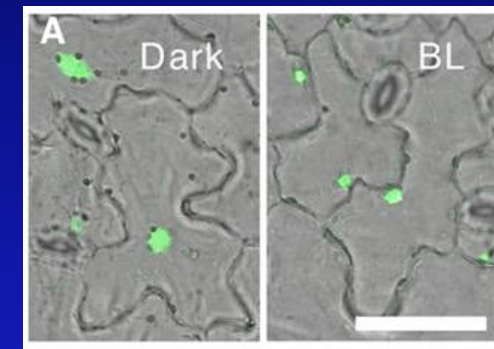
Pohyb chloroplastů je realizován pomocí dvou typů proteinů: myosinu a aktinu



UPDATE 2014

Higa T et al. (2014) PNAS 111: 4327-4331

Chloroplasty se připojují k jádru a regulují jeho pohyb - ochrana jádra proti nadměrnému osvětlení.



Mechanismy pohybu chloroplastů vlivem re-orientace myosinu a aktinu však nejsou dosud známy.

Identifikace regulačních proteinů:

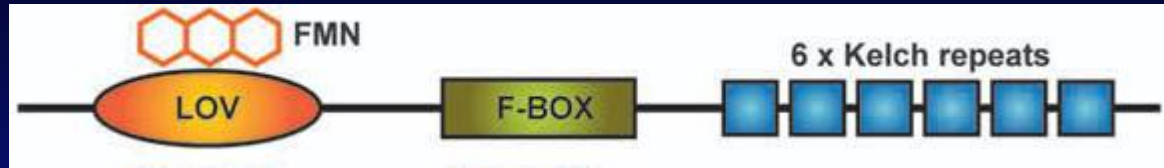
CHUP1 (Chloroplast Unusual Positioning 1) – actin-binding protein

PMI1, 2 (Plastid Movement Impaired 1, 2)

JAC1 (J-domain required for chloroplast ACcumulation response 1)

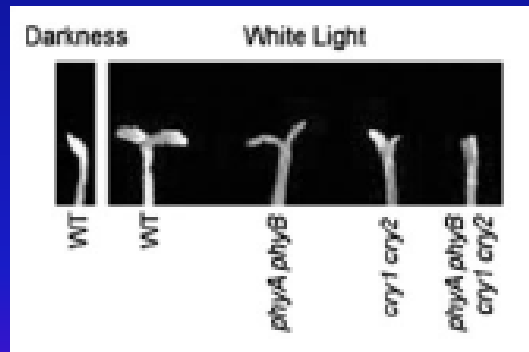
} Funkce neznámé

Zeitlupe (ZTL)



Skupina ZTL/FKF1/LKP2 fotoreceptorů s proteinovým motivem „kelch“

Analýza quadruple mutanta *phyAphyBcry1cry2* = fenotyp rostlin rostoucích ve tmě



Perelman et al. (2003)
Plant Physiol 133: 1717-1725

ALE transkripční analýza ukázala expresi světlem regulovaných genů!!! Mutant ukazuje reakce denního cyklu!!!



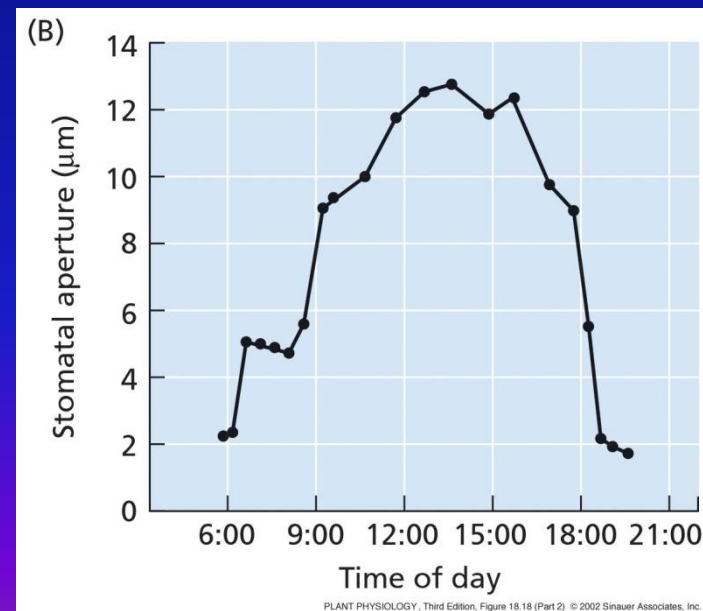
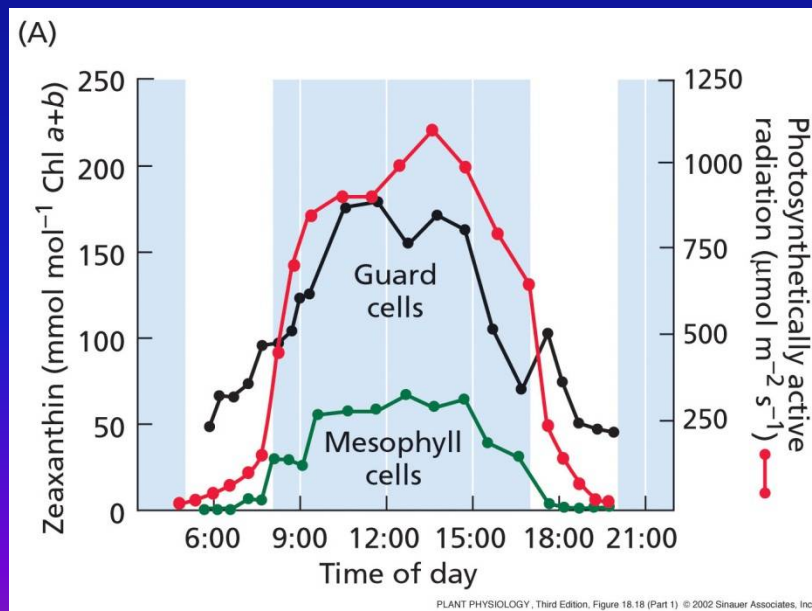
Nový receptor ZEITLUPE zprostředkuje tuto expresi a reakce denního cyklu – moduluje akumulaci proteinu TOC1 (viz [SFR3c-d](#)), který je klíčovým proteinem v regulaci denního rytmu.

ZTL obsahuje LOV doménu, která je podobná vazebnému místu pro chromofor flavin u fototropinů.

Zeaxantin (zeaxanthin)

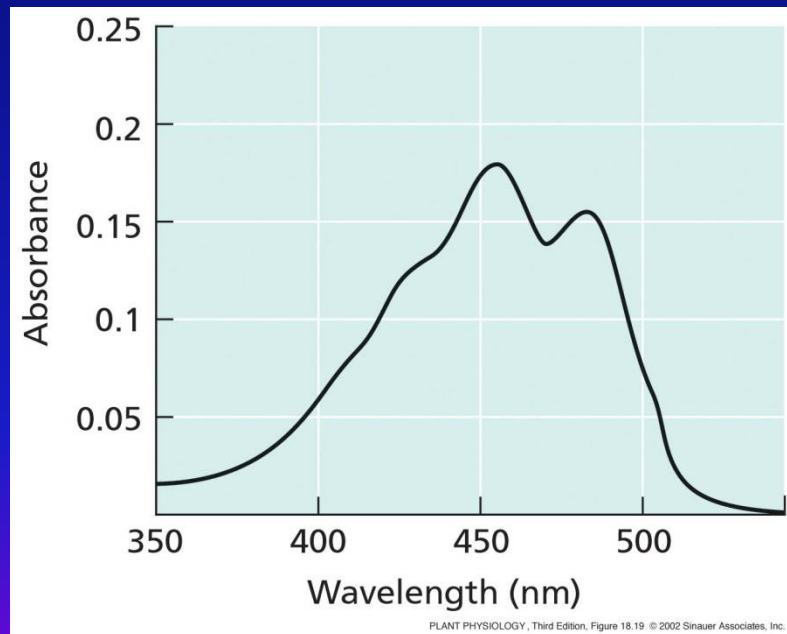
Zeaxantin – karotenoid; komponenta xantofylového cyklu v chloroplastech mezofylových buněk - chrání fotosyntetické pigmenty před nadměrným světlem.

Zeaxantin ve svěracích buňkách funguje jako receptor zprostředkující otevírání stomat

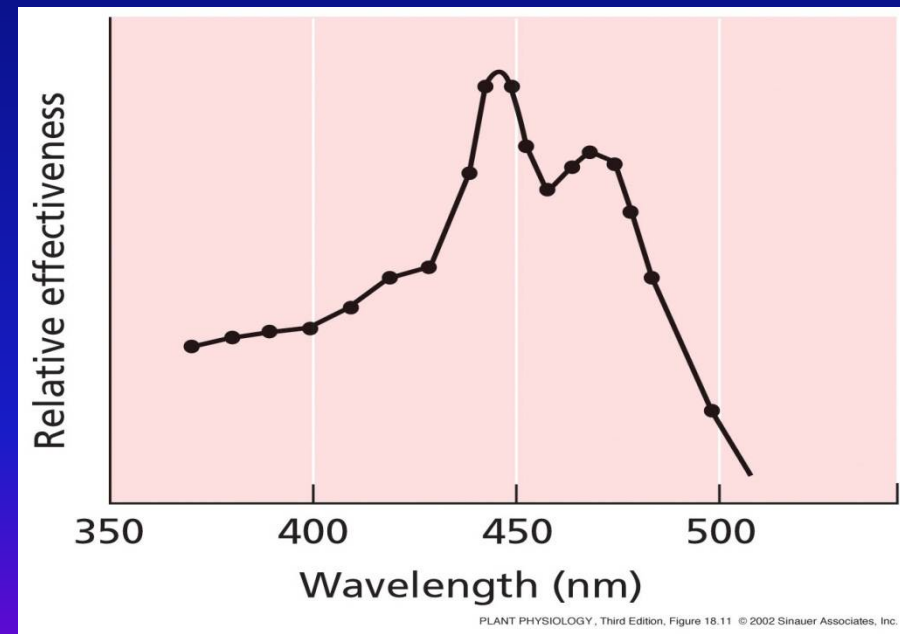


Důkazy potvrzující úlohu zeaxantinu jako fotoreceptoru ve stomatech:

