

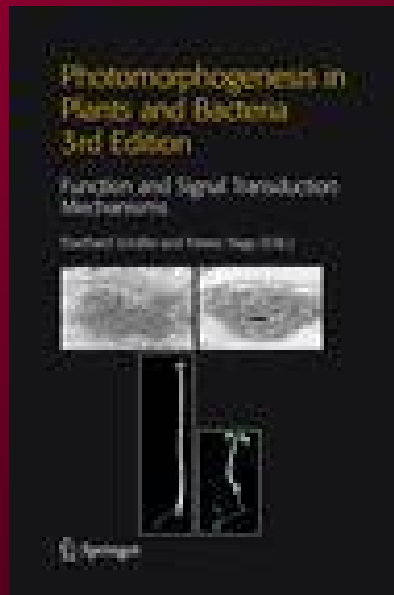
# Úloha genu *COP1* v rostlinné fotomorfogenezi a tumorogenezi u živočichů

- a) Fotomorfogeneze
- b) Úloha *COP1* ve fotomorfogenezi rostlin
- c) *COP1* a tumorogeneze

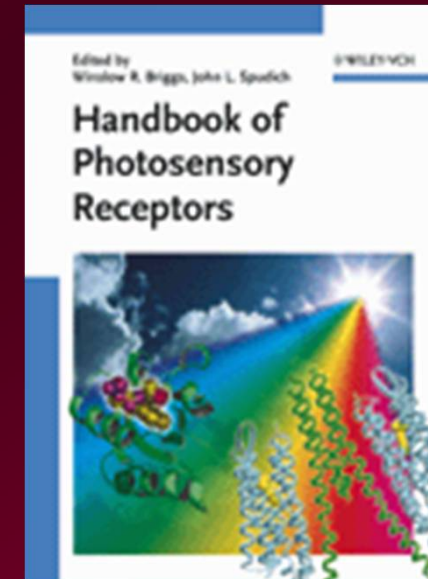
Martin Fellner

Laboratoř růstových regulátorů  
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

## a) Fotomorfogeneze



**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**

**Rockwell NC et al. (2006) Phytochrome Structure and Signaling Mechanisms.  
Annu Rev Plant Biol 57: 837-858**

<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208>

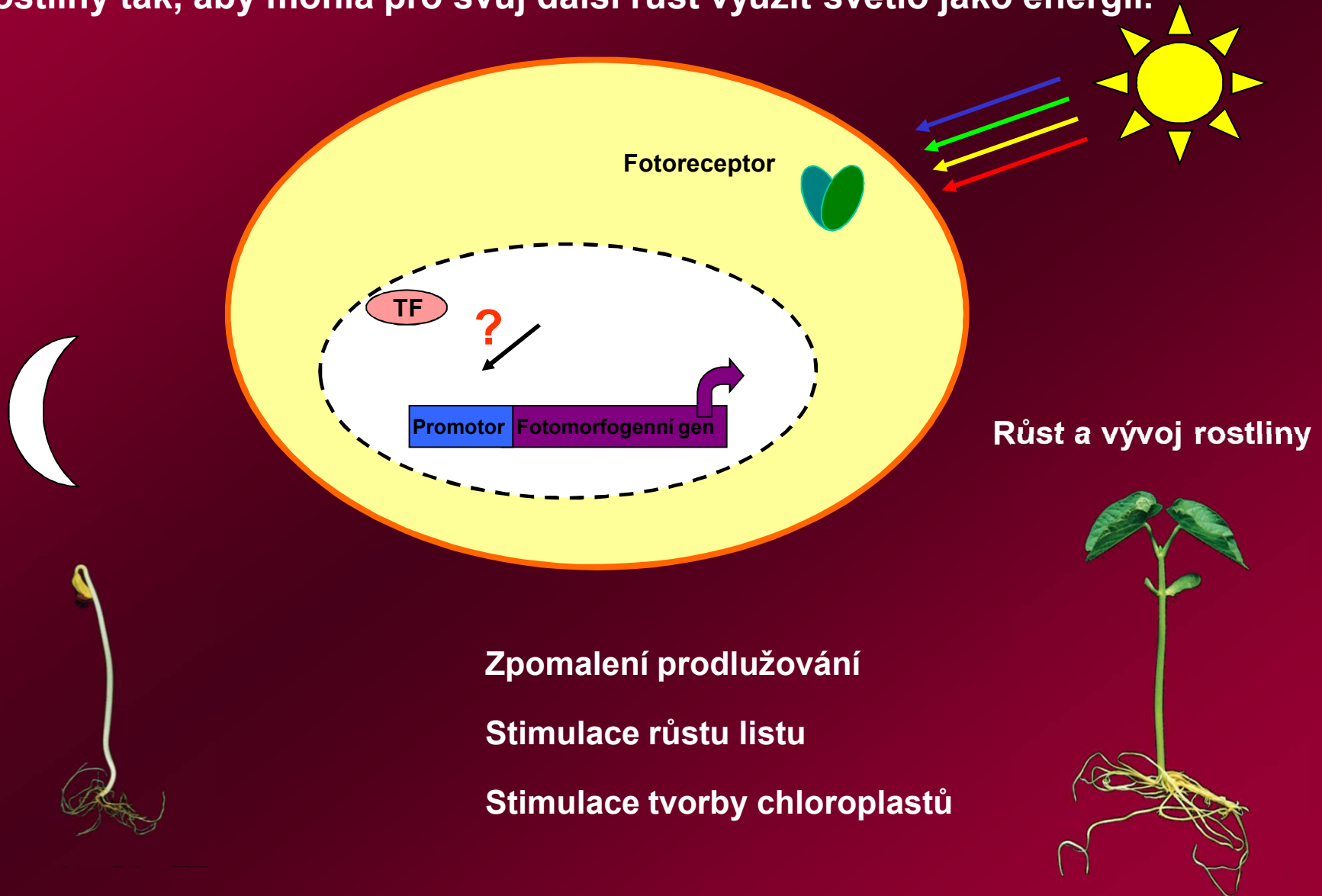
**Růst ve tmě  
(etioloizovaný růst, skotomorfogeneze)**



**Růst na světle  
(fotomorfogeneze)**



**Fotomorfogeneze** = proces, při kterém světlo jako signál změnil vývoj rostliny tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii.

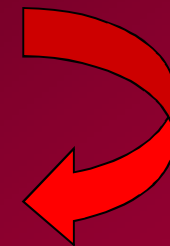


Při fotomorfogenezi je světlo zachycováno pigmenty, které jsou součástí **fotoreceptorů**:

- **červeného světla: fytochromy A až E (phytochromes)**
- **modrého světla a UV-A: kryptochromy a fototropiny (cryptochromes, phototropins)**

**Absorpce světla → aktivace signálních drah**

**Aktivace světlem indukovaných genů**



Fytochrom funguje v jádře – aktivuje transkripční faktory. Je však lokalizovaný původně v cytoplazmě => musí být přemístěn do jádra.

