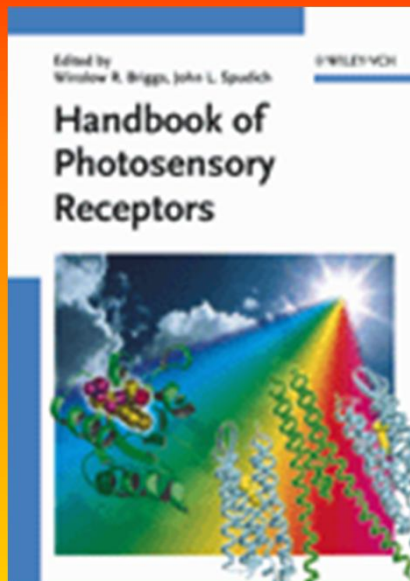


## 4) Role světla a fytochromů ve vývoji a růstu rostlin

c) Ekologické funkce fytochromů

d) Buněčný a molekulární mechanismus funkce  
fytochromů



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

## c) Ekologické funkce fytochromů

R/F reverzibilní pigment



Vlnové délky R a FR = informace pro rostlinu



**R : FR**

$$R : FR = \frac{\text{Proud fotonů při } 660 \text{ nm } \pm 10 \text{ nm}}{\text{Proud fotonů při } 730 \text{ nm } \pm 10 \text{ nm}}$$

**UPDATE 2010**

Franklin KA, Quail PH (2010) J Exp Botany 61: 11-24

Nové review of funkci fytochromů u *Arabidopsis*

## R : FR různých prostředí

**TABLE 17.3**  
Ecologically important light parameters

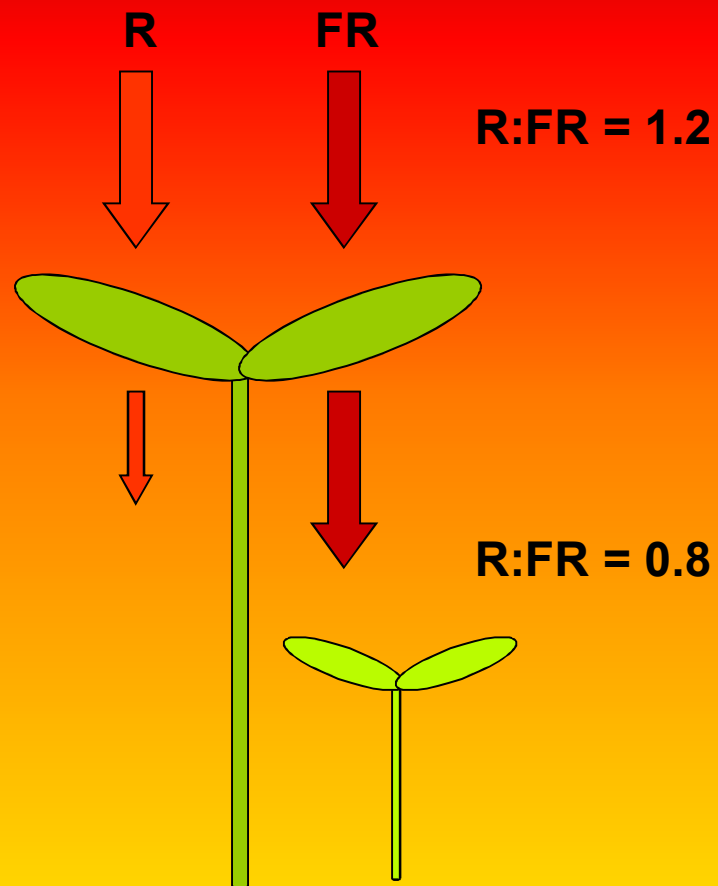
	Photon flux density ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	R/FR <sup>a</sup>
Daylight	1900	1.19
Sunset	26.5	0.96
Moonlight	0.005	0.94
Ivy canopy	17.7	0.13
Lakes, at a depth of 1 m		
Black Loch	680	17.2
Loch Leven	300	3.1
Loch Borrallie	1200	1.2
Soil, at a depth of 5 mm	8.6	0.88

Source: Smith 1982, p. 493.

Note: The light intensity factor (400–800 nm) is given as the photon flux density, and phytochrome-active light is given as the R:FR ratio.

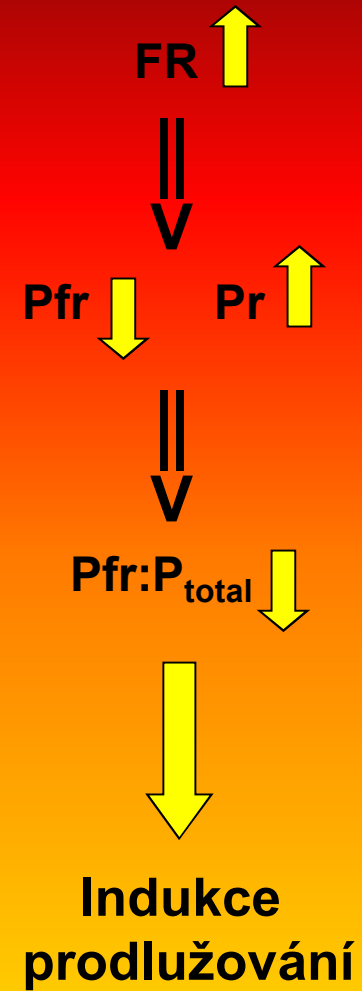
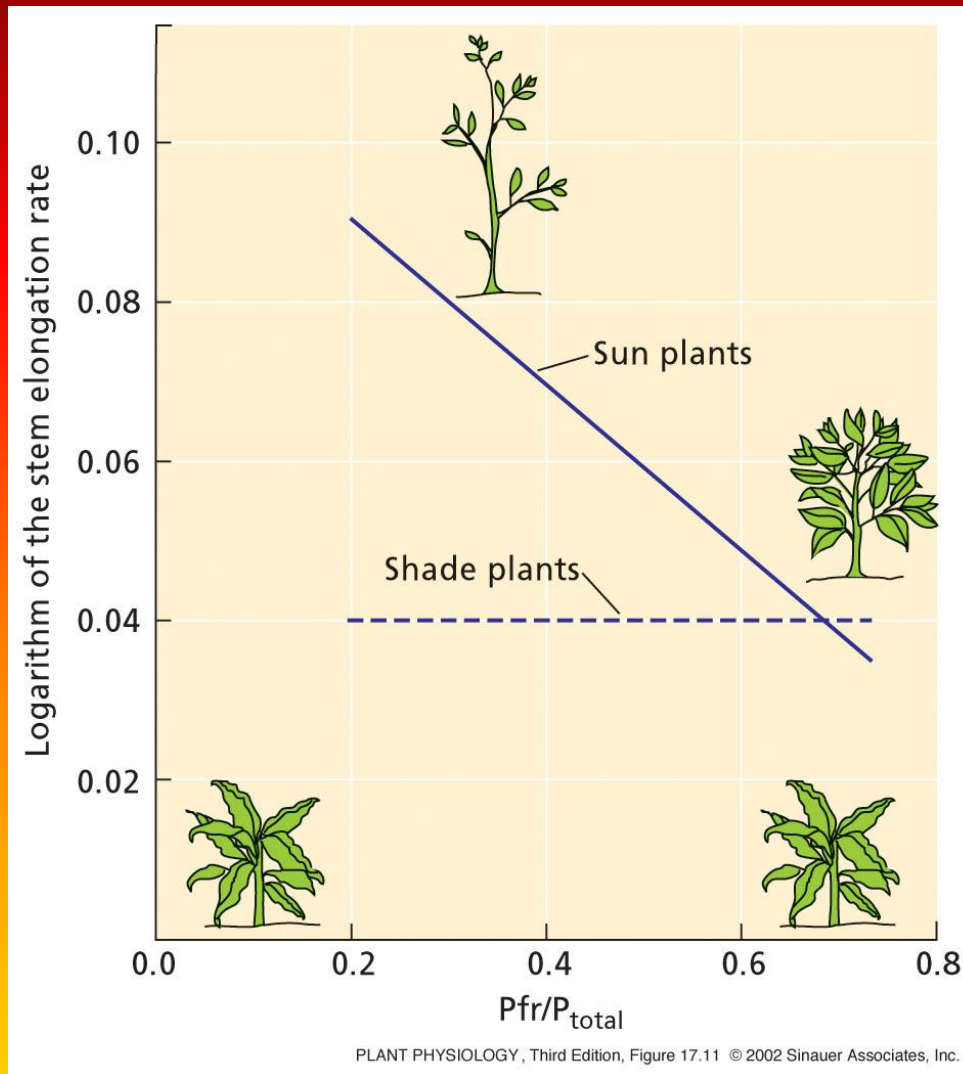
<sup>a</sup>Absolute values taken from spectroradiometer scans; the values should be taken to indicate the relationships between the various natural conditions and not as actual environmental means.

