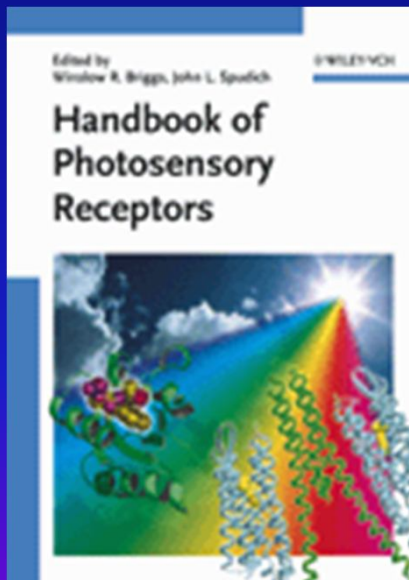


## 5) Reakce rostlin k modrému světlu

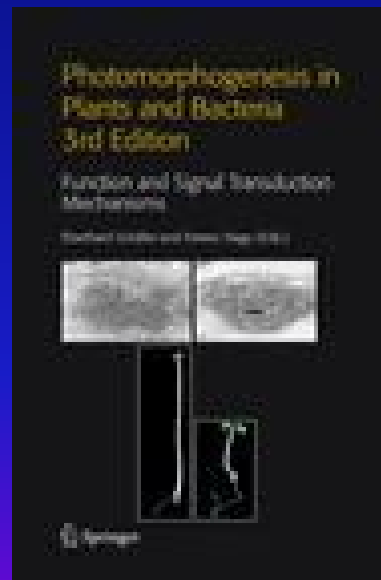
a) Fototropismus

b) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu

c) Stimulace otevírání průduchů (stomat)



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

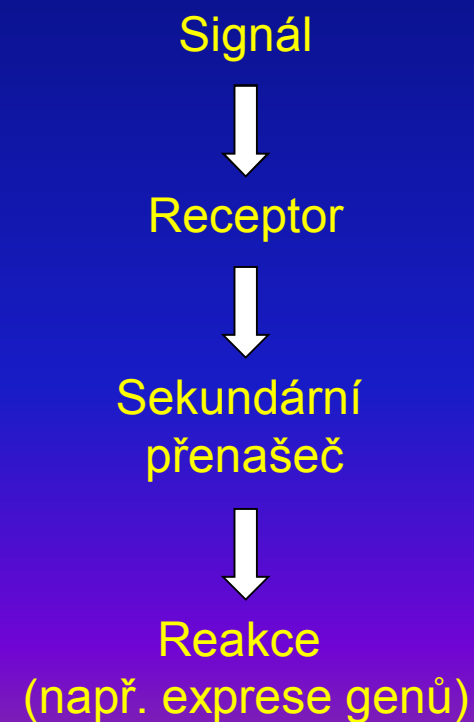
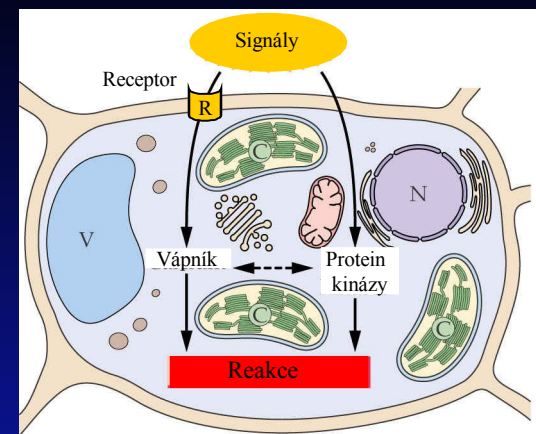
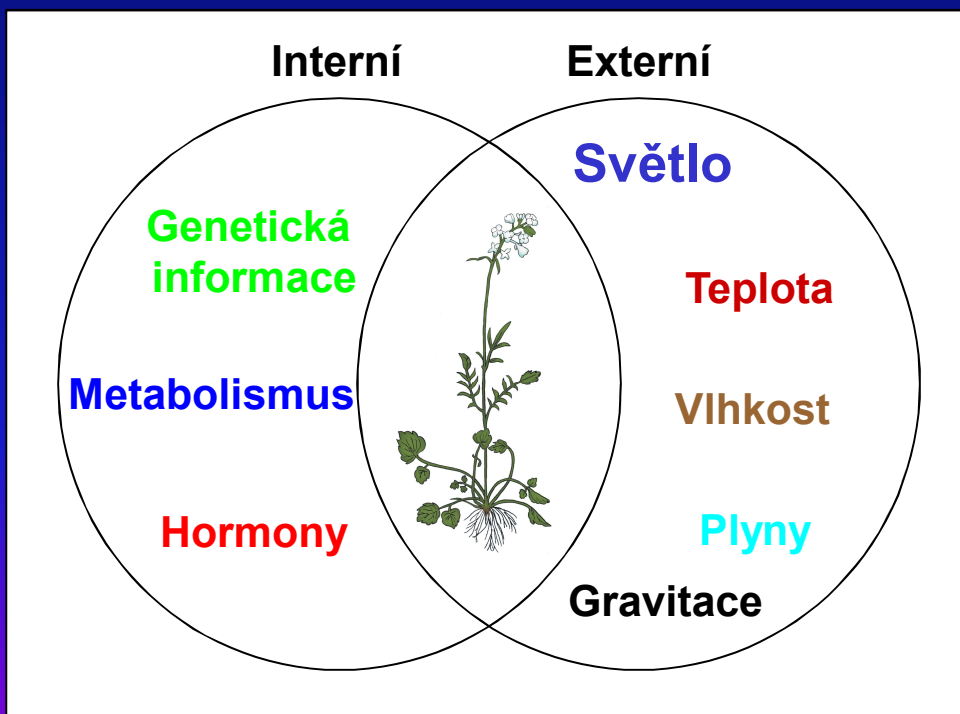


Schäfer E, Nagy F (eds) (2006)  
Photomorphogenesis in Plants  
and Bacteria, 3rd ed., Springer



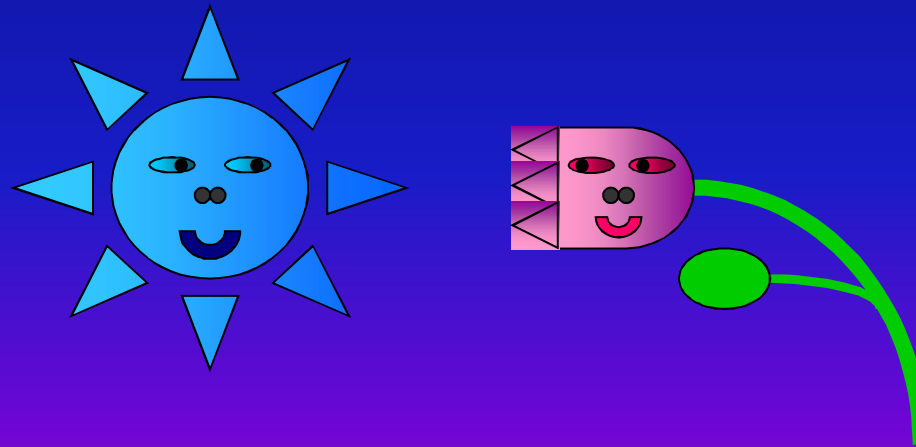
Whitelam GC, Halliday KJ (eds) (2007)  
Light and Plant Development  
Blackwell Publishing

## Vývoj a růst organismů jsou regulovány různými faktory



**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)

a) Fototropismus

b) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu

c) Stimulace otevírání průduchů

Aktivace genové exprese

Stimulace syntézy chlorofylu a karotenoidů

Fototaxe

Pohyb jádra **Update 2007:** Iwabuchi K et al. (2007) Plant Cell Physiol 48: 1291-1298

Změna polohy listů **Update 2008:** Inoue S et al. (2008) Mol Plant 1: 15-26

**Reakce rychlé** - sekundy (elektrické jevy na membráně)

**Reakce pomalé** - minuty, hodiny (stimulace biosyntézy pigmentů)

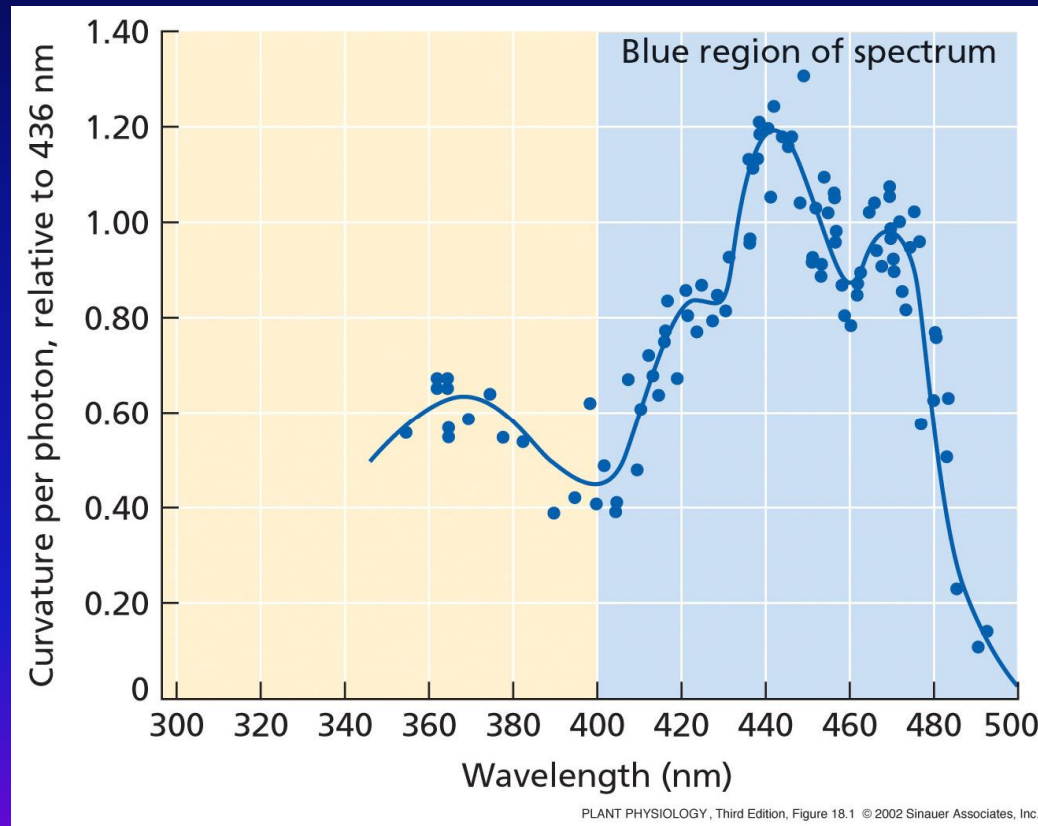
**Modré světlo je absorbováno specifickými receptory modrého světla, ale také fytochromy a chlorofylem**



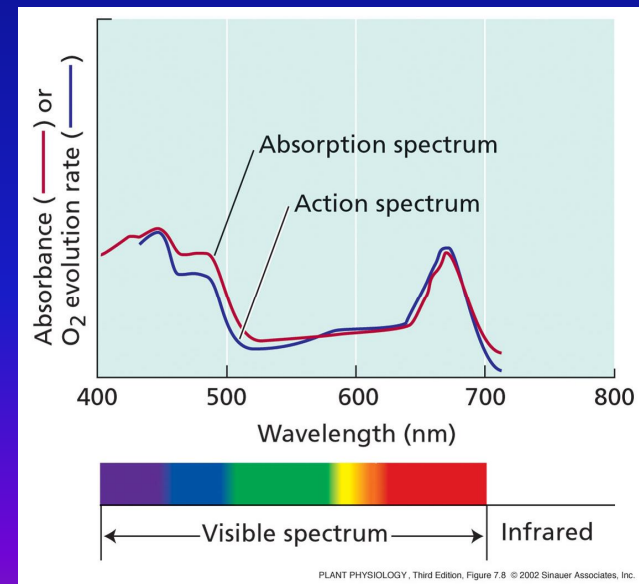
**Jak odlišit specifické reakce k modrému světlu?**

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

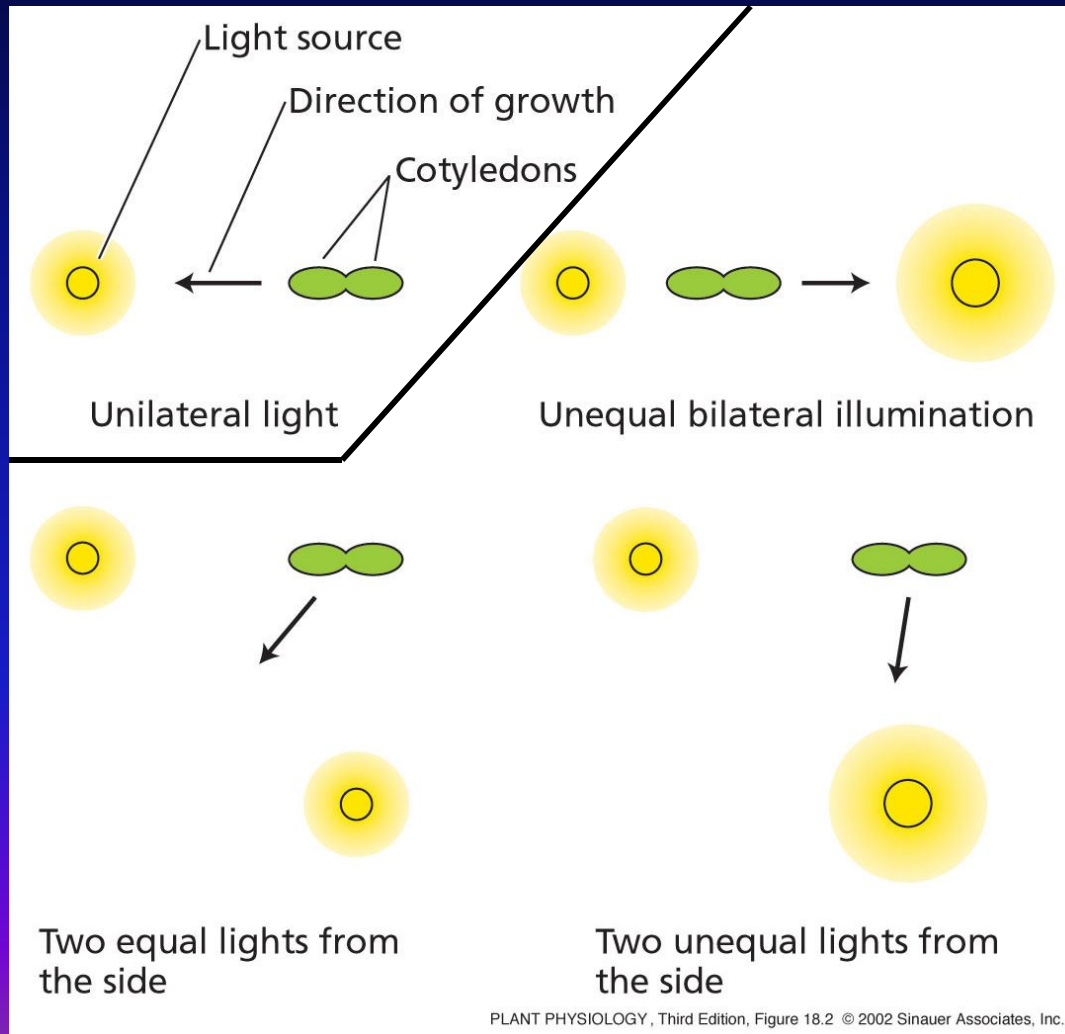
# Akční spektrum - graf, který vyjadřuje závislost intenzity pozorované reakce na vlnové délce světla