Sharma R (2001) Current Science 80: 178-188

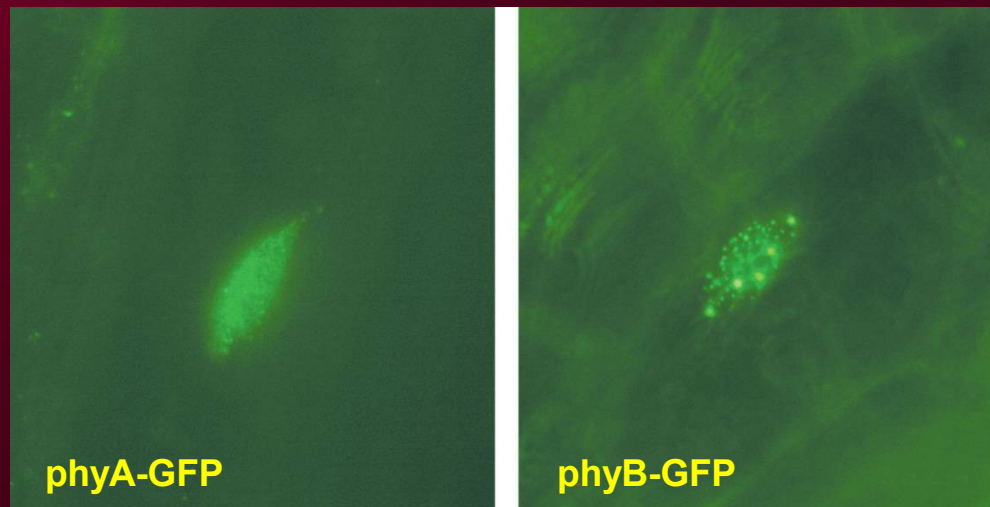


Fytochrom se přemísťuje do jádra vlivem světla

- Pohyb phyB – indukován R, inhibován FR; do jádra putuje pouze ve formě Pfr, pohyb je pomalý
- Pohyb phyA – indukován FR; putuje v obou formách; pohyb je rychlý.



Vizualizace pomocí GFP (green fluorescent protein; GFP aktivovaný světlem emituje fluorescenční záření)



## Konstrukt

Promotor *PHYB*    GFP

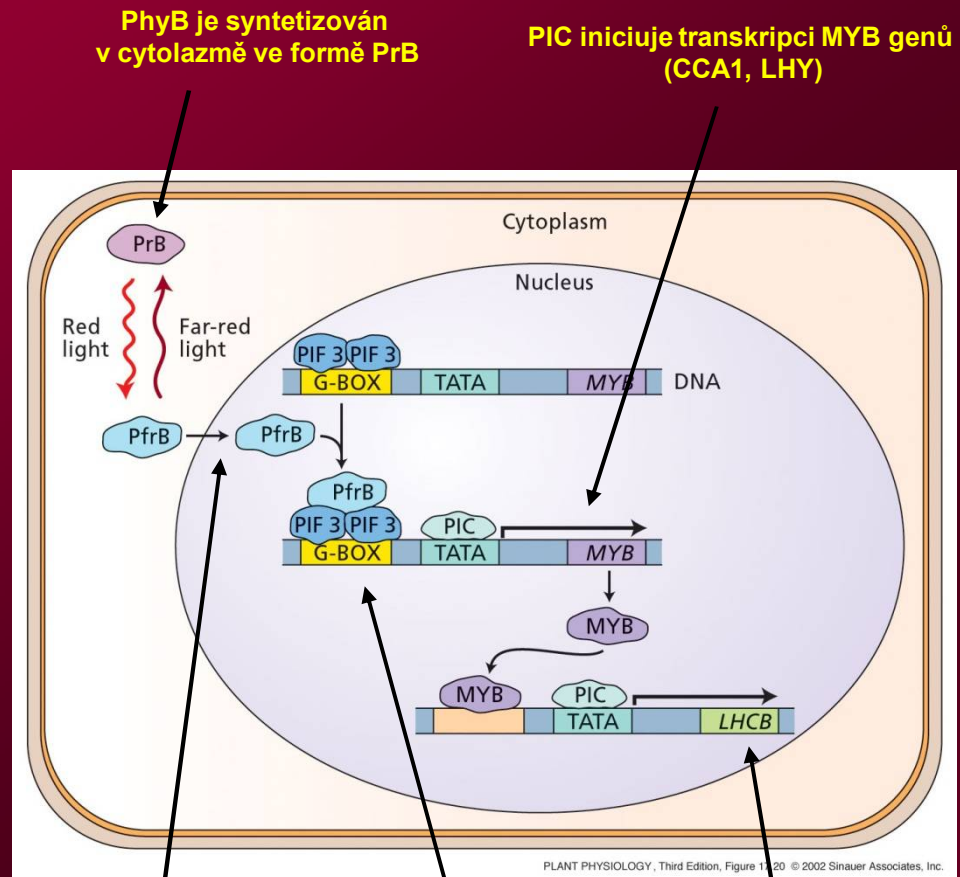


Transformace rostlin



Sledování exprese *PHYB*  
v buňkách a pletivech

## Regulace genové exprese fytochromem B



Ve formě PfrB je fytochrom transportován do jádra

PfrB se váže k dimeru PIF3

Transkripční faktor MYB aktivuje transkripci LHCB

**Jaderný protein PIF3 (Phytochrome Interacting Factor3):**

- transkripční faktor reagující s G-boxem (= část promotoru genu MYB)

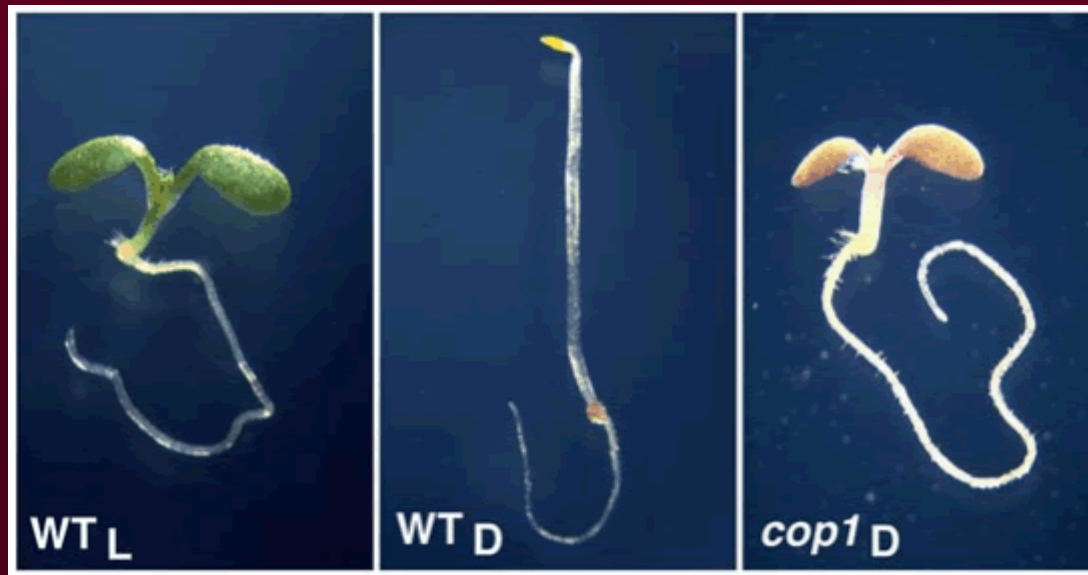
- reaguje s C-terminálním koncem fytochromu B – Pfr tvoří komplex s PIF3