- absorpční spektrum zeaxantinu souhlasí s akčním spektrem otevírání stomat indukovaného modrým světlem



Absorpční spektrum zeaxantinu

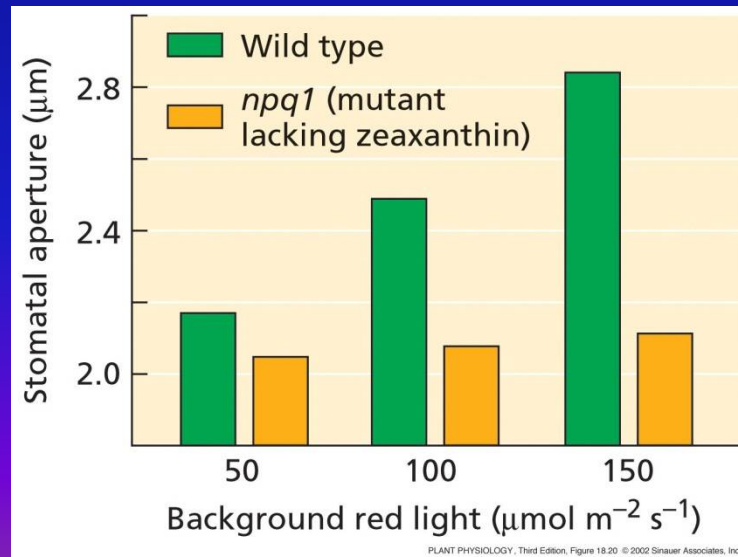


Akční spektrum otevírání stomat

- obsah zeaxantinu ve svěracích buňkách odpovídá velikosti stomatální apertury
- citlivost svěracích buněk k modrému světlu se zvyšuje s koncentrací zeaxantinu
- otevírání stomat indukované modrým světlem je inhibováno dithiotreitem (DTT) a inhibice je závislá na jeho koncentraci

DTT inhibuje enzym, který konvertuje violaxantin na zeaxantin
=> DTT snižuje akumulaci zeaxantinu

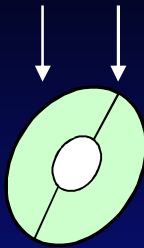
Arabidopsis mutant *npq1* (*nonphotochemical quenching*)



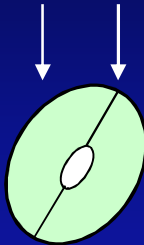
npq1 neakumuluje zeaxantin v chloroplastech
=> chybí specifické otevírání stomat
indukované modrým světlem

npq1 ukazuje pouze bazální otevírání stomat
indukované fotosyntézou

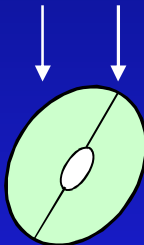
WT



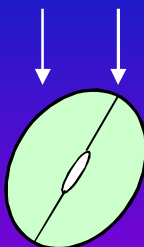
Do procesu otevírání stomat jsou zapojeny kromě zeaxantinu i fototropiny

phot1

Reakce stomat k modrému světlu je ovlivňována i geny *PHOT1* a *PHOT2*.

phot2

Mechanismus interakce PHOTs se zeaxantinem není znám.

phot1/phot2

Stomata fungují autonomně – reakce jednoho průduchu k modrému světlu nezávisí na reakci druhého průduchu k modrému světlu.

Do procesu otevírání stomat jsou zapojeny kromě zeaxantinu a fototropinů i kryptochromy a COP1

Otevírání stomat indukované modrým světlem:

WT > *cry1* = *cry2* > *cry1cry2*



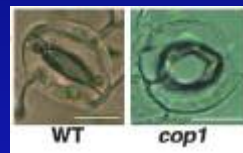
WT < *CRY1-ovx* = *CRY2-ovx*



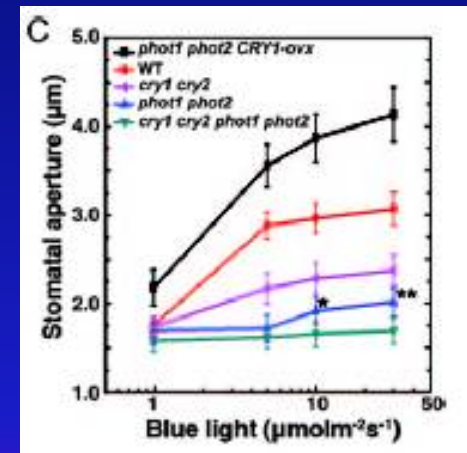
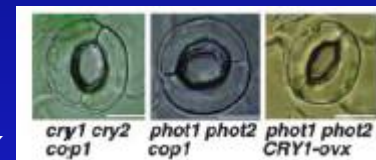
cry1cry2 > *phot1phot2* > *cry1cry2phot1phot2*



WT < *cop1*



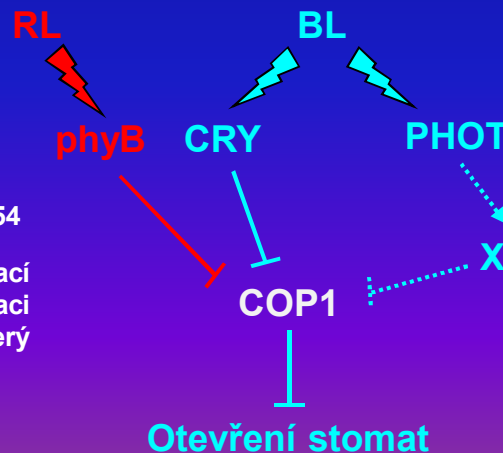
cry1cry2cop1 = *phot1phot2cop1* > *phot1phot2CRY1-ovx*



UPDATE 2014

Khanna et al. (2014) Mol Plant 7: 1441-1454

Uzavírání průduchů nastává degradací tubulinu ve 26S proteazomu. Degradaci tubulinu zprostředkuje COP1, který ubiquitínuje tubulin.

