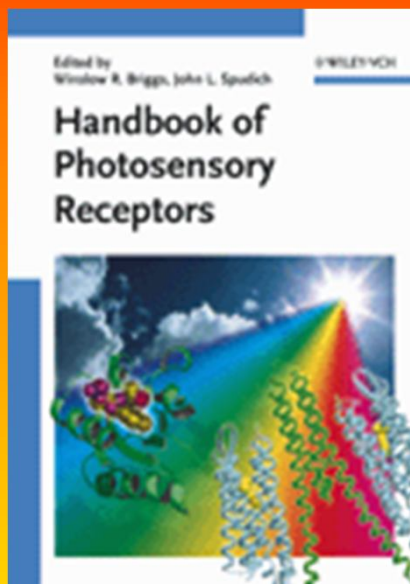
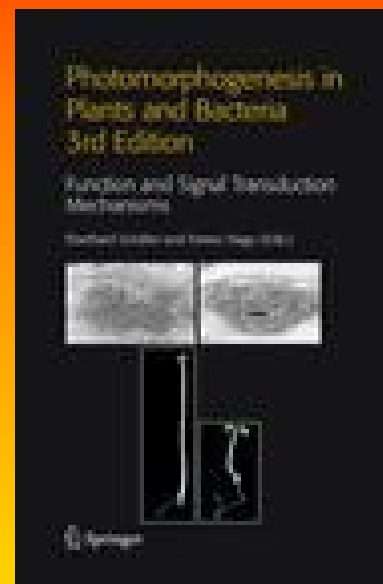


9) Fotomorfogeneze

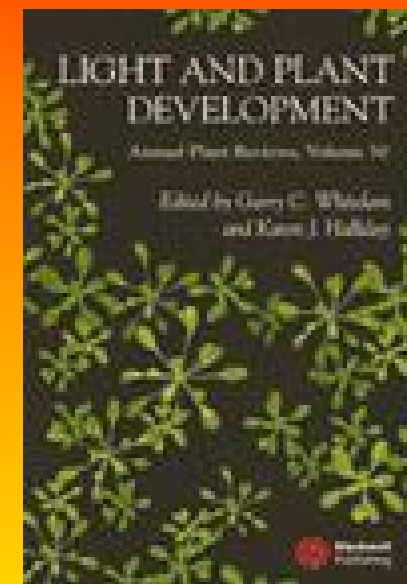
- a) Vlastnosti a lokalizace fytochromů
- b) Reakce rostlin zprostředkované fytochromy
- c) Ekologické funkce fytochromů
- d) Buněčný a molekulární mechanismus funkce fytochromů



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

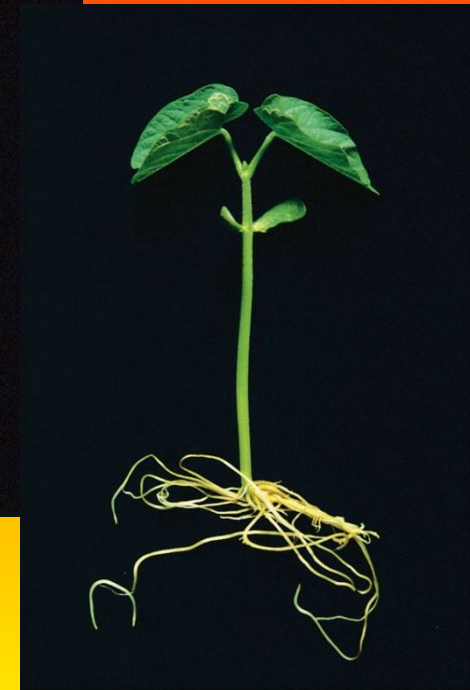
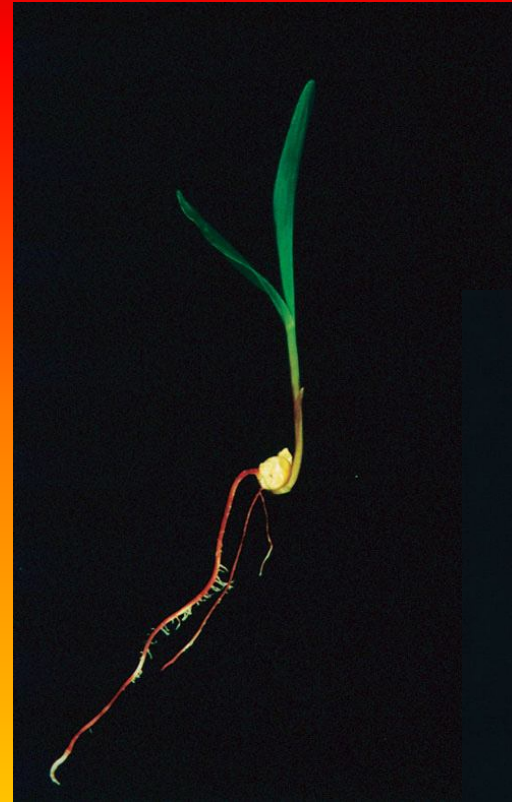
**Růst ve tmě
(etioloizovaný růst, skotomorfogeneze)**