## Shade avoidance (únik ze stínu) = reakce rostlin k zastínění



### Shade-avoidance reakce

- prodlužování
- redukce velikosti listů
- úbytek chlorofylu
- redukce tvorby sec. výhonů



## Denní rytmy (circadian rythms)

**Denní rytmy** = rytmické změny, při kterých se fáze vyšší aktivity střídají s fázemi o nižší aktivitě

Přetrvávají i bez přítomnosti exogenních faktorů => endogenní

Nutnost existence vnitřních stimulátorů (pacemakers)



### Endogenní oscilátory

- rostliny
- živočichové

- (ne)závislé na teplotě => funkční v různých klimatických podmínkách
- modulovány světlem => denní rytmus: 24 hodin

## Nyctinastie (spící pohyby rostlin) (nyctinasty)

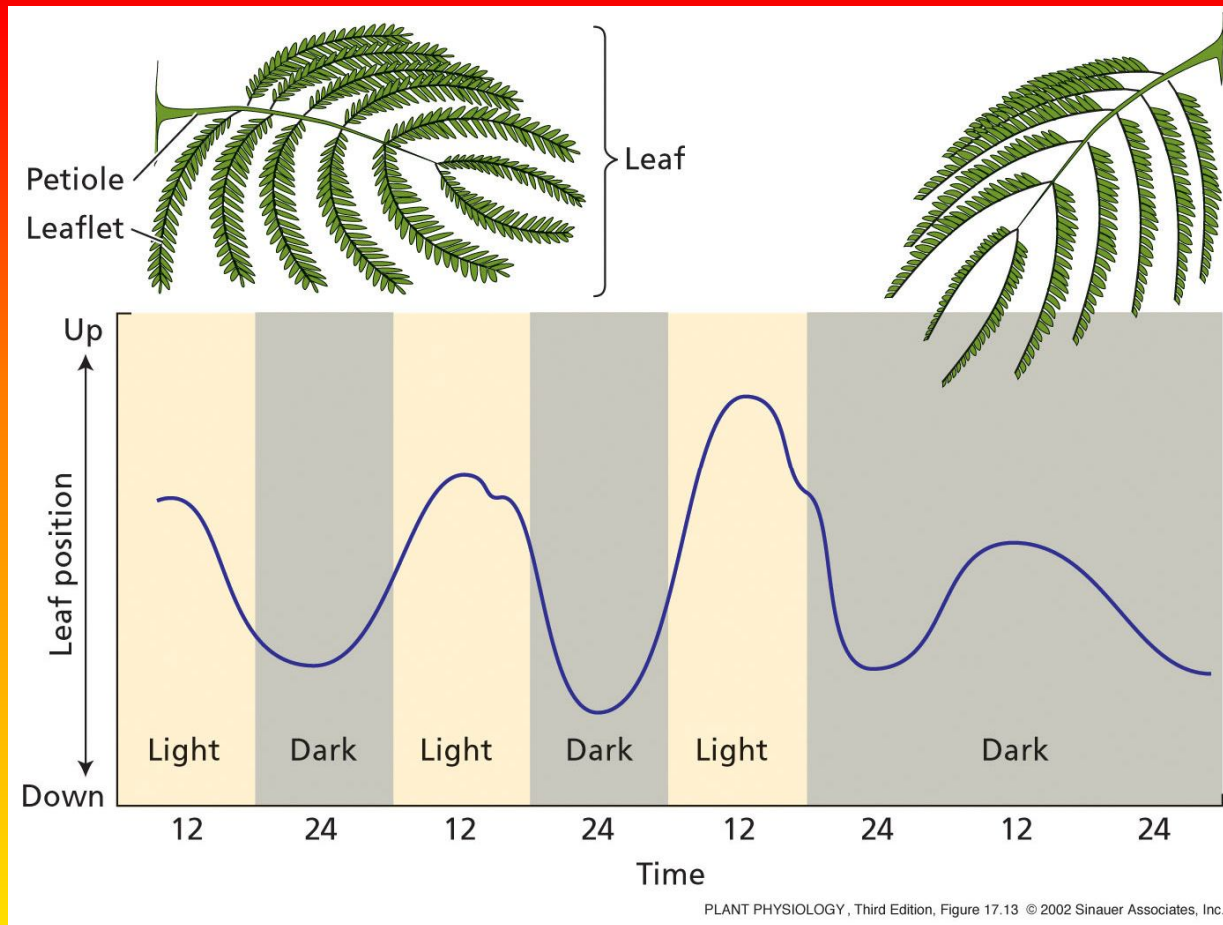
Světlo



Tma



R (červené) a B (modré) světlo stimuluje otevírání listů; FR ruší efekt R } Fytochromy jsou zapojeny

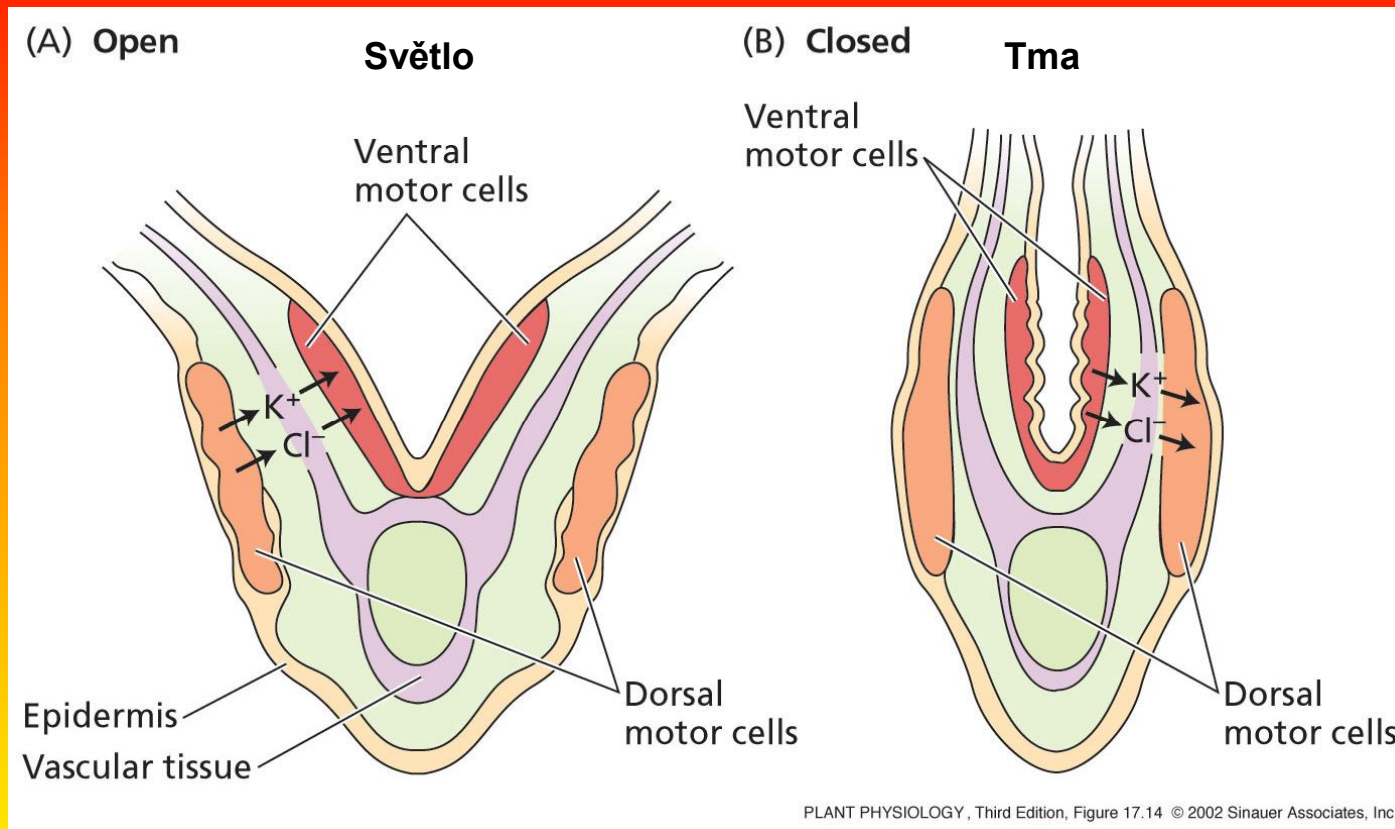




## Fyziologický mechanismus pohybu listů – změny v turgoru buněk pulvinia

Změny v turgoru buněk dorzálních a ventrálních buněk  
= změny v proudění  $K^+$  a  $Cl^-$

Akumulace  $K^+$  a  $Cl^-$  ve ventrálních buňkách => nafouknutí buněk => **otevírání listů**  
Ventrální buňky ztrácí  $K^+$  a  $Cl^-$  => smršťování buněk => **zavírání listů**



## Exprese genů a denní rytmy

**Geny skupiny *LHCB* – light harvesting chlorophyll a/b-binding proteins of photosystem II**

**Exprese *LHCB* je regulována fytochromy + denním rytmem**

**Př. 1: Hladina mRNA *LHCB* u hrachu osciluje v průběhu dne a noci; max. ráno, min. večer. Fytochrom přerušuje cyklickou oscilaci mRNA**

**Př. 2: Rostliny pšenice přeneseny z 12-hod cyklu do tmy => amplituda rytmu se zeslabuje; ozáření červeným světlem před umístěním do tmy však zeslabování amplitudy eliminuje**

## Geny denního rytmu u *Arabidopsis*

T-DNA mutanti => charakterizace mutantů => identifikace genů zapojených v denních rytmech

### Konstrukt



Transformace rostlin



Sledování exprese *LHCB*  
v buňkách a pletivech

*LUC* = kóduje enzym luciferázu

Luciferáza rozkládá substrát luciferin



Emise světla



Lokalizace genu

Mutant *toc* = *timing of CAB (LHCB)* => gen *TOC1* – hraje roli v oscilačním mechanismu

## Specializace fytochromů

Geny *PHYA* – *PHYE* jsou velice podobné, funkčně se však liší

***PHYB*** – identifikován analýzou mutanta *hy3* (nyní *phyB*) – dlouhý hypokotyl v bílém světle; *PHYB* mRNA redukována, protein *phyB* není syntetizován; normální exprese *PHYA*.

### Mutant *phyB*:

- nereaguje na stín
- nereaguje k FR aplikovanému na konci dne
- není schopen reagovat na R/FR reverzibilní indukci klíčení

***PHYB*** je zodpovědný za citlivost rostlin k R a zprostředkuje fotoreverzibilní klíčení semen

FR-HIR požaduje fotolabilní fytochrom typu I = phyA => phyA je receptor kontinuálního FR.