## Akční spektrum pro fototropismus

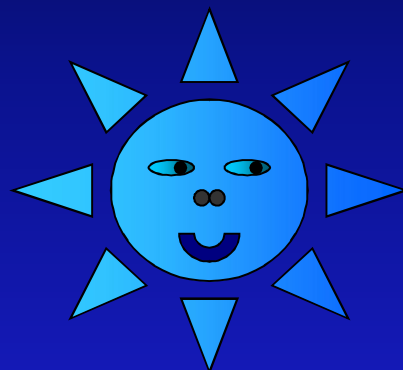
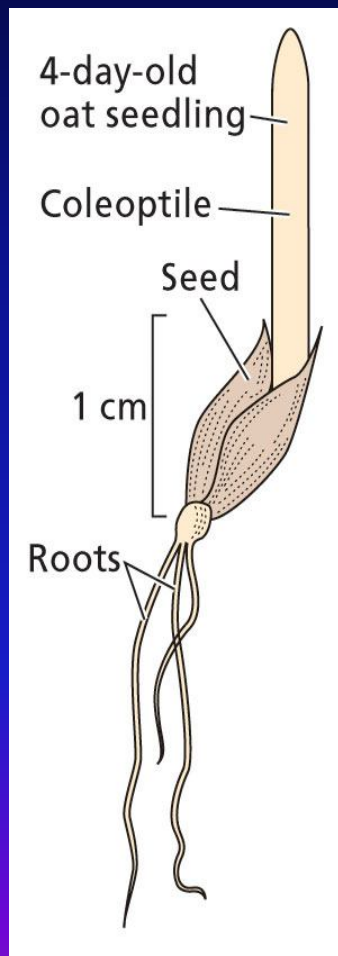


## a) Fototropismus – asymetrický růst směrem ke světlu



- houby
- kapradiny
- vyšší rostliny

## Koleoptile (coleoptile) – modifikované listy u jednoděložných rostlin

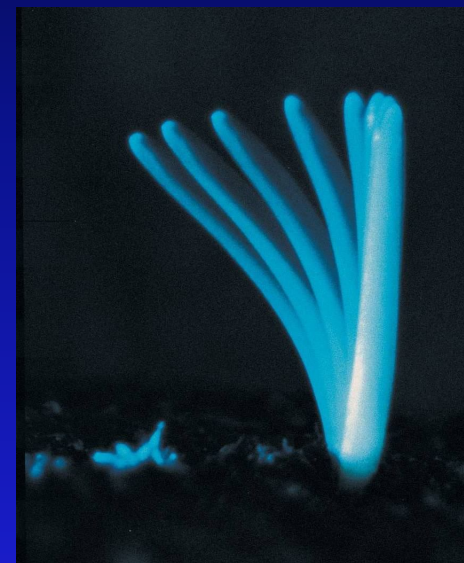


Auxinový gradient



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

~ 180 minut

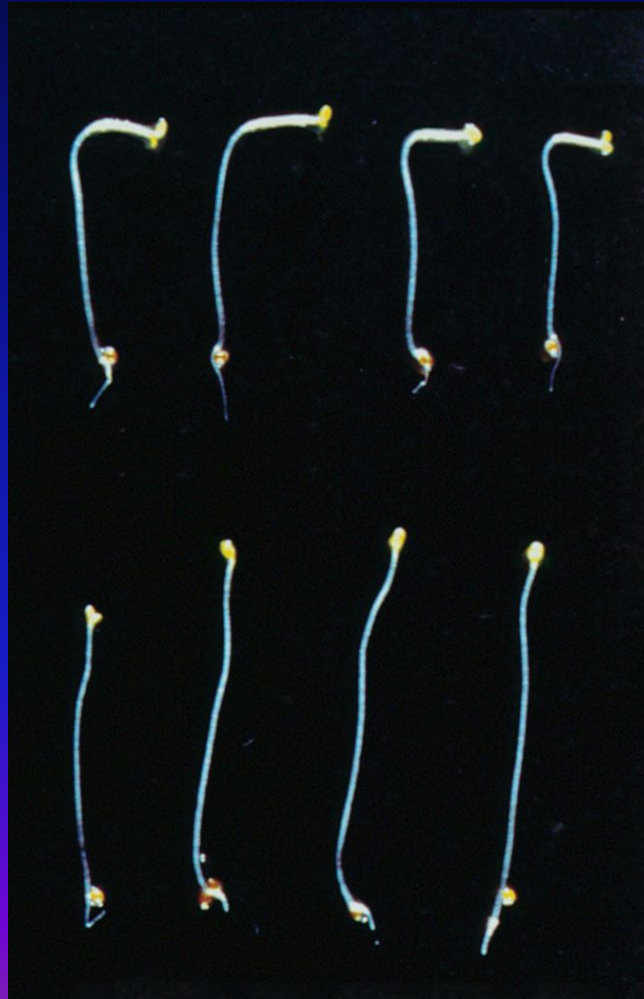


Zakřivení koleoptile

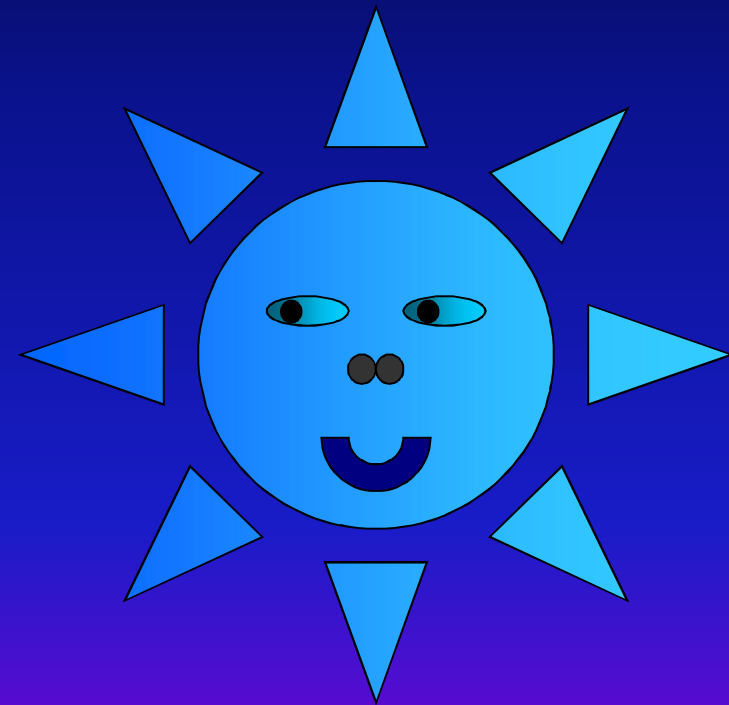


*Arabidopsis* mutant *phot1* s defektem ve fototropismu

WT

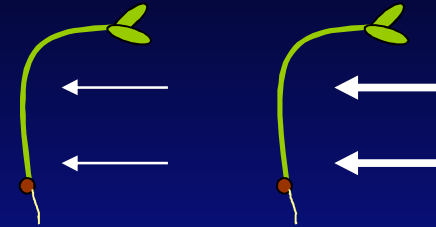


*phot1*



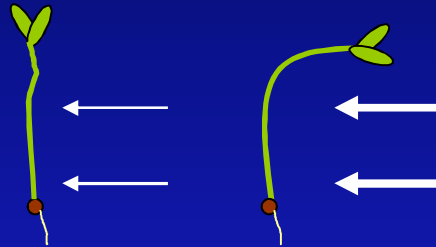
## Fototropické reakce rostlin k modrému světlu jsou zprostředkovány fototropiny

WT



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

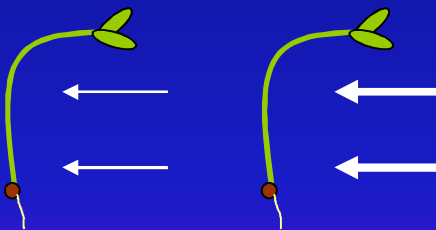
*phot1*



**Mutant *phot1*:**

- chybí reakce k BL  $0.01 - 1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- normální reakce k BL  $1 - 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

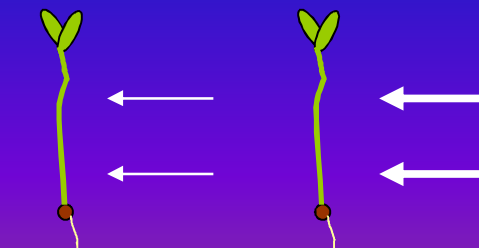
*phot2*



**Mutant *phot2*:**

- normální reakce k BL obou intenzit

*phot1/phot2*



**Mutant *phot1/phot2*:**

- chybí reakce k BL obou intenzit

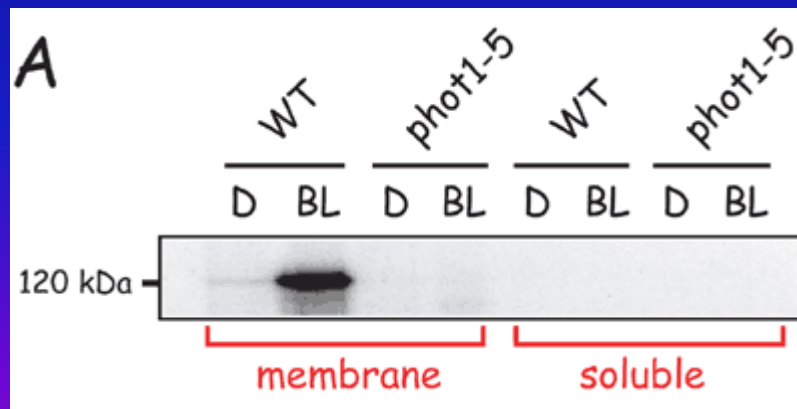
Podle:

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

## Receptory fototropiny (phototropins)

*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)

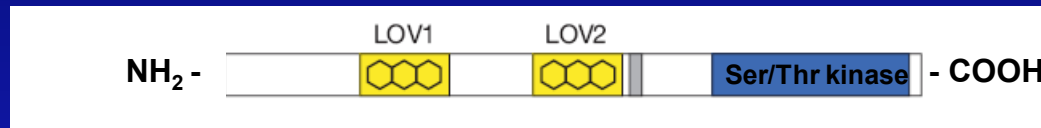


Struktura



## Struktura PHOT1

- 966 aminokyselin
- hydrofilní protein; schopnost připojovat se k membráně
- 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.

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

### UPDATE 2008

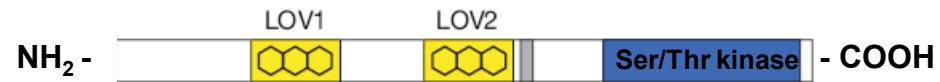
Wan Y-C et al. (2008) *Molecular Plant* 1: 103-117

Tma: PHOT1 – lokalizován na plazma membráně  
BL: PHOT1 – přesun do cytoplazmy

### UPDATE 2008 (December)

Han I-S et al. (2008) *Plant Cell* 20: 2835-2847

Transport PHOT1 z plazma membrány do cytoplazmy je regulován RL prostřednictvím PhyA.



## PHOT2

- podobný k PHOT1
- 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

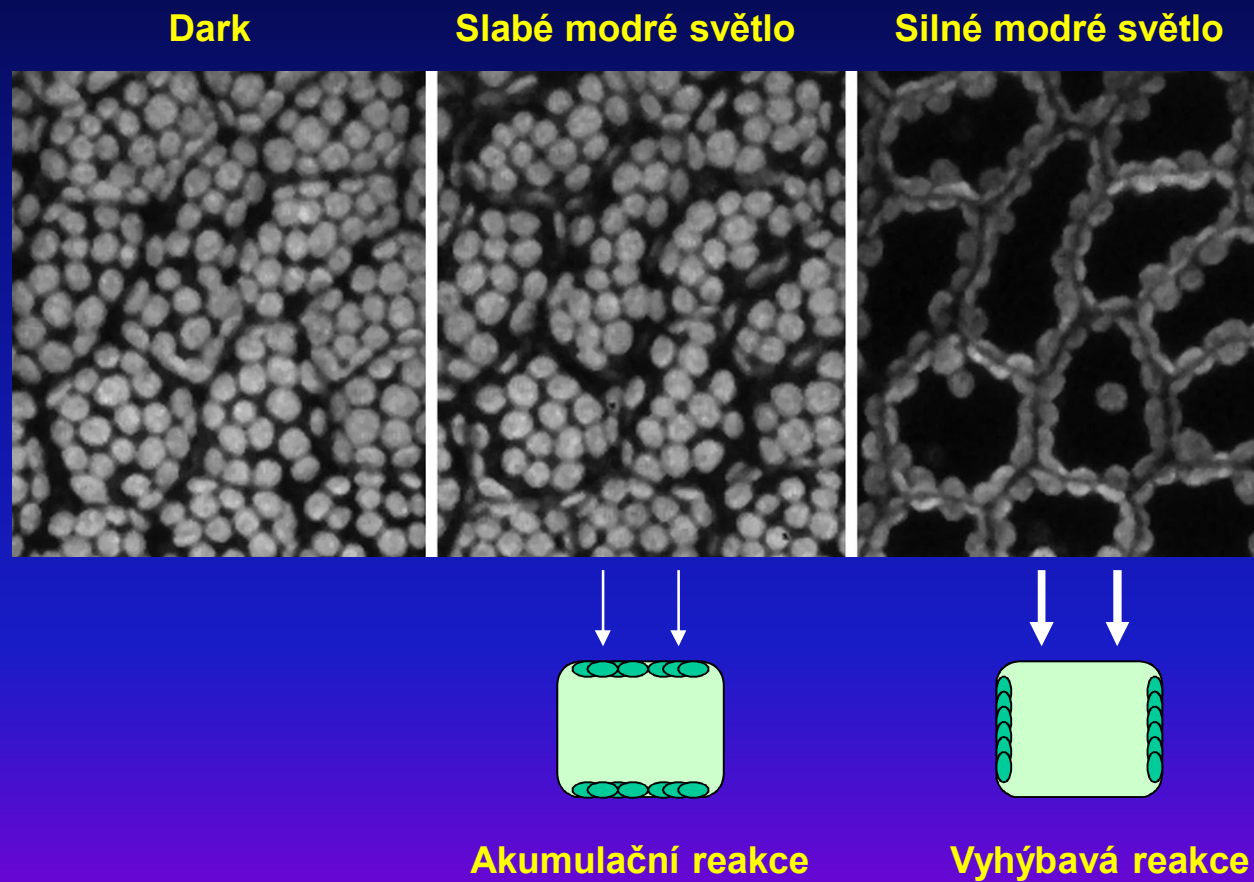
### Mutant *phot1/phot2*:

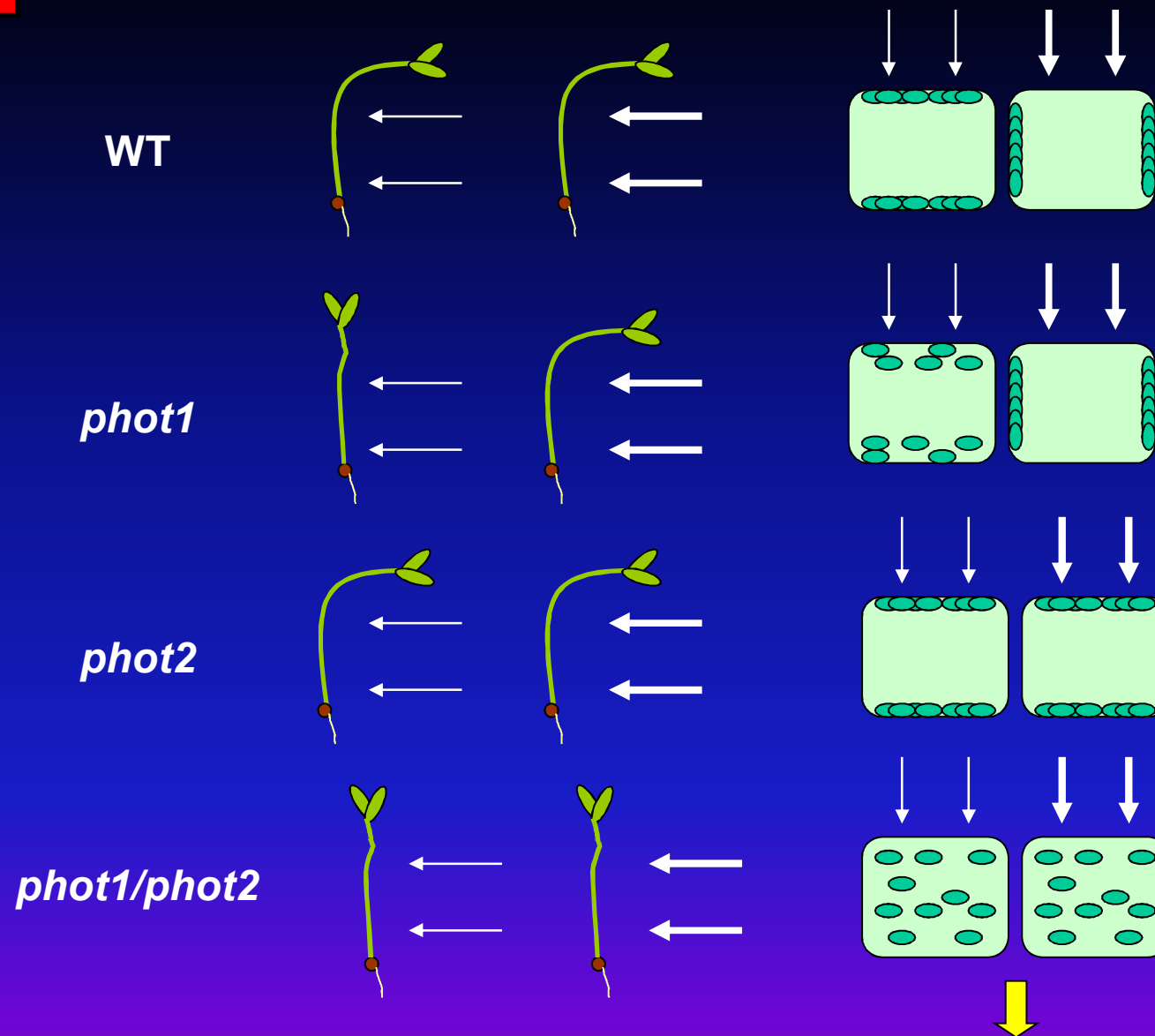
- nereaguje fototropicky k modrému světlu obou intenzit



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

## Fototropiny hrají roli v pohybu chloroplastů



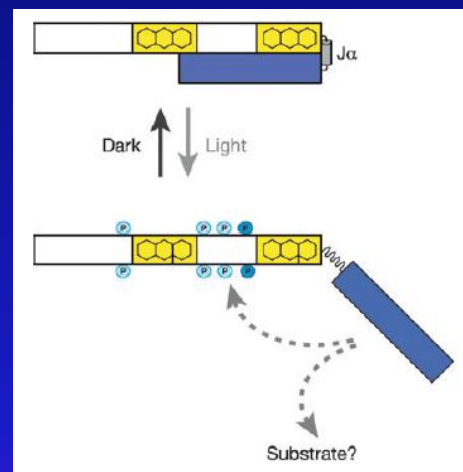
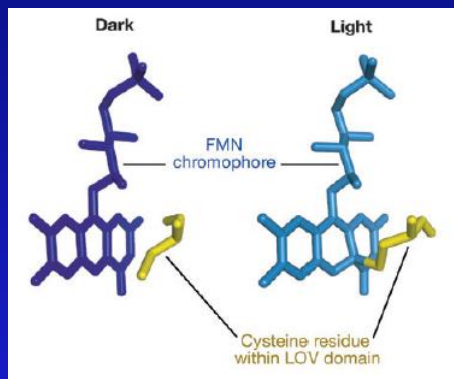
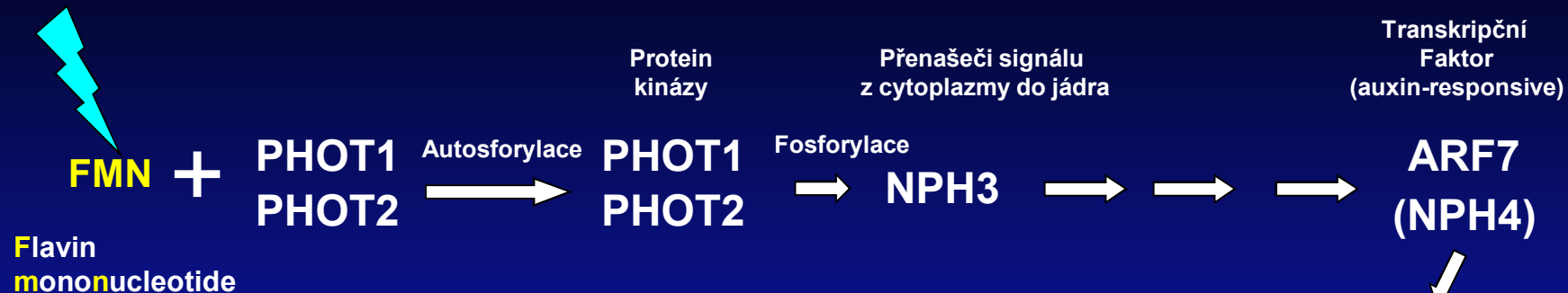


Podle:  
Briggs WR, Christie JM (2002) TIPS 7: 204-210

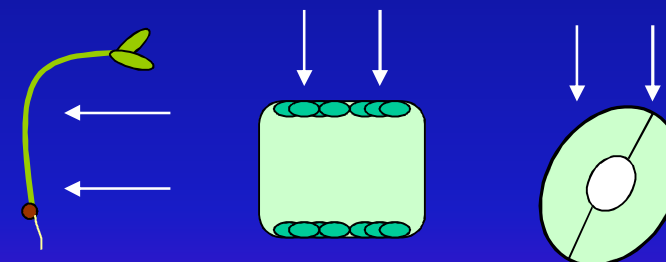
*PHOT2* hraje roli ve vyhýbavé reakci  
Oba geny, *PHOT1* a *PHOT2* hrají roli v akumulární reakci

# Signální dráha fototropinů PHOT

Modré světlo



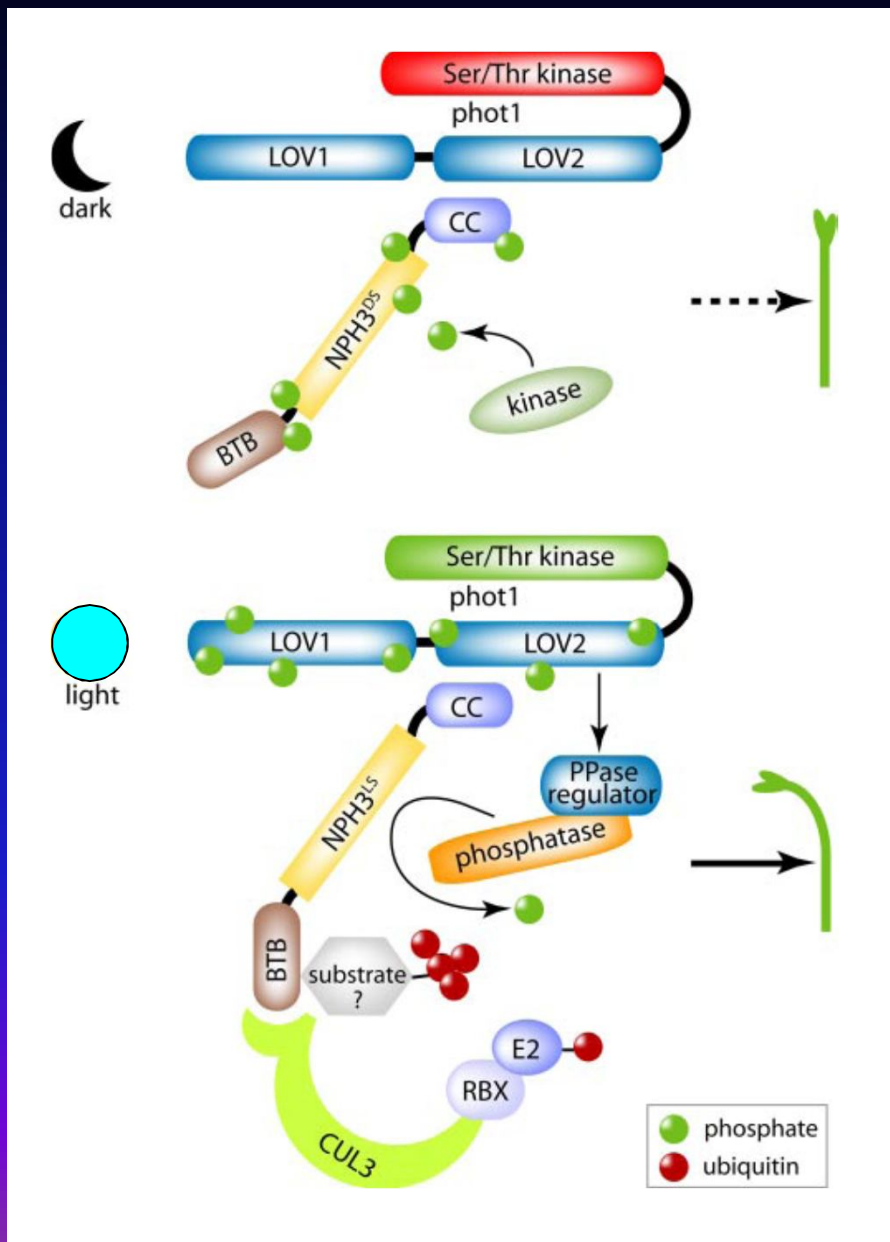
Fototropismus  
Pohyb chloroplastů  
Otevírání stomat



Phytochrome kinase substrate (PKS) (součást signální dráhy phyA) interaguje s PHOT1 a NPH3 na plazmatické membráně

- 1) PKS zprostředkuje fototropickou reakci
- 2) Molekulární spojení signálních drah fototropinů a phytochromu A





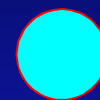
UPDATE 2007

Pedmale UV, Liscum E (2007) Journal of Biological Chemistry 282: 19992-20001



Tma

PHOT1 - nefosforylován; NPH3 - fosforylovaná forma



Modré světlo

PHOT1 – aktivace Ser/Thr kinázy – autofosforylace PHOT1 a aktivace 1 protein fosfatázy



NPH3 – defosforylován, katalyzováno 1 protein fosfatázou

NPH3 – funkční součást komplexu CUL3-ubiquitin-protein ligázy E3

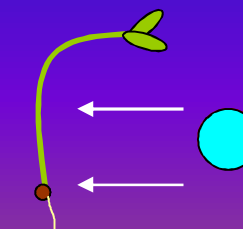
NPH3 – opět fosforylován neznámou kinázou



