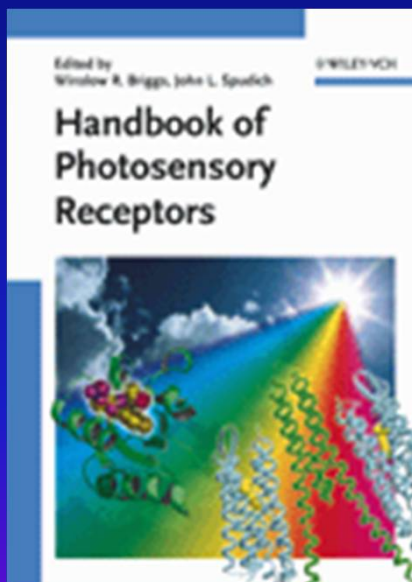


2) Úloha modrého světla ve vývoji a růstu rostlin

a) Fotobiologie reakcí zprostředkovaných modrým světlem

b) Fotoreceptory

c) Přenos signálu



Briggs WR, Spudis 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

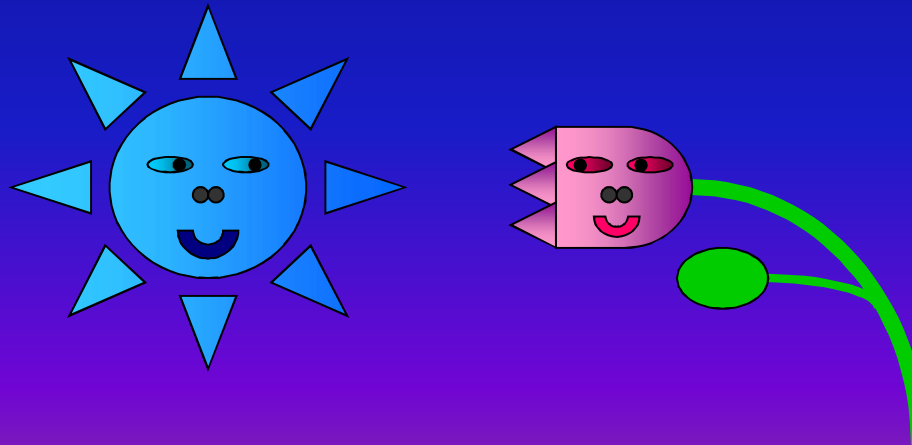
Martin Fellner

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)

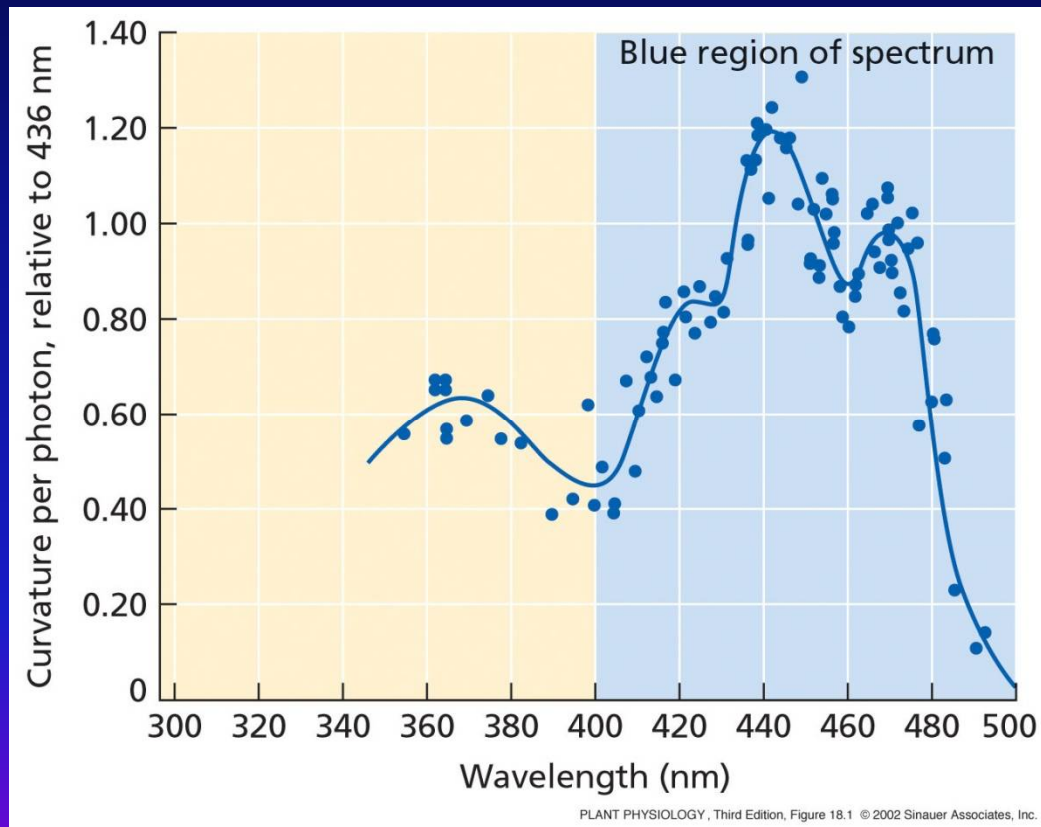
Modré světlo je absorbováno specifickými receptory modrého světla, ale také fytochromy a chlorofylem



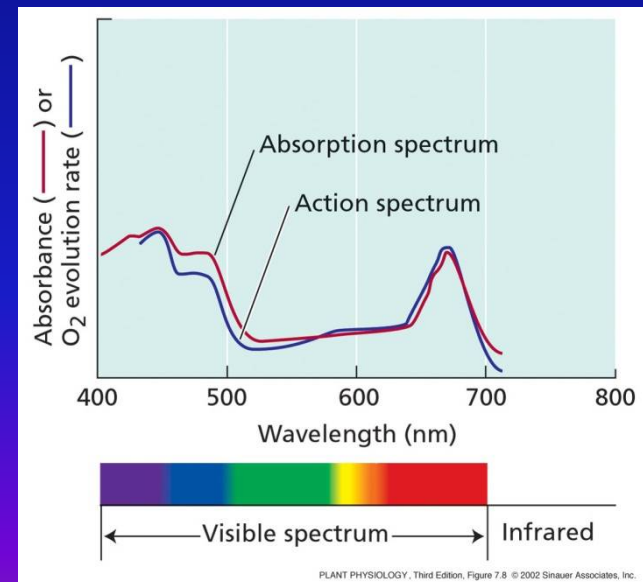
Jak odlišit specifické reakce k modrému světlu?

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

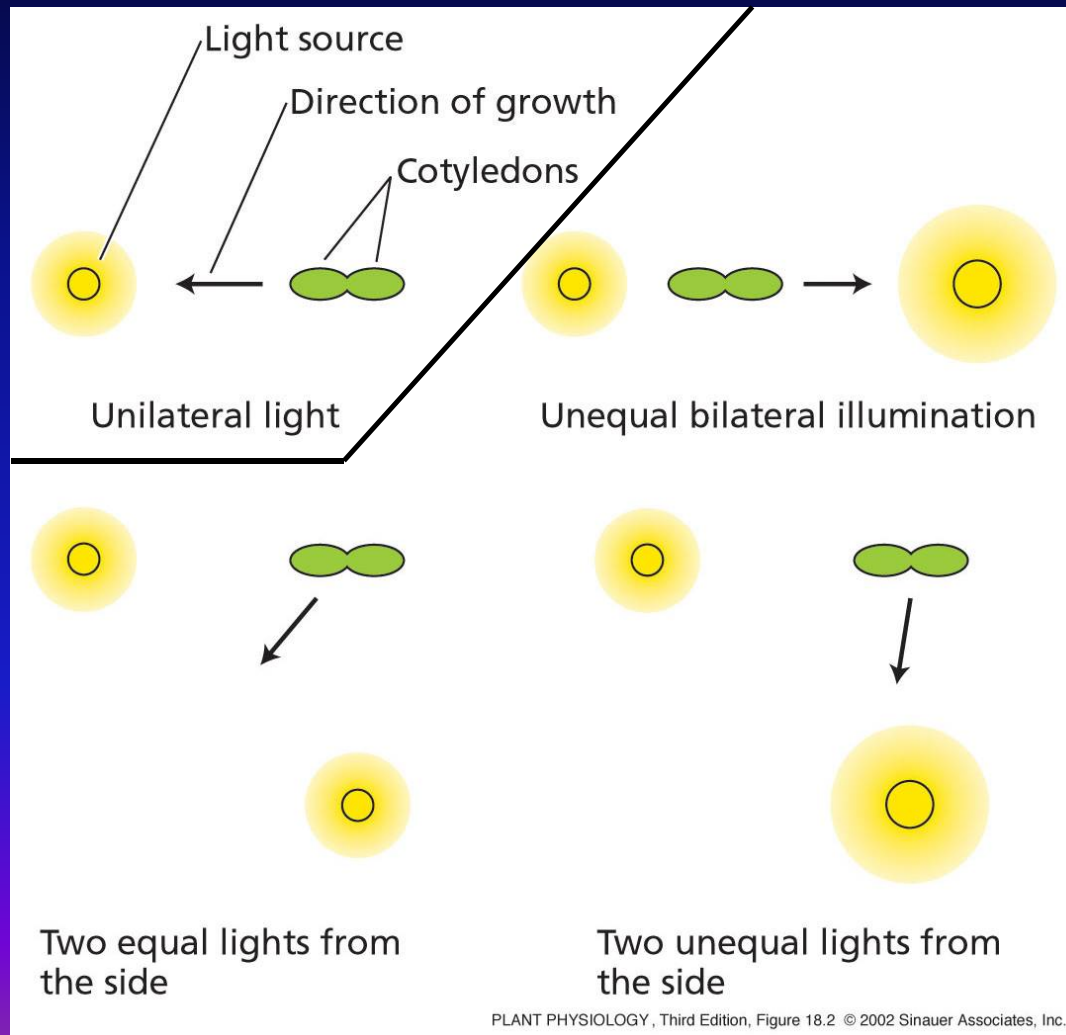
Akční spektrum - graf, který vyjadřuje závislost intenzity pozorované reakce na vlnové délce světla



Akční spektrum pro fototropismus



1) Fototropismus – asymetrický růst směrem ke světlu

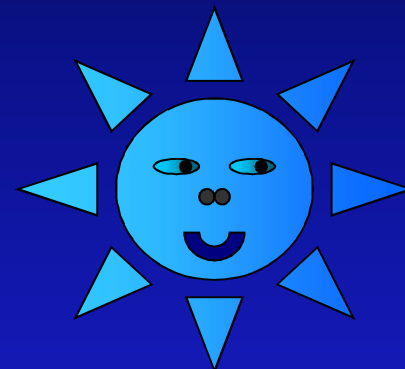
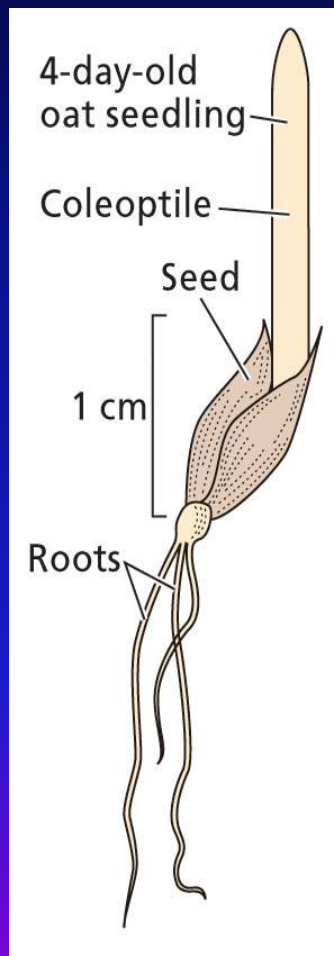