## b) Úloha COP1 ve fotomorfogenezi rostlin

Genetický skrínig → Selekce mutantů → Identifikace genů

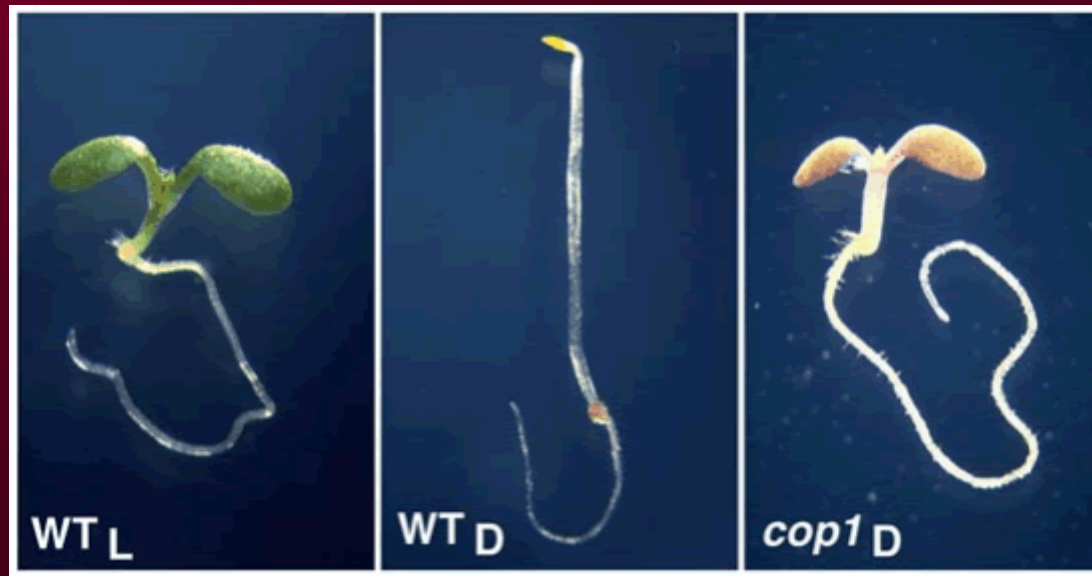
*cop1* (*constitutive photomorphogenesis 1*) - etiolizované rostliny ukazují fenotyp rostlin rostoucích na světle





Mutovaný (poškozený) gen *COP1* vede ke konstitutivní fotomorfogenezi

Zdravý gen *COP1* – negativní regulátor fotomorfogeneze



*COP1* – centrální gen fotomorfogeneze rostlin

## Struktura *Arabidopsis* COP1 (AtCOP1)



**N-terminální doména:** RING finger a coiled-coil doména

RING finger a coiled-coil doména – vnesení do *cop1* mutanta vede k osvobození letálního fenotypu



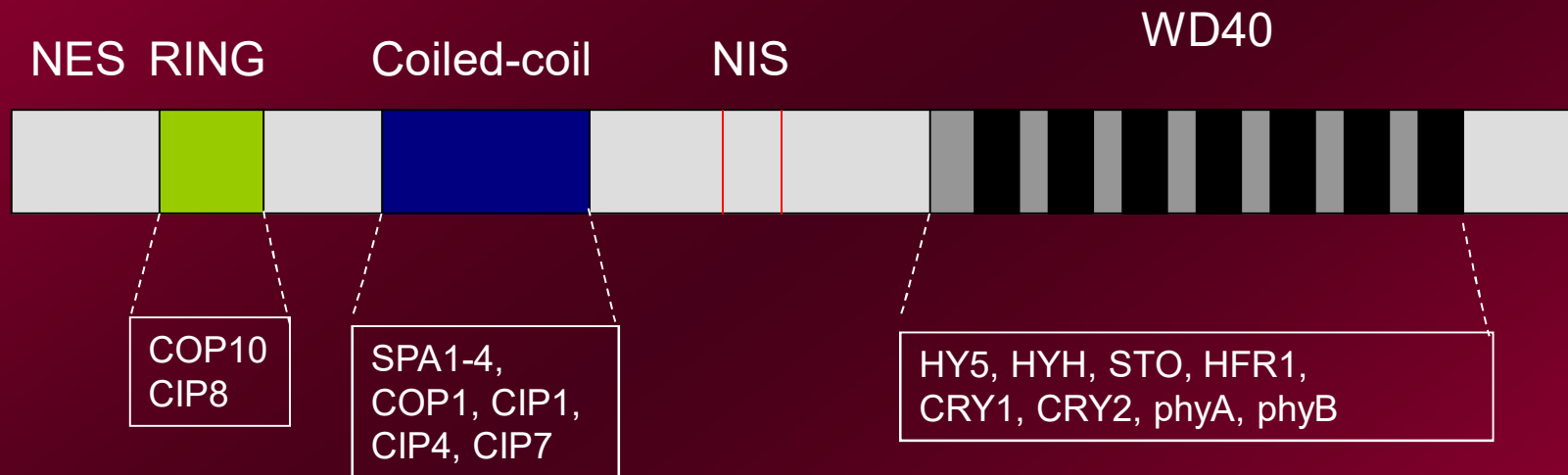
N-terminální doména má základní funkci ve vývoji rostlin

NES = leucine-rich Nuclear Export Signal

NIS = Nuclear Import Signal

**C-terminální doména:** WD40

## Interakce *Arabidopsis* COP1 s dalšími proteiny



Nezmapovaný faktor: LAF1

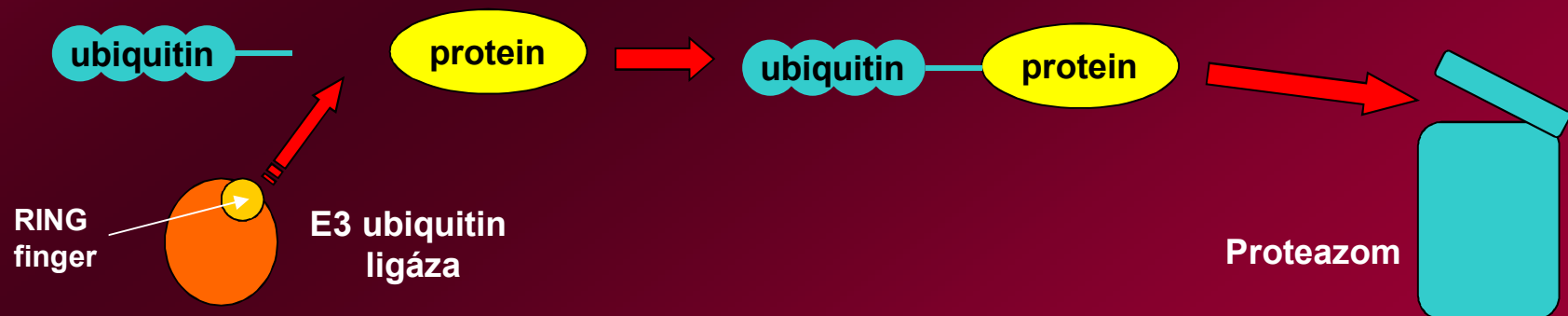
## COP1 funguje jako E3 ubiquitin ligáza