„Skoto“ = tma



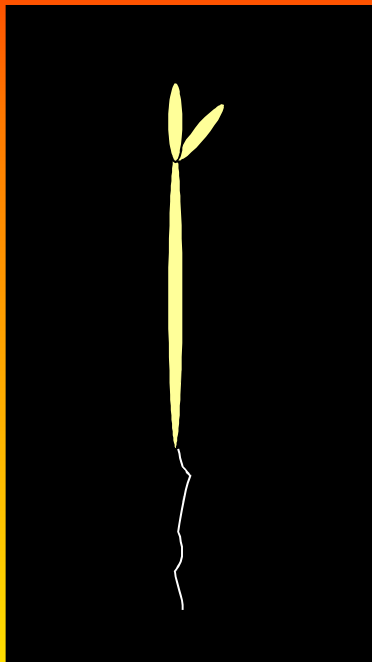
**Růst na světle
(fotomorfogeneze)**



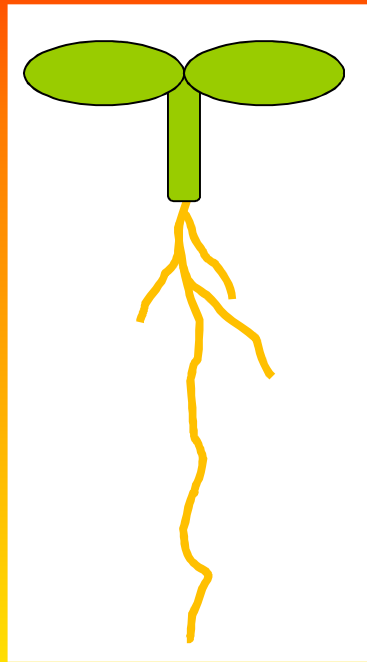
Fotomorfogeneze

Proces, při kterém světlo jako signál změni vývoj rostliny tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii.

Tma



Světlo



Základní fotomorfogenní reakce:

- inhibice prodlužování
- stimulace syntézy chlorofylu
- stimulace růstu listu
- regulace klíčení

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)**

a) Vlastnosti a lokalizace fytochromů

Fytochrom = proteinový pigment modré barvy identifikován v r. 1959

Reakce rostlin indukované fytochromy:

- **stimuluje klíčení**
- **stimuluje de-etiolizaci (např. otevírání listů)**
- **stimuluje tvorbu listových primordií a růst listů**
- **inhibuje prodlužování**

TABLE 17.1

Typical photoreversible responses induced by phytochrome in a variety of higher and lower plants

Group	Genus	Stage of development	Effect of red light
Angiosperms	<i>Lactuca</i> (lettuce)	Seed	Promotes germination
	<i>Avena</i> (oat)	Seedling (etiolated)	Promotes de-etiolation (e.g., leaf unrolling)
	<i>Sinapis</i> (mustard)	Seedling	Promotes formation of leaf primordia, development of primary leaves, and production of anthocyanin
	<i>Pisum</i> (pea)	Adult	Inhibits internode elongation
	<i>Xanthium</i> (cocklebur)	Adult	Inhibits flowering (photoperiodic response)
Gymnosperms	<i>Pinus</i> (pine)	Seedling	Enhances rate of chlorophyll accumulation
Pteridophytes	<i>Onoclea</i> (sensitive fern)	Young gametophyte	Promotes growth
Bryophytes	<i>Polytrichum</i> (moss)	Germling	Promotes replication of plastids
Chlorophytes	<i>Mougeotia</i> (alga)	Mature gametophyte	Promotes orientation of chloroplasts to directional dim light

PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Table 17.1 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

**Přijímání světla fytochromy
a přenos signálu se liší
v různých orgánech**



Efekt červeného světla (R; 650-680 nm) je eliminován červeným světlem o větší vlnové délce (FR; 710-740 nm)



Dark



R



R

FR



R

FR

R



R

FR

R

FR

→ 2 hypotézy

2 hypotézy vysvětlující R – FR reverzibilitu

- 1) Existence dvou pigmentů – pro R a FR – antagonisticky regulují klíčení
- 2) Existence jediného pigmentu – mění svoji formu z R-absorbující na FR-absorbující