- houby

- kapradiny

- vyšší rostliny

Koleoptile (coleoptile) – modifikované listy u jednoděložných

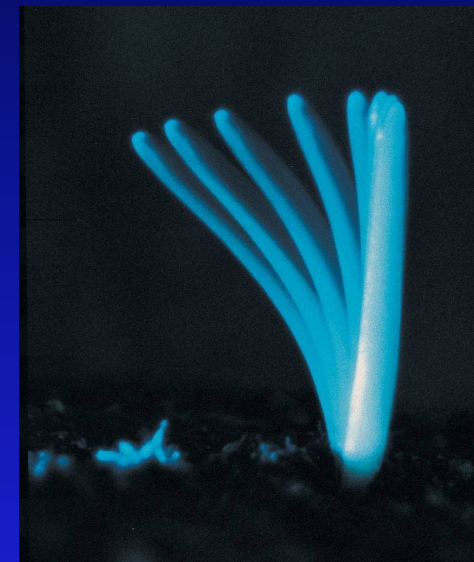


Auxinový gradient



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

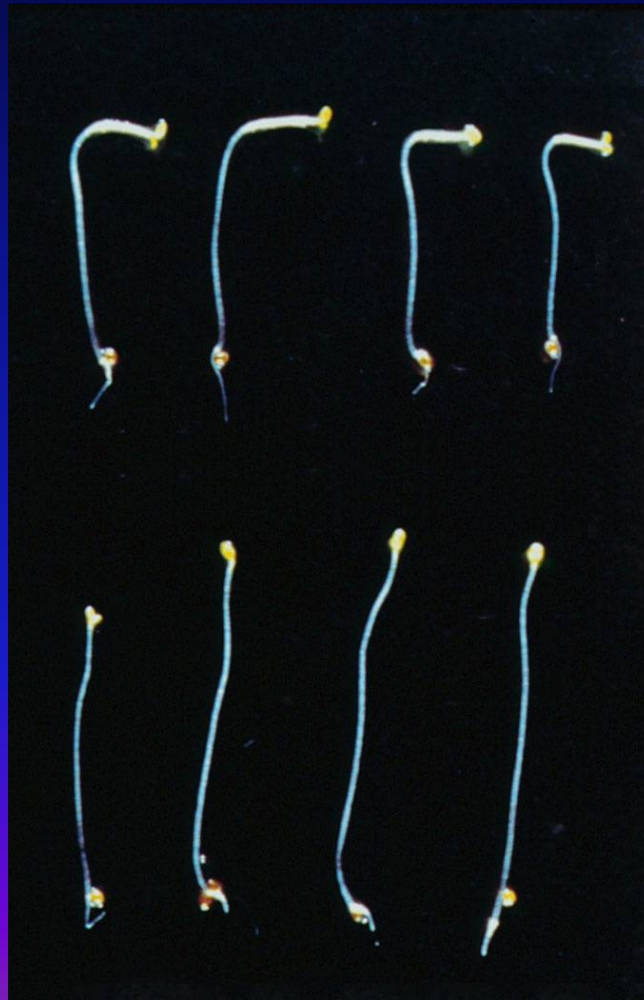
~ 180 minut



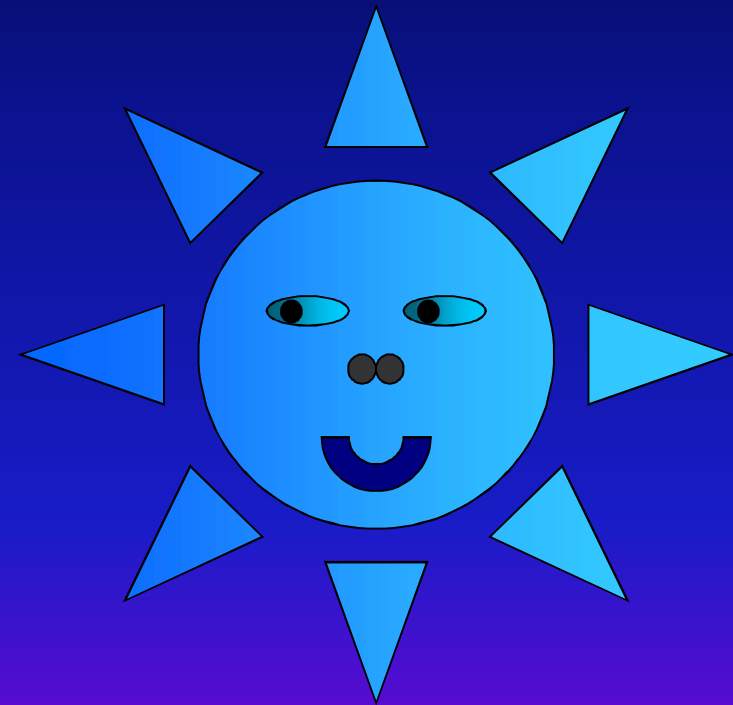
Zakřivení koleoptile

Arabidopsis mutant *phot1* s defektem ve fototropismu

WT

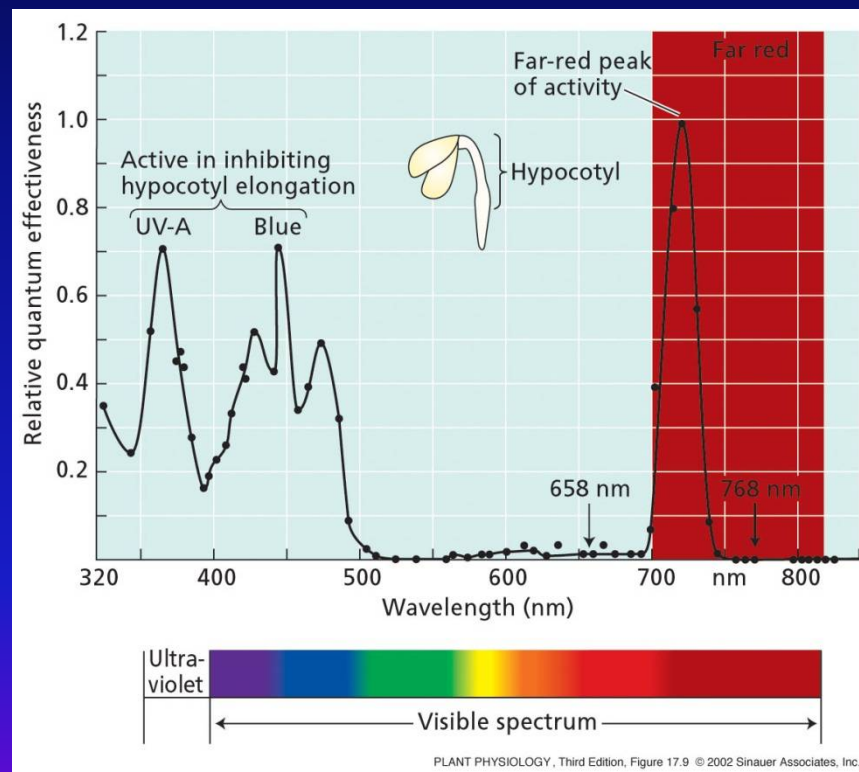


phot1

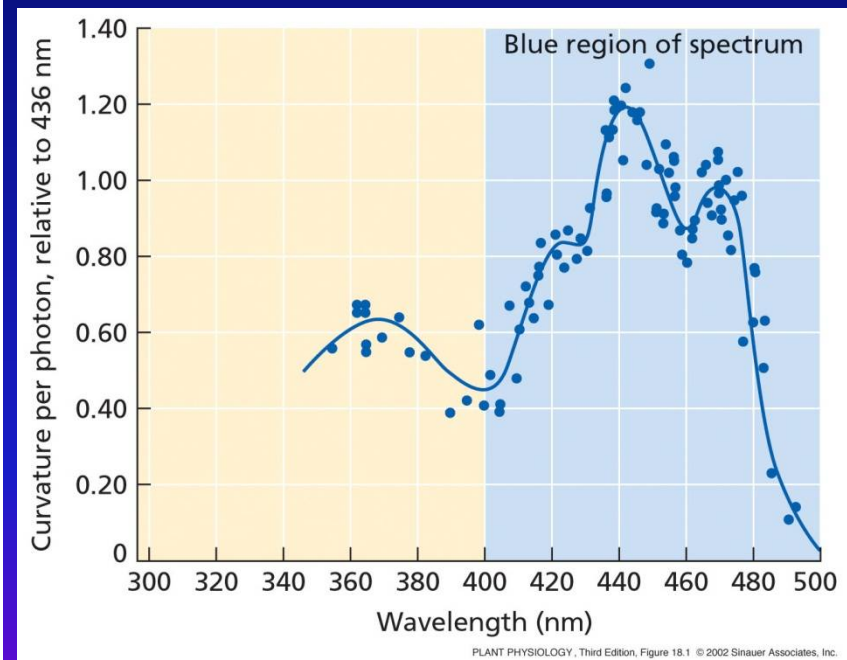


2) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu

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



**Akční spektrum pro inhibici růstu
etioloizovaných rostlin**



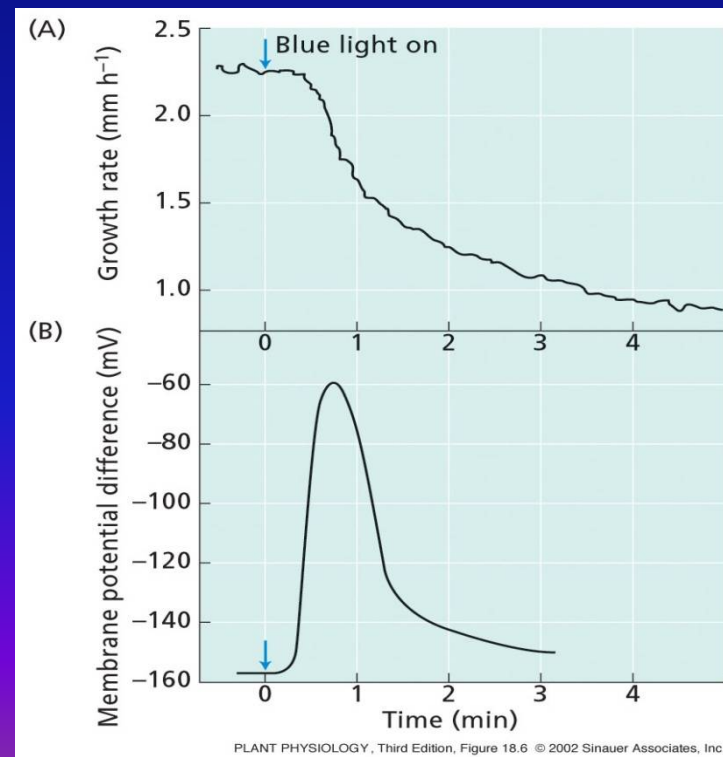
Akční spektrum pro fototropismus

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

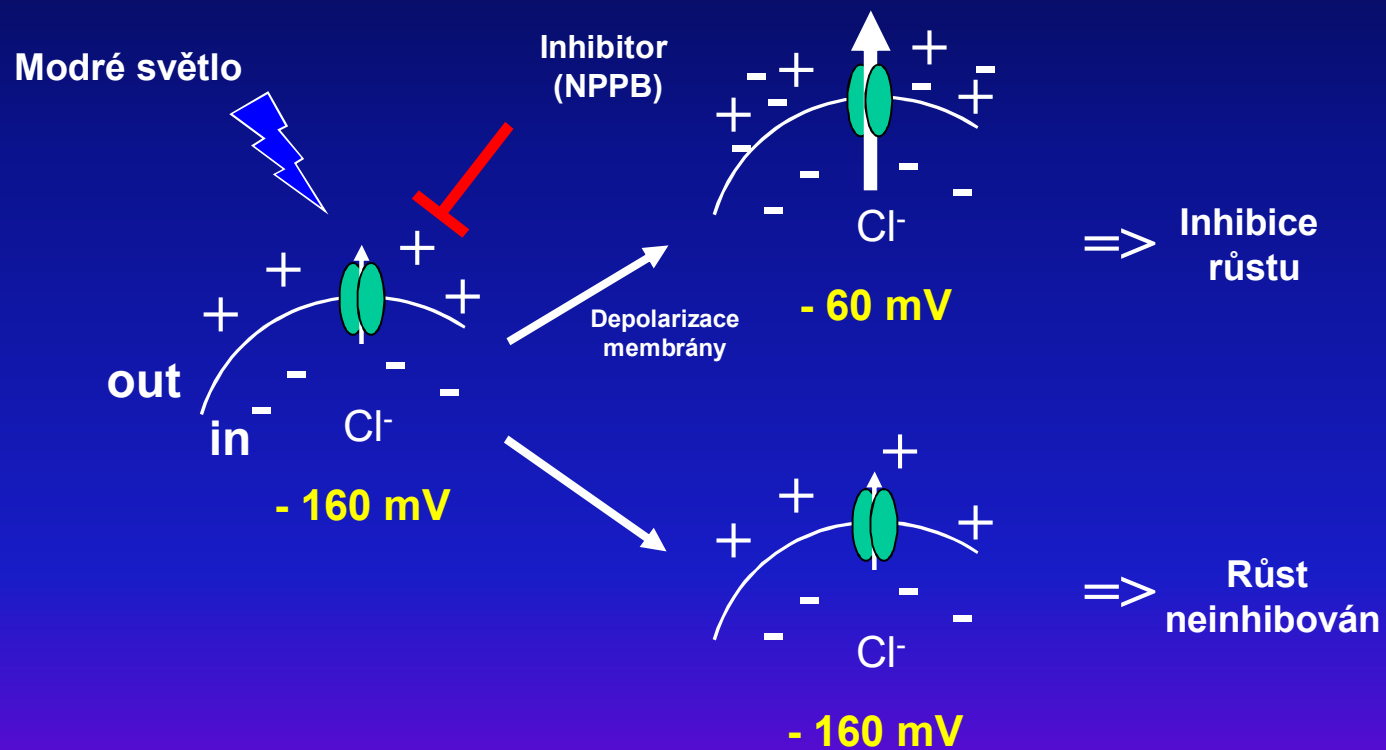
1) Aplikace silného žlutého světla => saturevaná inhibice růstu ~ 50%, stabilní Pr:Pfr. Následná aplikace slabého modrého světla => další inhibice růstu specificky zprostředkovaná fotoreceptory pro modré světlo.