Negativní funkce COP1 byla odhalena pomocí HY5

HY5 – bZIP transkripční faktor:

- akumuluje se v reakci na světlo
- v reakci na světlo aktivuje fotomorfogenické geny
- ve tmě dochází k degradaci HY5 pomocí proteolýzy zprostředkované proteazomem

Proteolýza zprostředkovaná proteazomem vyžaduje protein ubiquitin



Důkazy, že COP1 funguje jako E3 ubiquitin ligáza:

- COP1 interaguje přímo s HY5
- degradace HY5 je narušena v mutantu *cop1*
- mutant *cop1* s bodovou mutací v WD40 špatně interaguje s HY5
- HY5 se stabilizuje na světle, když COP1 je z jádra odstraněn

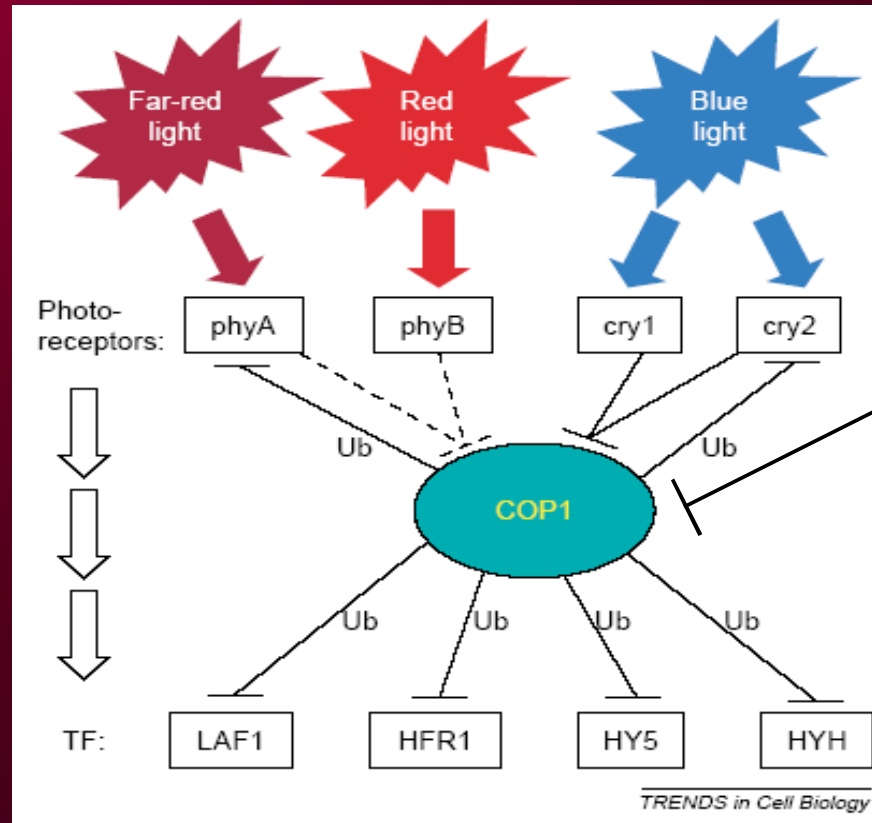


**COP1 = E3 ubiquitin ligáza**

COP1 rovněž ubiquitínuje HYH a transkripční faktory jiných typů:  
LAF1 (Myb) nebo HFR1 (bHLH)

COP1 funguje jako **hlavní vypínač**: ve tmě vypíná fotomorfogenezi tím, že degraduje transkripční faktory, které aktivují specifické geny fotomorfogeneze.