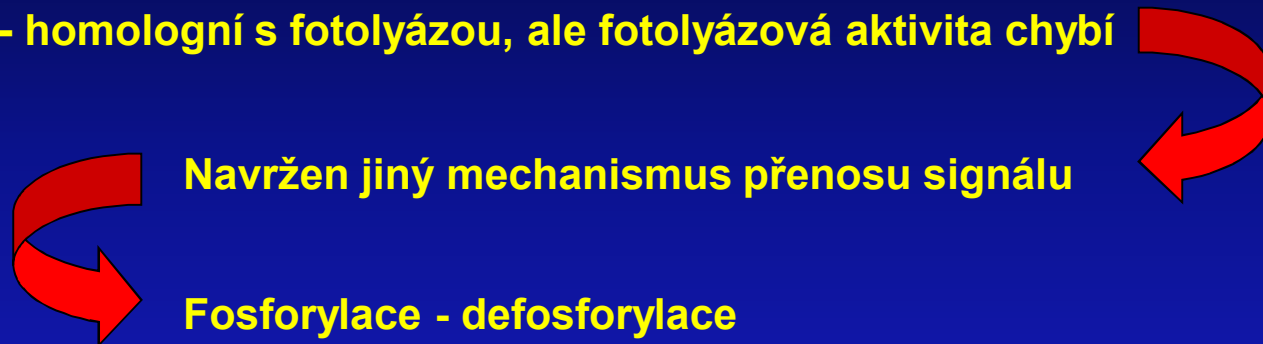


Mao J et al. (2005) PNAS 102: 446-452

c) Přenos signálu

Signální dráhy zapojující kryptochromy

CRY1 a CRY2 – homologní s fotolyázou, ale fotolyázová aktivita chybí

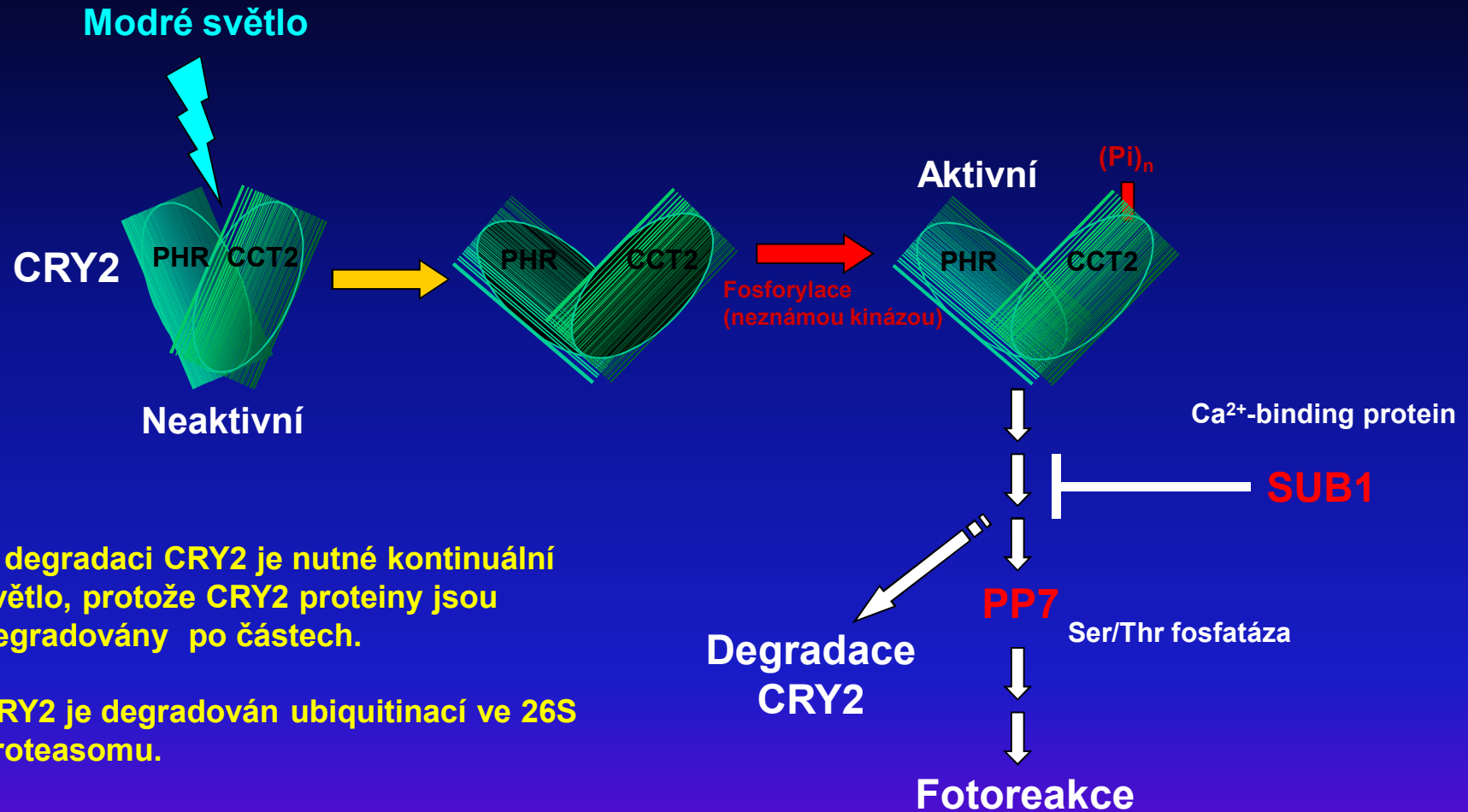


Fosforylace = připojení fosfátové skupiny k aminkyselínovému zbytku nějakého proteinu

Protein kináza = ATP-závislý enzym, který připojuje fosfátovou skupinu k proteinu. Protein se stává fosforylovaným a tím aktivním.

Absorbce BL N-terminální fotolyázovou doménou vede ke konformační změně C-terminální domény. C-terminální doména zprostředkuje přenos signálu. Váže se ke specifickému partnerskému proteinu (např. COP1).

Signální dráha kryptochromu CRY2



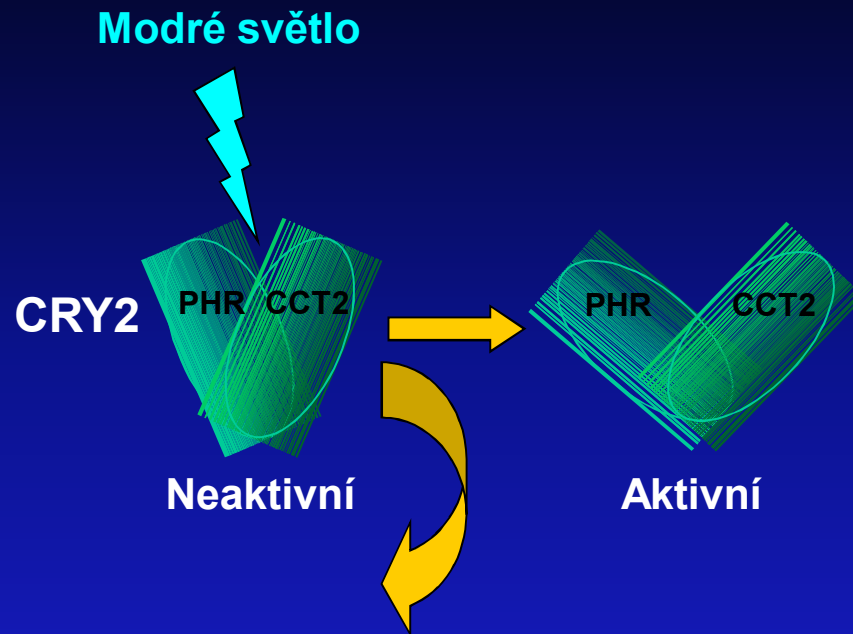
K degradaci CRY2 je nutné kontinuální světlo, protože CRY2 proteiny jsou degradovány po částech.

CRY2 je degradován ubiquitinací ve 26S proteasomu.

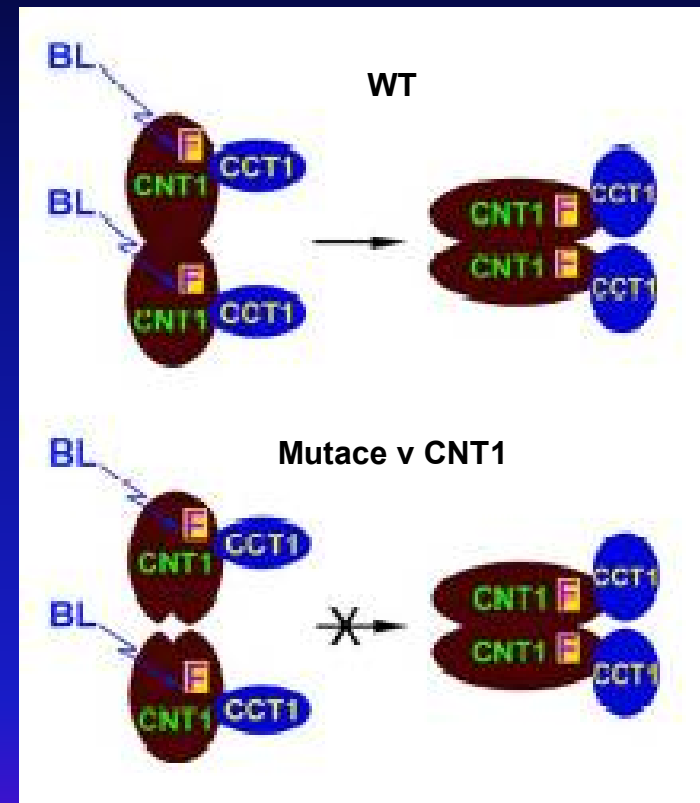
UPDATE 2016

Liu Q et al. (2016) Plant Cell Physiol 57: 2175-2186

CRY2 prochází degradací vlivem nejméně dvou E3-ubiquitin ligáz: CUL4- a CUL1-E3 ubiquitin ligáza



N-terminální doména PHR (CNT1) je nutná k homodimerizaci kryptochromu. **Dimerizace je nezbytná ke světelné aktivaci C-terminální domény (CCT)** => schopnost CCT interagovat se signálním proteinem COP1 v signální dráze modrého světla.

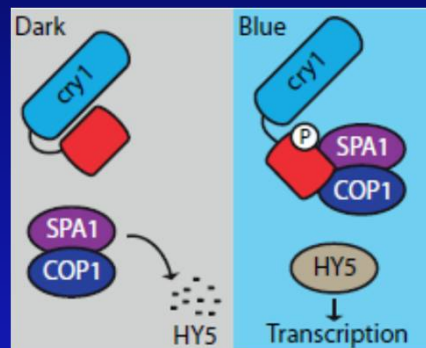


Sang et al. (2005) Plant Cell 17: 1569 - 1584

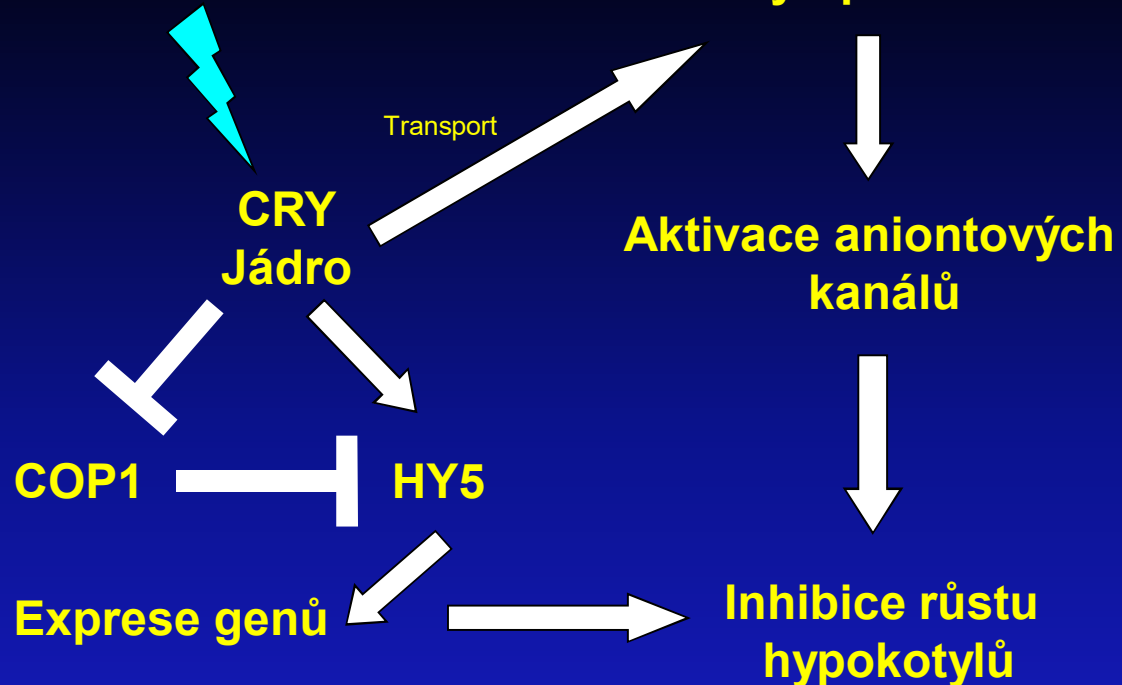
CRYs jsou akumulovány v jádře

CRY2 - nezávisle na světle

CRY1 - ve tmě; na světle transport do cytoplazmy a část zůstává v jádře



Modré světlo



Mutant *phot1* – defekt v rychlé fázi inhibice růstu (do 30 minut po ozáření)

PHOT1
Iniciace inhibice do 30 minut

Mutant *cry1, cry2* – defekt v pomalé fázi inhibice růstu (30 – 120) minut po ozáření