2) Změna v rychlosti růstu hypokotylu zprostředkovaná fitochromy ~ 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 *S/G* je aktivováno nespecificky 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)

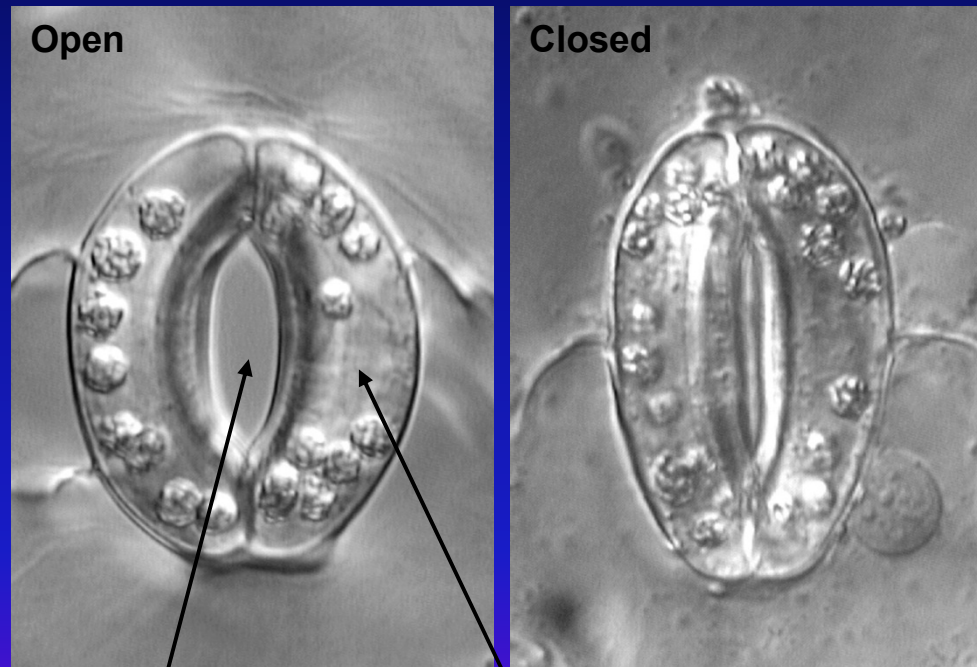
Průduchy hrají hlavní regulační roli ve výměně plynů v listech

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

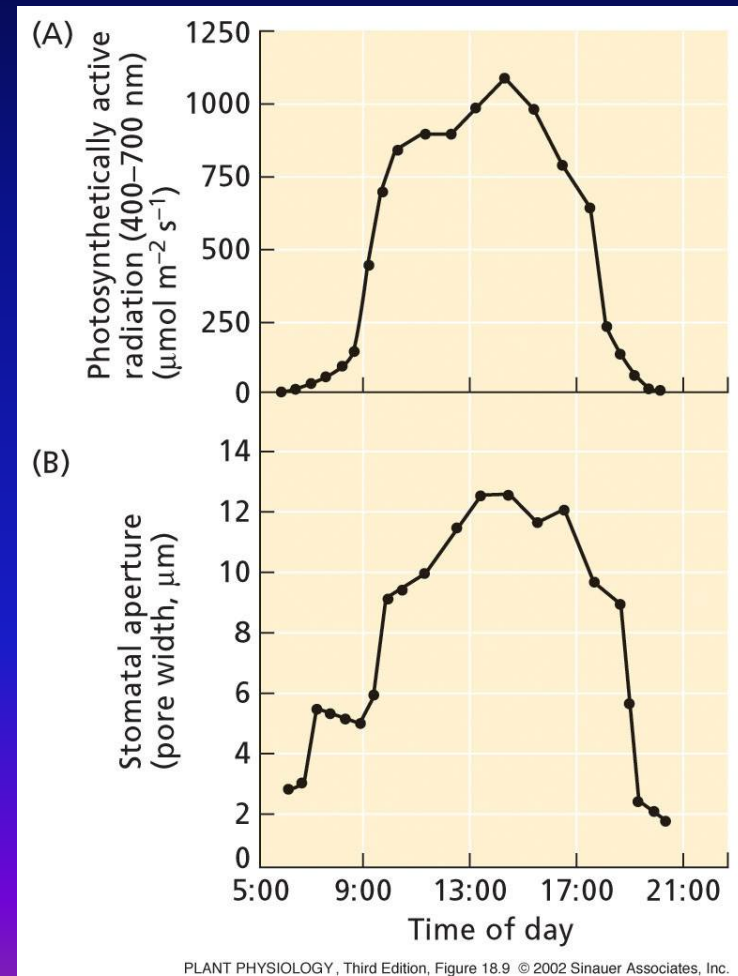
Světlo je dominantní faktor regulující otevírání a zavírání stomat dopadem na epidermální buňky listu.

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 světle indukovaném otevírání stomat

+

Nefotosyntetická složka stomatální reakce ke světlu

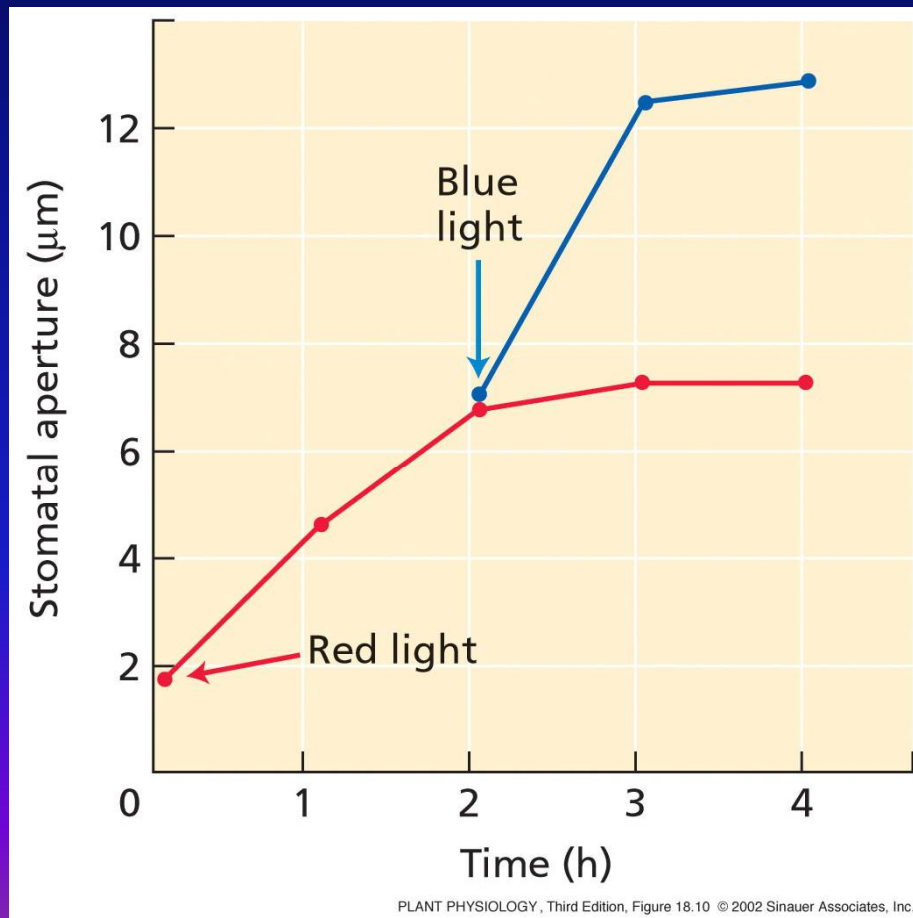


Světlo aktivuje dvě výrazné reakce svěracích buněk:

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

Specifická stomatální reakce

Modré světlo způsobuje současně fotosyntetickou a specifickou nefotosyntetickou reakci

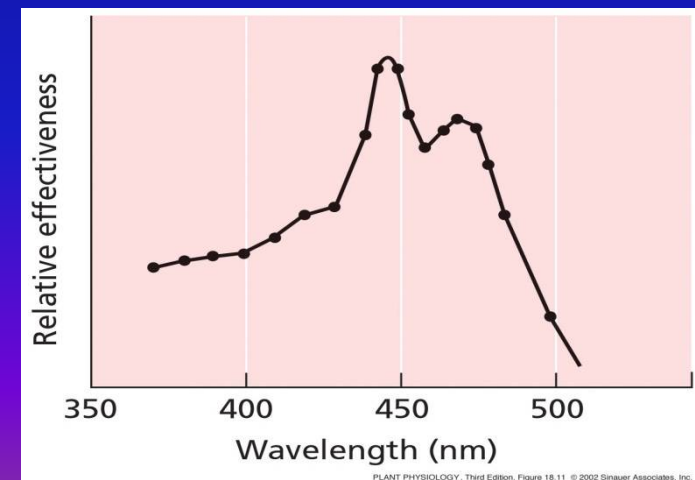


1) Saturace fotosyntetické reakce
silným červeným světlem => částečné
otevření stomat

2) Aplikace slabého modrého světla



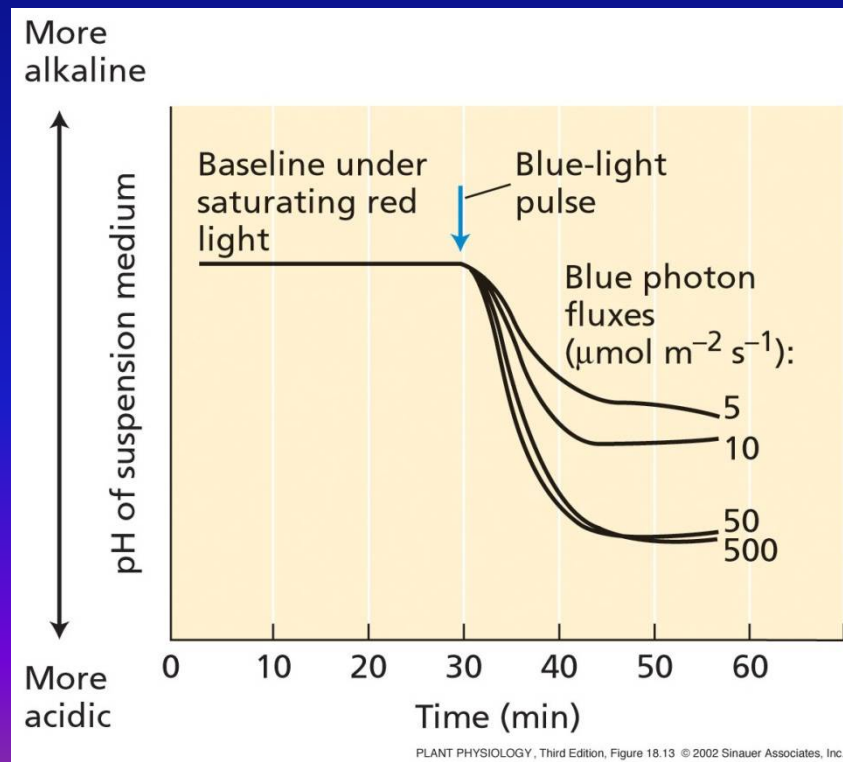
**Další, nefotosyntetické, otevření stomat
vyvolané modrým světlem**



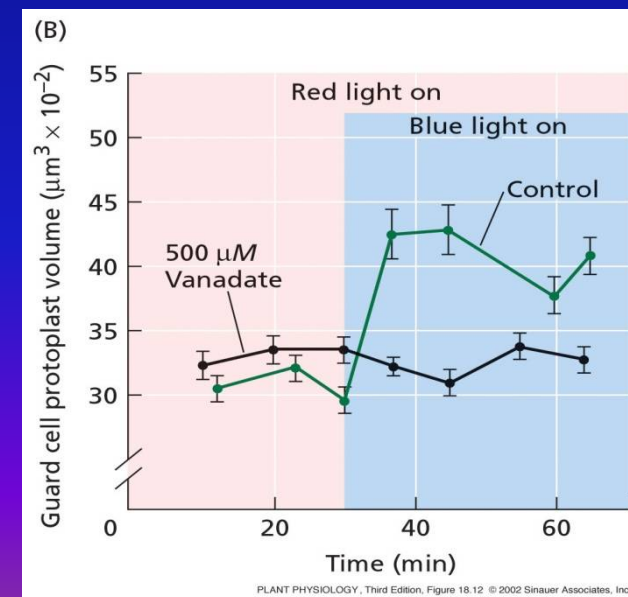
Mechanismus otevírání průduchů indukovaného modrým světlem – aktivace protonové pumpy (H^+ -ATPase)