Mutant *phyA*:

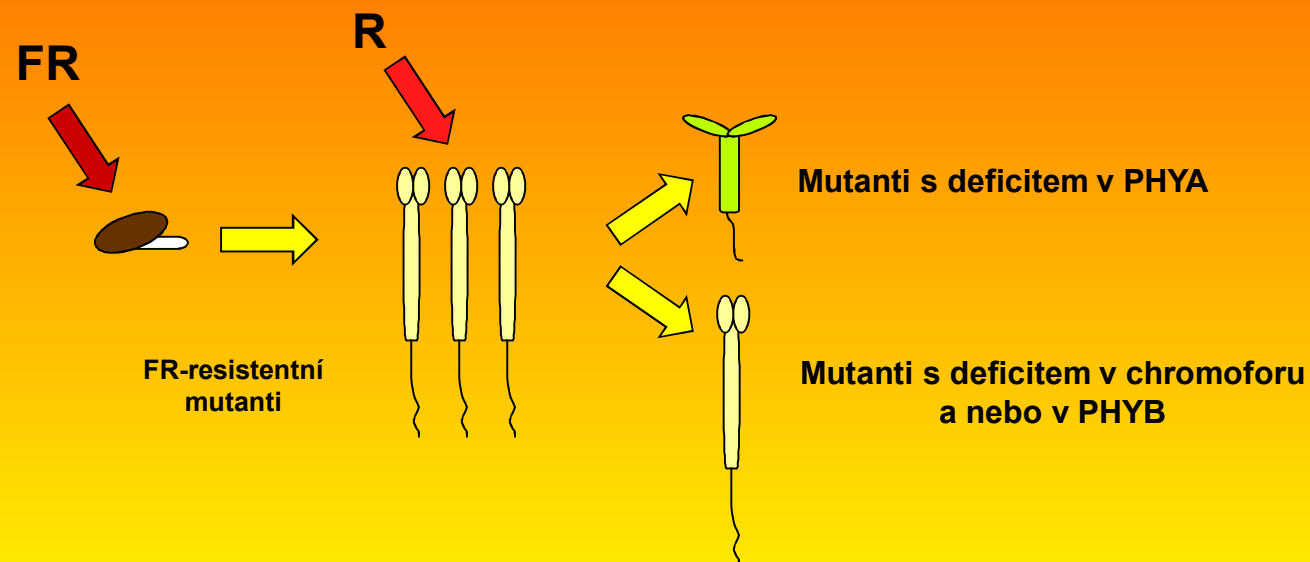
- neukazuje reakci k FR
- vytváří vysoký a tenký fenotyp

=

fenotyp mutantů s defektem v chromoforu či phyB



Obtížné selektovat mutantu se specifickým defektem pouze v proteinu PHYA



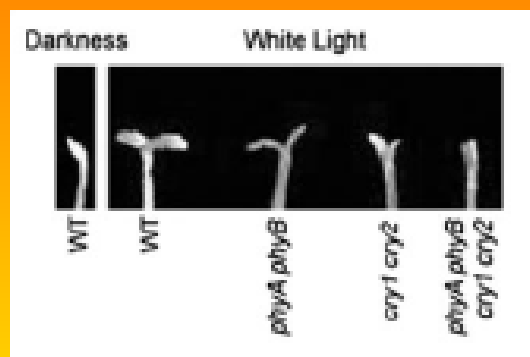
## Role fytochromů C, D a E ve vývoji rostlin

Funkce phyC, D a E se překrývají s funkcemi phyA a phyB- hrají doplňkové role:

Analýza double a triple mutantů:

- phyD a phyE pomáhají zprostředkovat reakci shade-avoidance (primárně kontrolována fytochromem B)
- phyD reguluje prodlužovací růst řapíku a kvetení (primárně phyB)
- phyE doplňuje phyB a phyD v růstu řapíku a kvetení a doplňuje funkci phyA a phyB v inhibici růstu internodií

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

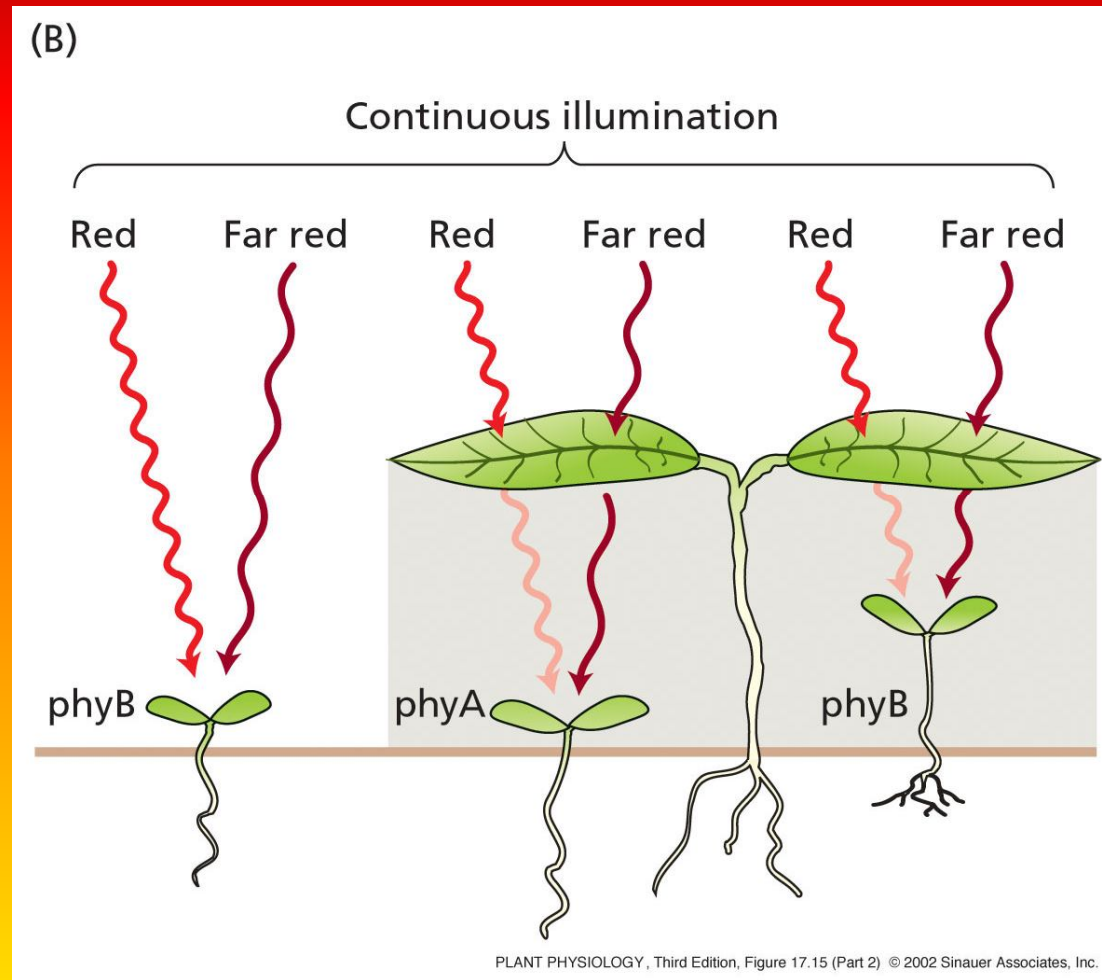


**ALE transkripční analýza ukázale expresi světlem regulovaných genů!!! Mutant ukazuje reakce denního cyklu!!!**



Fotoreceptory phyC, D, E a nový receptor ZEITLUPE zprostředkují tuto expresi a reakce denního cyklu.

## Interakce phyA a phyB v shade-avoidance reakci



### Přímé sluneční světlo:

Hodně R => de-etiolizace  
řízena phyB

### Stín:

Hodně FR => zpočátku  
de-etiolizace řízena  
phyA. PhyA je labilní =>  
později de-etiolizace  
řízena phyB

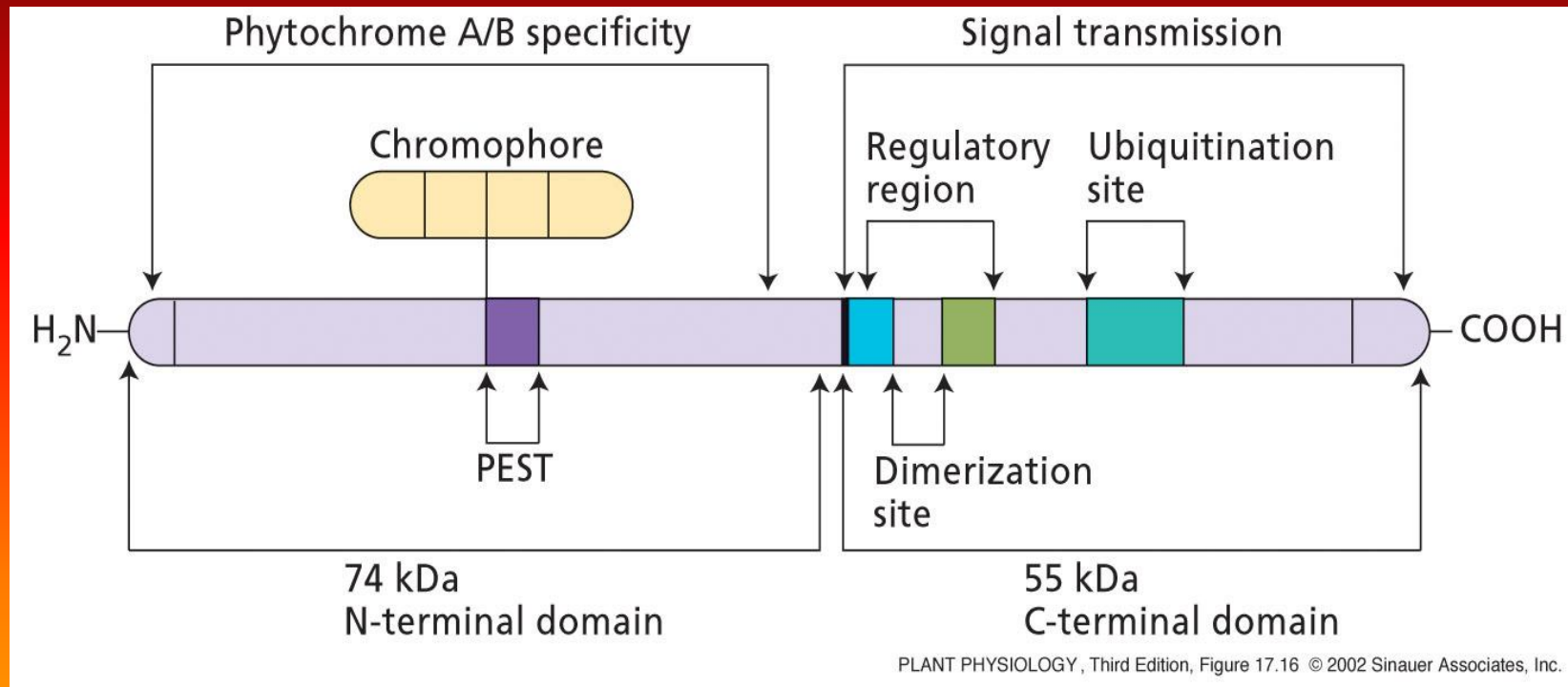
## Funkční domény fytochromu

Skupina genů kódujících fytochromy => různé reakce jsou regulovány specifickými fytochromy, nebo interakcí fytochromů