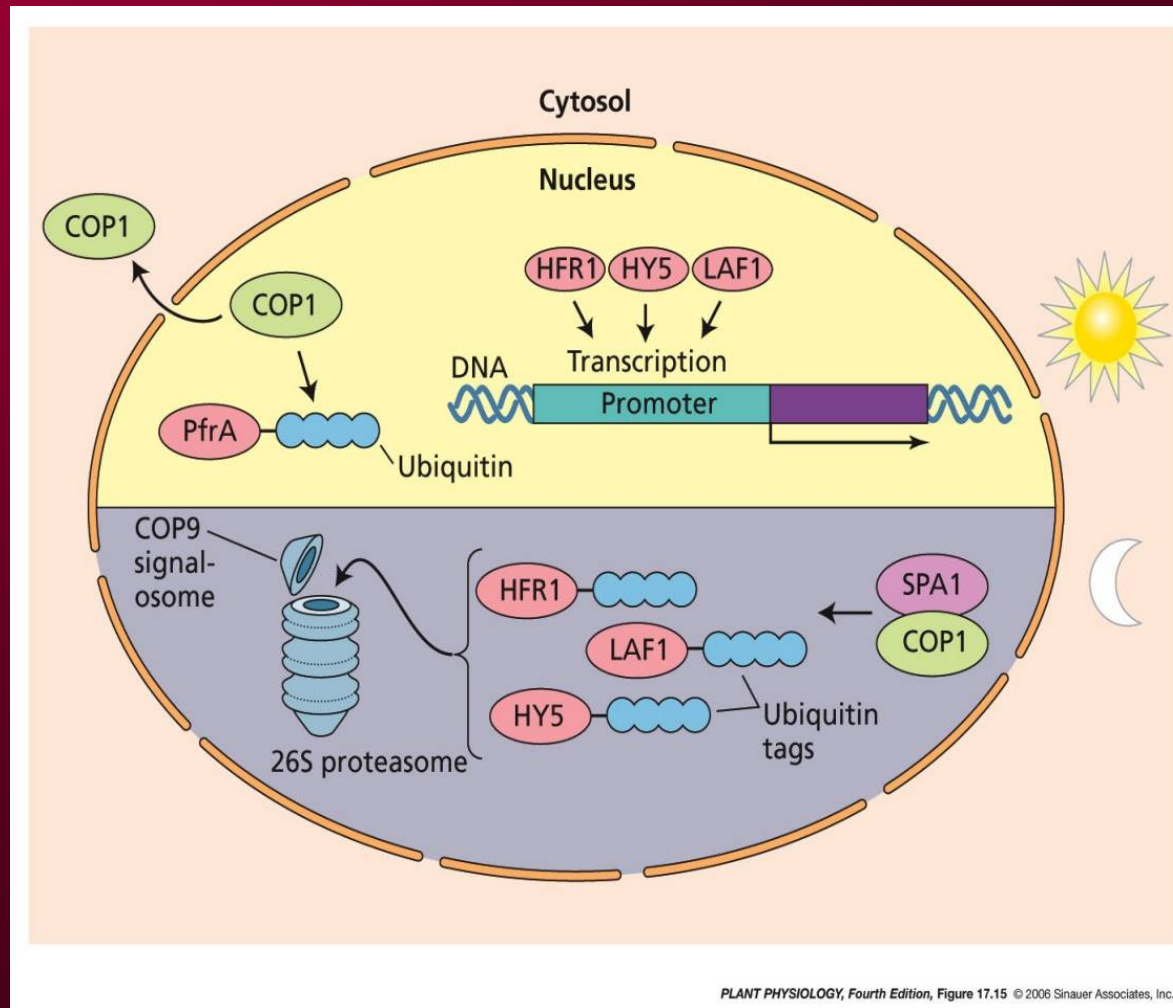
## Schéma úlohy COP1 ve fotomorfogenezi



COP1 přímo interaguje s **phyA** a **CRY2** a směřuje je k ubiquitinaci proteazomem => ochrana před nadměrnou aktivací signálních drah

COP1 zprostředkuje vliv **phyA** a **B** a **CRY1** a **CRY2** na transkripční faktory.

## Funkce COP1 je modulována nukleoplazmatickou translokací



Mutace Leu zbytků  
v doméně NES proteinu  
COP1  
(odpovědné za export  
proteinu z jádra)



Zvýšená akumulace  
mutovaného COP1  
v jádře

Transgenní rostliny  
overexprimující COP1  
s mutovanou doménou  
NES (zodpovědnou za import  
proteinu do jádra)



Snížená akumulace  
mutovaného COP1 v jádře  
= konstitutivní  
fotomorfogeneze

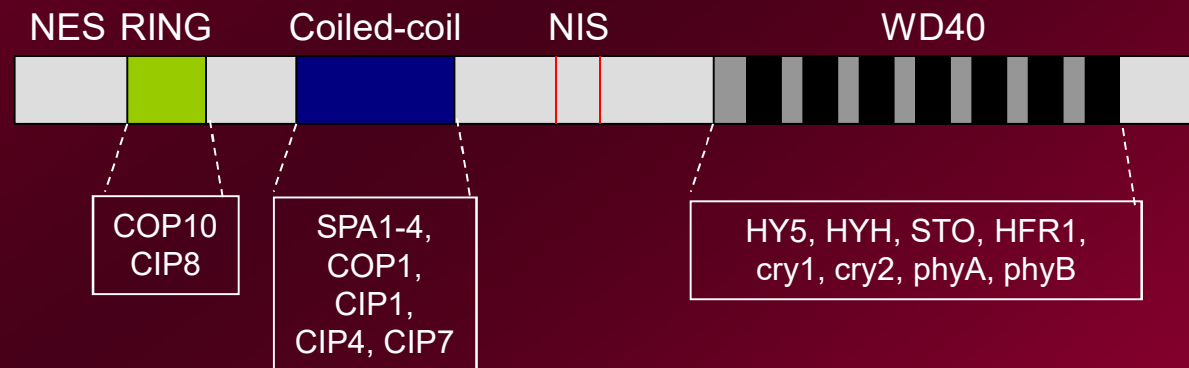


## Faktory regulující COP1

- kvasinkový dvouhybridní skrínig
- genetické interakce
- purifikace proteinových komplexů

### 1) Proteiny SPA

- regulují funkci COP1 v signální dráze phyA
- obsahují N-terminální kinase-like doménu, coiled-coil doménu, WD40 na C-konci
- WD40 vysoce homologní k WD40 doméně COP1
- fyzicky interagují s COP1 prostřednictvím coiled-coil domény



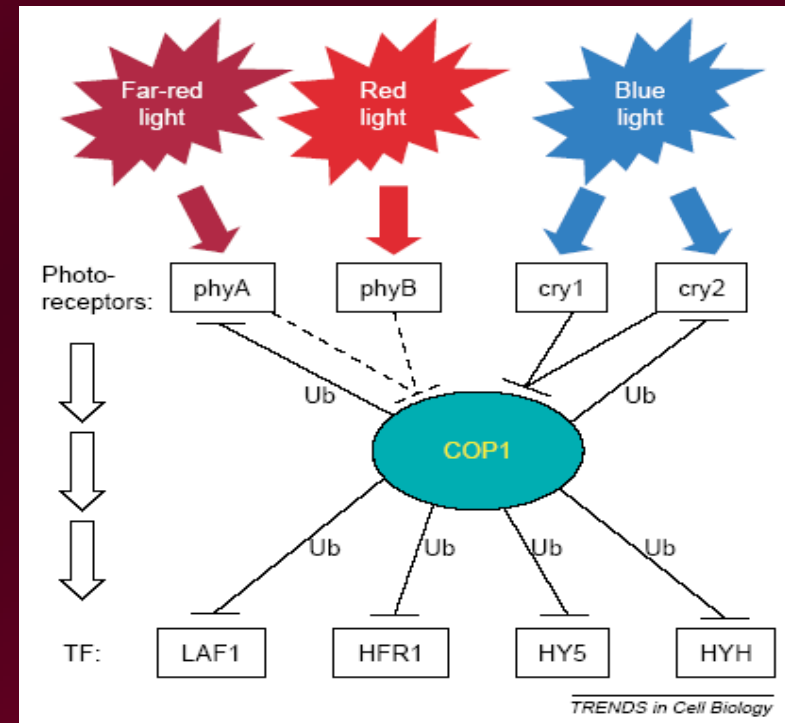
**Mechanismus regulace COP1 proteiny SPA není znám.**

- zvyšují aktivitu (fosforylací COP1) - usnadňují interakci COP1 se substráty
- stabilizují COP1 komplexy

## 2) Kryptochromy

- na světle jsou CRY1 a CRY2 fosforylovány =>  
=> stávají se aktivními

- na světle CRY1 a CRY2 negativně regulují  
aktivitu COP1 asociací C-terminální domény  
CRY (CCT) s doménou WD40 proteinu COP1