Vazba NPH3 na CUL3 – aktivace komplexu CUL3-ubiquitin-protein ligáza E3

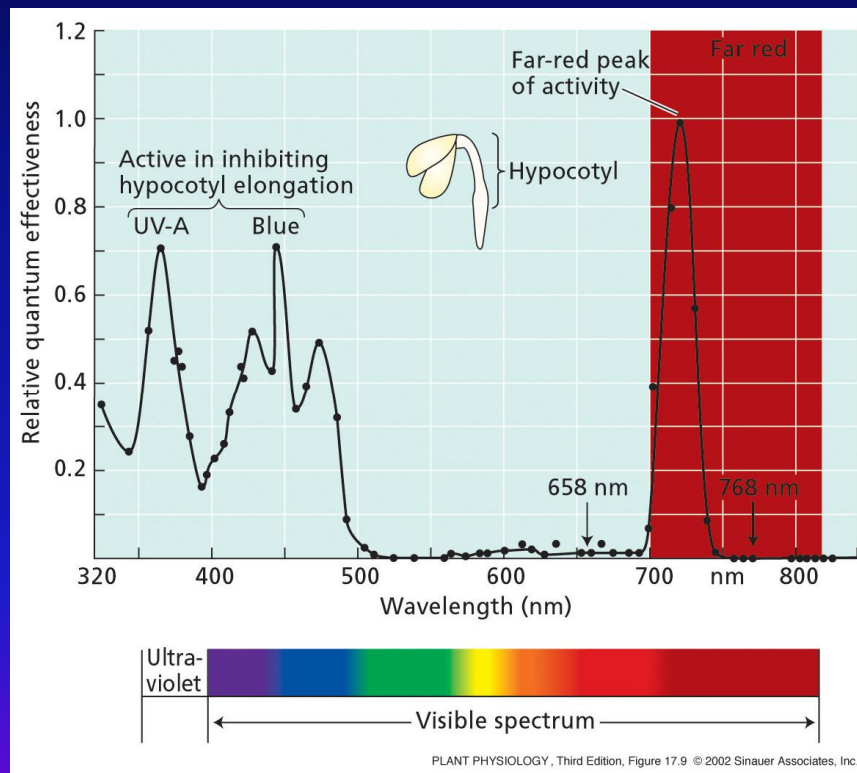


Phototropická reakce k modrému světlu

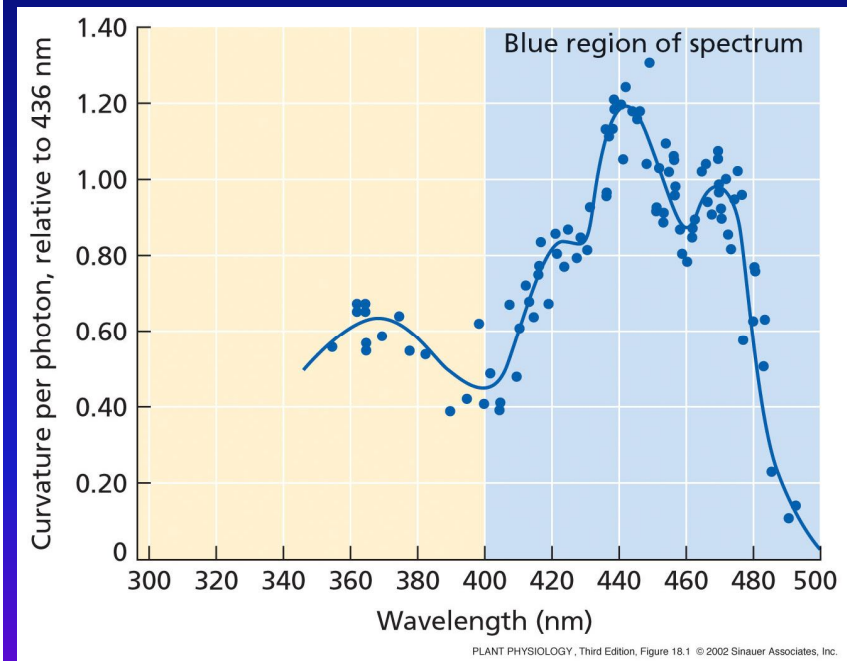


## b) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu

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



**Akční spektrum pro inhibici růstu etiolizovaných rostlin**



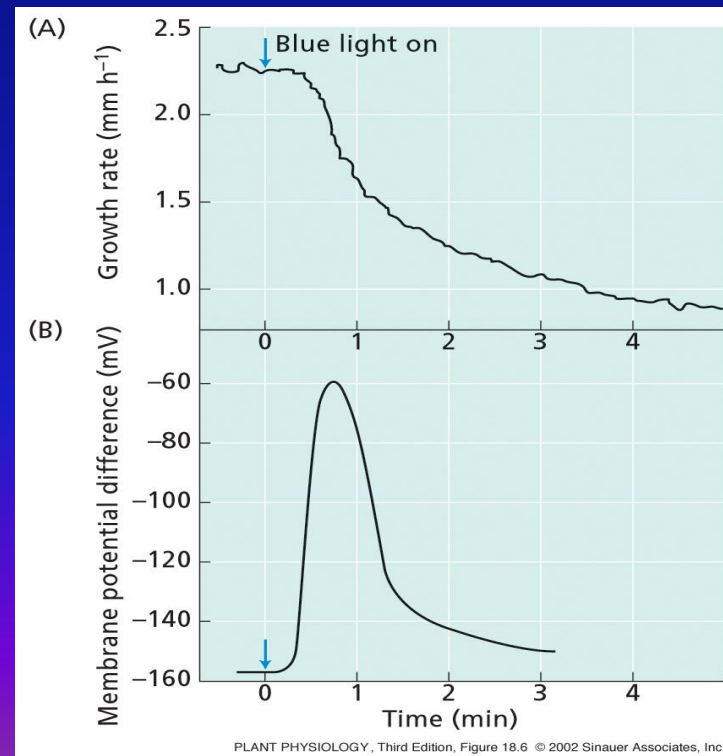
**Akční spektrum pro fototropismus**

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

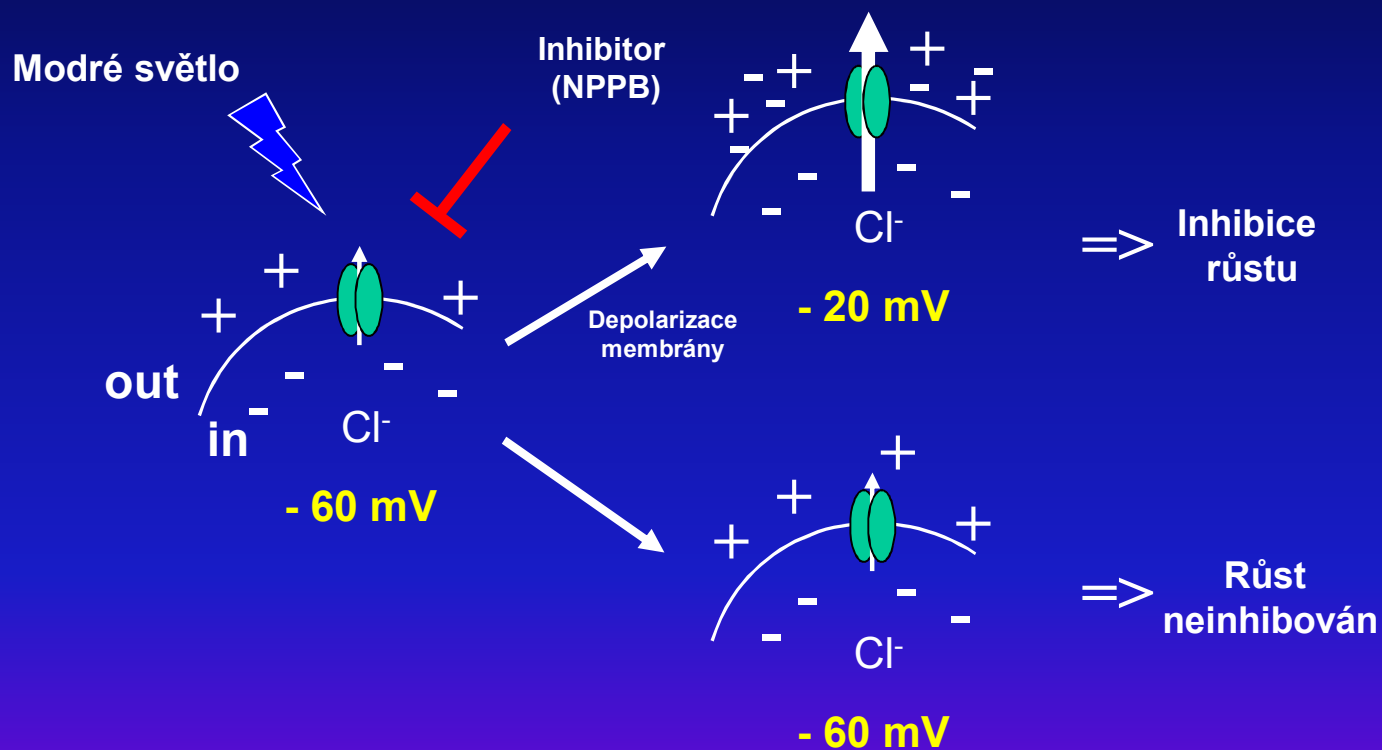
1) Aplikace silného žlutého světla => saturevaná inhibice růstu ~ 50%, stabilní Pr:Pfr. Následná aplikace slabého modrého světla => další inhibice růstu specificky zprostředkovaná fotoreceptory pro modré světlo.

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<sup>-</sup> kanálů.



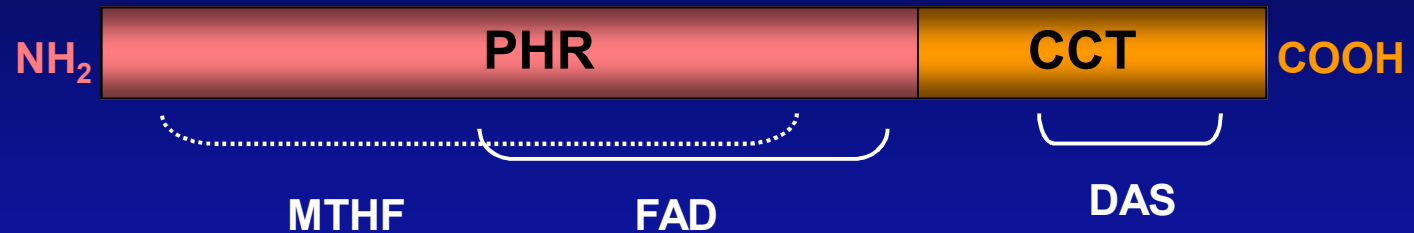
## Aniontové kanály zprostředkují inhibici růstu modrým světlem



## Receptory kryptochromy (cryptochromes)

*Arabidopsis* mutant *hy4* – hypokotyl není inhibován modrým světlem

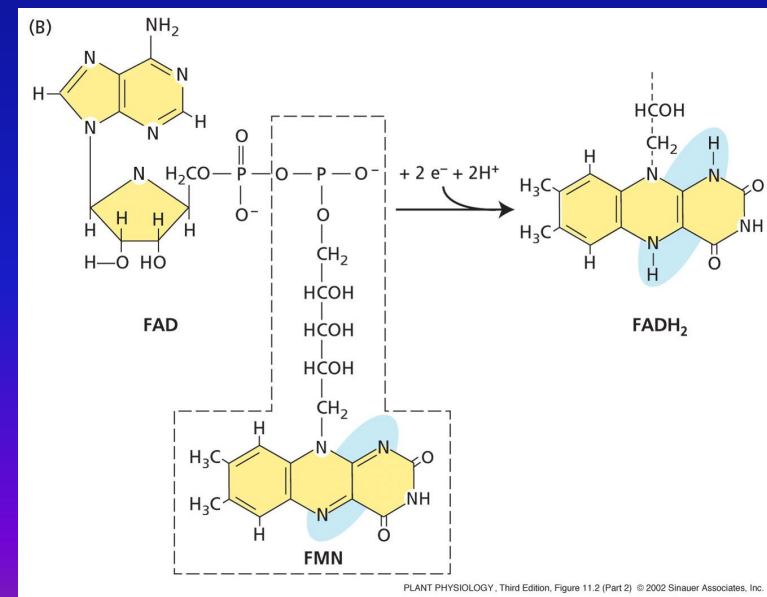
Gen *HY4* => protein, monomer 75 kDa



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

- Flavin = flavin adenine dinucleotide, FAD
- Pterin = methenyltetrahydrofolate, MTHF

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



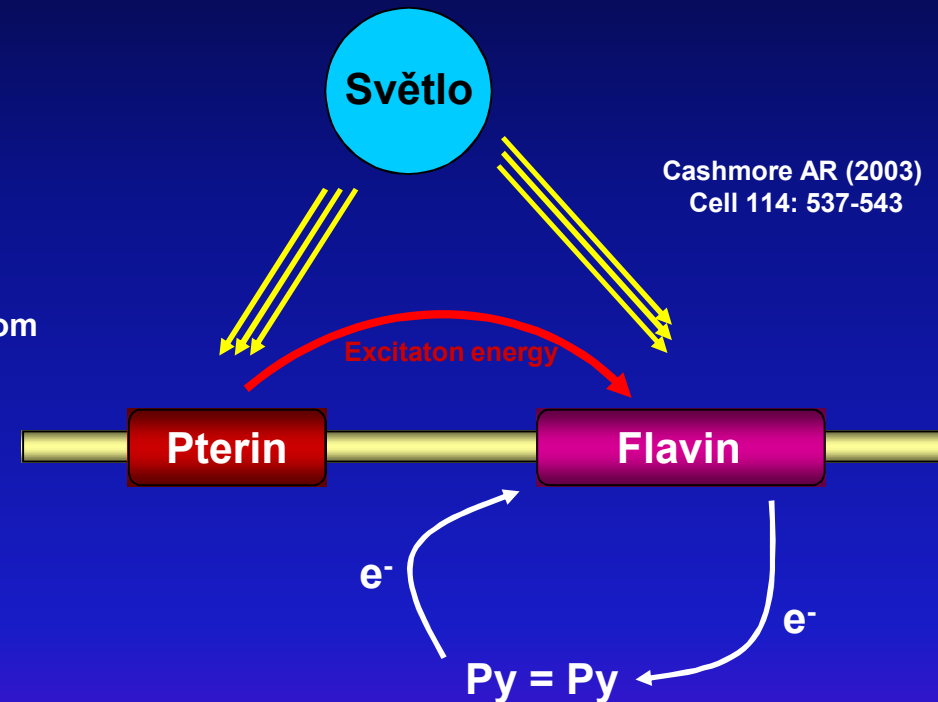
## Exprese *HY4* v *Echerichia coli* – chybí fotolyázová aktivita

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



UPDATE 2006

Selby CP and Sancar A (2006) PNAS 103: 17696-17700

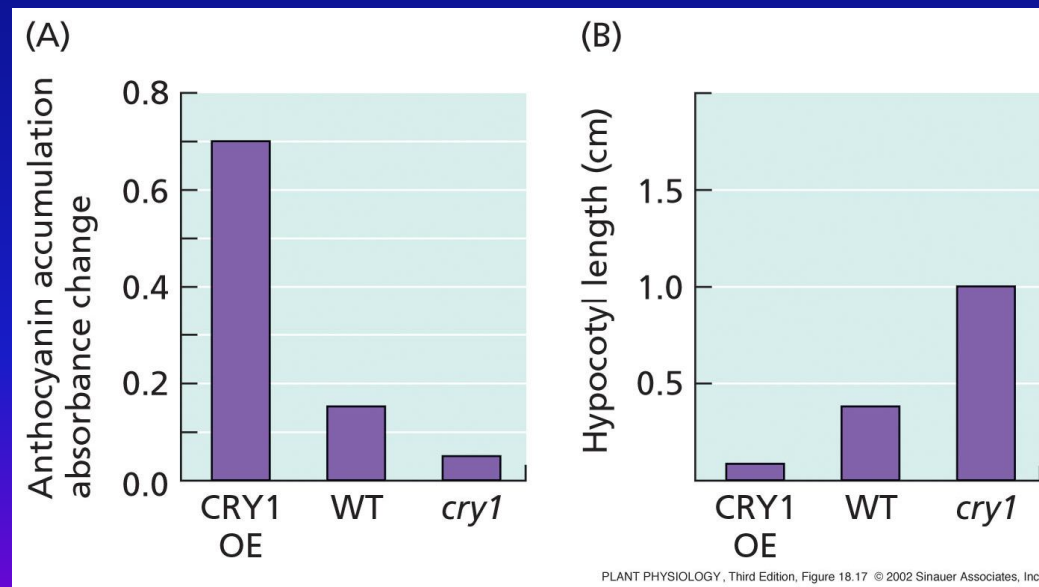
Nový enzym cryptochrome-DASH (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystic*, *Human*)

CRY-DASH je fotolyáza s vysokou specificitou k cyclobutan-pyrimidinovým dimerům (CPD) na jednovláknové DNA

**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 ke CRY1; na světle nestabilní**

### **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 ?**

#### **UPDATE 2006**

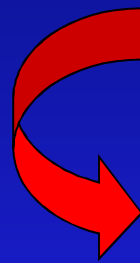
Huang Y et al. (2006) PNAS 103: 17701-17706

**CRY3 patří ke CRY-DASH enzymům s fotolýzovou aktivitou; návrh nového mechanismu stabilizace cyclobutan-pyrimidinových dimerů.**