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

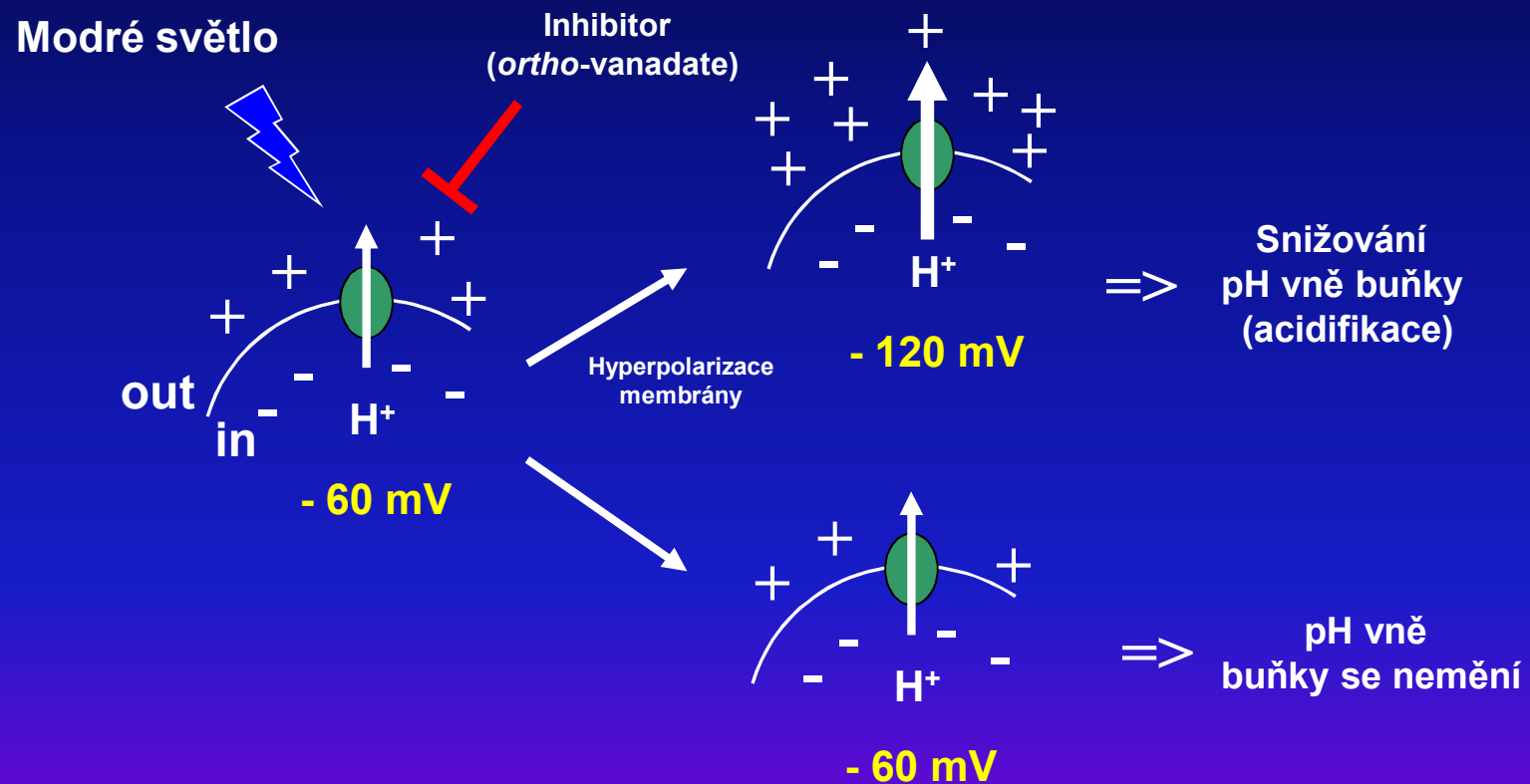
Acidifikace může být blokována aplikací CCCP (blokátor tvorby pH gradientu) nebo vanadatem (inhibitor protonové pumpy)



Acidifikace je způsobena aktivací protonové pumpy modrým světlem



Aktivace protonové pumpy modrým světlem



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

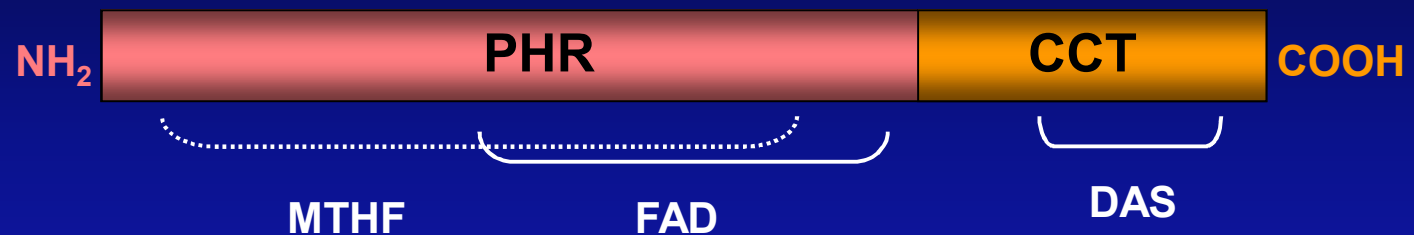
Christie JM et al. (2015) Plant Cell Physiol 56: 401-413

Review o fotoreceptorech.

Kryptochromy (cryptochromes)

Arabidopsis mutant *hy4* – hypokotyl není inhibován modrým světlem

Gen *HY4* => protein, monomer 75 kDa

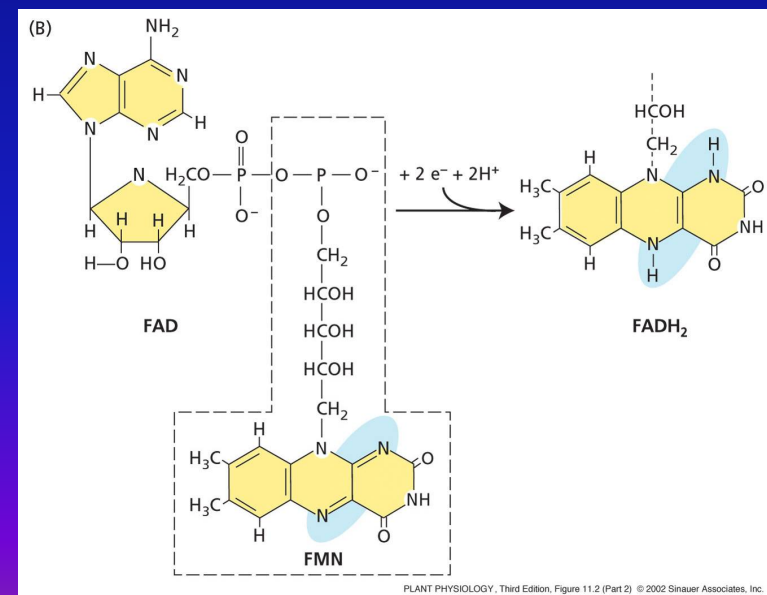


PHR = Photolyase-related doména; N-terminální doména; homologní k DNA fotolyáze; váže dva typy chromoforu:

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)



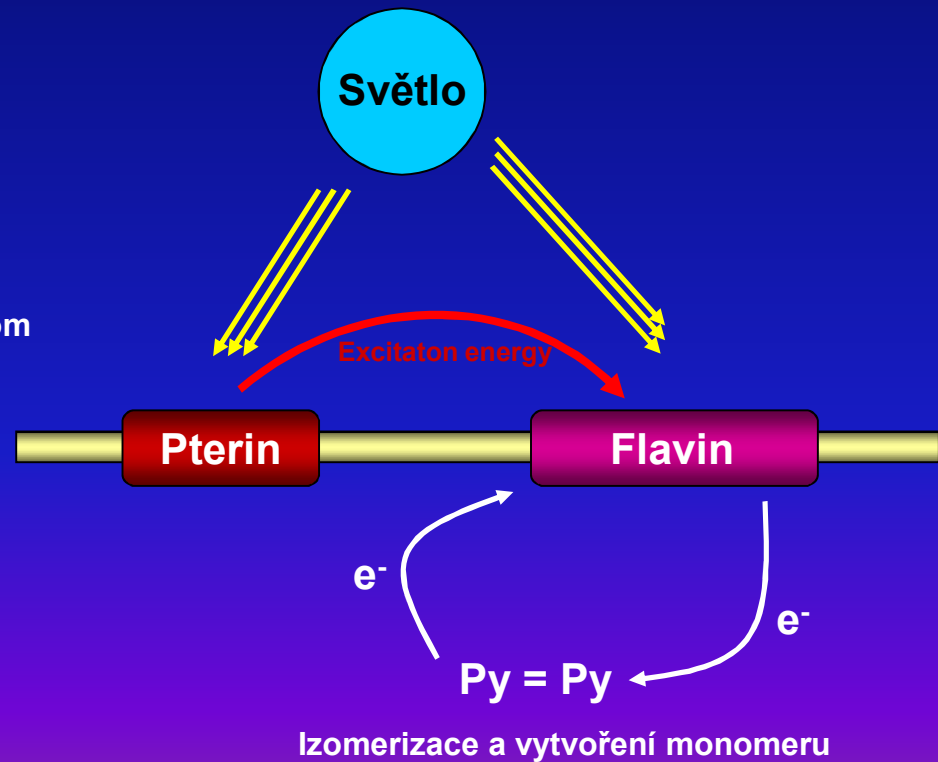
Exprese *HY4* v *Echerichia coli* – chybí fotolyázová aktivita

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.

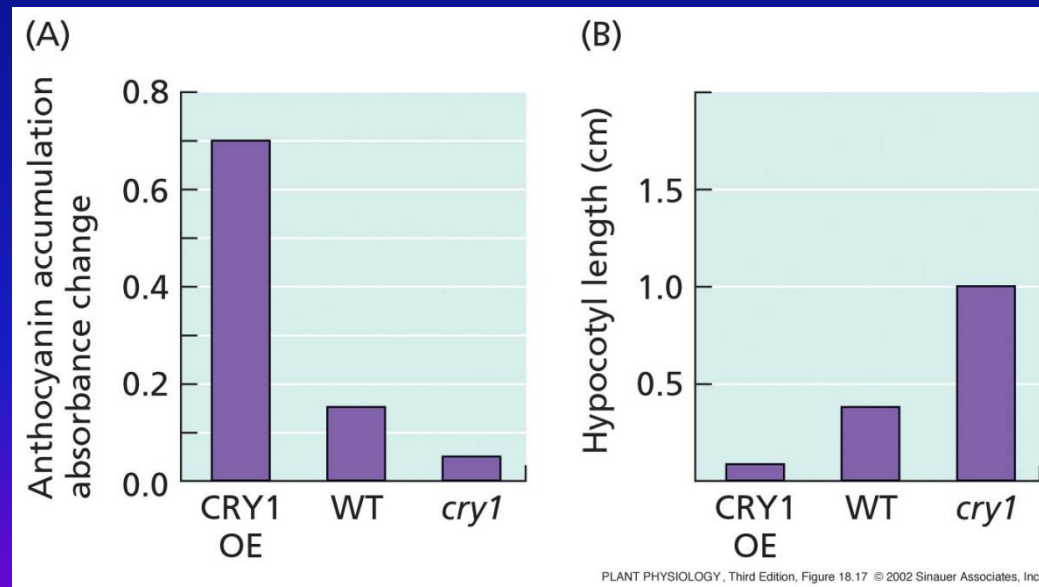
↓
Odlišné funkce těchto proteinů



**HY4 = CRY1 (CRYPTOCHROME 1) – kóduje fotoreceptor modrého světla;
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.