CRY1, CRY2
iniciace inhibice do 120 minut



Folta KM (2004) Plant Physiol 135: 1407-1416

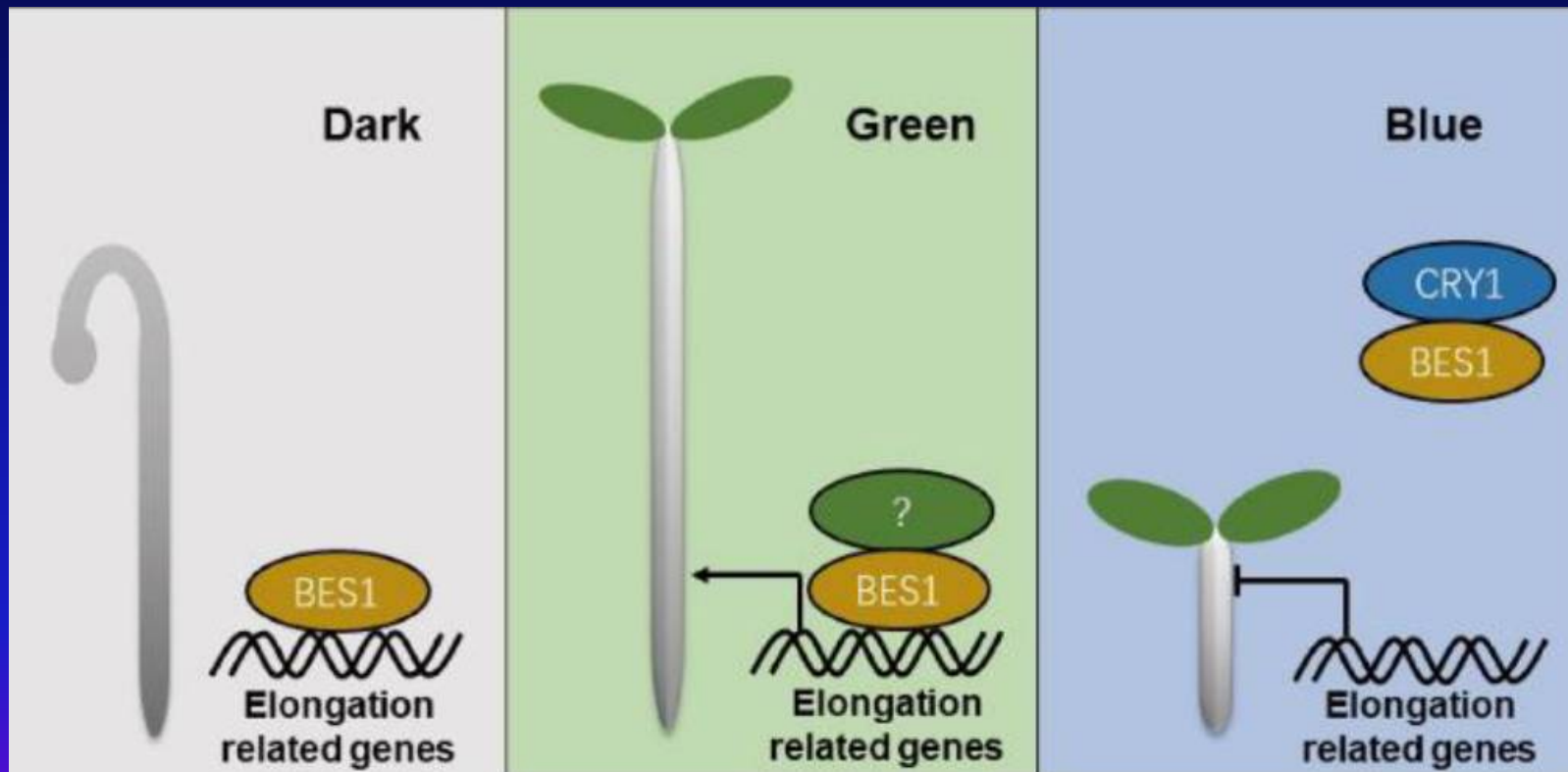
Zelené světlo stimuluje prodlužování => působí proti modrému světlu (viz blue/green reverzibilita u stomat)

UPDATE 2016

Liu B et al. (2016) J Plant Res 129: 137-148

Review of mechanizmech signalizace prostřednictvím kryptochromů.

Zelené světlo stimuluje prodlužování hypokotylu prostřednictvím signalizace brasinosteroidů.



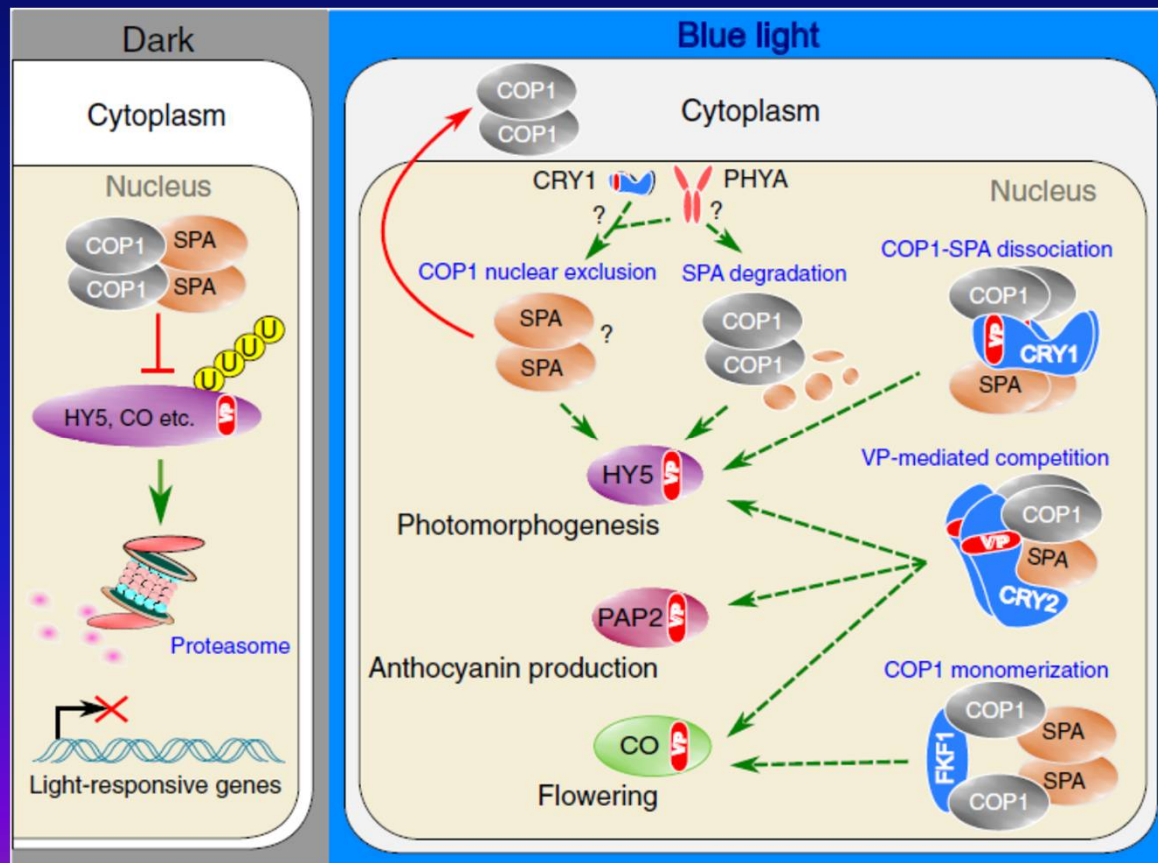
Ani jeden ze známých fotoreceptorů není receptorem zeleného světla, který aktivuje BES1!

Molekulární mechanismus inhibice COP1/SPA modrým světlem prostřednictvím kryptochromů

UPDATE 2020

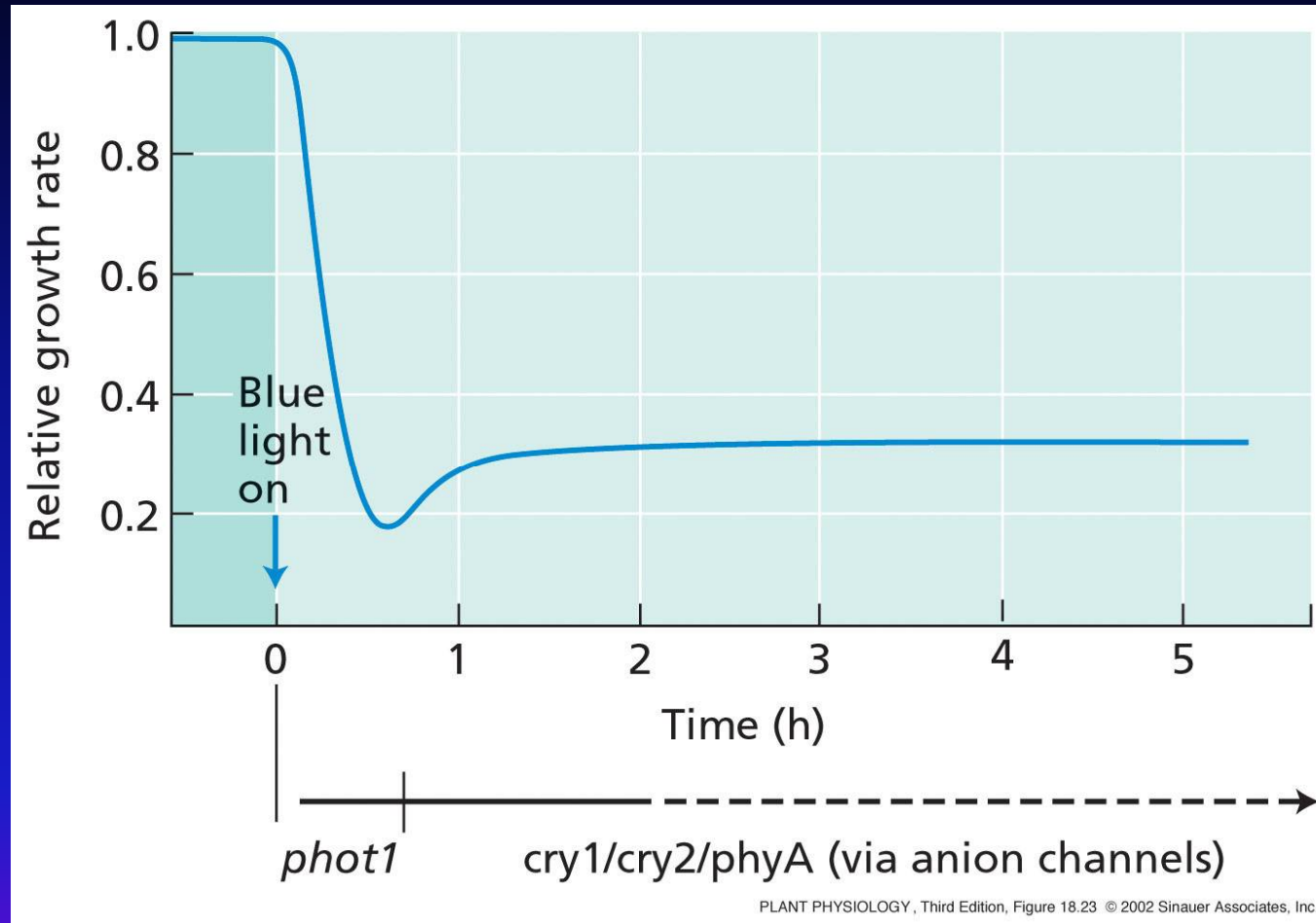
Ponnu J et al. (2019) PNAS 116: 27133-27141