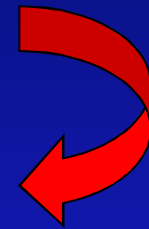
## Signální dráha kryptochromů CRY

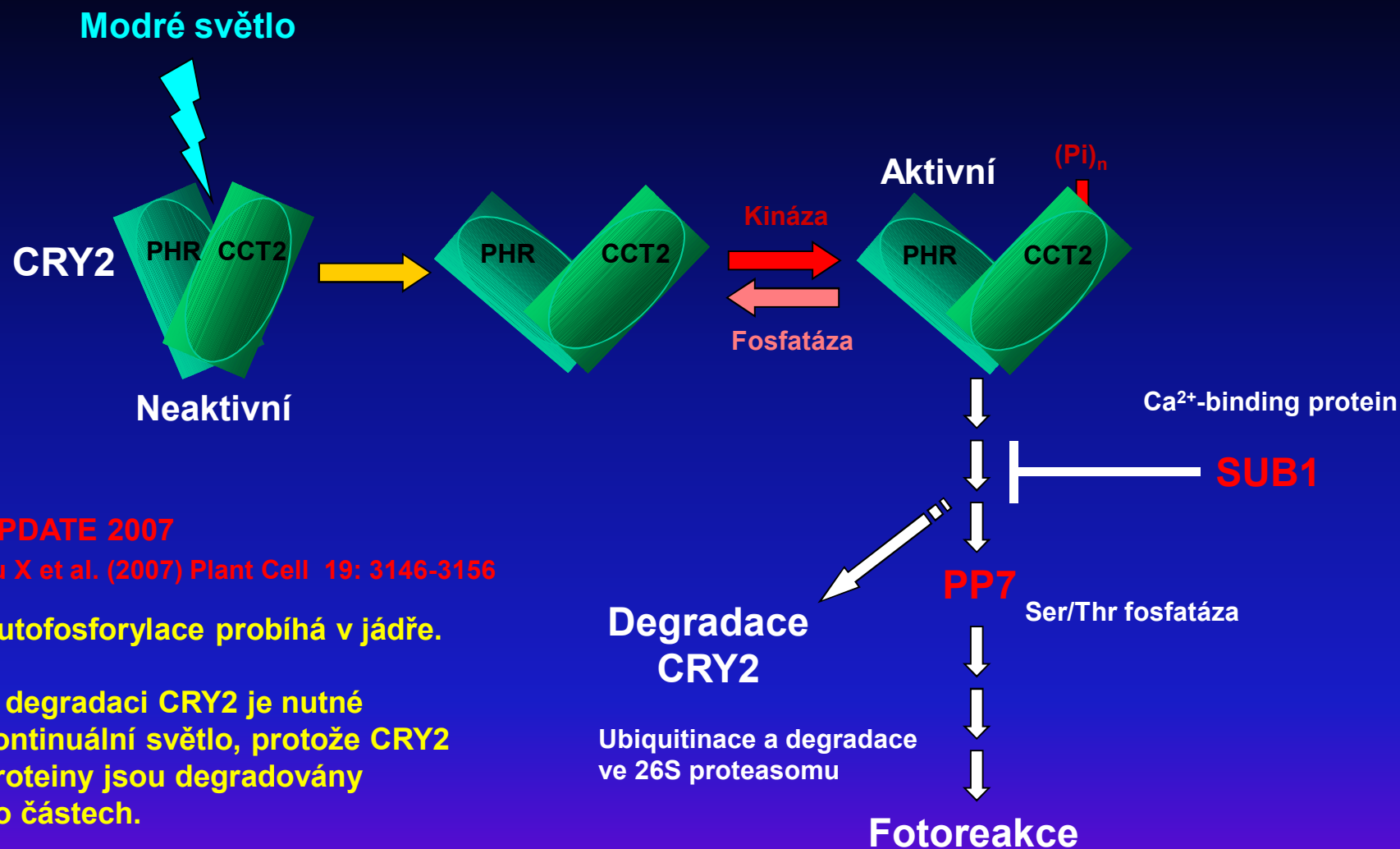
CRY1 a CRY2 – homologní s fotolýzou, ale fotolýzová aktivita chybí



Navržen jiný mechanismus přenosu signálu

Fosforylace - defosforylace



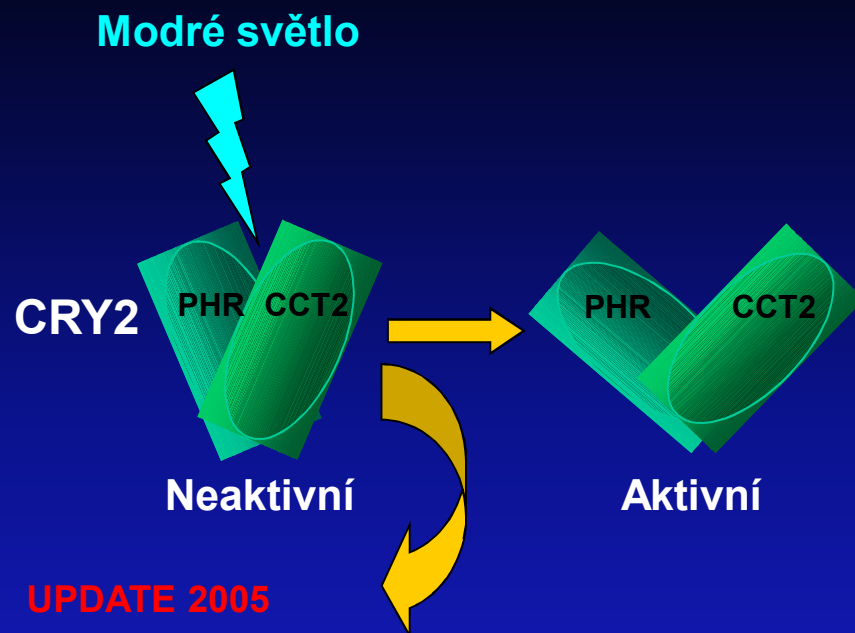
**UPDATE 2007**

Yu X et al. (2007) *Plant Cell* 19: 3146-3156

**Autofosforylace probíhá v jádře.**

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

**CRY2 je degradován ubiquitinací ve 26S proteasomu**



### UPDATE 2005

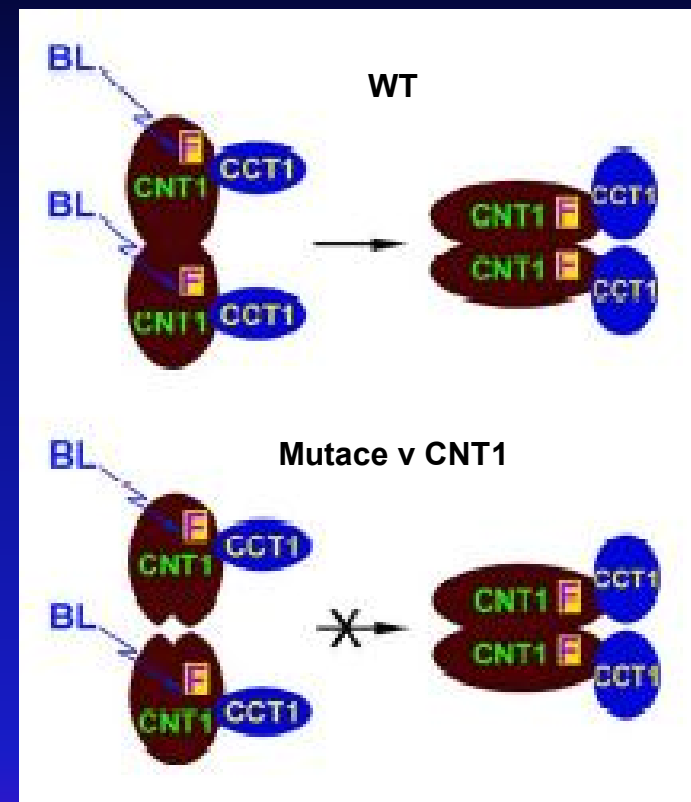
#### Objasněna funkce N-terminální domény kryptochromu

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.

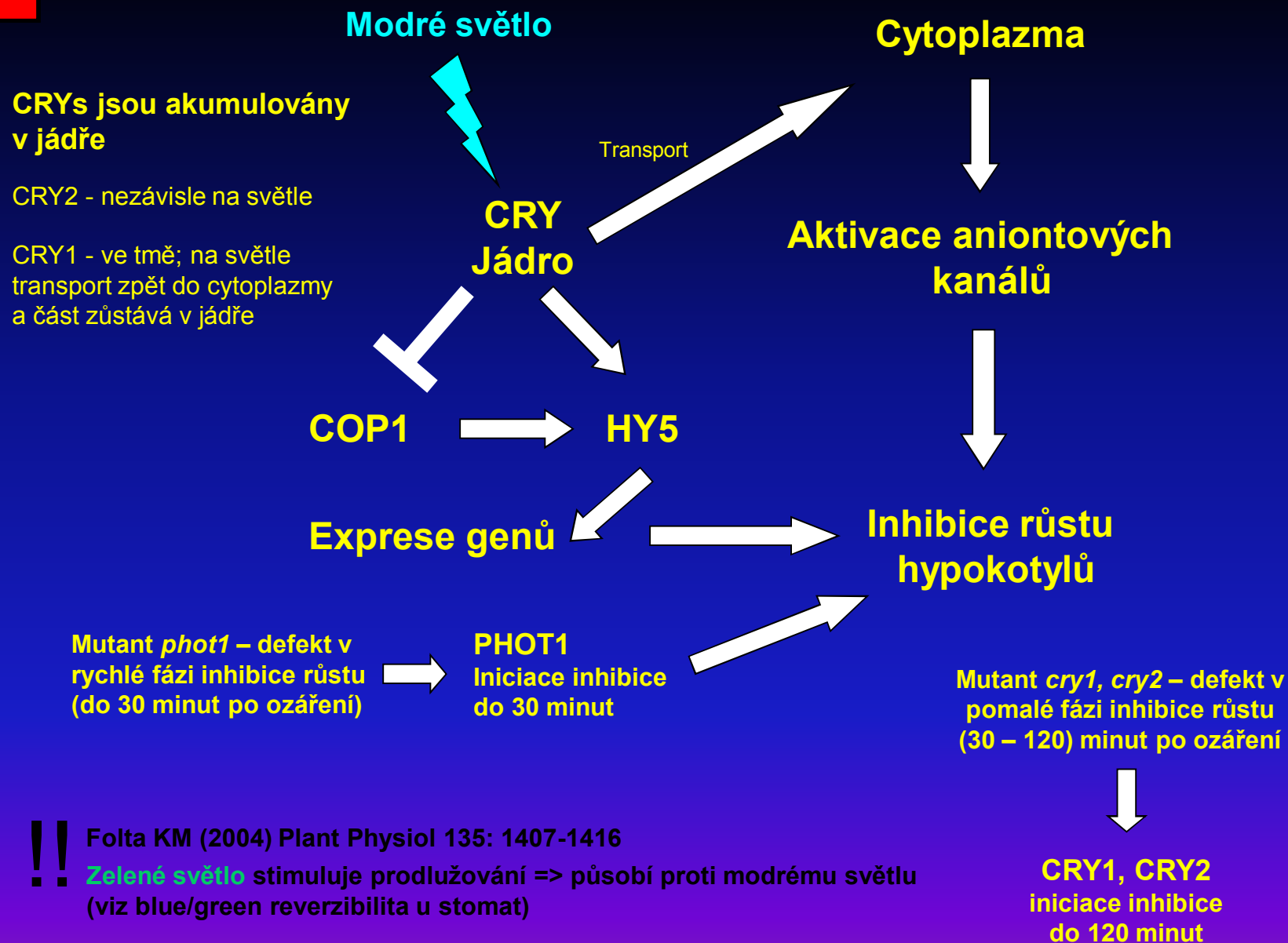
N-terminální doména PHR obsahuje NC80 doménu přesně v místě styku s C-terminální doménou.

**Tma:** PHR a CCT tvoří uzavřenou konformaci – potlačuje motiv NC80 – neaktivní kryptochrom

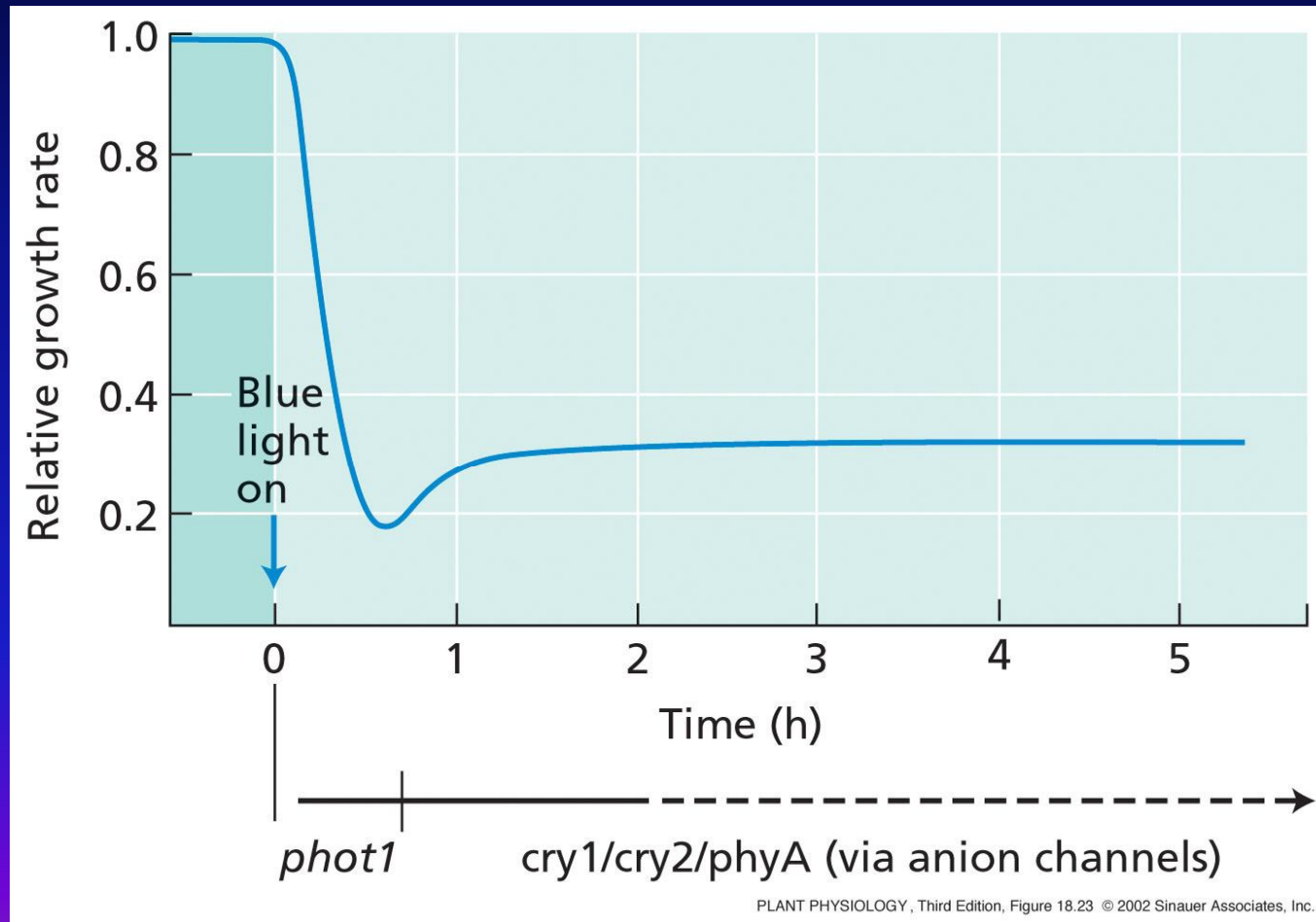
**Modré světlo:** CCT je fosforylována – de-represe NC80 - PHR a CCT tvoří otevřenou konformaci – aktivní kryptochrom