### Strategie:

- overexprese fytochromů v GMO => vysoká hladina fytochromů => studium funkce fytochromů
- nahrazení či změna sekvencí fytochromu v GMO => studium funkce domén fytochromu

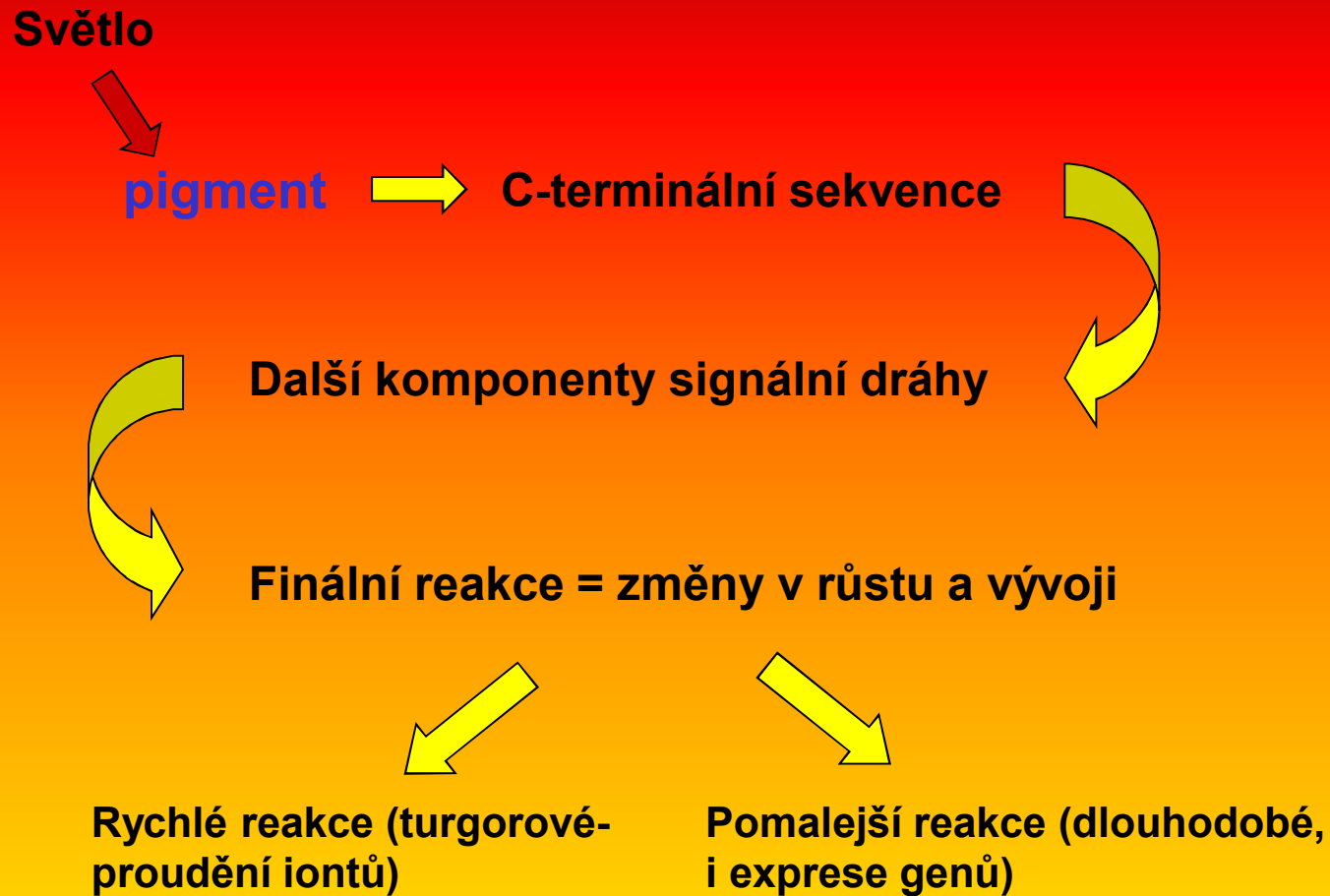




**N-terminální doména: nese místo vázající chromofor a PEST doménu = fotocitlivé části molekuly; rozhodují o reakci k R či FR.**

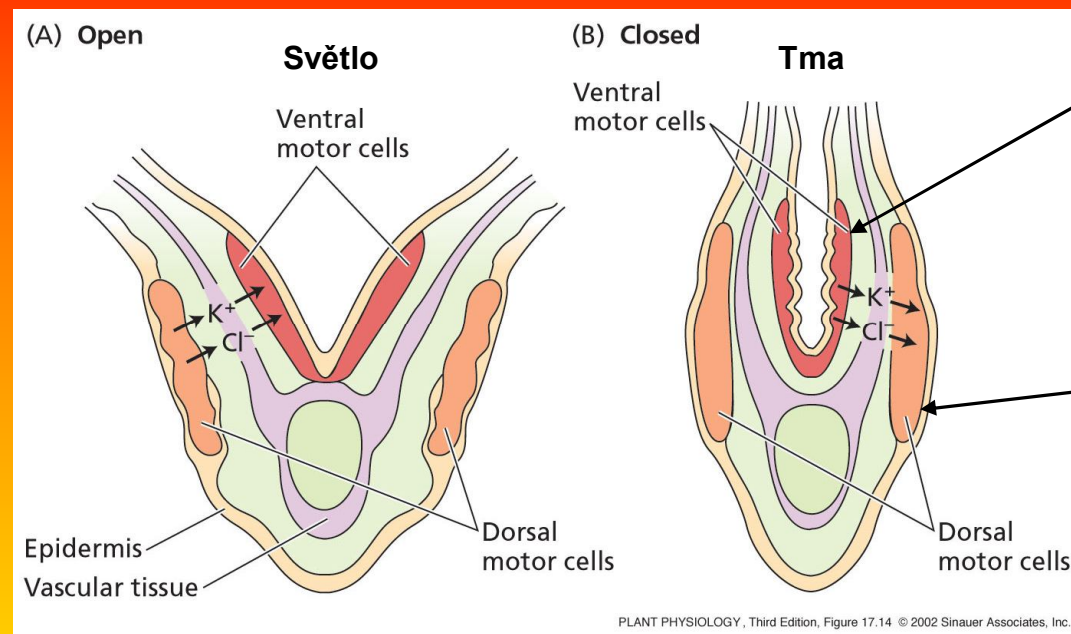
**C-terminální doména: obsahuje regulační oblast, a dimerizační a ubikitinační místo; přenáší signál na další proteiny ve fytochromové signální dráze.**

## d) Buněčný a molekulární mechanismus funkce fytochromů



## Regulace membránového potenciálu a proudění iontů zprostředkované fytochromy

Lag fáze zavírání listů ~ 5 minut => krátká doba na expresi genů => přímá indukce změny propustnosti membrány prostřednictvím fytochromů