Ponnu J (2020) Physiologia Plantarum 169: 418-429



CRY obsahují **valine-prolinový (VP)** motiv na C-terminální doméně CRY (CCT2), který se podobá COP1-WD40 vazebné sekvenci přítomné na všech substrátech COP1.

Inhibice růstu hypokotylu indukované modrým světlem

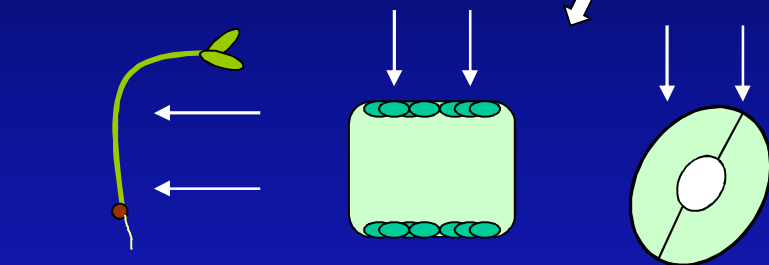
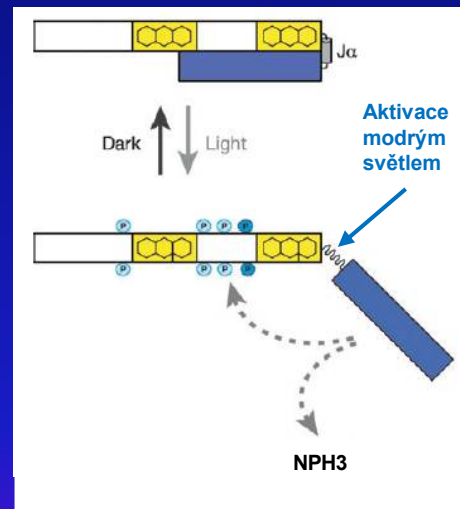
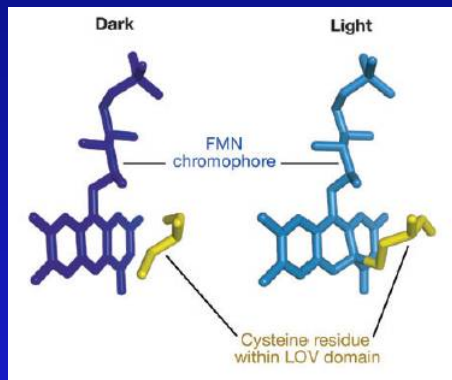
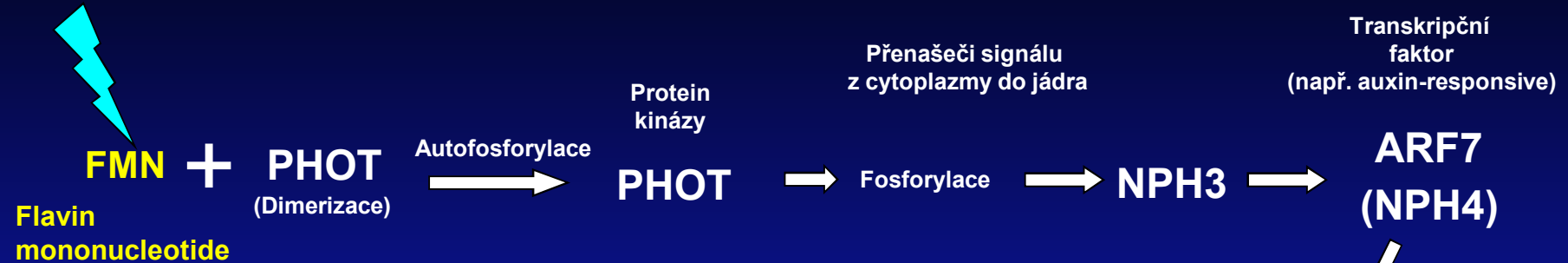


Ranná fáze zprostředkovaná *phot1* – minuty až 30 minut

Pozdní fáze zprostředkovaná CRY1, CRY2, phyA – hodina a více

Signální dráha fototropinů PHOT

Modré světlo

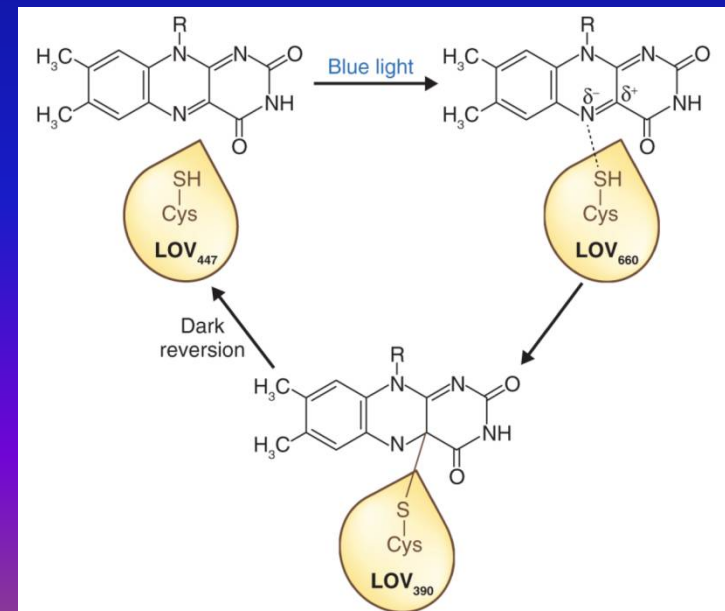


Klíčovou pro přenos signálu je autofosforylace na dvou konzervovaných Ser reziduích na C-terminální doméně (PHOT1: Ser-763 a Ser-85; PHOT2: Ser-761 a Ser 763). Ve tmě je PHOT defosforylován protein fosfatázou PP2A.

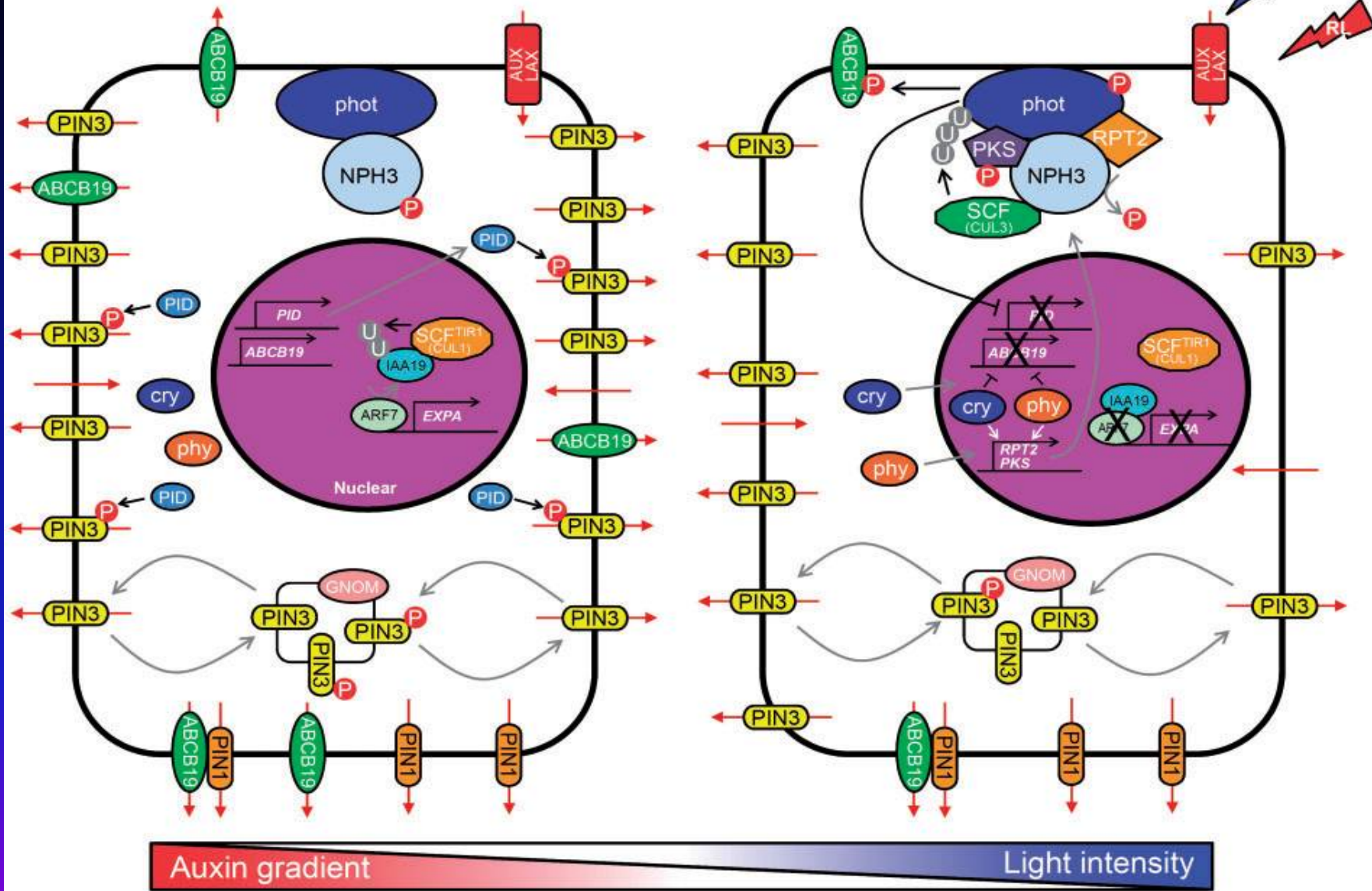
Update 2018

Christie JM (2018) Plant Physiology 176: 1015-1024

Nejnovější review o signalizaci prostřednictvím fototropinů.