Fototropiny (phototropins)



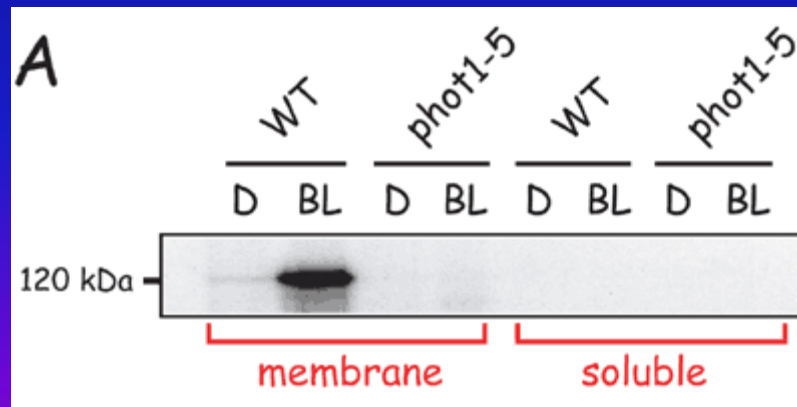
Winslow Russel Briggs († 11.2. 2019)



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)

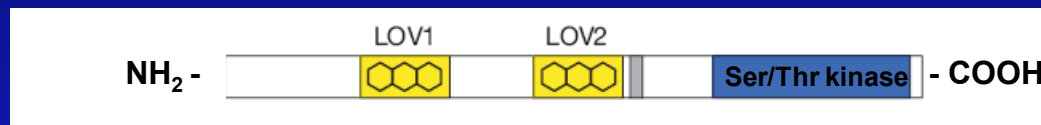


Struktura

(1997-1998)

Struktura PHOT1

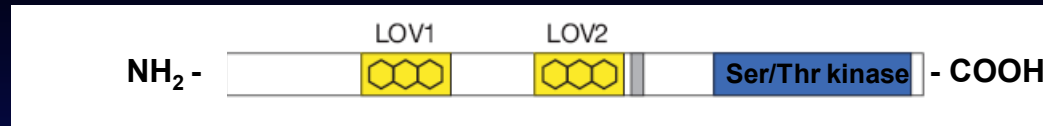
- 966 aminokyselin
- hydrofilní protein; připojený k membráně – mechanismus není znám
- C-terminální část – 11 typických domén v serine/threonine kináze
- N-terminální část – 2 opakující se domény LOV1, LOV2; každá 110 aminokyselin;



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

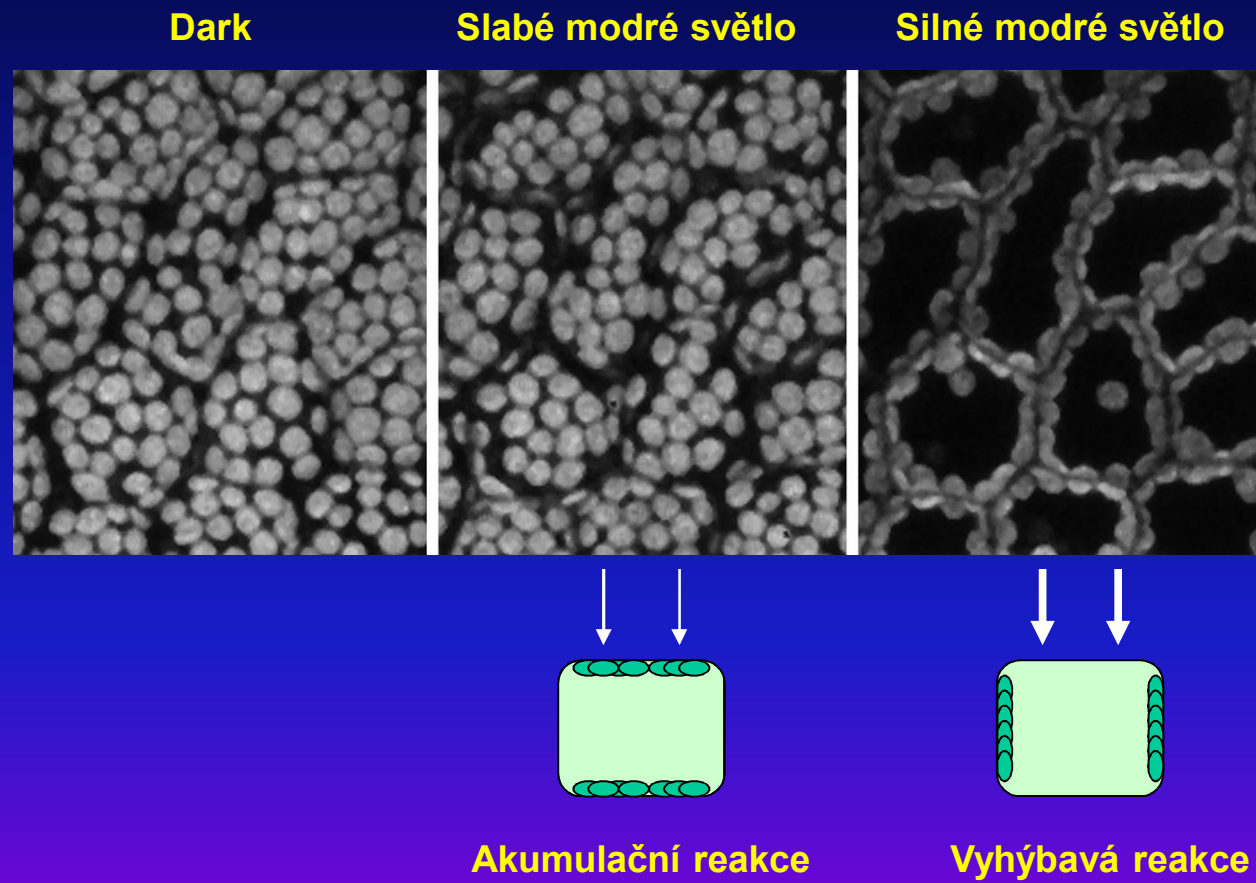
Mutant *phot1/phot2*:

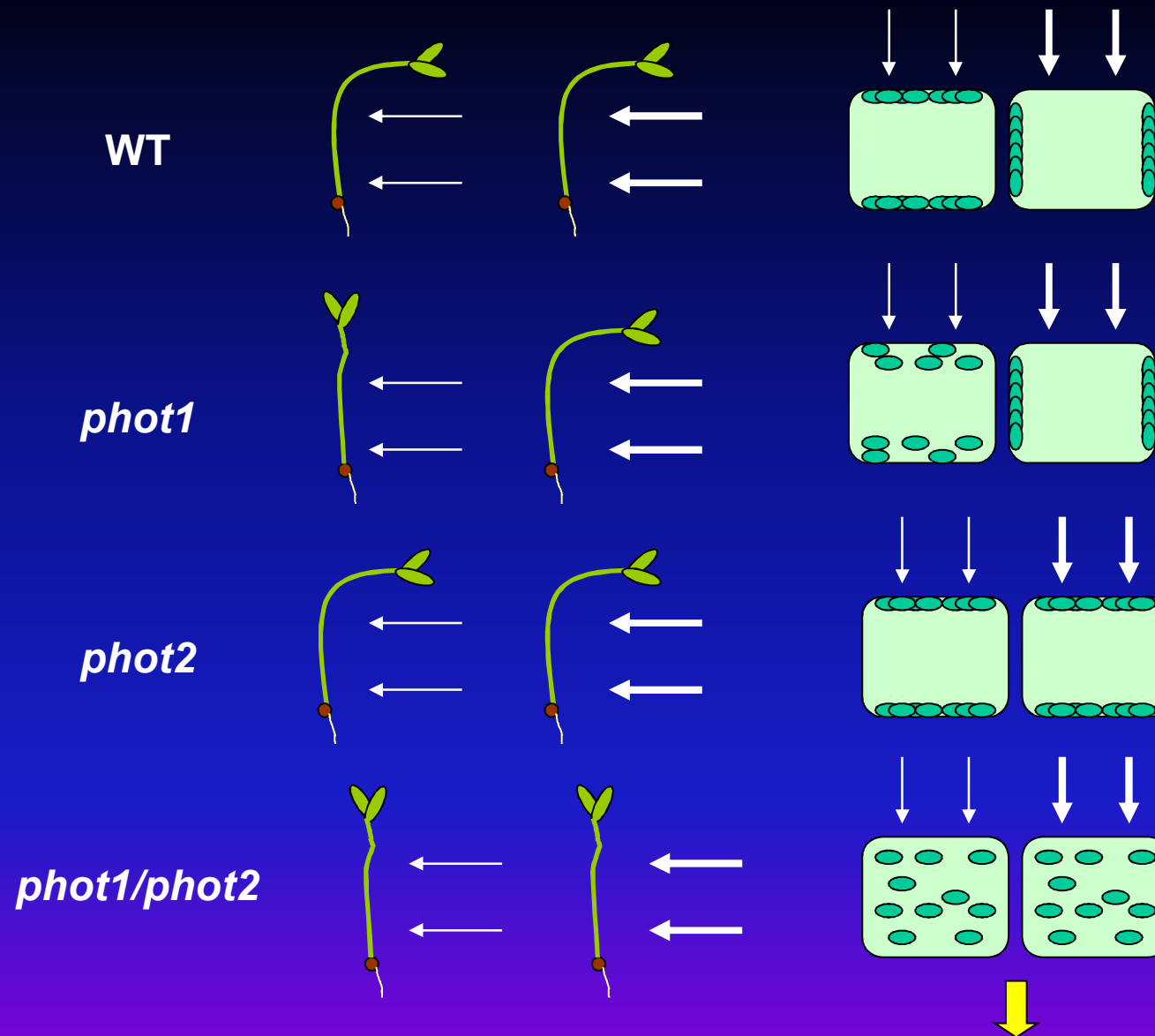
- nereaguje fototropicky k modrému světlu obou intenzit



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

Fototropiny hrají roli v pohybu chloroplastů

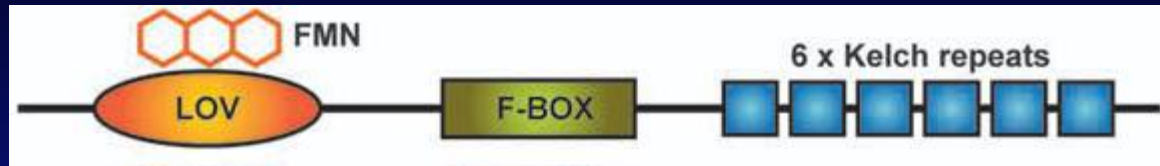




Podle:
Briggs WR, Christie JM (2002) TIPS 7: 204-210

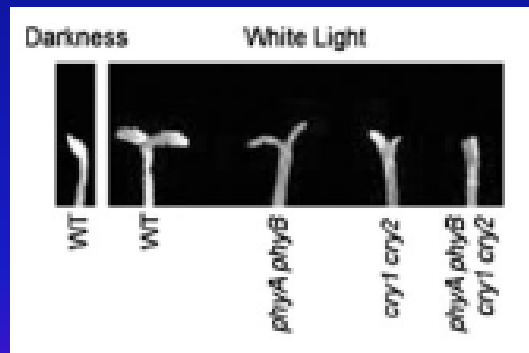
***PHOT2* hraje roli ve vyhýbavé reakci**
Oba geny, *PHOT1* a *PHOT2* hrají roli v akumulární reakci

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!!!



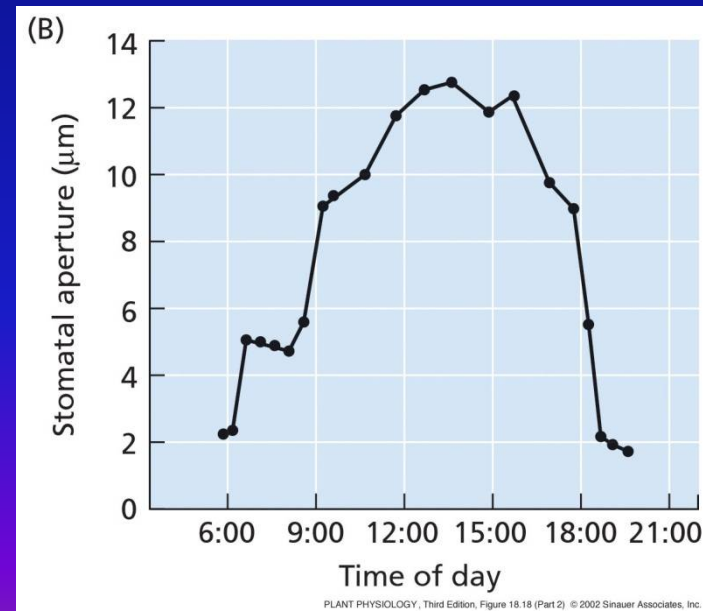
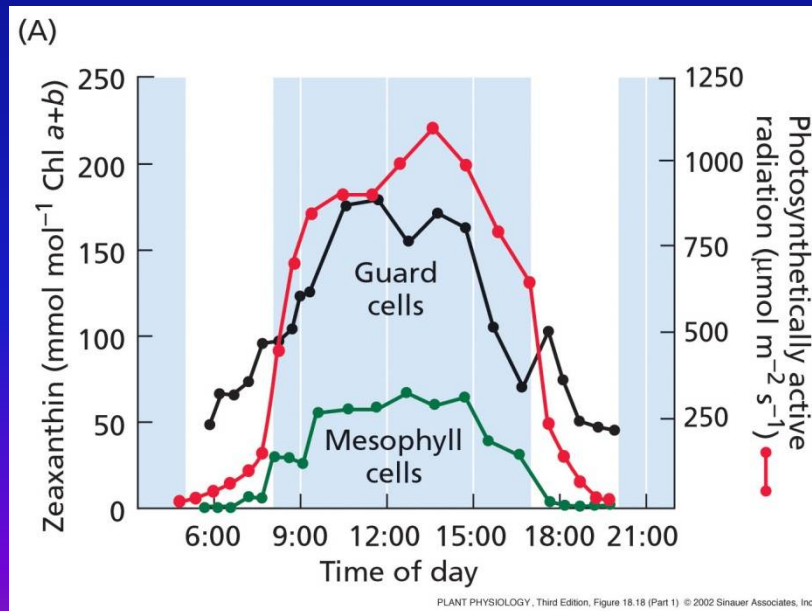
Nový receptor ZEITLUPE zprostředkuje tuto expresi a reakce denního cyklu – moduluje akumulaci proteinu TOC1 (viz [SFR3c-d](#)), který je klíčovým proteinem v regulaci denního rytmu.