Ztráta  $K^+$  a  $Cl^-$



$H^+$  proudí dovnitř buňky => pH apoplastu se zvyšuje

$H^+$  pumpa ventrálních buněk je deaktivována

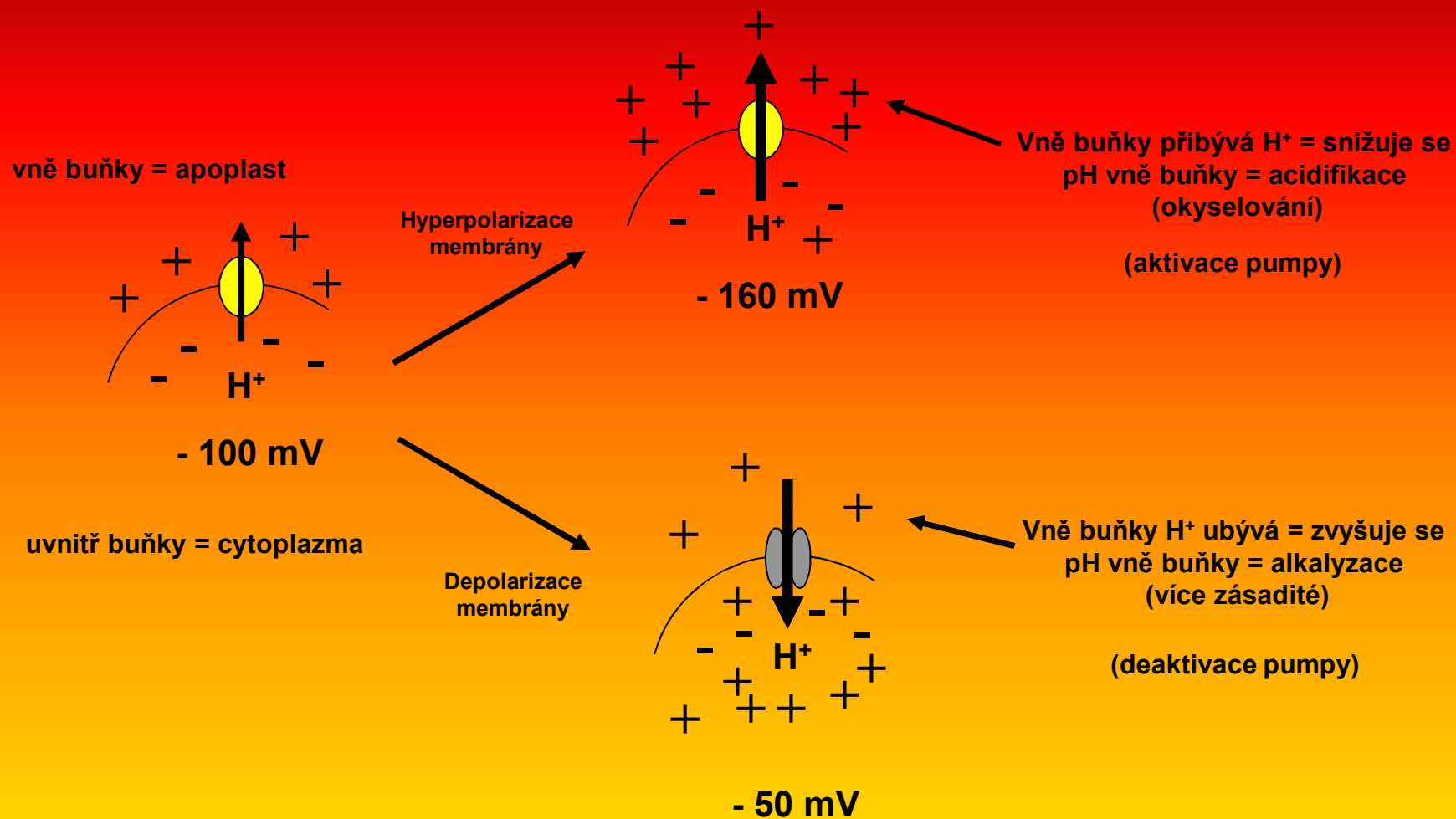
Akumulace  $K^+$  a  $Cl^-$  v buňce



$H^+$  proudí ven z buňky => pH apoplastu se snižuje

$H^+$  pumpa dorzálních buněk je aktivována

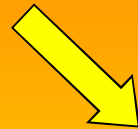
## H<sup>+</sup> pumpa a pH



Denní rytmus pohybu listů má původ v denním rytmu otevírání  $K^+$  kanálů zprostředkovaného fytochromy. Proces je rychlý, nikoliv však okamžitý => fytochromy nepůsobí přímo na membráně



Existence dalších kroků v signální dráze



Cytoplazmatická hladina  $Ca^{2+}$

Fytochrom neobsahuje transmembránovou doménu => nevyskytuje se v membráně => výskyt v cytoplazmě



K přenosu signálu na membránu je potřeba sekundární přenašeč



Cytoplazmatická hladina  $Ca^{2+}$

## Fytochrom reguluje expresi genů



**Rychlé exprese genů:** fytochrom řídí aktivaci transkripčních faktorů. Transkripční faktory vstupují do jádra a stimulují transkripci specifických genů.

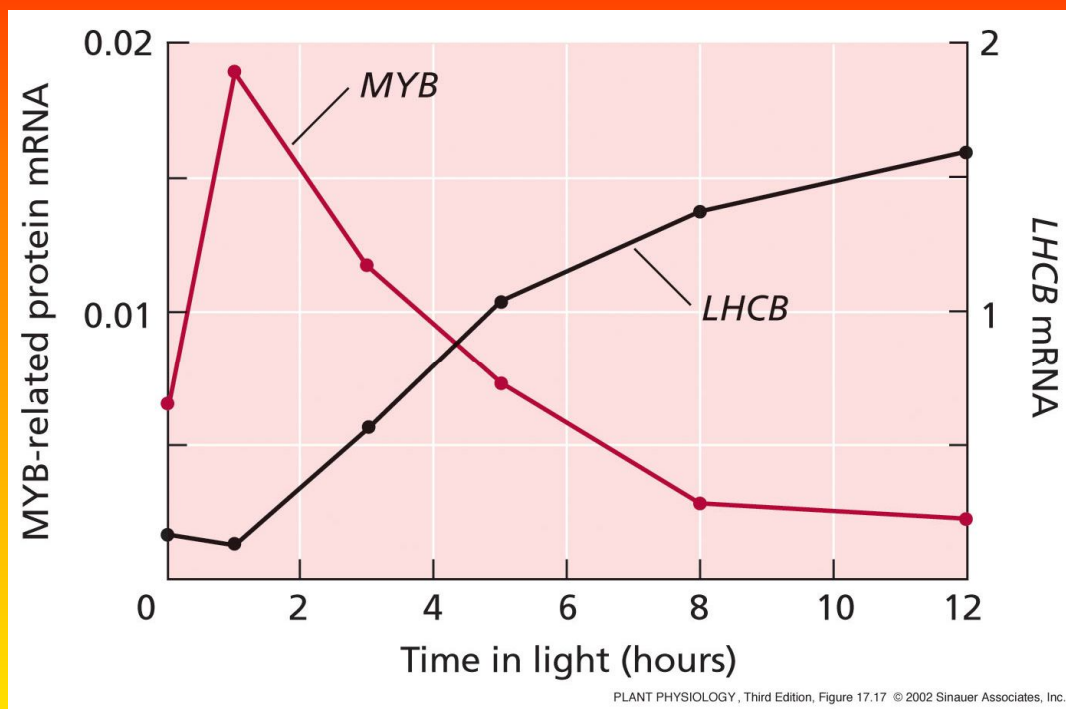
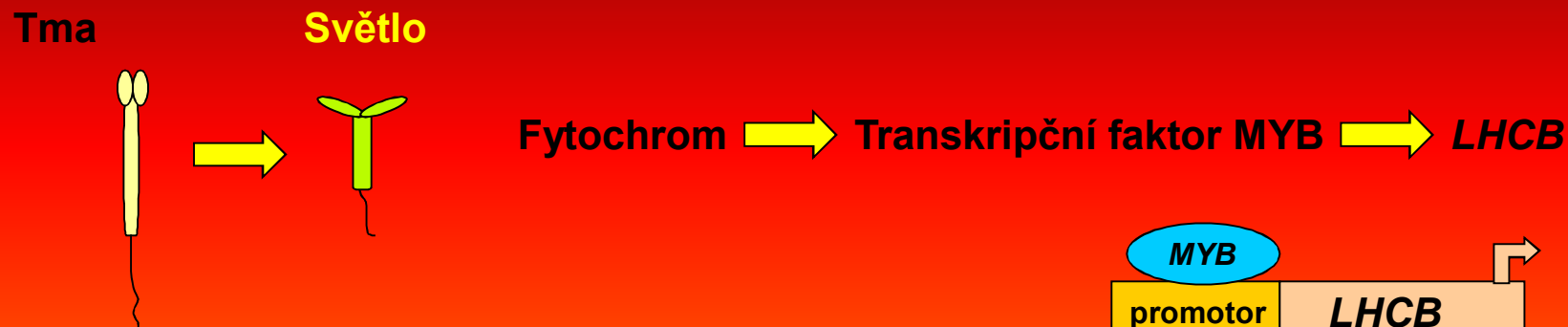
**Expese ranných genů** = genů primární reakce (primary response genes) - nezávislá na syntéze proteinů

**Expese pozdějších genů** = genů sekundární reakce (secondary response genes) - závislá na syntéze proteinů

Fotoregulace je soustředěna na nukleární geny kódující informace pro syntézu chloroplastů:

- small subunit of ribulose-1,6-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)  
*RBCS*
- light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins: *LHCB*

## Fytochromem řízená regulace exprese genů *MYB* a *LHCB*



***MYB* – geny primární reakce**

Carré IA, Kim J-Y (2002) J Exp Bot 53: 1551-1557

<http://jxb.oupjournals.org/search.dtl>

***LHCB* – gen sekundární reakce**

**CCA1** (*circadian clock associated1*) (patří k *MYB* genům) – reguluje expresi *LHCB* pomocí denního rytmu; konstitutivní exprese potlačuje denní rytmy, expresi *LHY* a expresi sám sebe

Mutace v *CCA1* vede k narušení regulace exprese *LHCB* denním rytmem a fytochromem

**LHY** (*late elongated hypocotyl*) (patří k *MYB* genům) – transkript osciluje s denním rytmem

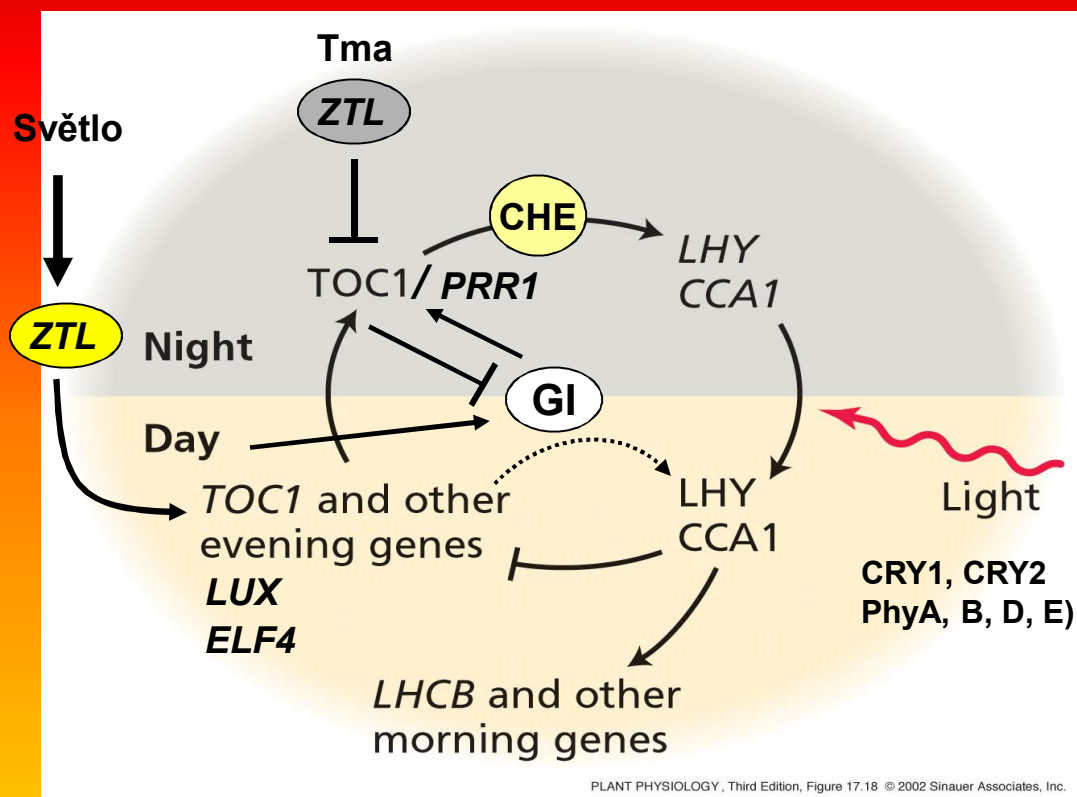


**CCA1 a LHY hrají roli v denních rytmech**



**Denní oscilátor - transkripčně-translační negativní zpětná vazba – nalezen u bakterií, hub, hmyzu a savců; synchronizuje fyziologické a vývojové události rostliny s denními a ročními změnami v okolním prostředí**