Hypotéza potvrzena. Reverzibilní vlastnosti potvrzeny *in vitro*



3 následující témata

- 1) Fotoreverzibilita a její vztah k reakci fytochromu
- 2) Struktura fytochromu, lokalizace, konformační změny
- 3) Geny, kódující fytochromy a jejich funkce ve fotomorfogenezi

1) Fotoreverzibilita a její vztah k reakci fytochromu

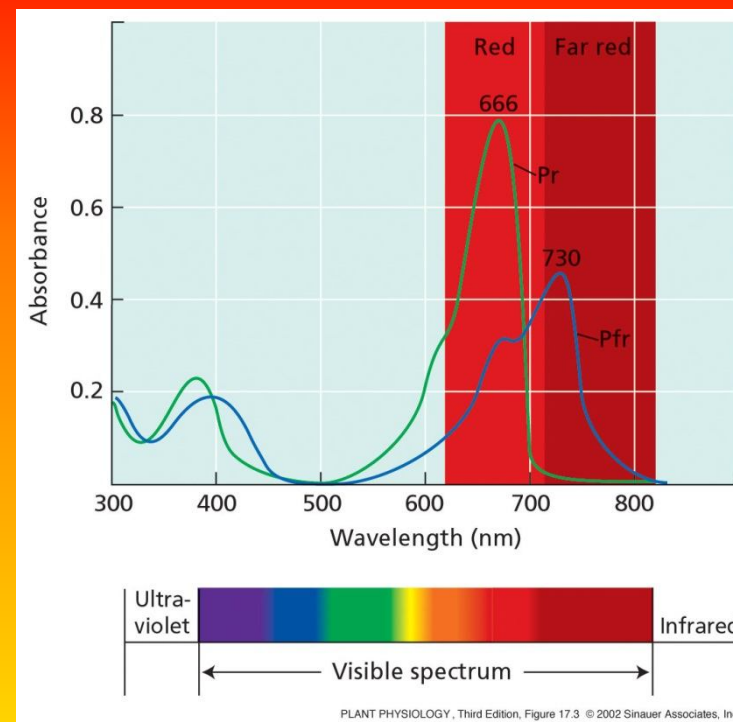


Forma fytochromu absorbující R: **Pr**

Pr syntetizován ve tmě *de novo*



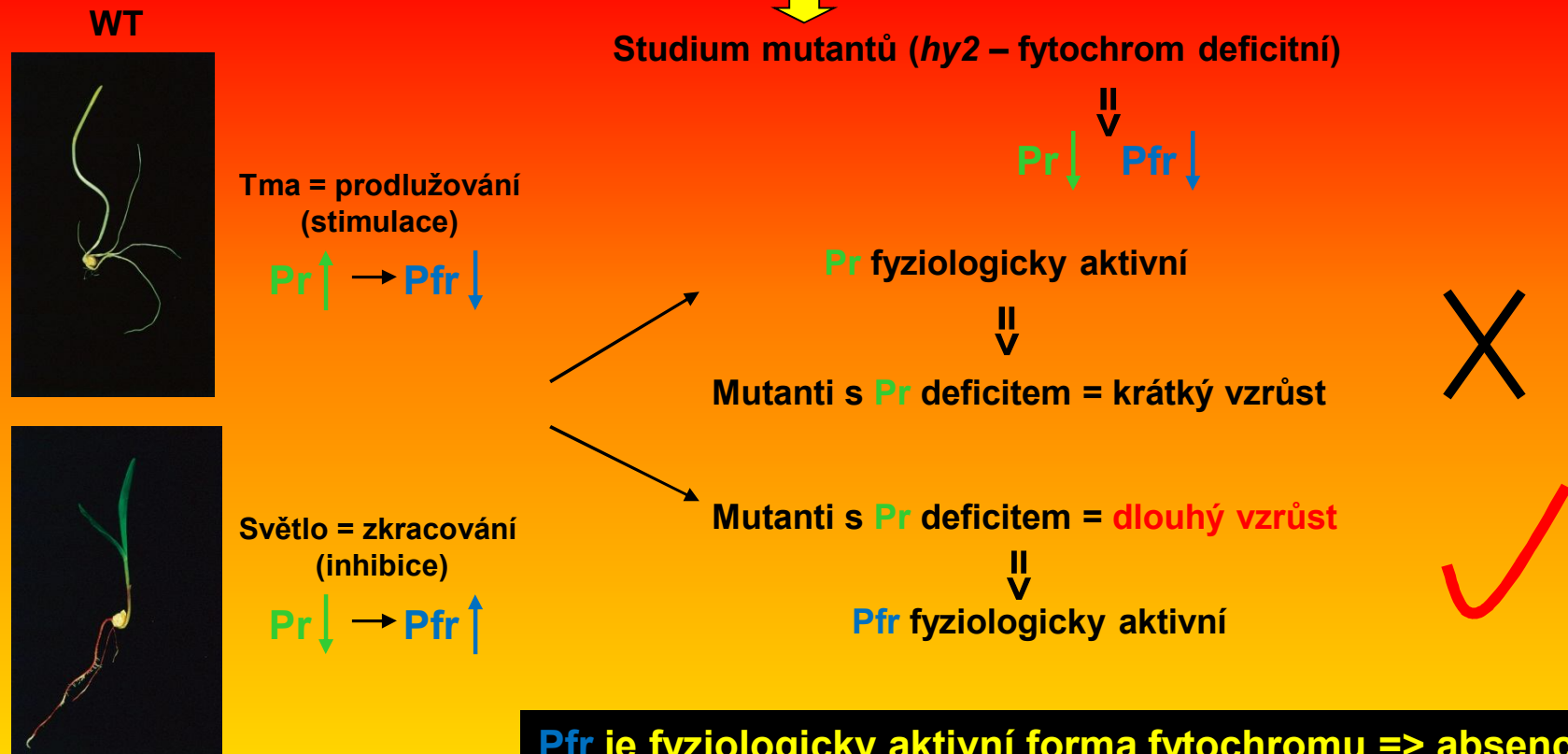
Fotostacionární stav: **Pr** : **Pfr** = **98%** : **2%**