Molekulární mechanismus fototropické reakce



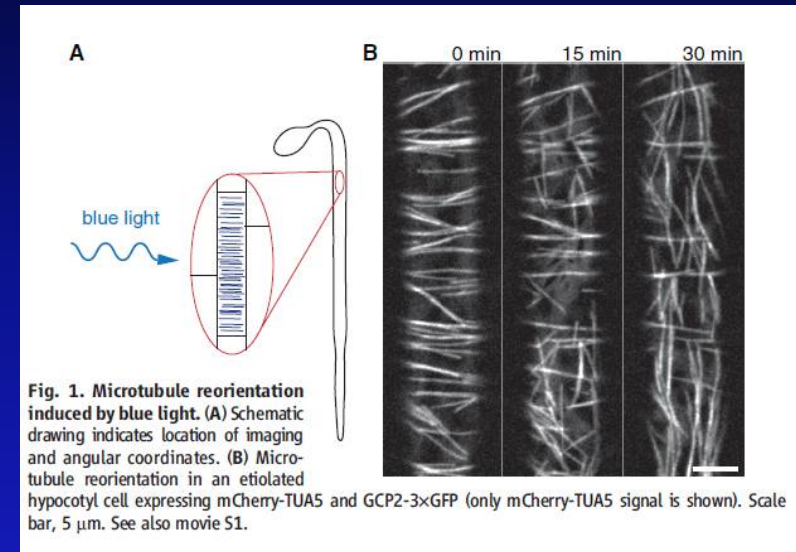
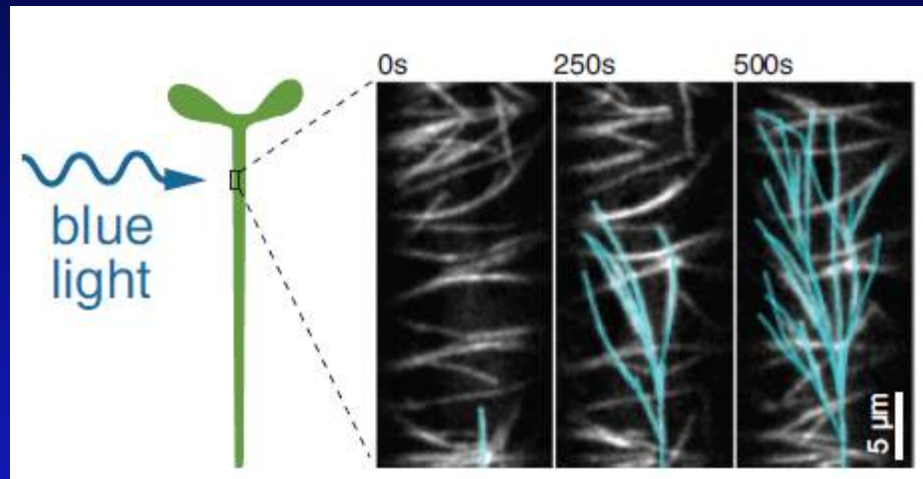
UPDATE 2012

Sakai T, Haga K (2012) Plant & Cell Physiology 53: 1517-1534

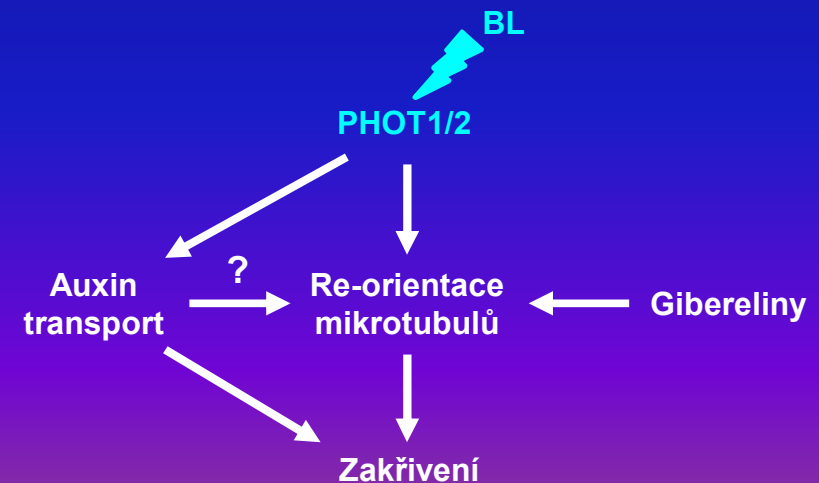
UPDATE 2013

Lindeboom JJ et al. (2013) Science 342: 1245533

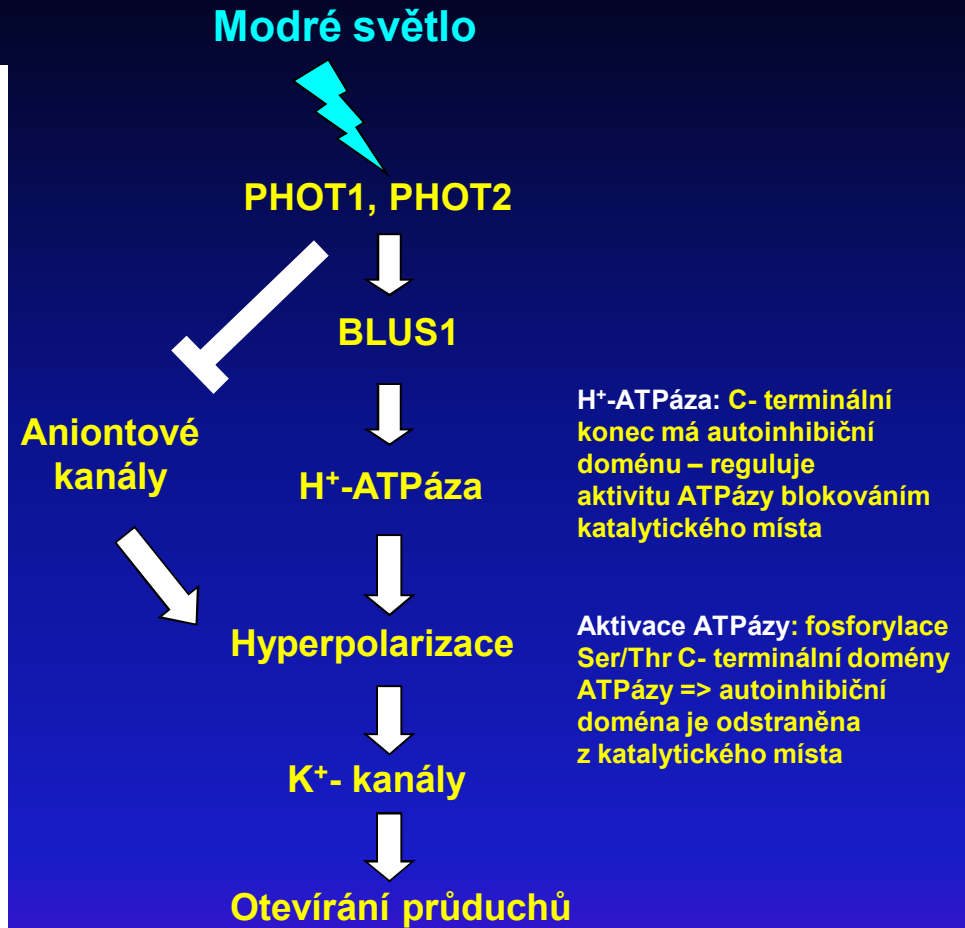
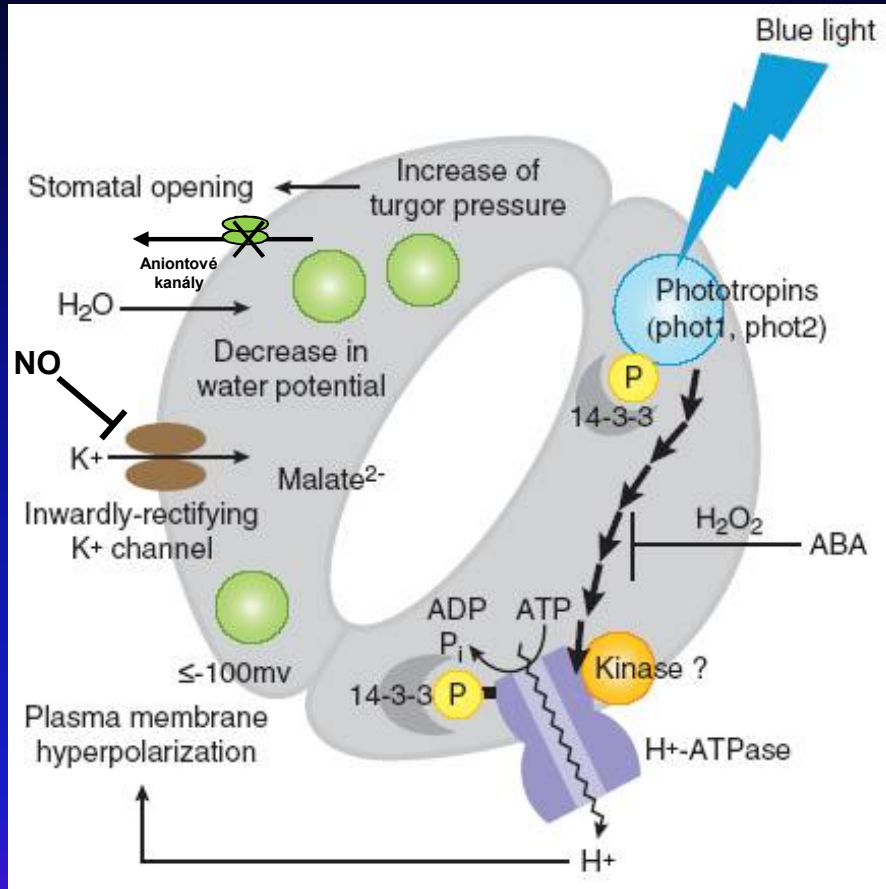
Mechanismus zakřivování způsobeného re-orientací nově vznikajících mikrotubulů epidermálních a kortikálních buněk.