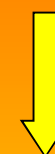
**Denní oscilátor u *Arabidopsis***



Alabadí D et al. (2001) Science 293: 880-883

Model interakce genů *LHY* a *CCA1*, plus genu *TOC1* (slide 11), navržen v r. 2001:

Světlo a *TOC1* aktivují expresi *LHY* a *CCA1* – světlo působí jako zesilovač *TOC1*



Nové informace

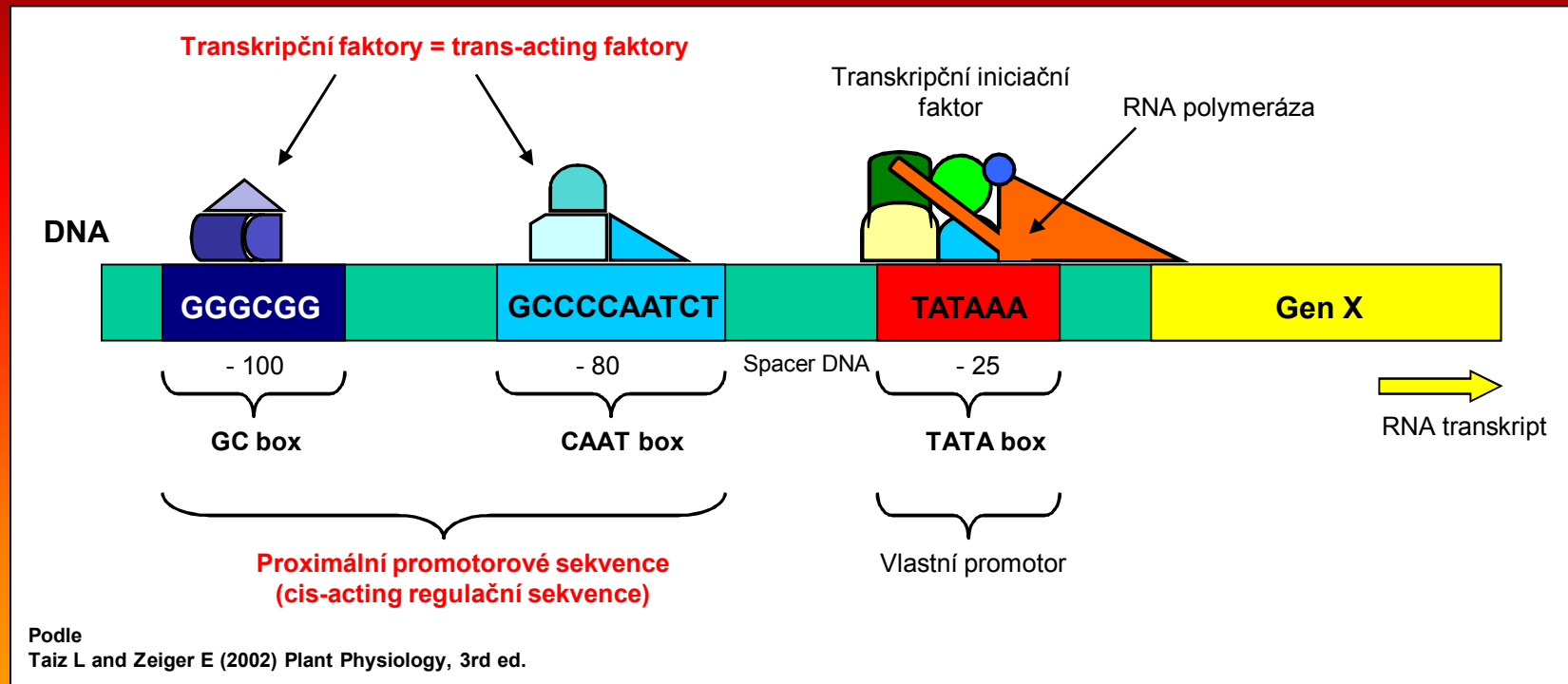
Boikoglou E, Davis SJ (2009) Signaling in Plants. Signaling and Communication in Plants. In: Baluška F, Moncuso S (eds), Springer-Verlag Berlin, str. 261

**UPDATE 2009**

Prunela-Paz JL et al. (2009) Science 323: 1481-1485

**CHE** (**C**CA1 **H**iking **E**xpedition) - TF, blokuje expresi *CCA1* vazbou k jeho promotoru. *TOC1* se váže k *CHE*, blokuje *CHE* a uvolňuje expresi *CCA1*.

## Regulační sekvence kontrolují světlem regulovanou transkripci



Geny regulované fytochromy mají velké množství **cis-regulačních sekvencí** => široké spektrum regulace reakcí rostlin ke světlu a interakcí s fytochromy => široké spektrum **trans-acting faktorů**

Identifikováno 50 regulačních faktorů fungujících v ranných signálních drahách (phyA a phyB) i pozdních signálních drahách, společných pro více fytochromů

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

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

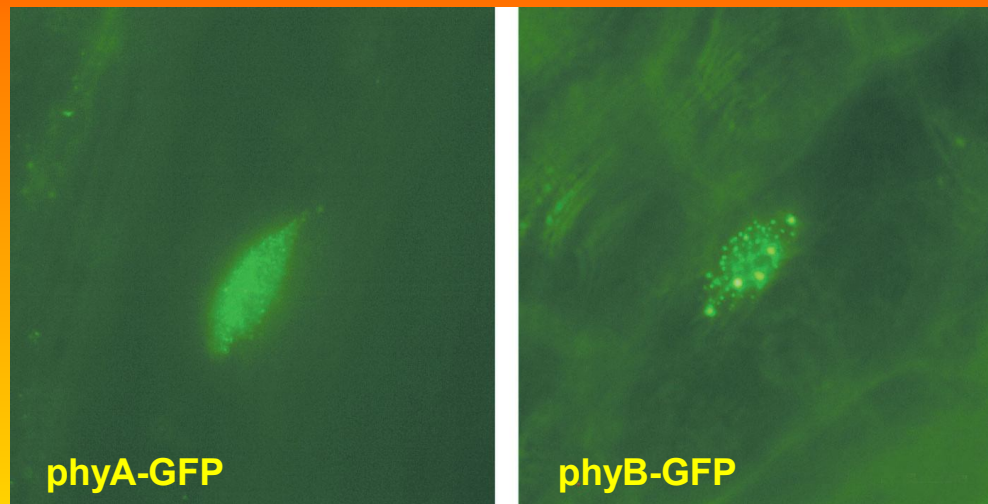
<http://www.ias.ac.in/currsci/jan252001/178.pdf>