[Pfr] \cong [fyziologická reakce]

[Pr] $\not\cong$ [fyziologická reakce]

Je Pfr fyziologicky aktivní forma fytochromu??



Pfr je fyziologicky aktivní forma fytochromu => absence Pfr způsobuje neschopnost rostliny reagovat na světlo

2) Stavba fytochromu

Fytochrom = rozpustný protein, ~ 250 kDA, 2 podjednotky = dimer

Fytochrom = chromofor + apoprotein

(pigment) (polyptid, 125 kDa)

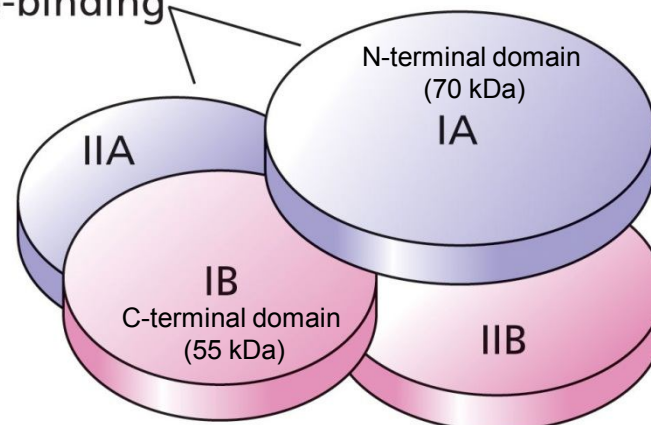
Vyšší rostliny:

Chromofor = lineární tetrapyrrol = fytochromobilin

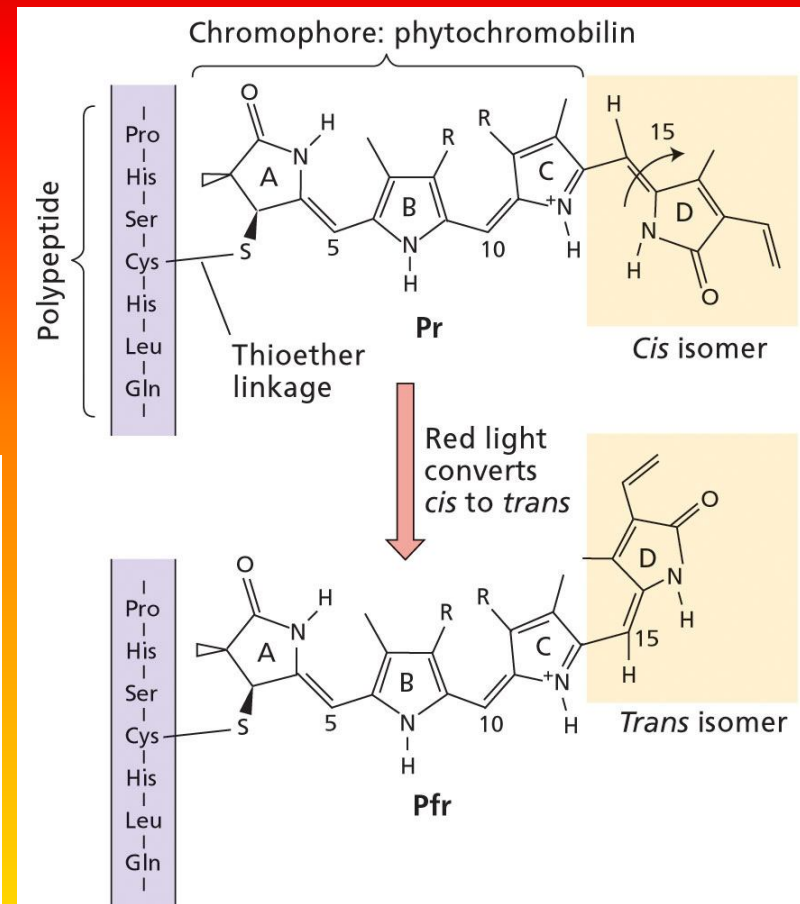
Fytochromobilin + apoprotein = holoprotein