### 3) COP/DET/FUS

Další geny: *DET (DE ETIOLATED)*  
*FUS (FUSCA)* }

Mutanti s fenotypem konstitutivní fotomorfogeneze



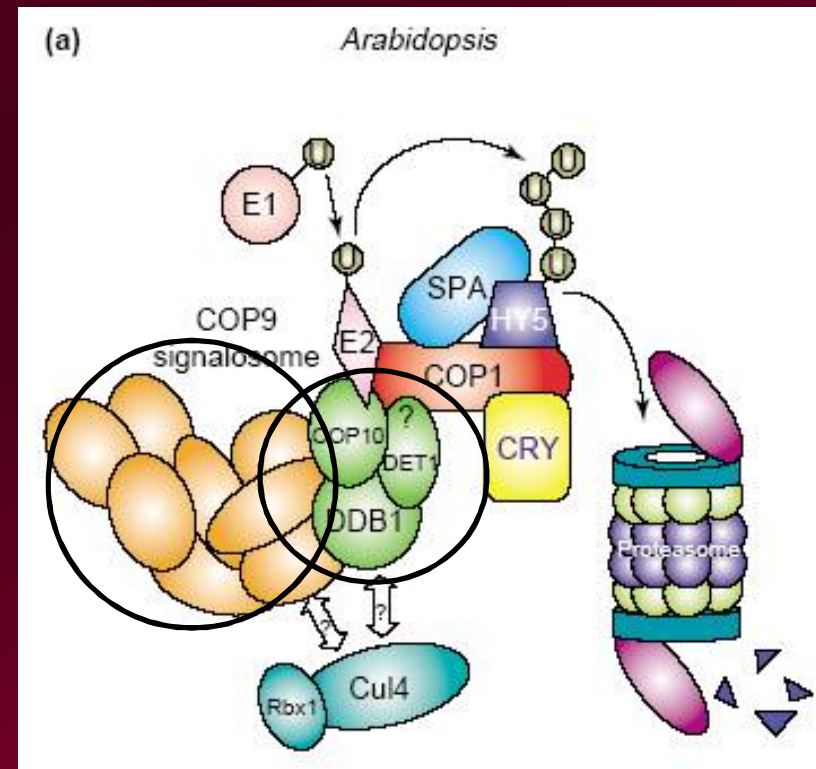
Součástí dvou velkých komplexů:

COP9 signalozom (CSN)

CDD komplex

CSN – konzervovaný u rostlin a živočichů; spojen s multi-komplexy E3 ubiquitin ligázy; reguluje aktivitu E3

CDD komplex – nalezen pouze u rostlin



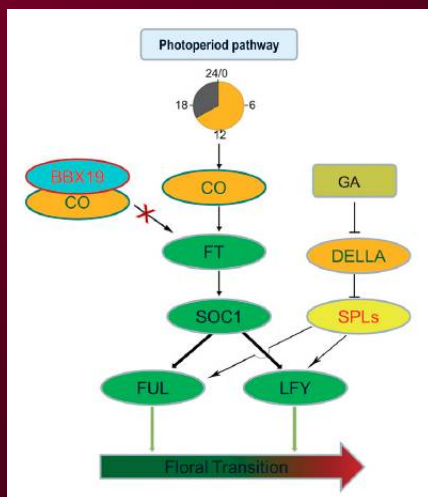
- E1 - ubiquitin-activating enzyme
- E2 - ubiquitin-conjugating enzyme
- Cul4 – Cullin 4 protein (ubiquitin ligáza)
- Rbx1 - RING-box protein 1 (ubiquitin ligáza)

## 4) Transkripční faktory BBX

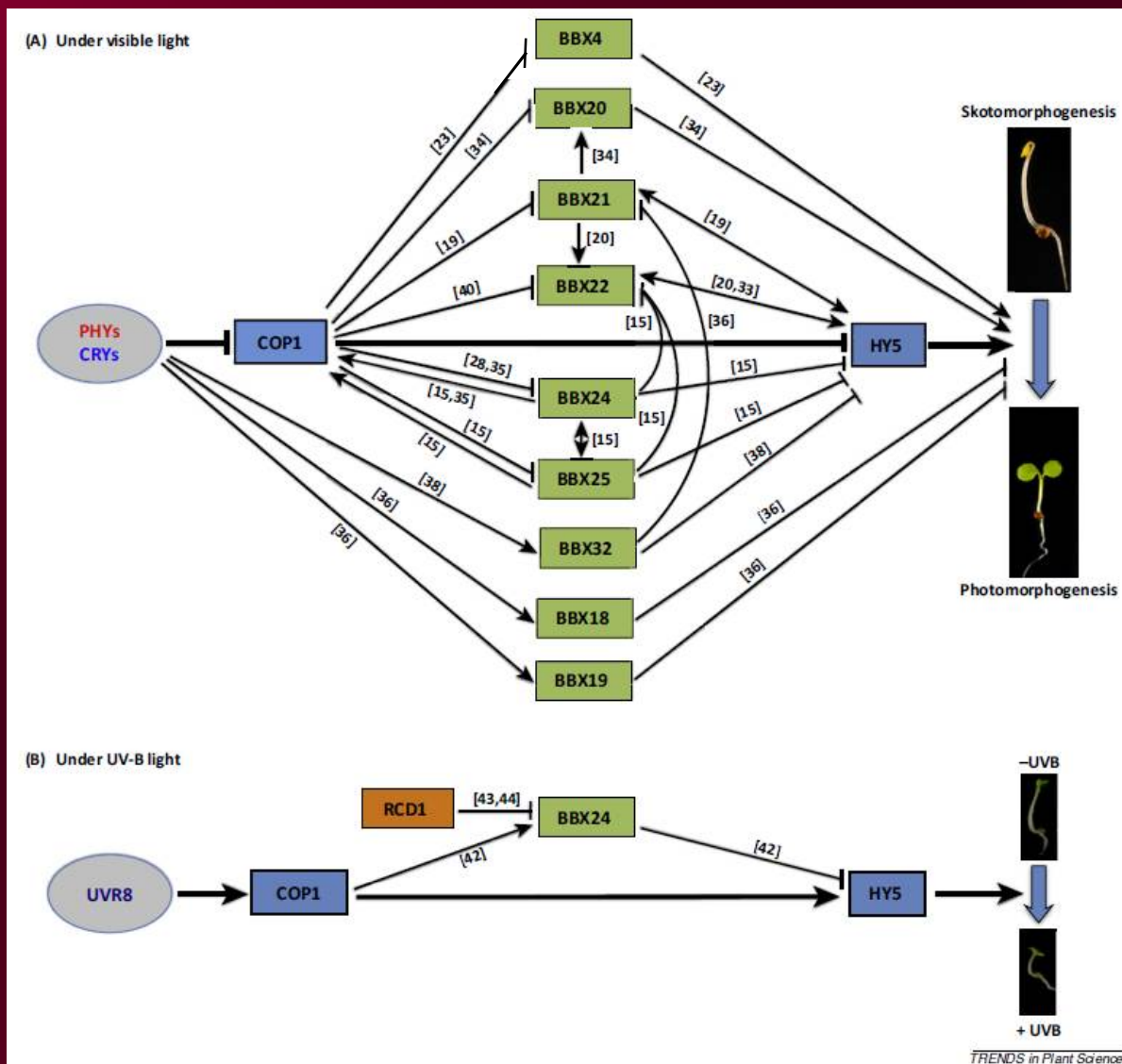
B-box (BBX) proteiny - zinc-finger transkripční faktory obsahující doménu zvanou B-box a často i doménu CCT (CONSTANS, CO-like, and TOC1).