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

Zeaxantin (zeaxanthin)

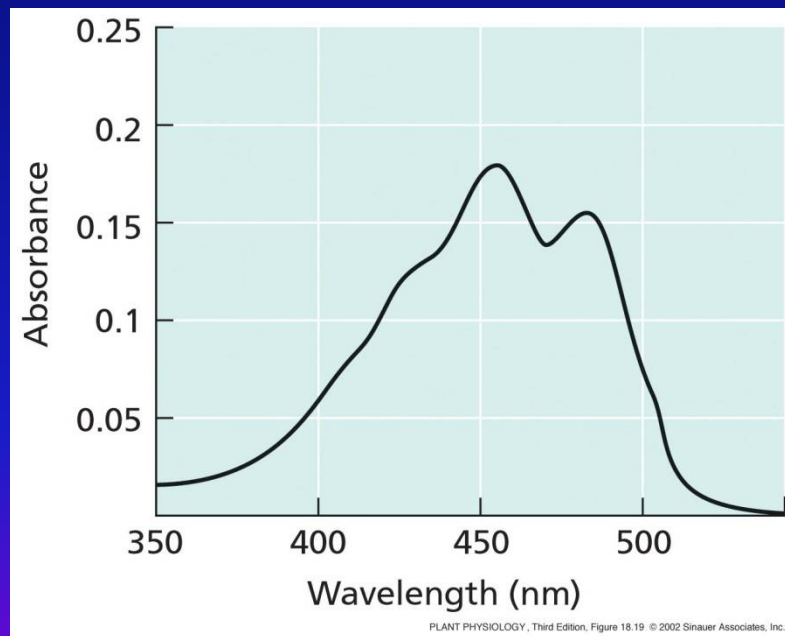
Zeaxantin – karotenoid; komponenta xantofylového cyklu v chloroplastech mezofylových buněk - chrání fotosyntetické pigmenty před nadměrným světlem.

Zeaxantin ve svěracích buňkách funguje jako receptor zprostředkující otevírání stomat

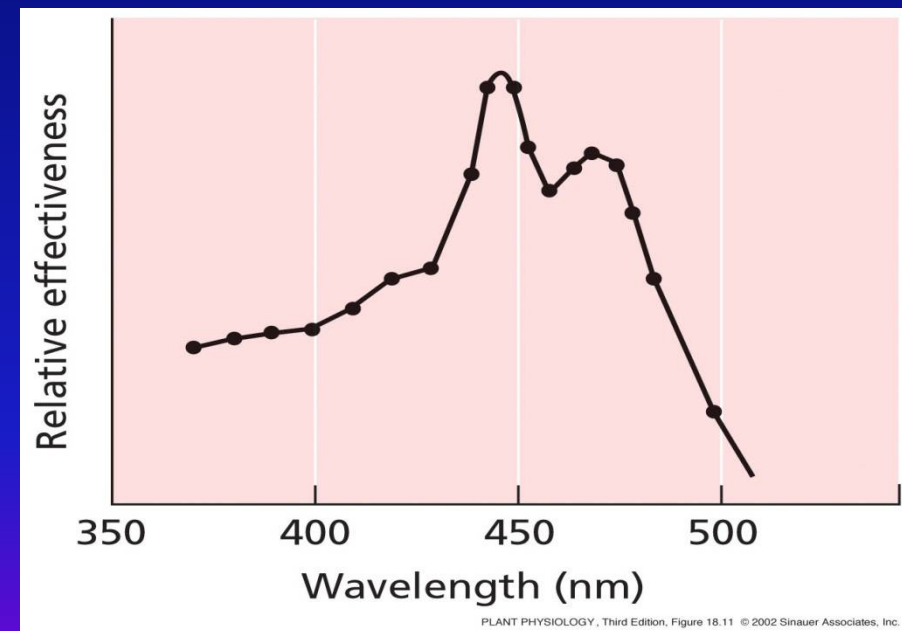


Důkazy potvrzující úlohu zeaxantinu jako fotoreceptoru ve stomatech:

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



Absorpční spektrum zeaxantinu

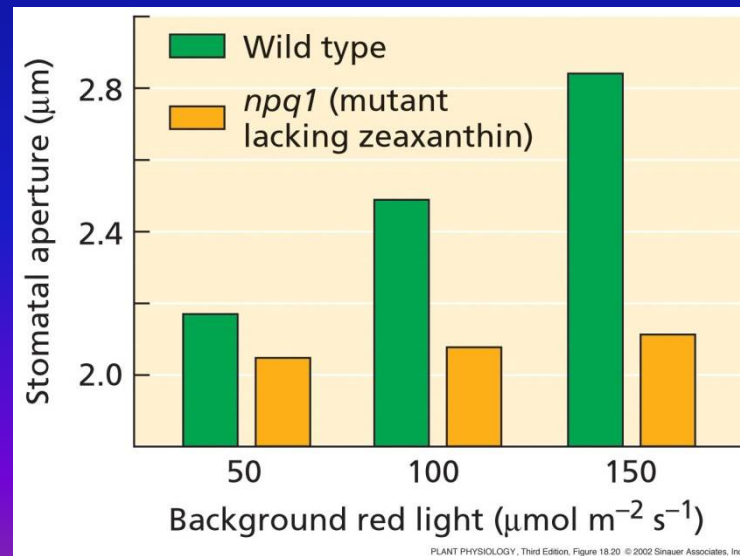


Akční spektrum otevírání stomat

- 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*)



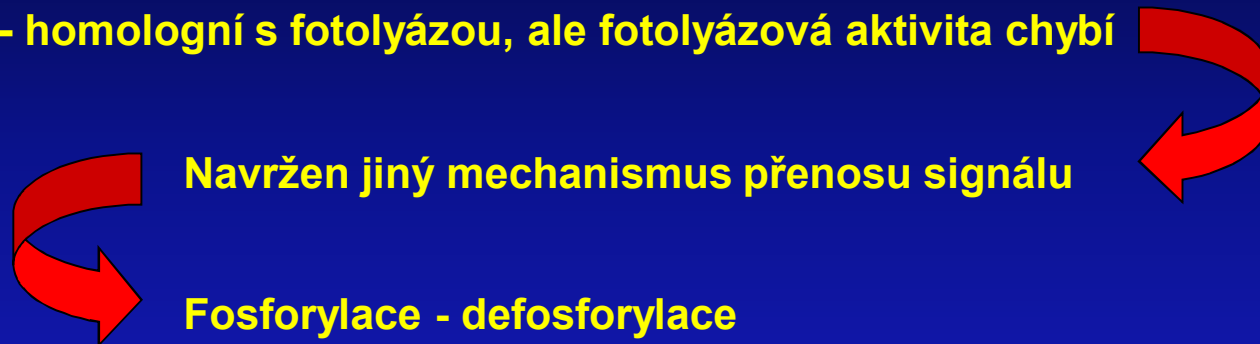
npq1 neakumuluje zeaxantin v chloroplastech
=> chybí specifické otevírání stomat
indukované modrým světlem

npq1 ukazuje pouze bazální otevírání stomat
indukované fotosyntézou

c) Přenos signálu

Signální dráhy zapojující kryptochromy

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

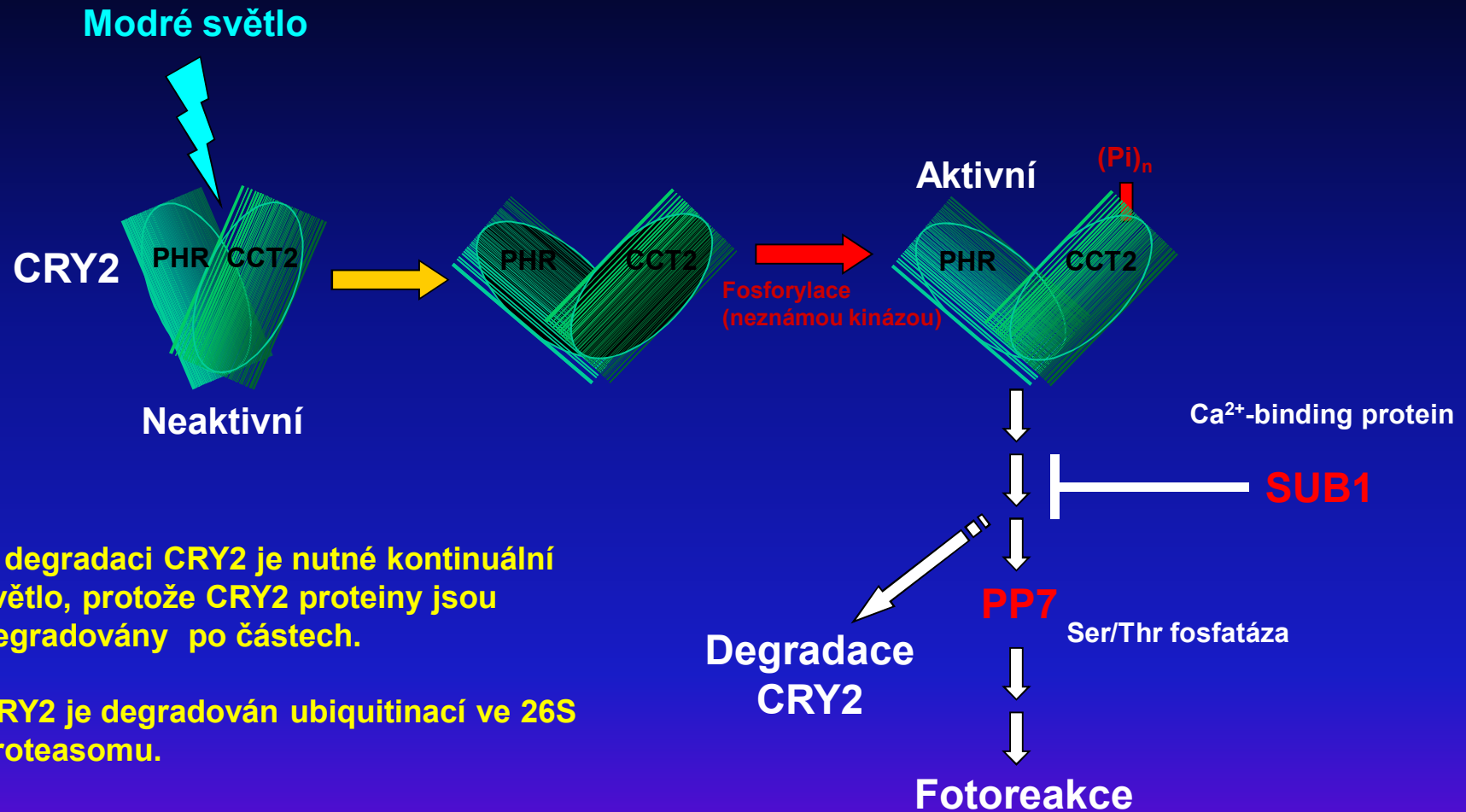


Fosforylace = připojení fosfátové skupiny k aminkokyselinovému zbytku nějakého proteinu

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



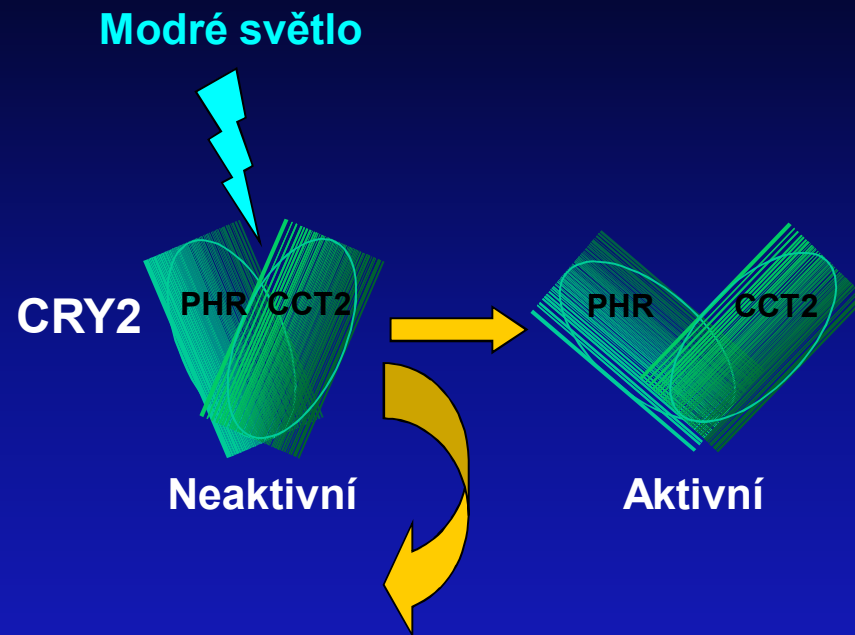
K degradaci CRY2 je nutné kontinuální světlo, protože CRY2 proteiny jsou degradovány po částech.