Dimer fytochromu

Chromophore-binding domains



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.5 © 2002 Sinauer Associates, Inc.



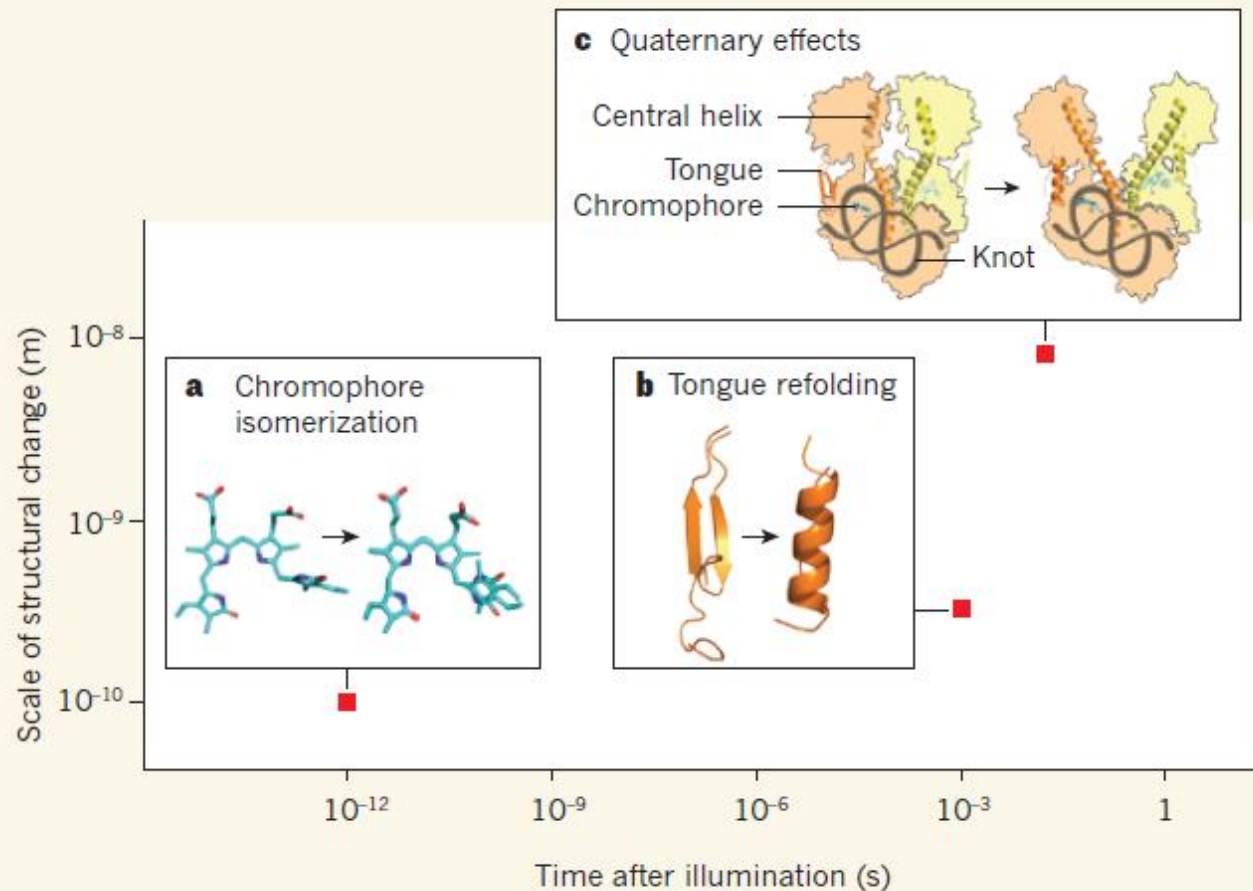
PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.4 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Update 2014

Baker AW, Forest KT (2014)
Nature 509: 174–175

Takala et al. (2014)
Nature 509: 245-258

a) Světlem indukované konformační změny chromoforu z formy *cis* na *trans*



b) Reorganizace klíčové sekundární struktury zvané „tongue“: struktura β -hairpin se mění na strukturu α -helix

c) Uzavřená kvarterní struktura fytochromu (vyskytující se ve tmě) se otevírá a vzniká konformace ve tvaru Y; typická pro fytochrom v buňkách na světle.