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*

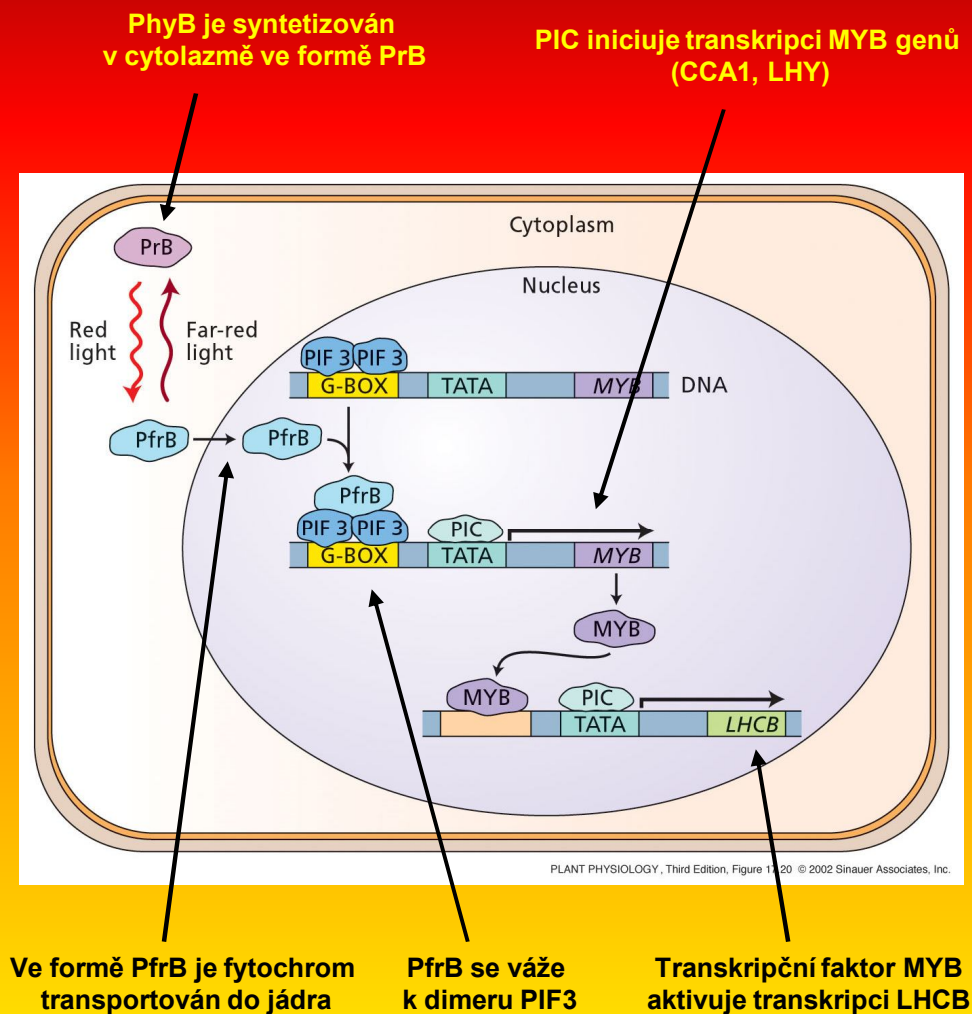


Transformace rostlin



Sledování exprese *PHYB*  
v buňkách a pletivech

## Regulace genové exprese fytochromem B



1) Regulace genové exprese přímo PfrB

2) Regulace genové exprese prostřednictvím PIF3

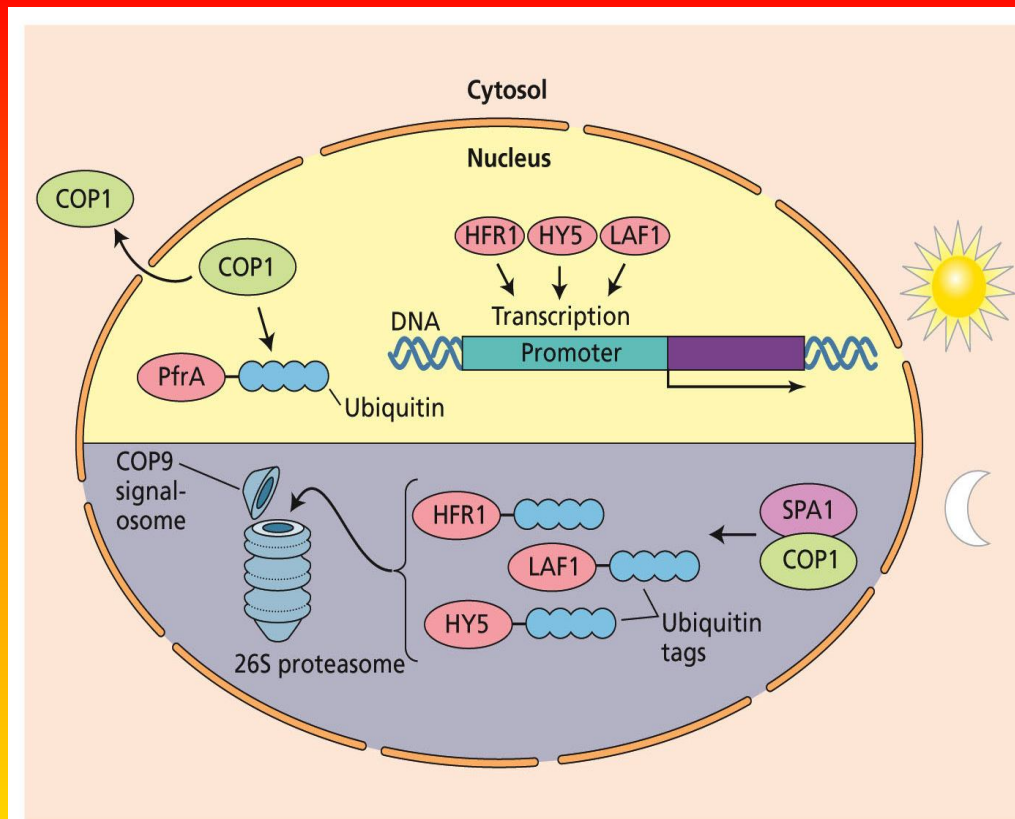
**PIF3** (phytochrome interacting factor3)

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

- reaguje s C-terminálním koncem PfrB => PIF3 a PfrB tvoří komplex

## Regulace genové exprese fytochromem A

- 1) Regulace genové exprese přímo PfrA
- 2) Regulace genové exprese prostřednictvím PIF3
- 3) Regulace genové exprese prostřednictvím COP1



PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 17.15 © 2006 Sinauer Associates, Inc.

**Tma:**

Akumulace COP1 v jádře



Represe exprese fotomorfogenních genů díky ubiquitinaci transkripčních faktorů (HY5, HFR1, LAF1,...)

**Světlo:**

Transport COP1 z jádra do cytoplazmy předáním ubiquitinu proteinu PfrA



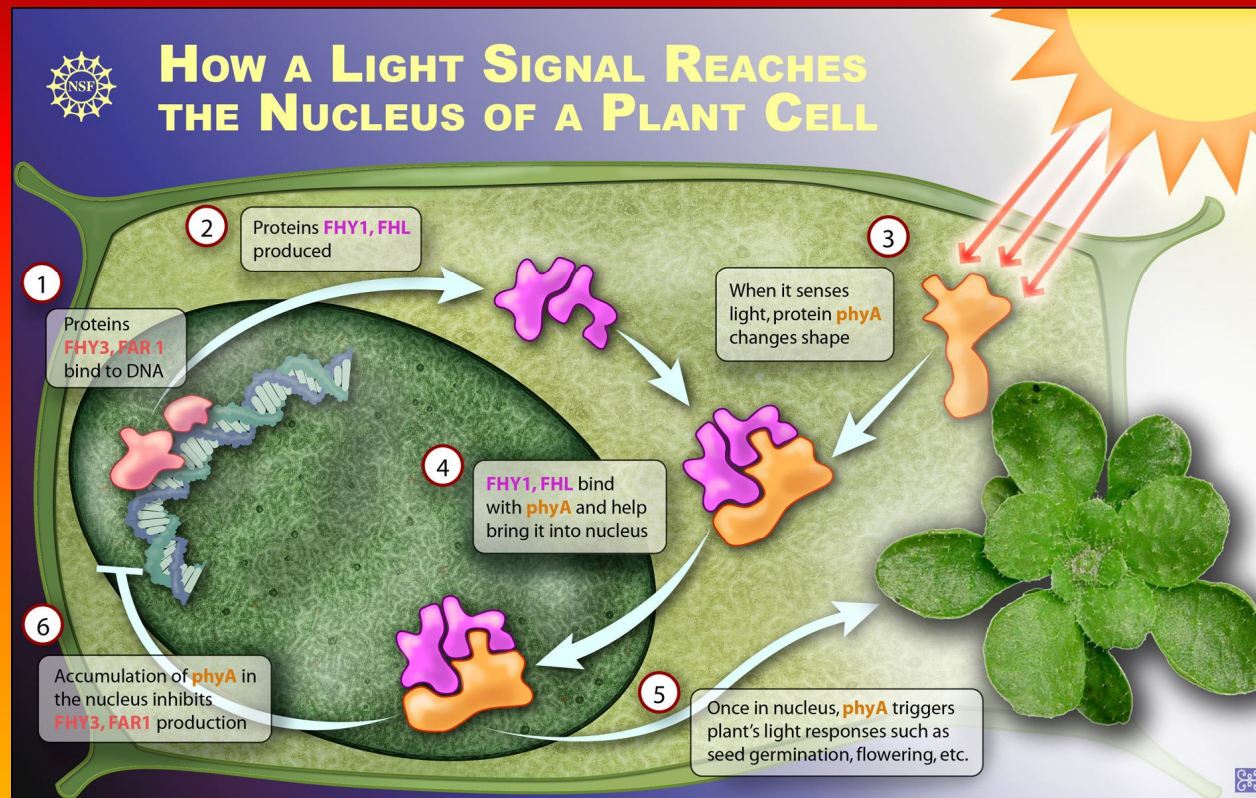
Obnovení exprese fotomorfogenních genů odblokováním transkripčních faktorů (HY5, HFR1, LAF1,...)

**UPDATE 2010**

Jang I-CH et al. (2007) Plant Cell 22: 2370-2383

PIF3 stimuluje ubiquitinaci phyB indukovanou COP1 – stimuluje interakci COP1/phyB

## Regulace transportu fytochromu A do jádra



**Transkripční faktory:** FHY3 a FAR1 – řídí produkci proteinů FHY1 a FHL

**Proteiny:** FHY1 a FHL – vazba na phyA – regulace transportu phyA do jádra

**Transport phyA do jádra** – spouštění světelných reakcí (klíčení, kvetení, atd.) + regulace produkce transkripčních faktorů FHY3 a FAR1 => zpětná vazba: phyA ovlivňuje svůj vlastní transport do jádra

## Pomocí biochemických přístupů byly nalezeny mechanismy fungující v signální dráze fytochromů

**G-proteiny (viz KFZR2, slide 25)** – sekvence je známa, gen klonován;  $\alpha$ -podjednotka váže GTP - pro funkci G-proteinu je nutná hydrolýza GTP na GDP; G-protein funguje po fytochromu (tj. downstream)

Signální dráha se po G-proteinu rozděluje na dvě:

- signální dráha závislá na  $\text{Ca}^{2+}$  (sekundární přenašeč, KFZR2) - požaduje calmodulin; exprese genů a vývoj chloroplastů
- signální dráha nezávislá na  $\text{Ca}^{2+}$  - syntéza anthocyaninů