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



## Zapojení *PHOT1* v inhibici růstu hypokotylu indukované modrým světlem



## c) Stimulace otevírání průduchů (stomat)

**UPDATE 2008**

Jia W, Zhang J (2008) Plant Signaling and Behavior 3: 772-777

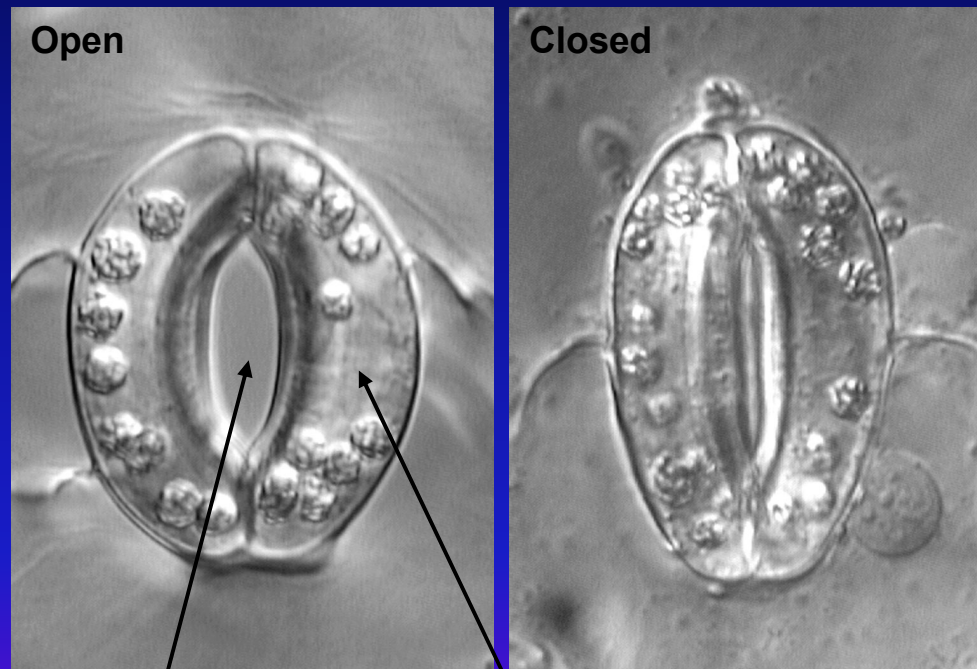
**Průduchy hrají hlavní regulační roli ve výměně plynů v listech**

**Průduchy – modelový objekt pro studium reakcí k modrému světlu:**

- reakce stomat k modrému světla 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

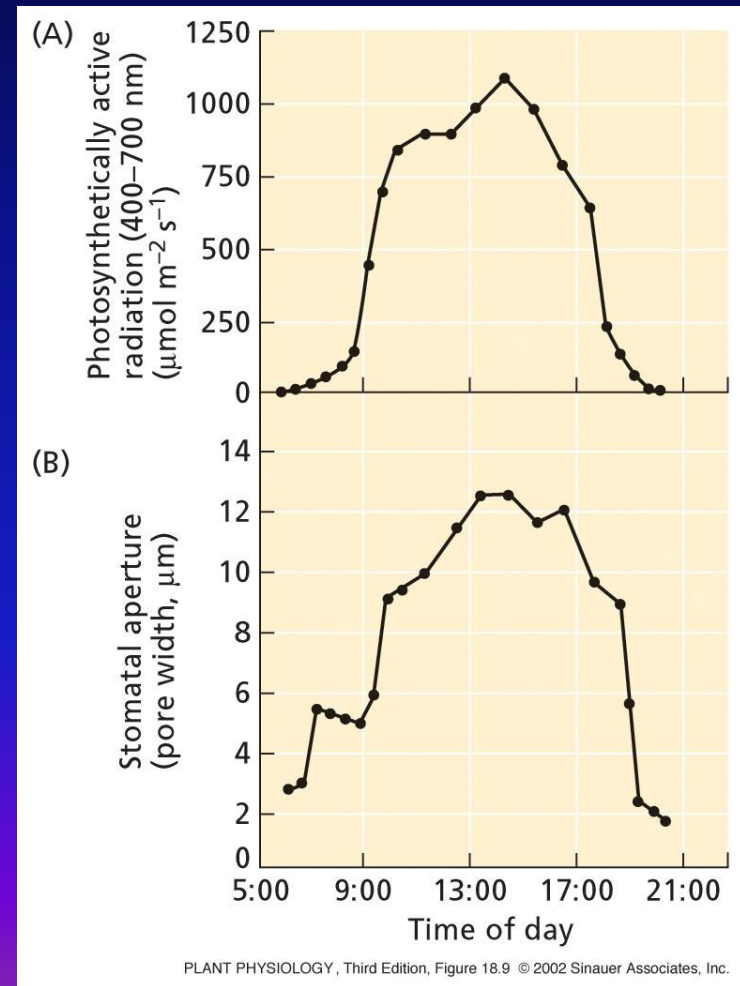
**Světlo je dominantní faktor regulující otevírání a zavírání stomat dopadem na epidermální buňky listu.**

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**



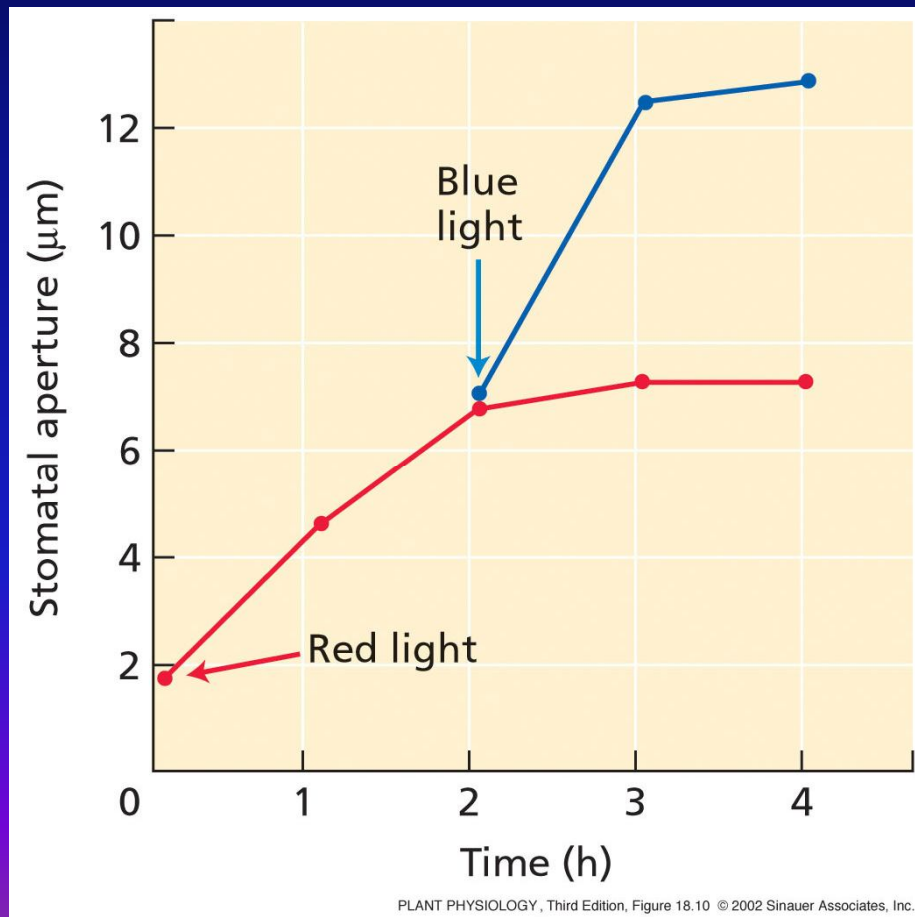
**Světlo aktivuje dvě výrazné reakce svěracích buněk:**

- fotosyntéza v chloroplastech svěracích buněk
- specifická reakce k modrému světlu



## Specifická stomatální reakce

Modré světlo způsobuje současně fotosyntetickou a specifickou nefotosyntetickou reakci

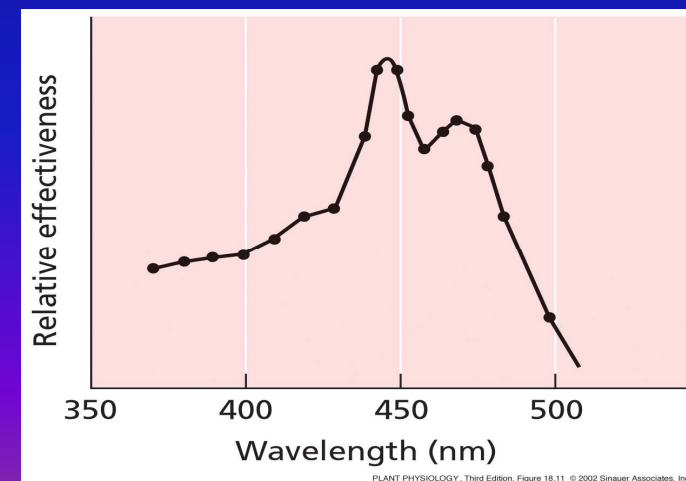


1) Saturace fotosyntetické reakce silným červeným světlem => částečné otevření stomat

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 štěrbiny = otevření průduchu



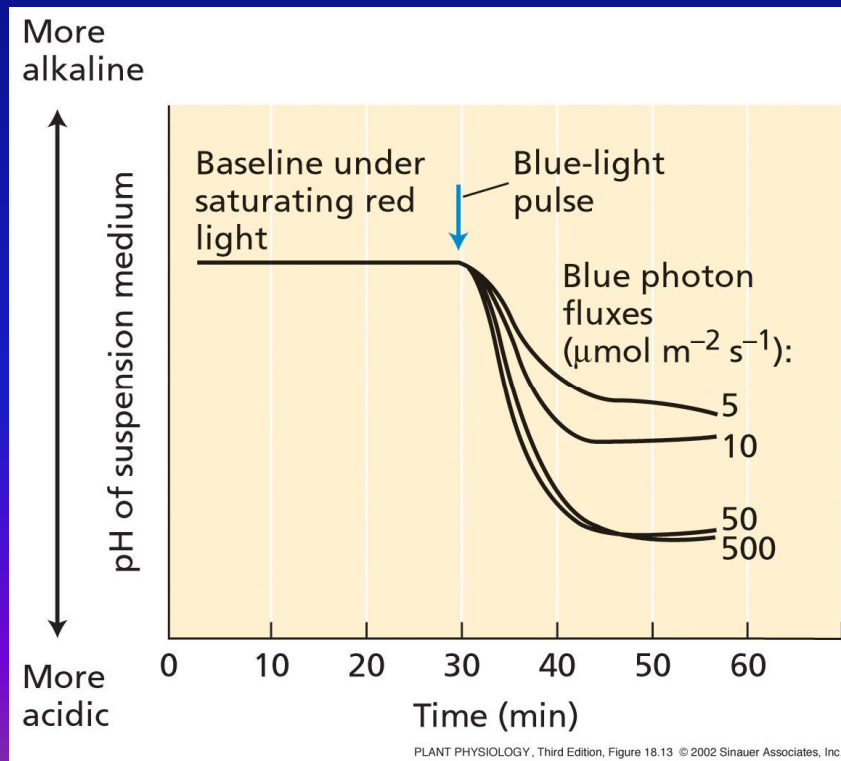
Modré světlo



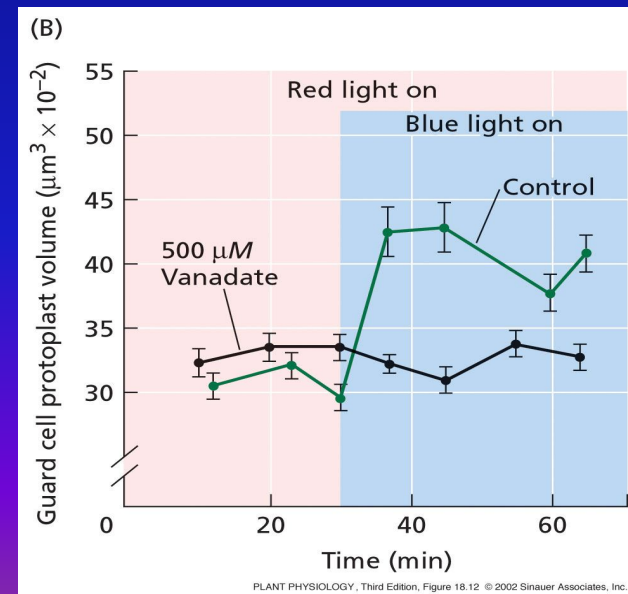
## Modré světlo aktivuje protonovou pumpu ( $H^+$ - ATPase)