3) Geny kódující fytochromy

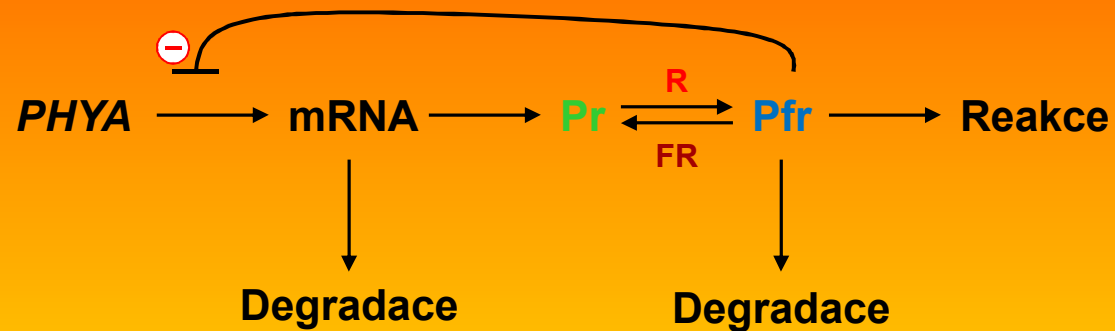
Typ I **PHYA** Typ II **PHYB**
PHYC
PHYD
PHYE

Konvence:

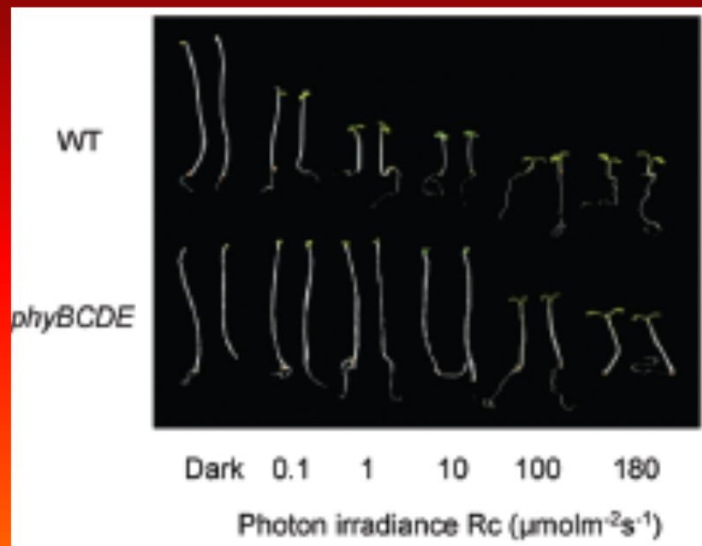
PHYA = apoprotein

phyA = celý fytochrom = apoprotein + chromofor

PHYA – exprese inhibována světlem => transkripčně aktivní v etiolizovaných rostlinách (jednoděložné)



❖ dvouděložné – degradace Pfr



Analýza quadruple mutanta při $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
phyBphyCphyDphyE – de-etiolizace a vývoj
 rostliny až do kvetení



Při vysokých ozářeních (nad $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$):

- *phyA* není degradován
- *phyA* funguje jako světelný senzor

Update 2010

Franklin KE, Whitela GC (2007) Plant Sign Behavior 2: 1-3

Analýza quintuple mutanta u *Arabidopsis* (*phyAphyBphyCphyDphyE*):
 fytochromy nejsou jedinými receptory červeného světla, ale rostlina
 bez fytochromů inkubovaná na RL zastavuje svůj růst brzy po vývoji
 děloh; modré světlo přijímané kryptochromy tuto blokádu vývoje
 uvolňuje.