BBX proteiny – klíčové faktory v regulaci růstu a vývoje:

- fotomorfogeneze
- kvetení



- reakce k zastínění
- reakce k biotickým a abiotickým stresům.



Gangappa SN and Botto JF (2014) Trends in Plant Science 19: 460-470

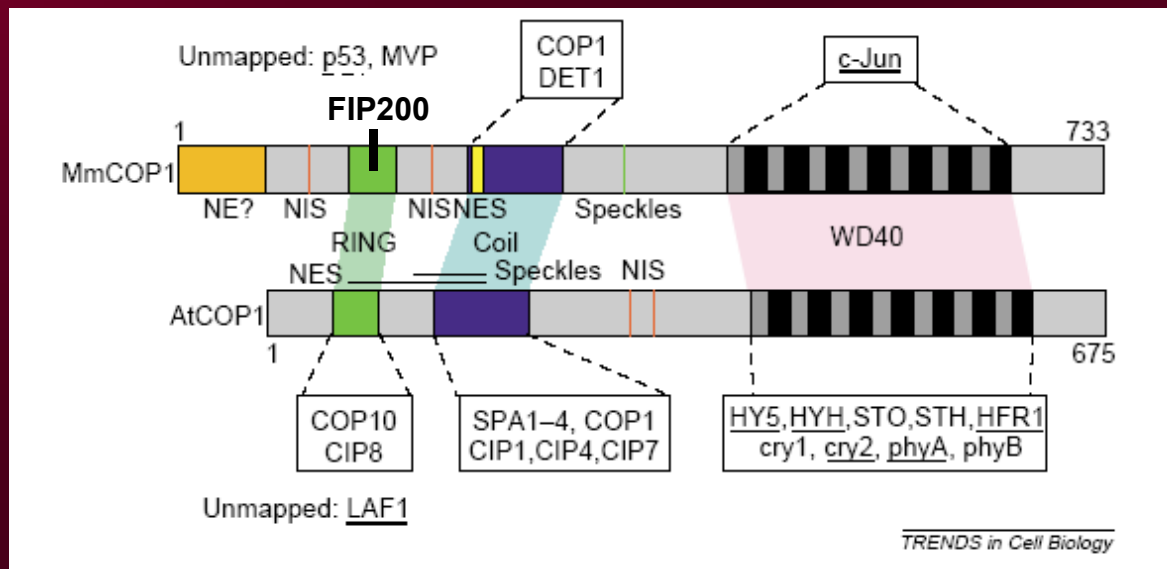
Wang C-Q et al. (2014) The Plant Cell 26: 3589-3602

## c) COP1 a tumorigeneze

**COP1 – velice konzervovaný u ryb, obojživelníků, ptáků a savců;  
nebyl identifikován u *Drosophily*, ale byl nalezen u komára**

**MmCOP1 – role v tumorigenezi a reakcích ke stresům**

### Struktura savčího *COP1* (*MmCOP1*)



**NE – umožňuje interakci  
COP1 s jadernou obálkou**

**COP1 migruje mezi jádrem a  
cytoplazmou. Má ale odlišné  
import a export signály  
(NIS, NES)**

**Coiled-coil doména – self –  
dimerizace COP1; interaguje  
s DET1**

**COP1 interaguje s c-Jun, p53  
a MVP prostřednictvím WD40**

## Funkce COP1 v savčích buňkách

Stejně jako u rostlin, živočišný COP1 je zapojen v ubiquitinaci proteinů. Jeho úloha u savců je však mnohem méně známa než u rostlin

Tři nejznámější substráty COP1: **p53** (tumor suppressor protein)  
**c-Jun** (proto-oncogene)  
**MVP** (major vault protein)

### p53 - tumor suppressor protein

Identifikován v r. 1979

COP1 degraduje p53: Overexprese COP1 → Inhibice transkripce a apoptózy závislé na p53

Vysoká exprese COP1 byla zjištěna ve vysokém procentu v endokarcinomech prsu a vaječníků

Eliminace COP1 → Zastavení buněčného cyklu v G1 fázi

U rostlin je aktivita COP1 regulována světlem.

**Otázka:** Co reguluje aktivitu COP1 u živočichů? Co způsobuje zvýšení či redukci exprese COP1?



Poškození DNA – důsledek UV a ionizačního záření

Nejčastěji mutovaným supresorem je **p53**

**Update 2008**

**Benjamin CL et al. (2008) Photochem Photobiol 84: 55-62**

UVB indukuje mutaci (C=>T a CC=>TT) v genu *p53*. Mutace jsou spojené s vývojem rakoviny kůže. Mutace *p53* - detekovány v myši kůži dopředu před vypuknutím rakoviny. **Využití:** Testování opalovacích krémů.



**c-Jun**

UV záření



Akumulace c-Jun

Iniciace transkripce AP-1  
(activator protein)