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

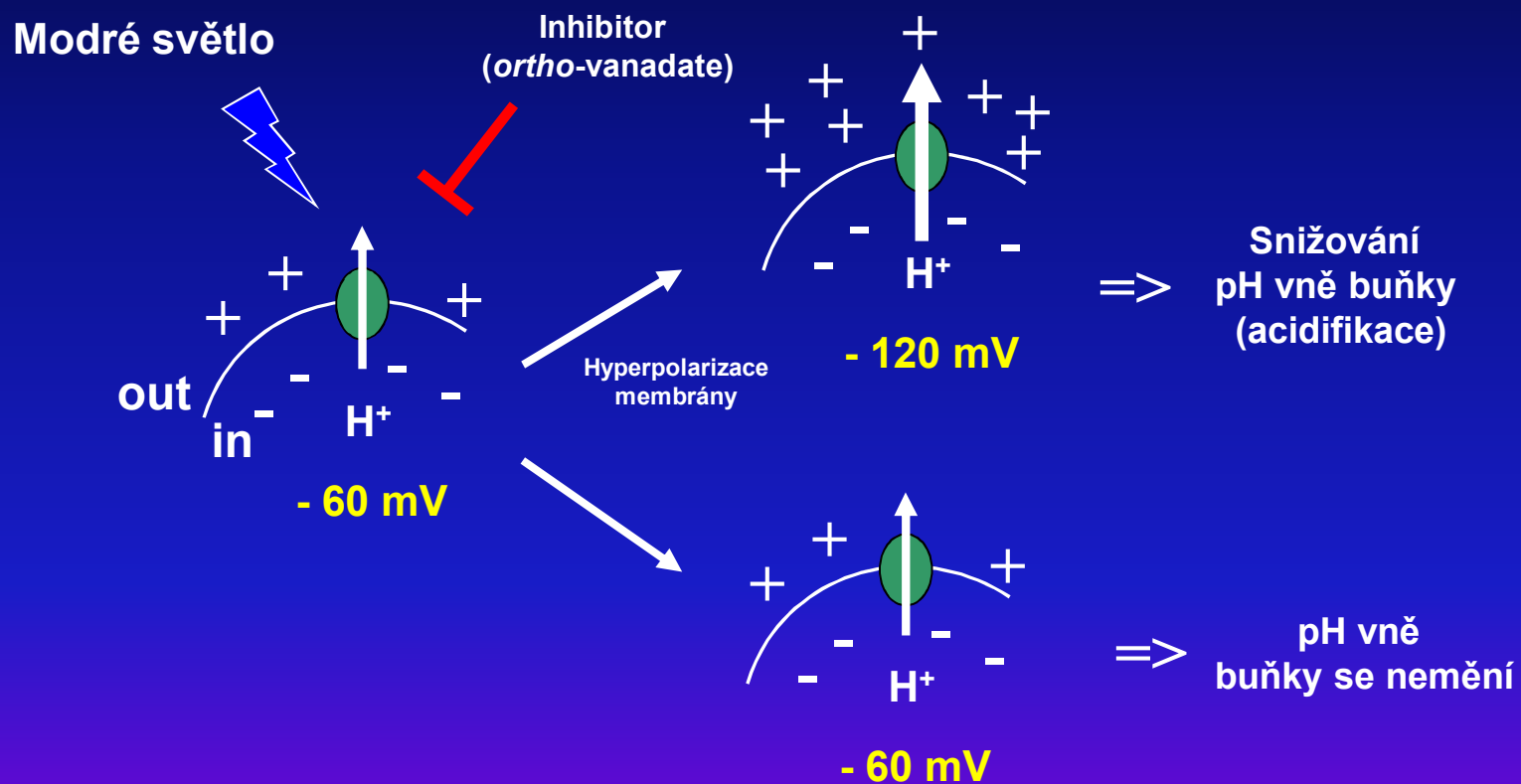
Acidifikace může být blokována aplikací CCCP (blokátor tvorby pH gradientu) nebo vanadatem (inhibitor protonové pumpy)



Acidifikace je způsobena aktivací protonové pumpy modrým světlem



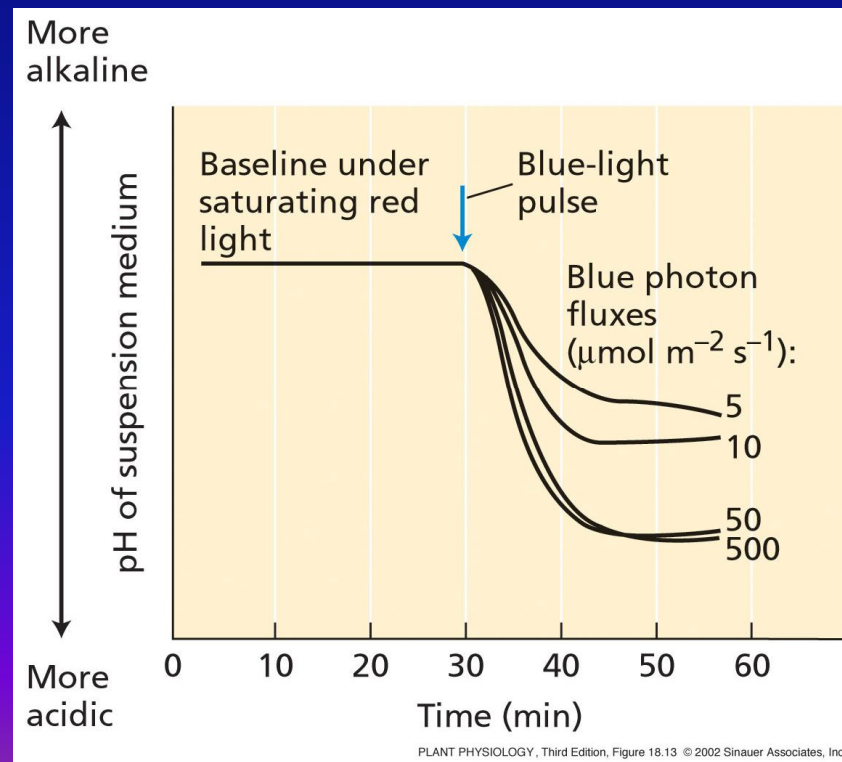
## Aktivace protonové pumpy modrým světlem



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



Reakce stomat funguje jako senzor fotonů



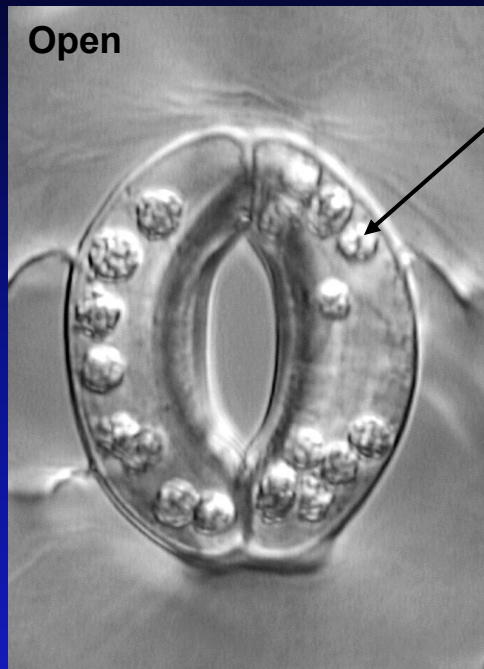
## **Modré světlo reguluje osmotický stav svěracích buněk aktivací protonové pumpy a stimulací syntézy organických látek**

1908 F. E. Lloyd – „škrob-cukr“ hypotéza: 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

### **Tři odlišné cesty osmoregulace ve svěracích buňkách**

- 1) Vlivem  $K^+$ ,  $Cl^-$ , a malátu<sup>2-</sup> pocházejícího z hydrolýzy škrobu**
- 2) Vlivem sacharózy vznikající hydrolýzou škrobu**
- 3) Vlivem sacharózy vznikající fotosyntézou (chloroplasty svěracích 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 ↓)**



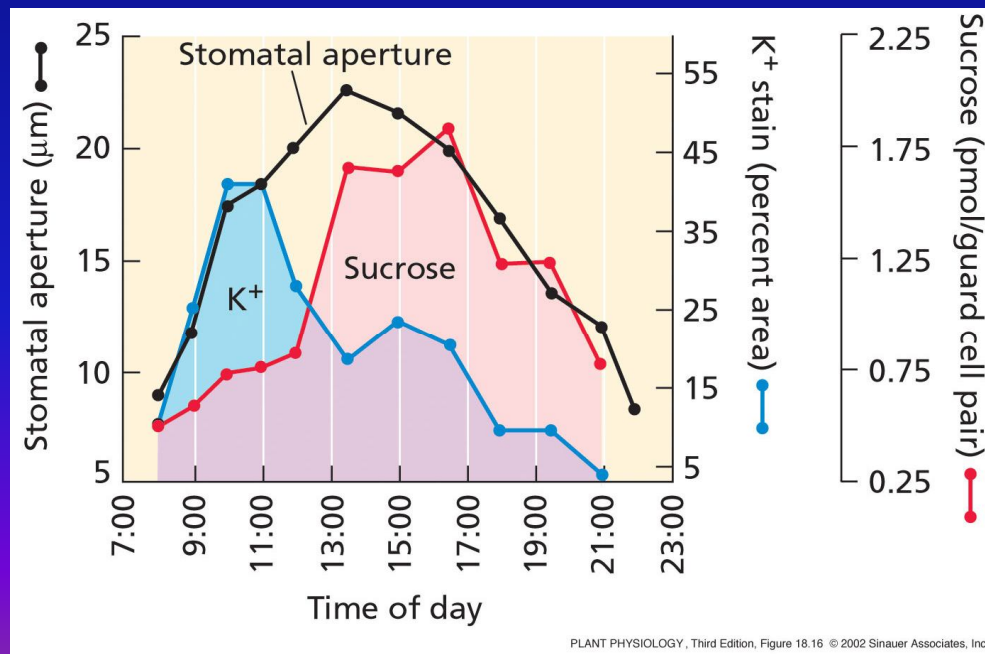
**Stomata se otvírají**

**Zavírající se stomata: syntéza škrobu → Osmotický tlak ↓ (osmotický potenciál ↑)**

## Cukr je osmoticky aktivní látka ve svěracích buňkách

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

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



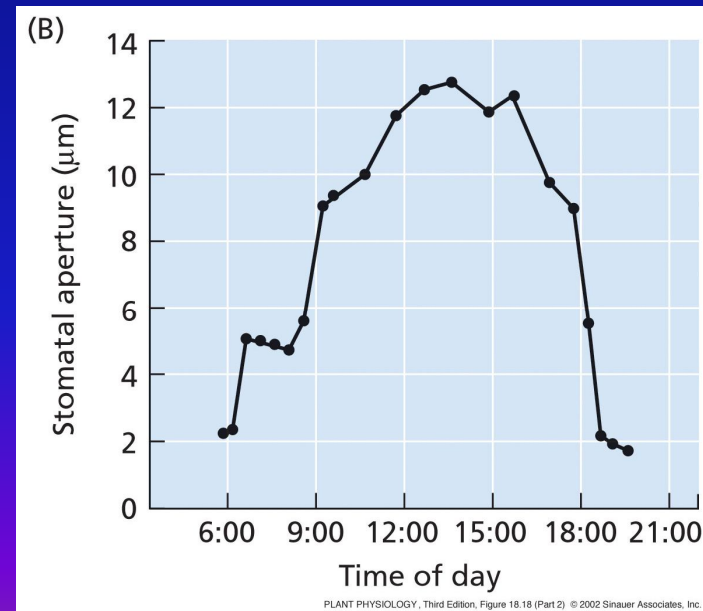
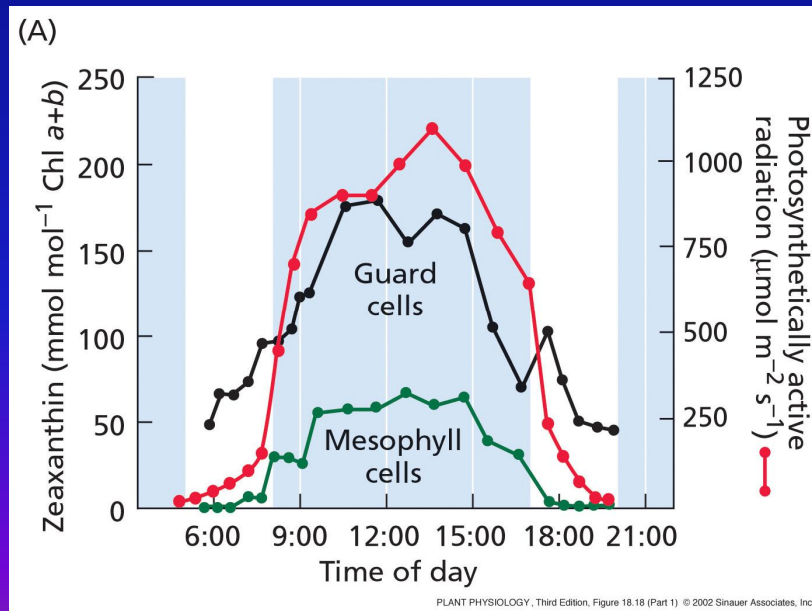
**Otevírání stomat: nárůst  $K^+$**   
**Zavírání stomat: pokles cukru**



## Receptory zapojené v regulaci otevírání průduchů

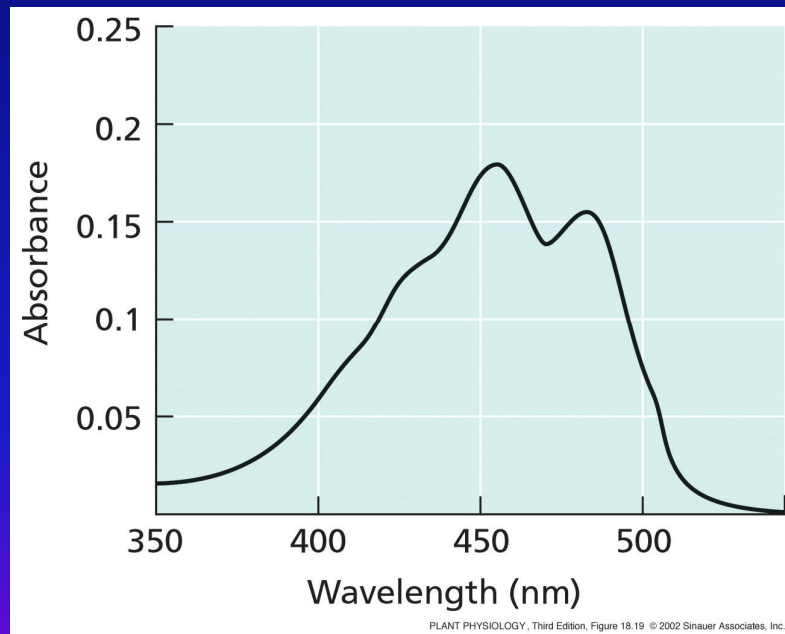
**Zeaxantin – karotenoid; komponenta xantofilového cyklu v chloroplastech mezofylových buněk - chrání fotosyntetické pigmenty před nadměrným světlem.**