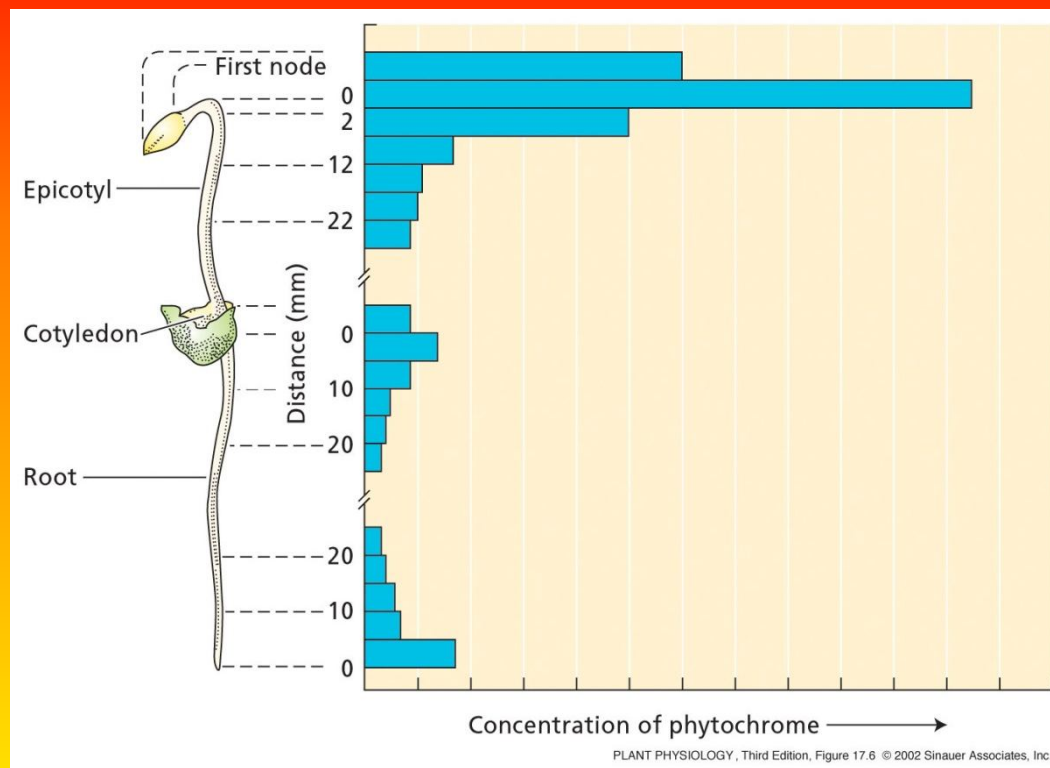
***PHYB - E* – exprese není ovlivňována světlem => transkripčně aktivní v etiolizovaných
 i zelených rostlinách; proteiny *phyB - E* jsou stabilnější**



Lokalizace fytochromů v buňkách a pletivech

Znalost lokalizace fytochromů napovídá o jejich funkcích

- Spektrofotometricky – etiolizované rostliny
- Vizualizace genové exprese pomocí reportérového genu *GUS*



Konstrukt

Promotor *PHYA*

GUS



Transformace rostlin



Sledování exprese *PHYA*
v buňkách a pletivech

b) Reakce rostlin zprostředkované fytochromy

- 1) Rychlé biochemické reakce
- 2) Pomalejší morfologické změny (+ pohyb a růst)

Lag fáze = čas mezi stimulací světlem a pozorovatelnou reakcí

Krátká – několik minut (zvětšování a smršťování buněk)

Dlouhá – několik týdnů (kvetení)

Ozářenost (fluence, protonový proud) = počet fotonů dopadajících na jednotku plochy ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$)

Ozářenost za časovou jednotku (irradiance, fluence rate) = počet fotonů dopadajících na jednotku plochy za jednotku času ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

Rozdělení reakcí podle rozsahu ozáření, které ji vyvolávají:

a) Very-low-fluence responses (VLFRs) (reakce k velmi slabé ozáření)

Indukované ozáření: $0.0001 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$; saturace při $0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$

- Stimulace růstu koleoptile
- Inhibice růstu mezokotylu
- Stimulace klíčení semen *Arabidopsis*

b) Low-fluence responses (LFRs) (reakce k nízké ozáření)

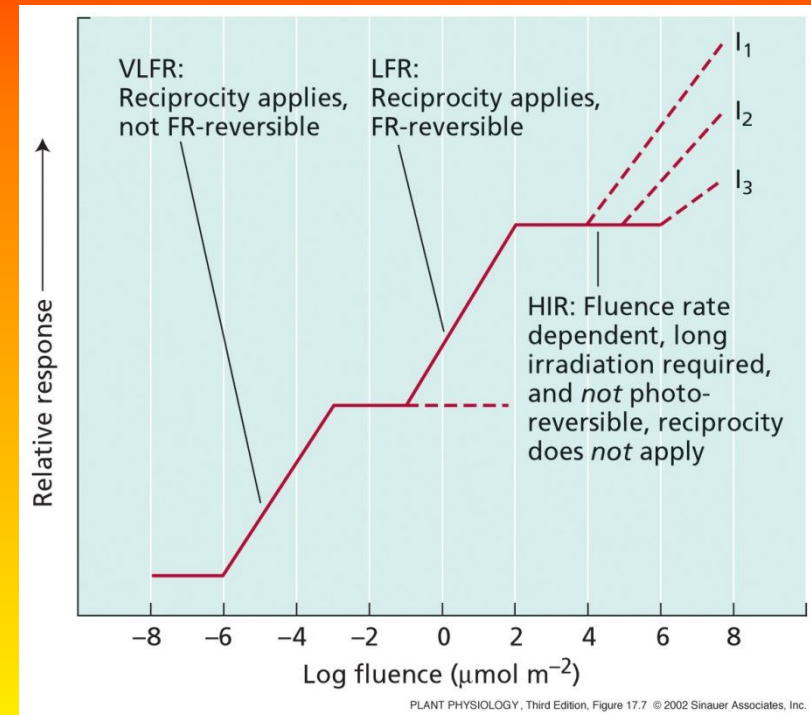
Indukované ozáření: $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$; saturace při $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$