Modré světlo prostřednictvím fotoreceptorů PHOT1 a PHOT2 stimuluje vznik nově orientovaných mikrotubulů. Vznik nových mikrotubulů je řízen proteinem **kataninem**, který rozděluje (rozštěpuje) existující mikrotubuly. Růst konců nově vniklých mikrotubulů vede ke vzniku re-orientovaných mikrotubulů v epidermálních a kortikálních buňkách. Tato re-orientace vede ke změně ukládání celulózy v nově vznikající buněčné stěně a k zakřivení.

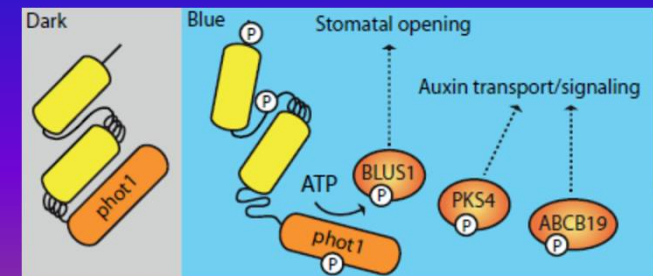


Otevírání průduchů prostřednictvím fototropinů PHOT1 a PHOT2



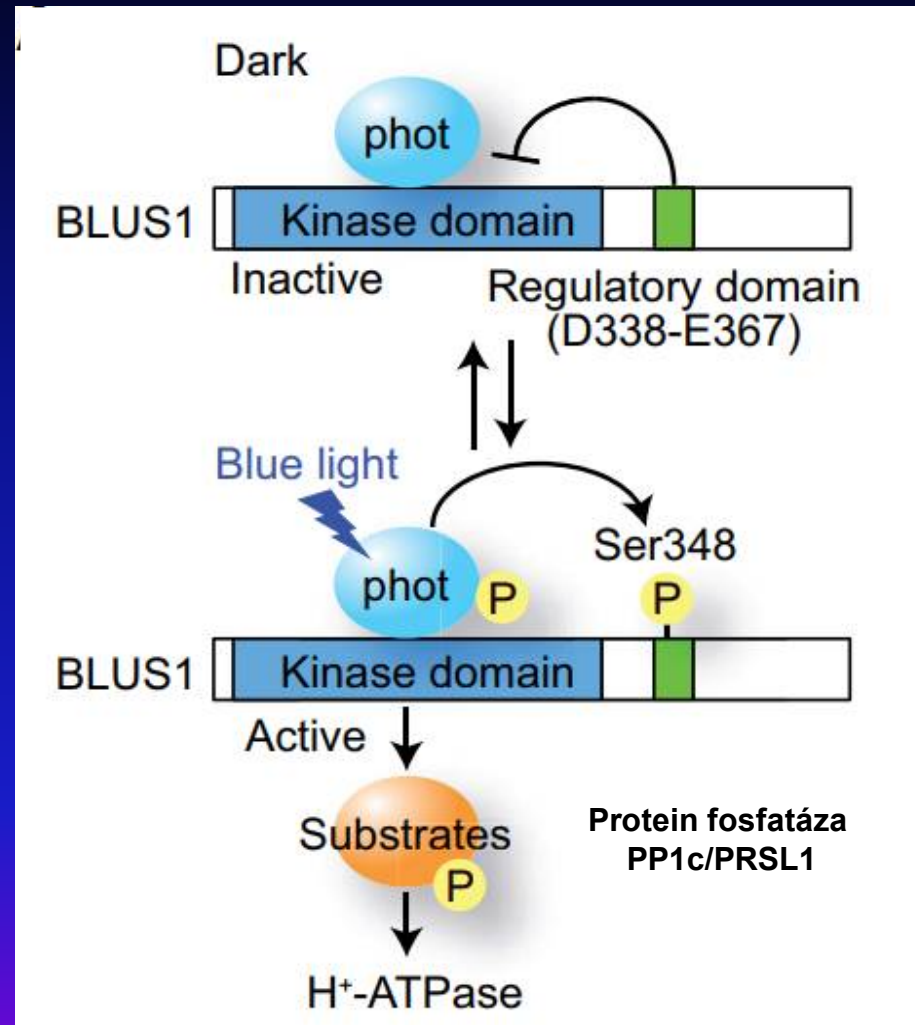
UPDATE 2016

Cotelle V and Leonhardt N (2016) *Frontiers in Plant Science* 6: article no: 1210
 Review o úloze proteinů 14-3-3



Christie JM et al. (2015) *Plant Cell Physiol* 56: 401-413

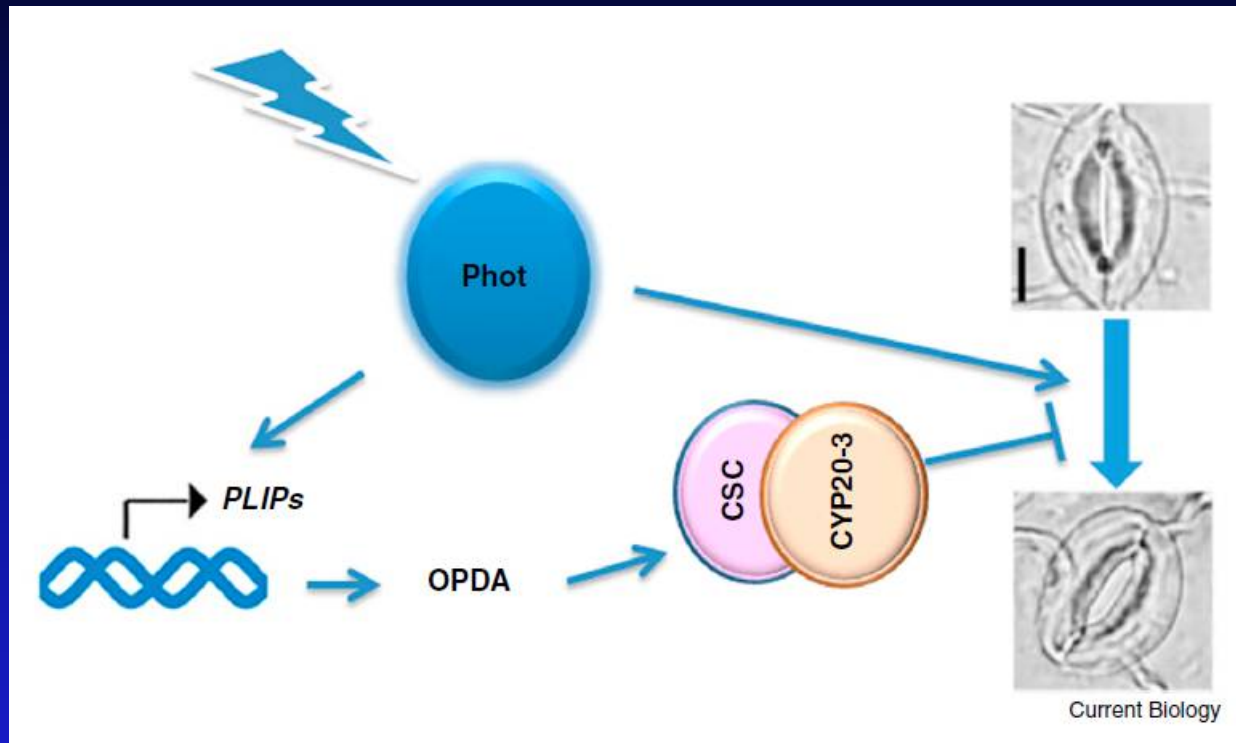
Model otevírání průduchů modrým světlem prostřednictvím regulace BLUS1