CRY2 je degradován ubiquitinací ve 26S proteasomu.

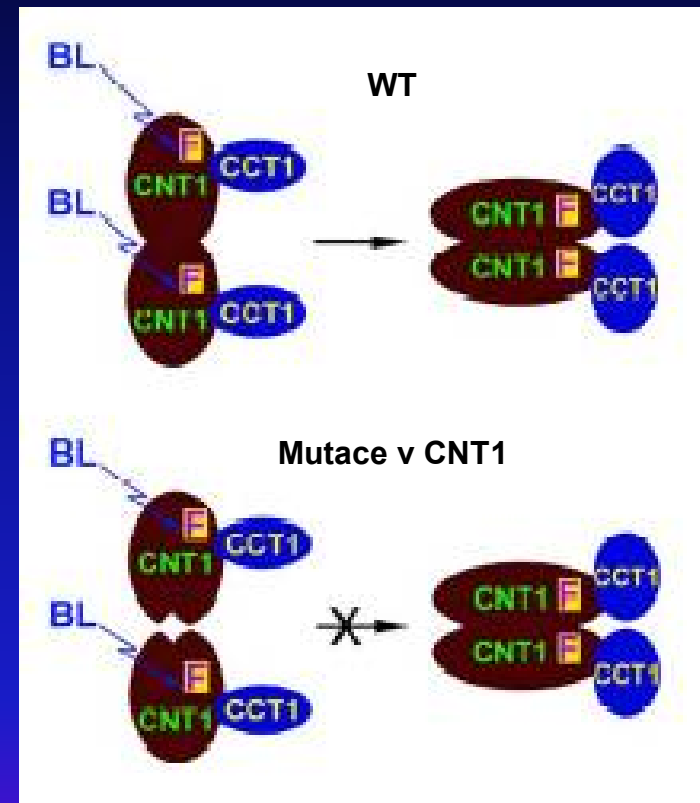
UPDATE 2016

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.

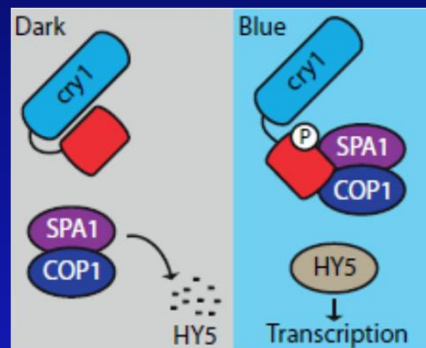


Sang et al. (2005) Plant Cell 17: 1569 - 1584

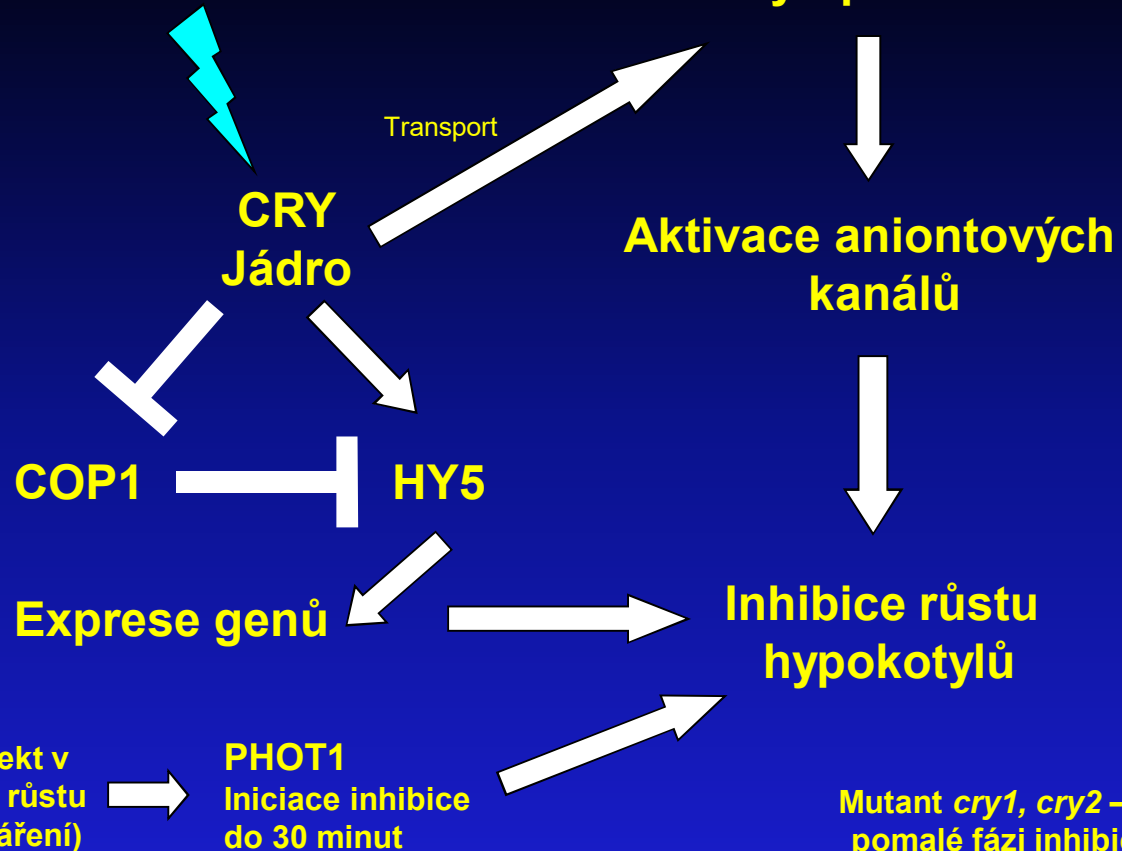
CRYs jsou akumulovány v jádře

CRY2 - nezávisle na světle

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



Modré světlo



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

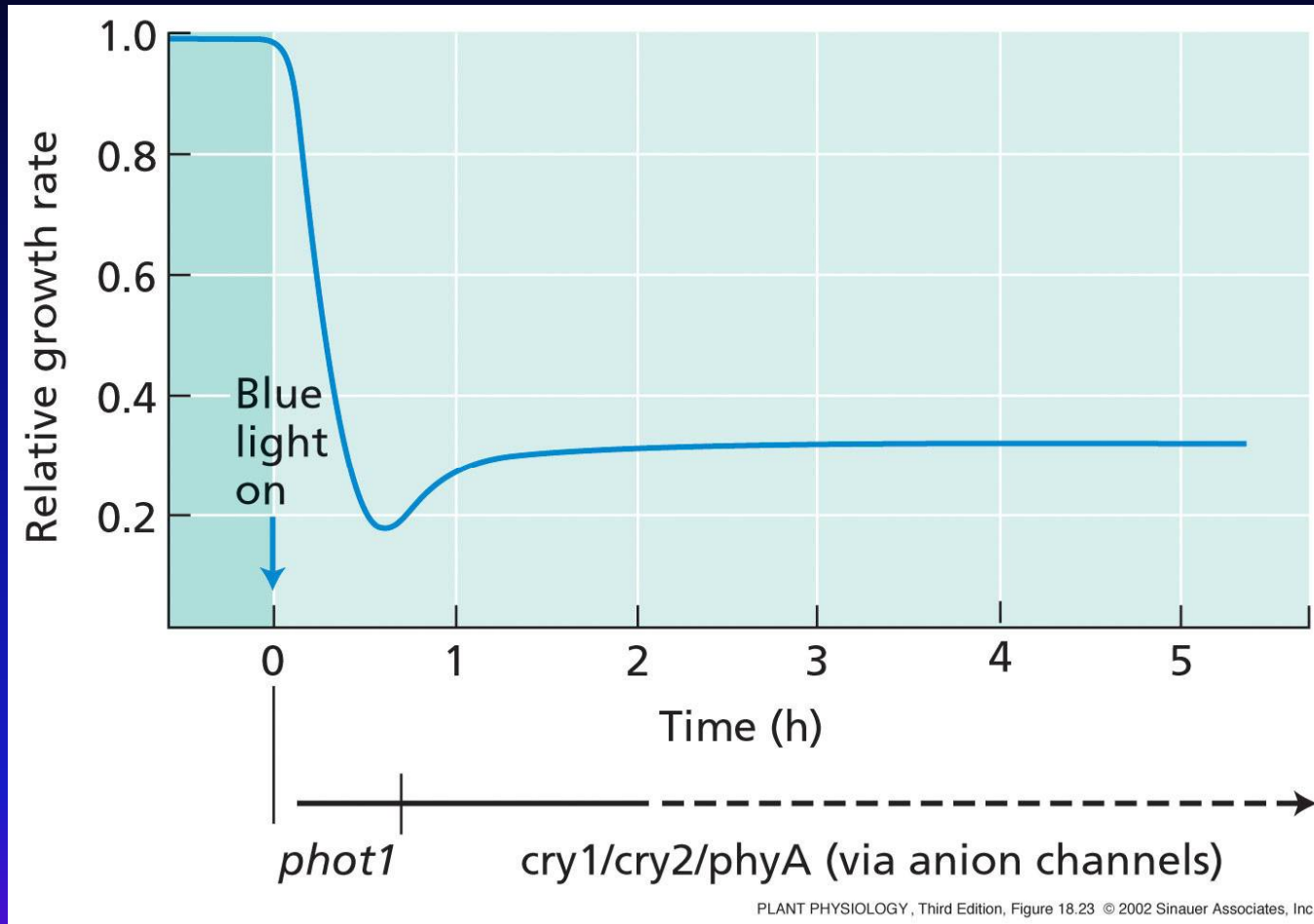
Zelené světlo stimuluje prodlužování => působí proti modrému světlu (viz blue/green reverzibilita u stomat)

UPDATE 2016

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

Review of mechanizmech signalizace prostřednictvím kryptochromů.

Inhibice růstu hypokotylu indukované modrým světlem

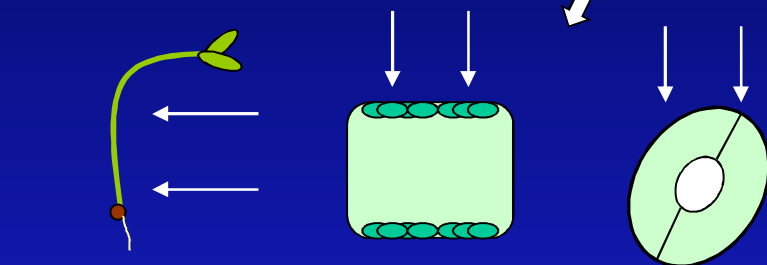
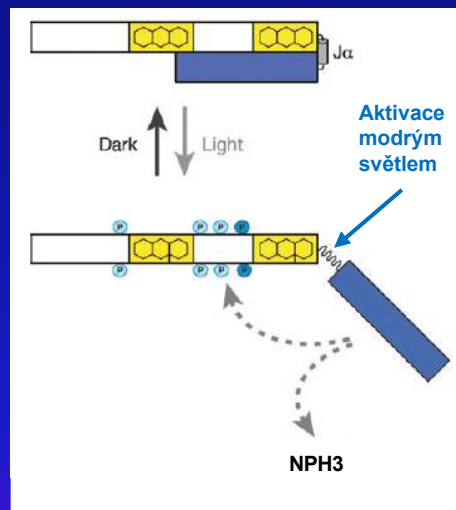
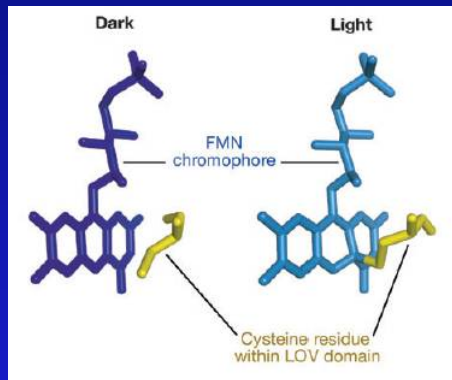
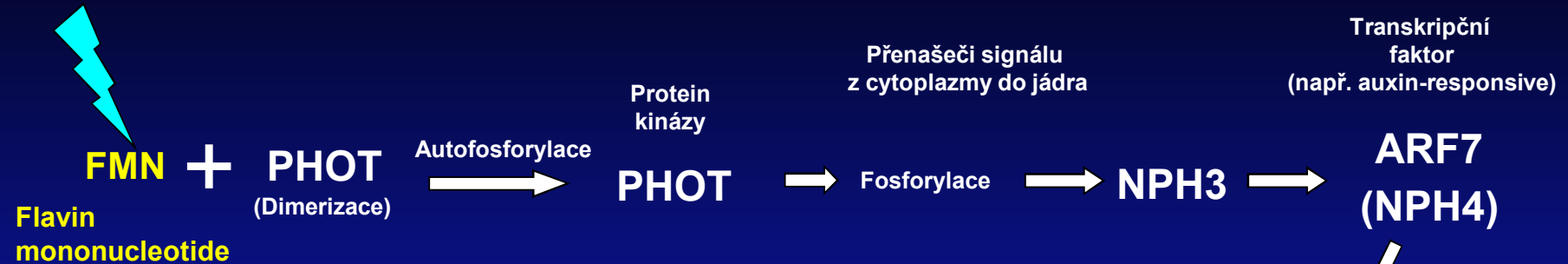