**Zeaxantin ve svěracích buňkách funguje jako receptor zprostředkující otevírání stomat**

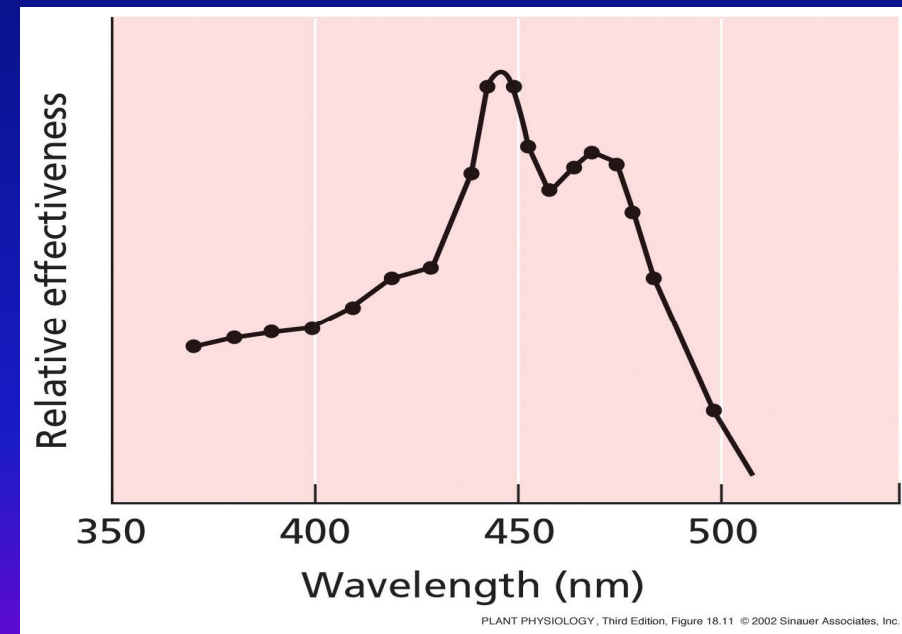


## Důkazy pro roli zeaxantinu jako fotoreceptoru ve stomatech

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



**Absorpční spektrum zeaxantinu**

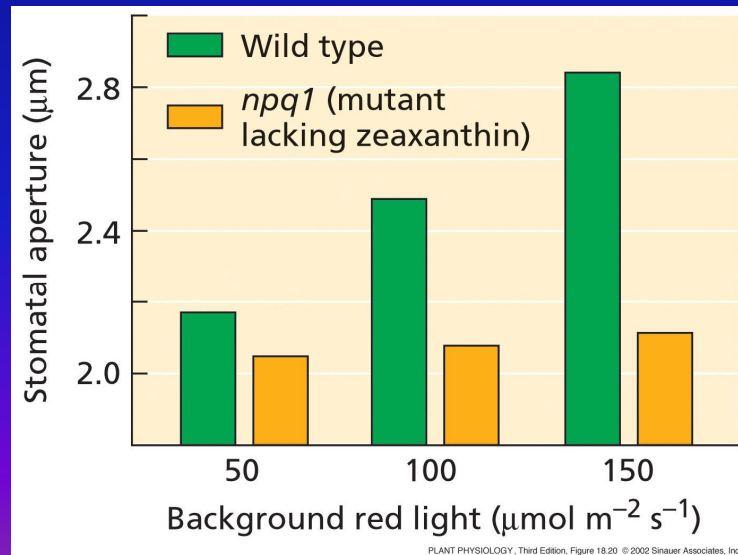


**Akční spektrum otevírání stomat**

- 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 koncentraci

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

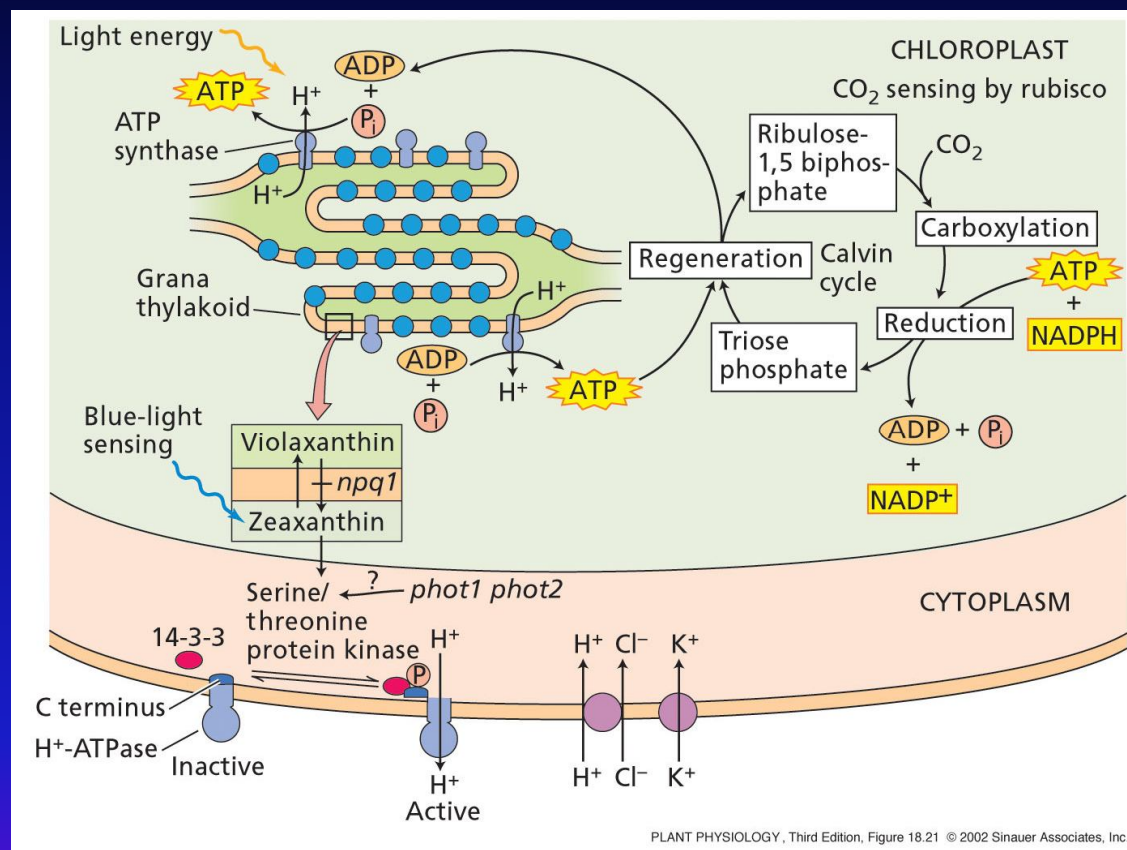
### *Arabidopsis* mutant *npq1* (*nonphotochemical quenching*)



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

*npq1* ukazuje pouze bazální otevírání stomat  
indukované fotosyntézou

## Otevírání stomat prostřednictvím zeaxantinu



Modré světlo



Zeaxantin



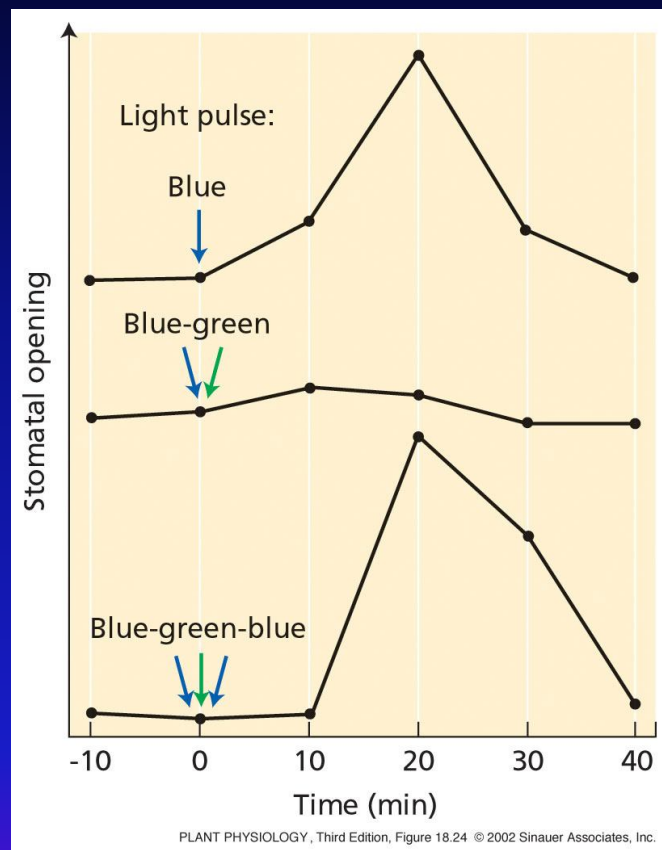
H<sup>+</sup>-ATPáza



Otevírání stomat

Mechanismus zapojení zeaxantinu v otevírání stomat vlivem modrého světla je třeba dále ověřit – kontroverzní výsledky v intaktních listech a protoplastech svěřacích 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)

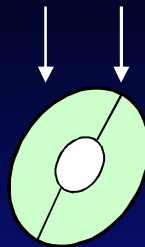
Tma

**UPDATE 2007**

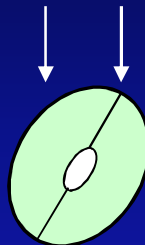
Folta KM, Maruhnich SA (2007) J Exp Botany 58: 3099-3111

Nejnovější review o reverzních účincích zeleného světla na růst a vývoj rostlin

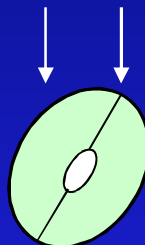
WT



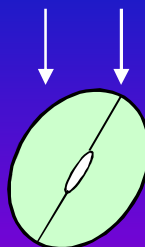
Do procesu otevírání stomat jsou zapojeny kromě zeaxantinu i fototropiny

*phot1*

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

*phot2*

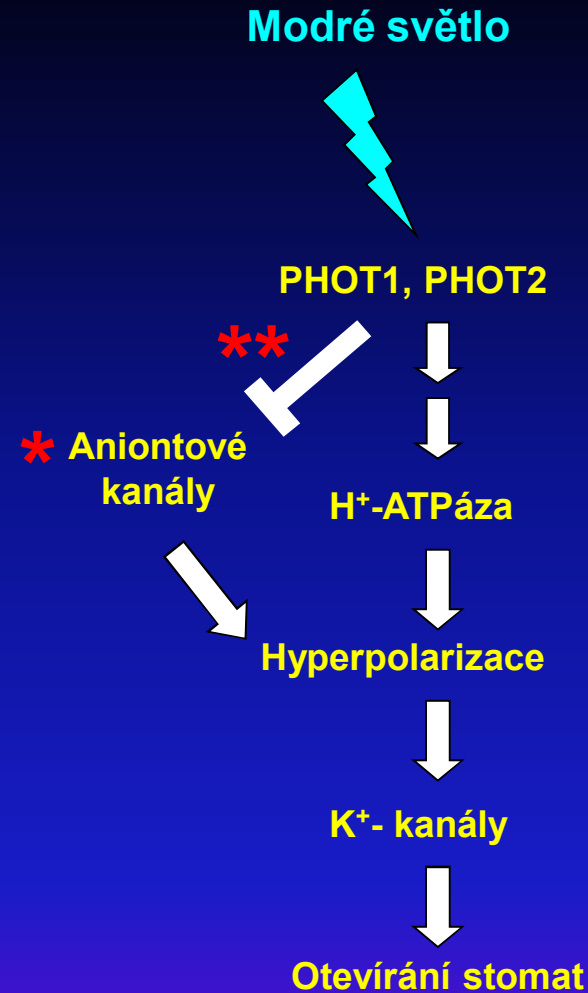
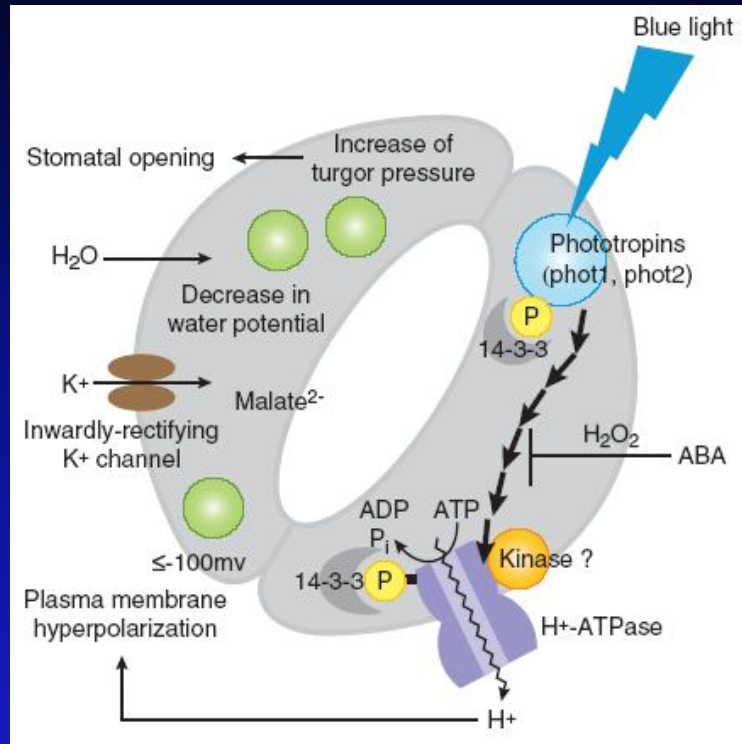
Mechanismus interakce PHOTs se zeaxantinem není znám.

*phot1/phot2*

**UPDATE 2007**

Boccalandro H et al. (2007) *Plant Signaling and Behavior* 2: 1-3

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



H<sup>+</sup>-ATPáza: C- terminální konec má autoinhibiční doménu – reguluje aktivitu ATPázy blokováním katalytického místa

Aktivace ATPázy: fosforylace Ser/Thr C- terminální domény ATPázy => autoinhibiční doména je odstraněna z katalytického místa

**\* UPDATE 2007**

Marten H et al. (2007) Plant Journal 50: 29-39

**\*\* UPDATE 2007**

Lee Y et al. (2007) Plant Journal 52: 803-816

PIP4 (PIP kináza) – vznik PtdIns (4,5) P2 (fosfatidylinositol 4,5-bifosfát) ve svěracích buňkách. PtdIns (4,5) P2 inhibuje aniontové kanály => udržení otevření stomat

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

Otevírání stomat indukované modrým světlem:

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



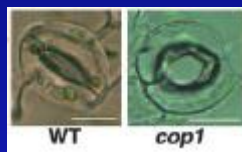
WT < *CRY1-ovx* = *CRY2-ovx*



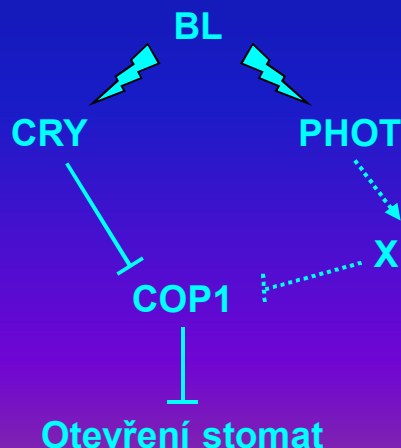
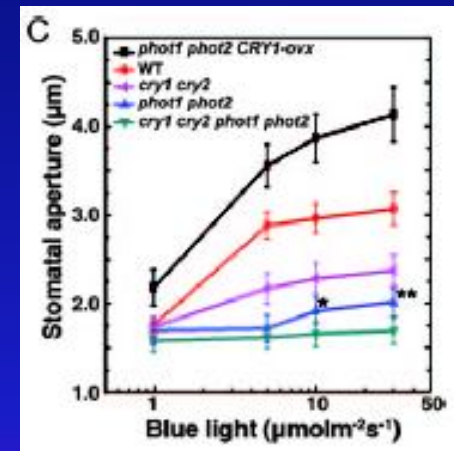
*cry1cry2* > *phot1phot2* > *cry1cry2phot1phot2*



WT < *cop1*



*cry1cry2cop1* = *phot1phot2cop1* > *phot1phot2CRY1-ovx*



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

<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/102/34/12270>