Redukce transkripce p53



Tumorigeneze

**MVP**

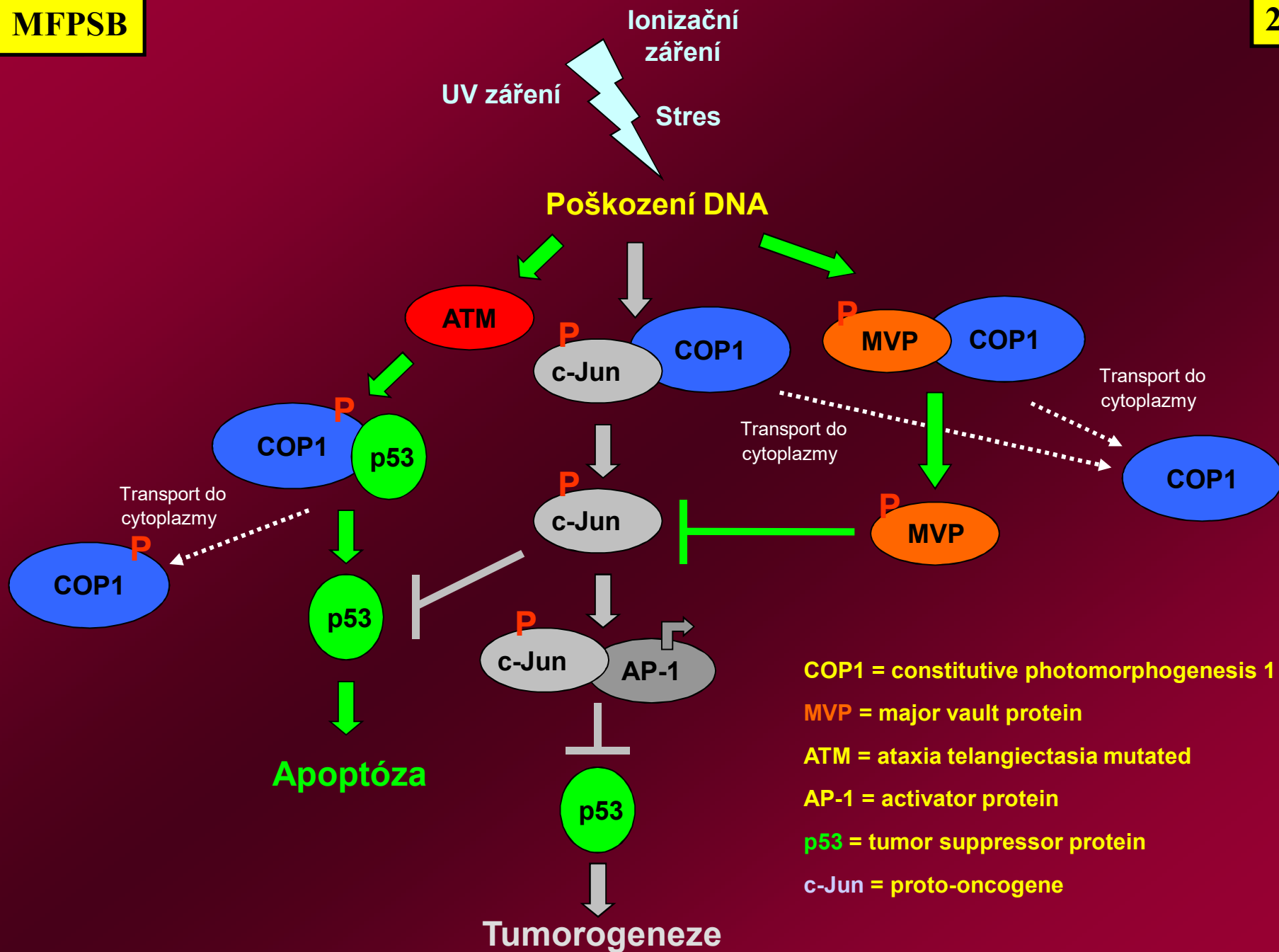
UV záření



Fosforylace MVP

Rozpad komplexu  
COP1-MVPRedukce transkripce AP-1  
(activator protein)

Apoptóza



**COP1 = constitutive photomorphogenesis 1**  
**MVP = major vault protein**  
**ATM = ataxia telangiectasia mutated**  
**AP-1 = activator protein**  
**p53 = tumor suppressor protein**  
**c-Jun = proto-oncogene**

Update 2011

Wei W, Kaelin WG (2011) J Clin Investig 12: 1263-1265

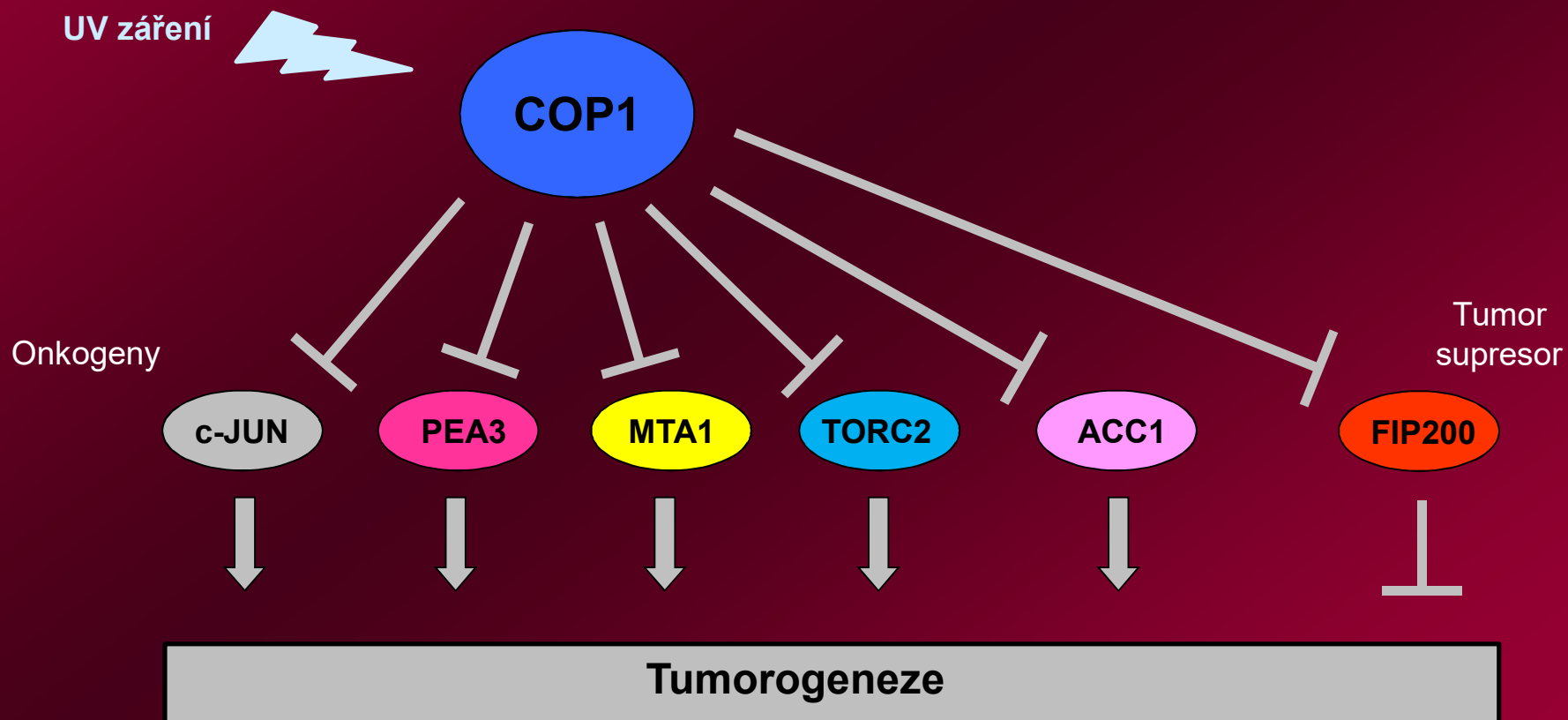
Update 2013

Kobayashi et al. BMC Biochemistry 2013, 14:1

Další substráty COP1:

Onkogeny: ACC1, PEA3, MTA1, TORC2

Tumor supresor: FIP200



# Kdo jsou?



**Xing-Wang Deng**  
Yale University, New Haven



**Vishva M. Dixit**  
Genentech, Inc., San Francisco



**Joanne Chory**  
The Salk Institute, La Jolla



**Chunling Yi**  
Yale University, New Haven



**David Dornan**  
Genentech, Inc., San Francisco

## Klíčová slova pro příští přednášku

**Boron**

**Borate transport**

**Boron transporter**

**NaBC1**

**Boron channel**

**Na<sup>+</sup>-coupled borate transporter**

**Boron transport**

**Boric acid**

**NIP5;1 NIP6;1**

**BOR1, BOR3, BOR4**

**Xylem loading**

**Google:** <http://www.google.cz/>

**NCBI:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>