UPDATE 2021

Hosotani S et al. (2021) Plant Cell 33: 1813–1827

UPDATE 2023

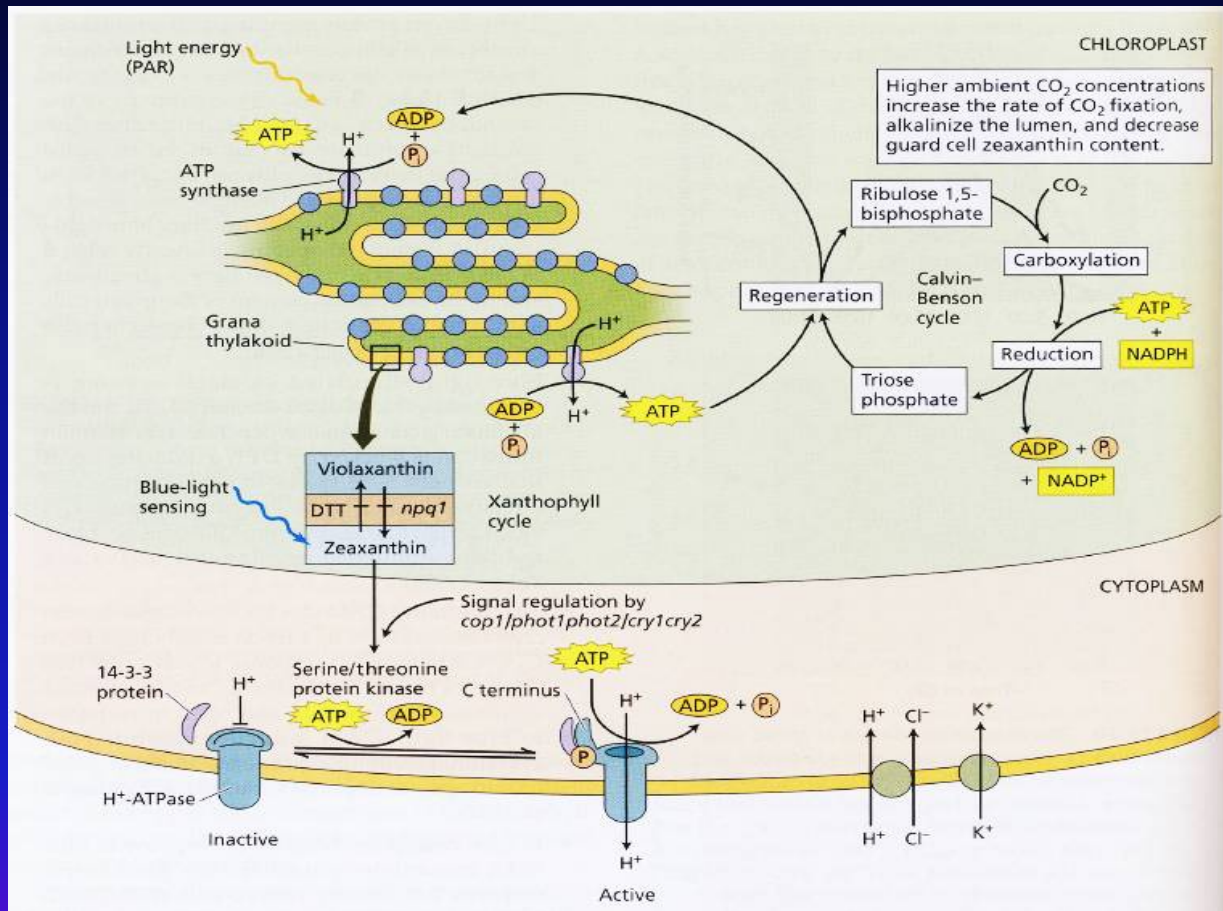
Chang Y et al. (2023) *Current Biology* 33: 1071-1081Liu H (2023) *Current Biology* 33: R219-R237

Modré světlo aktivuje fototropiny => otevření průduchů. Mezitím modré světlo aktivuje transkripci PLIPs (fosfolipáz) => akumulace OPDA (kyselina 12-oxo-fytodienová = metabolit oxylipinu) => vazba OPDA k receptorovému komplexu CSC-CYP20-3 => inhibice aktivity H⁺-ATPázy (pumpování H⁺ ze svěrací buňky ven) a transportu K⁺ do svěrací buňky.



Uzavření průduchů = „brzda“

Signální dráha zeaxantinu ve svěracích buňkách stomat



Modré světlo



Zeaxantin



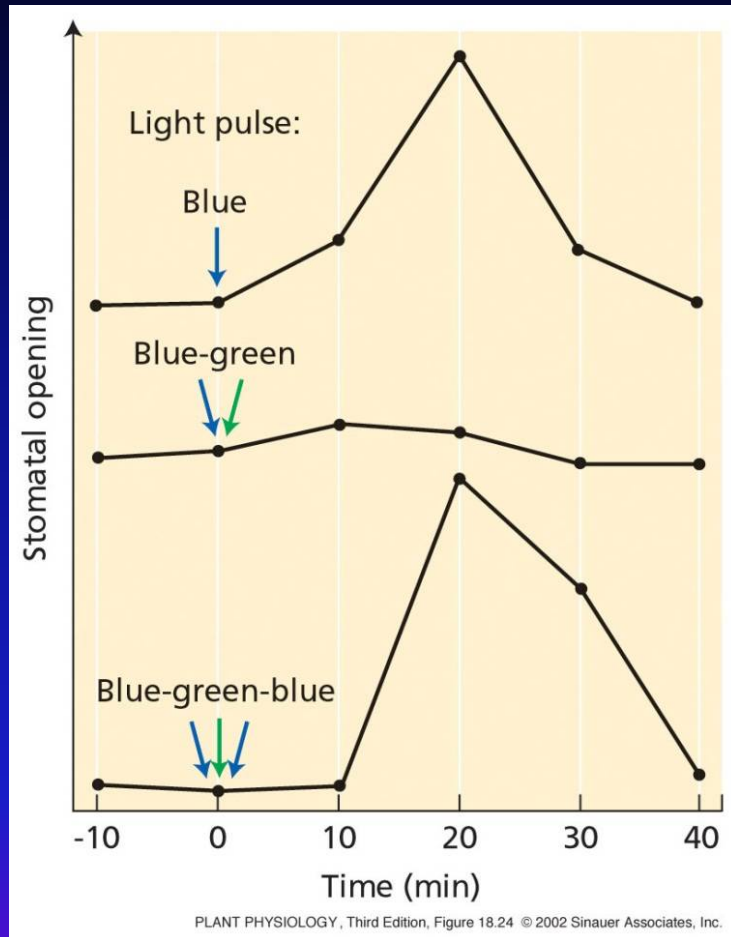
H^+ -ATPáza



Otevírání stomat

Mechanismus zapojení zeaxantinu v otevírání stomat vlivem modrého světla je třeba dále ověřit – kontroverzní výsledky v intaktních listech a protoplastech svěracích buněk u mutanta *npq1*.

Reverzibilita otevírání stomat



Akční spektra modrého (otevírání stomat) a zeleného (zavírání stomat) světla jsou posunuta o 90 nm

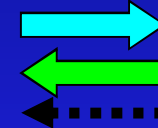
Tento posun je způsoben izomerizací zeaxantinu

Modré světlo

Zelené světlo

Trans –izomer
Zeaxantinu
(neaktivní)

Cis –izomer
Zeaxantinu
(aktivní)



Tma

UPDATE 2015

Golovatskaya IF and Karnachuk RA (2015) Russian J Plant Physiology 62: 727-740

Review o fyziologické úloze zeleného světla ve vývoji a růstu rostlin.

Fotosynteticky aktivní světlo:
červené a modré



Rychlost syntézy ATP



Calvinův cyklus
(fixace CO₂)

Violaxantin

Enzym
optimum pH 5.2
(integrální thylakoidní
protein)

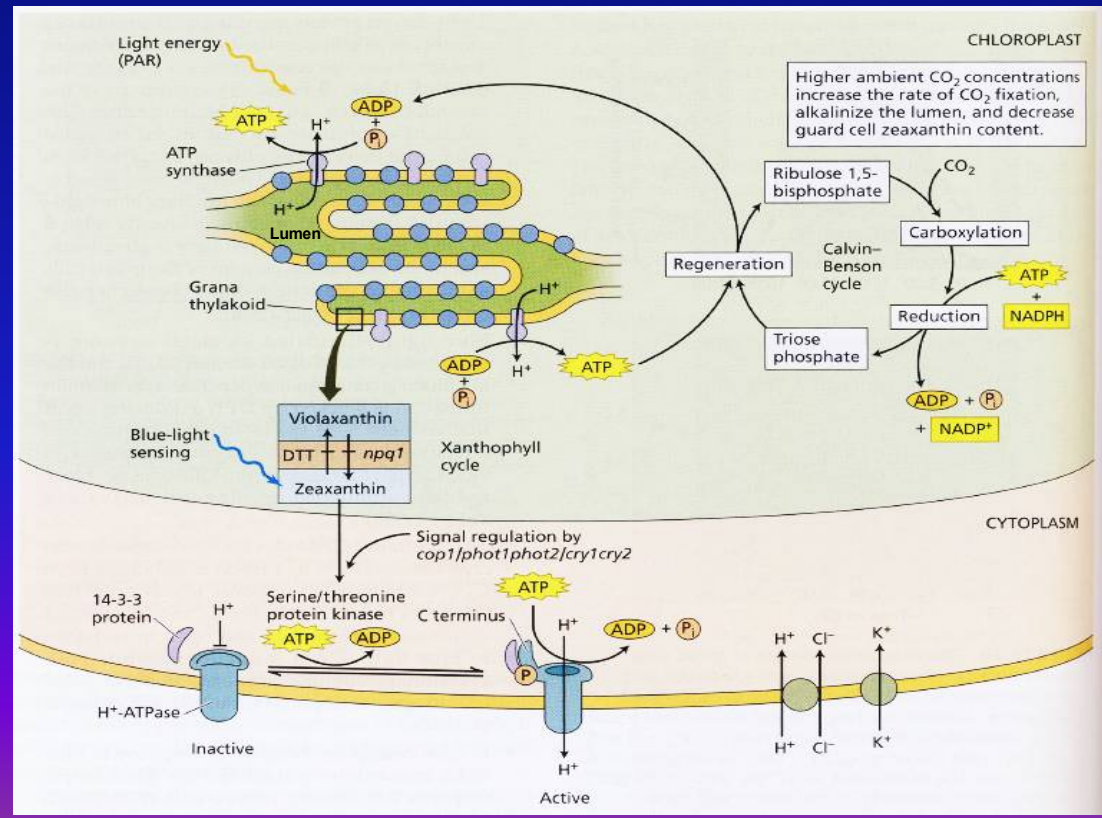


Zeaxantin



Otevírání
stomat

CO₂



Zeaxantin funguje
jako senzor CO₂ :

Vysoká [CO₂]



Vysoká fixace CO₂ =
vysoká spotřeba ATP



Alkalizace lumenu
(zvyšování pH)



Snížení obsahu zeaxantinu