Cyklický GMP (cyklický guanosine monofosfát) – sekundární přenašeč

### Update 2007

Temple BRS, Jones AM (2007) Annu Rev Plant Biol 58: 249 – 266

Vyčerpávající review o funkci rostlinného heterotrimerického komplexu G proteinu



Alan M. Jones  
University of North Carolina

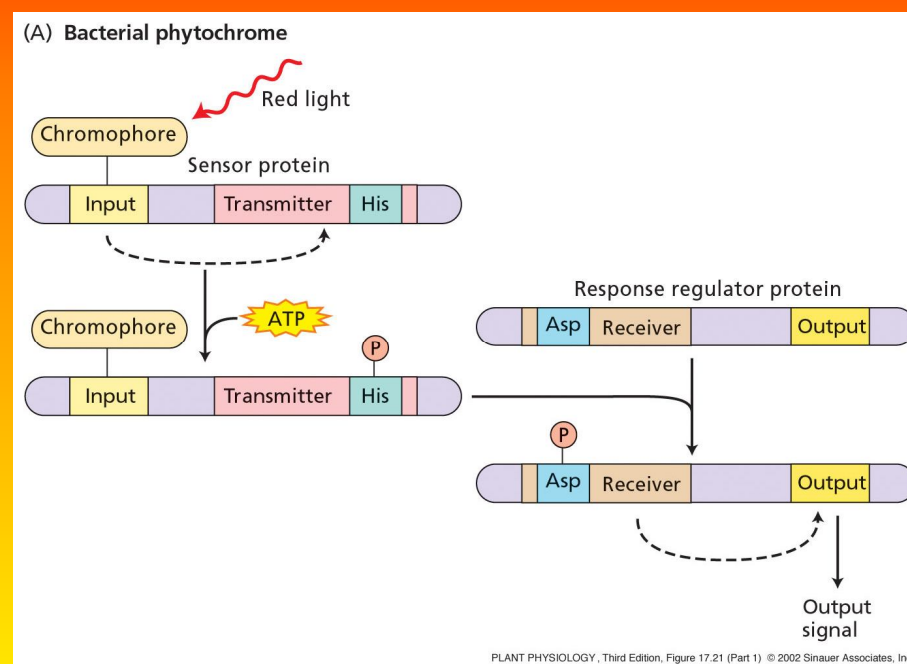
## Fosforylace – důležitý mechanismus fungující v řadě signálních drah, včetně fytochromů

Fosforylace reguluje aktivitu transkripčních faktorů (a jiných enzymů) (**KFZR2d-f**)

**Fosforylace** = připojení fosfátové skupiny k amikokyselinovému zbytku nějakého proteinu

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

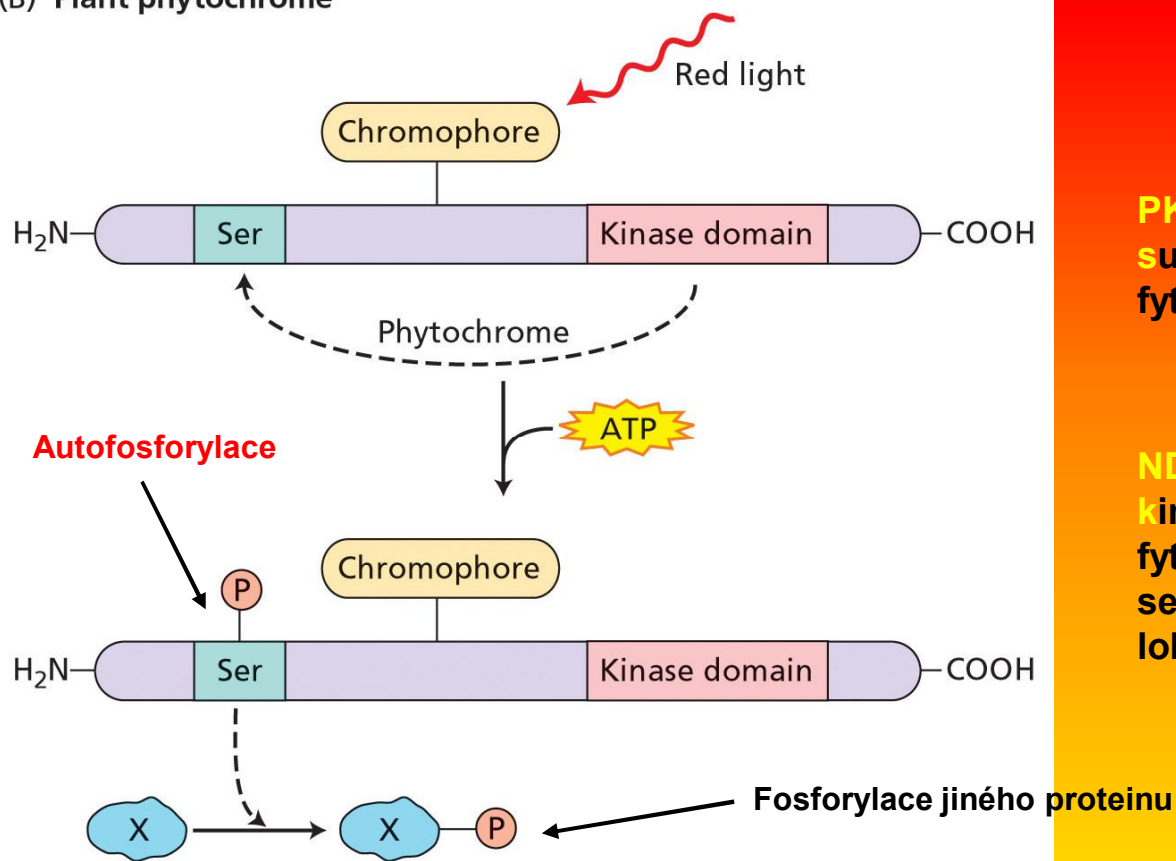
**Bakteriální fytochrom = histidin kináza, závislá na světle, funguje jako senzorový protein, fosforyluje regulační protein**





Rostlinný fytochrom = serin/threonin kináza, kromě jiných proteinů fosforyluje i sám sebe

(B) Plant phytochrome

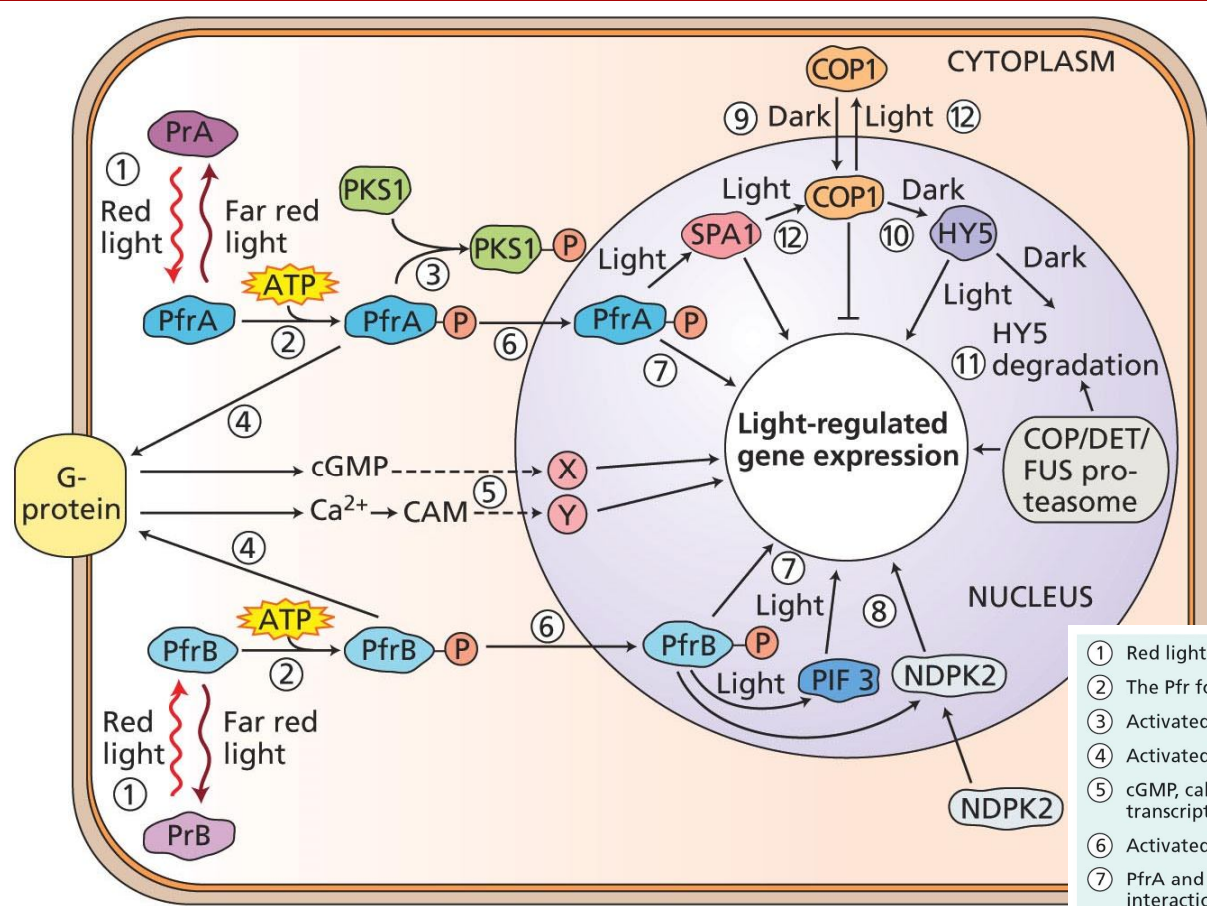


PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.21 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

**PKS1** (phytochrome kinase substrate) – protein fosforylován fytochromem A v cytoplasmě

**NDPK2** (nukleotid disphosphate kinase2) – protein fosforylován fytochromem B, kinázová aktivita se zvyšuje v případě Pfr; lokalizace není známa

## Faktory zapojené v expresi genů regulované fytochromy



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.22 (Part 1) © 2002 S

- ① Red light converts PrA and PrB to their Pfr forms.
- ② The Pfr forms of phyA and phyB phytochrome can autophosphorylate.
- ③ Activated PfrA phosphorylates phytochrome kinase substrate 1.
- ④ Activated PfrA and PfrB may interact with G-proteins.
- ⑤ cGMP, calmodulin, and calcium may activate transcription factors (X and Y).
- ⑥ Activated PfrA and PfrB enter the nucleus.
- ⑦ PfrA and PfrB may regulate transcription directly or through interaction with phytochrome interacting factor 3.
- ⑧ Nucleoside diphosphate kinase 2 is activated by PfrB.
- ⑨ In the dark, COP1 enters the nucleus and suppresses light-regulated genes.
- ⑩ In the dark, COP1, an E3 ligase, ubiquitinates HY5.
- ⑪ In the dark, HY5 is degraded with the assistance of the COP/DET/FUS proteasome complex.
- ⑫ In the light, COP1 interacts directly with SPA1 and is exported to the cytoplasm.

PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.22 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

**UPDATE 2007**

**Kevei E et al. (2007) J Exp Botany 58: 3113-3124**