Ranná fáze zprostředkovaná *phot1* – minuty až 30 minut

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

Signální dráha fototropinů PHOT

Modré světlo

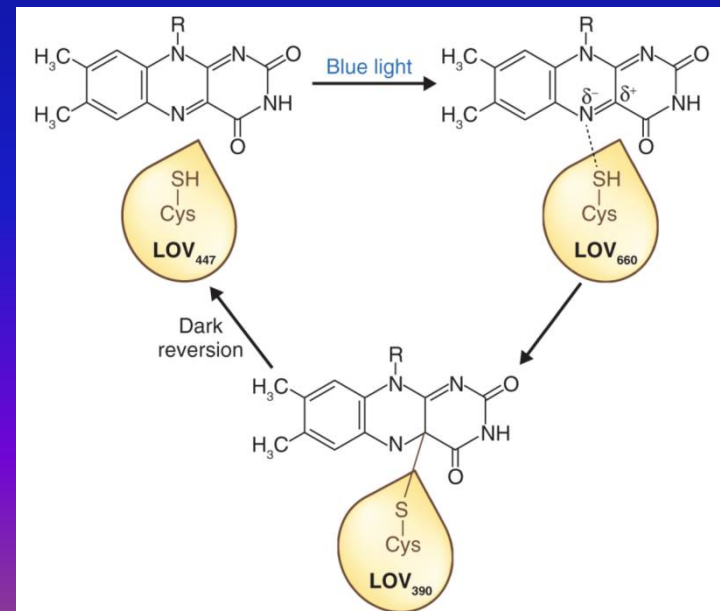


Klíčovou pro přenos signálu je autofosforylace na dvou konzervovaných Ser reziduích na C-terminální doméně (PHOT1: Ser-763 a Ser-85; PHOT2: Ser-761 a Ser 763). Ve tmě je PHOT defosforylován protein fosfatázou PP2A.

Update 2018

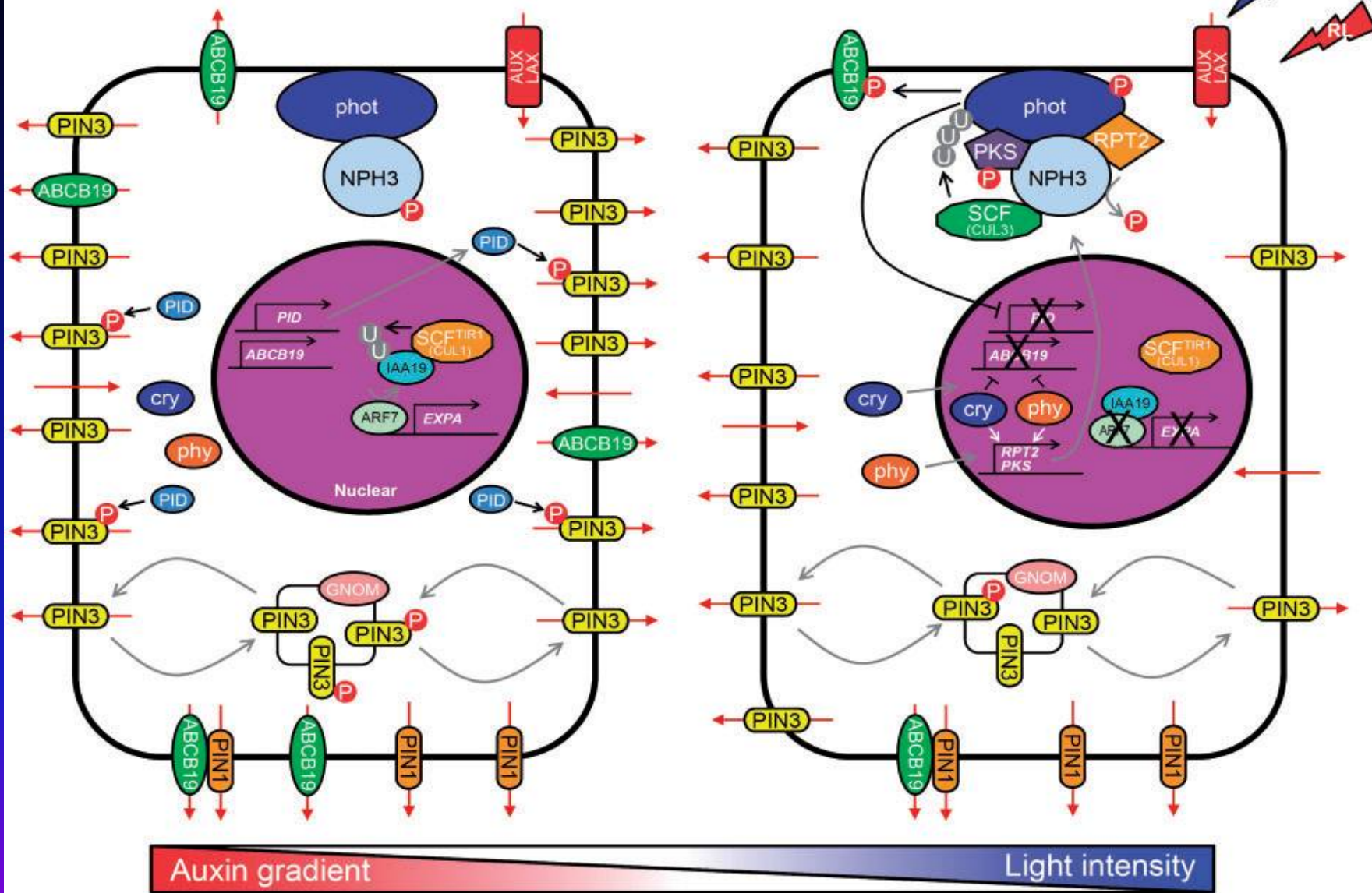
Christie JM (2018) Plant Physiology 176: 1015-1024

Nejnovější review o signalizaci prostřednictvím fototropinů.



Molekulární mechanismus fototropické reakce

40

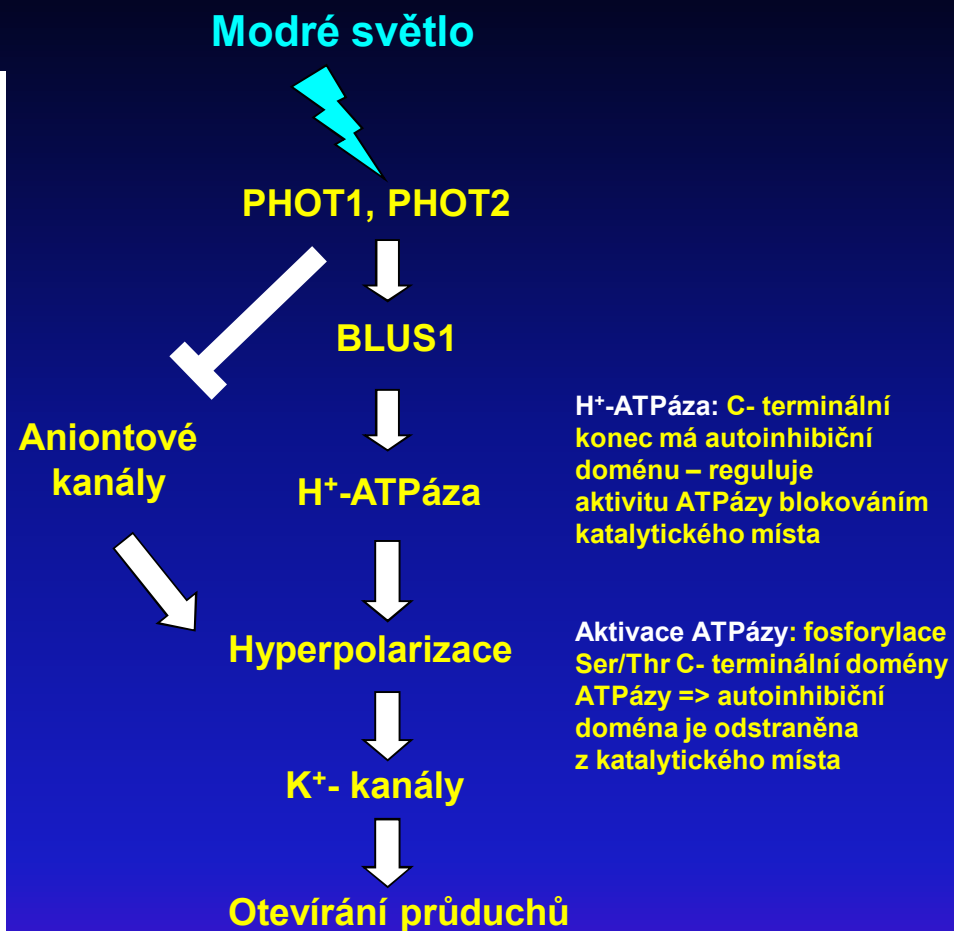
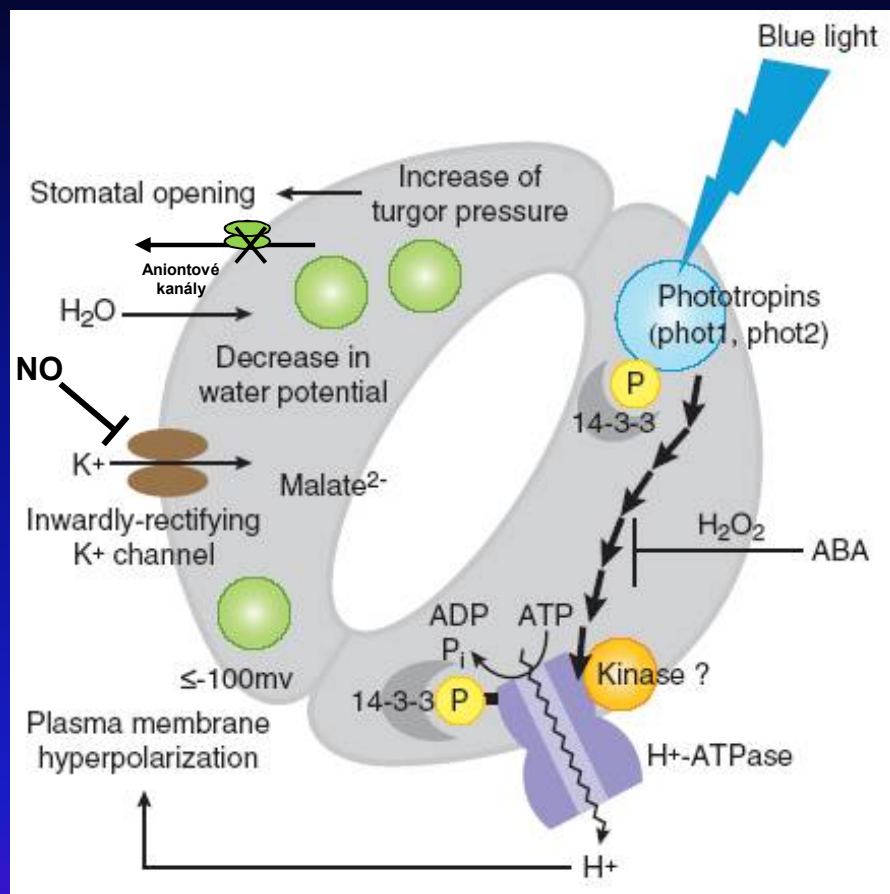


UPDATE 2012

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

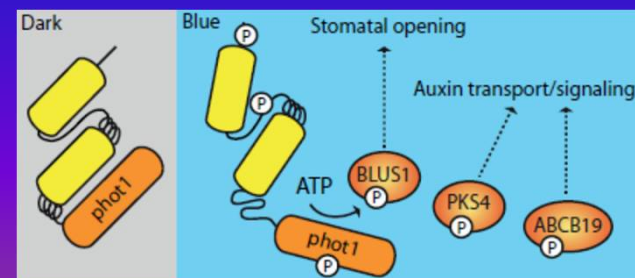
Otevírání průduchů prostřednictvím fototropinů PHOT1 a PHOT2

41



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