- Klíčení semen salátu
- Regulace pohybu listů
- Klíčení semen *Arabidopsis*

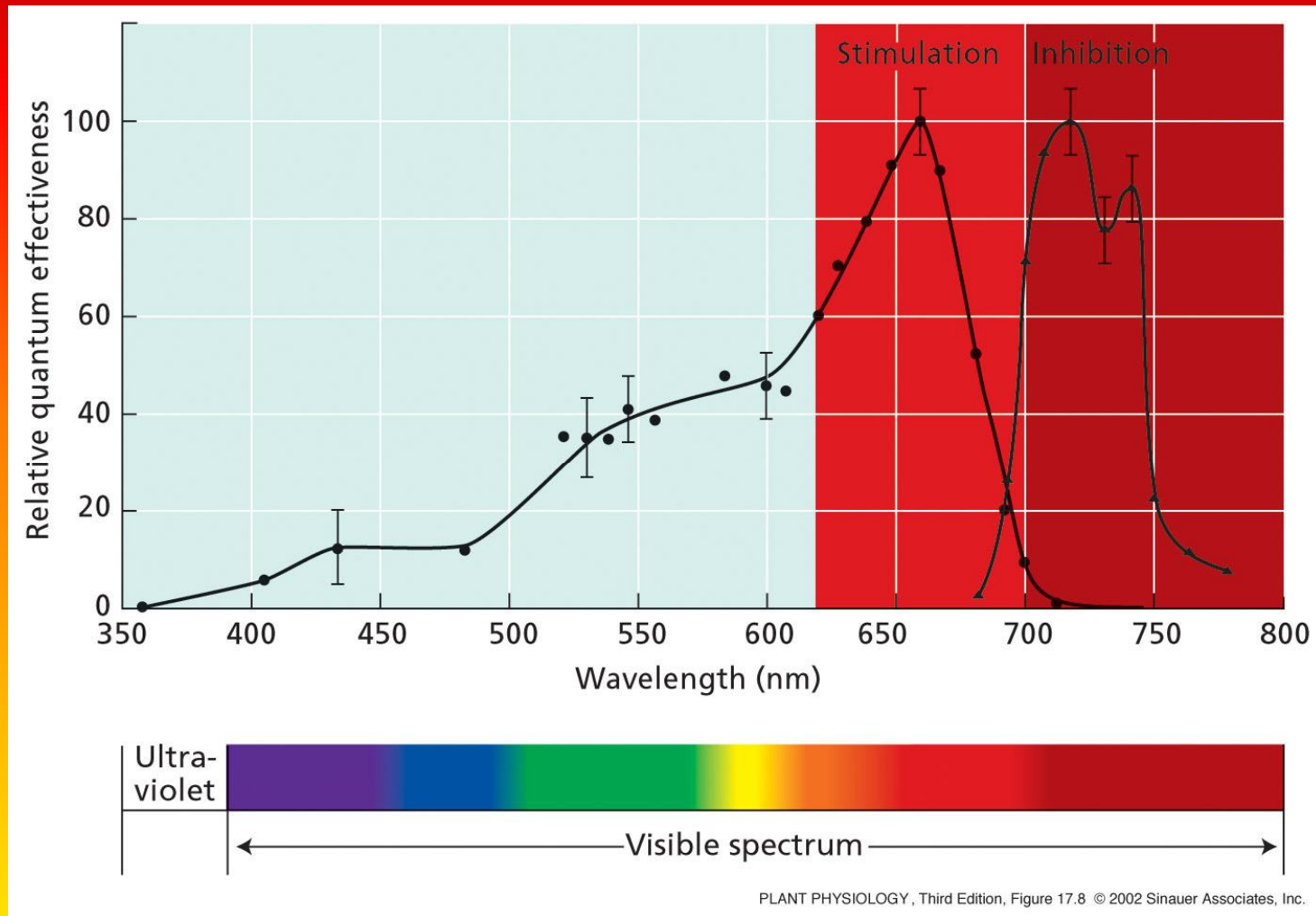
c) High-irradiance responses (HIRs) (reakce k vysoké ozáření)

Vyžaduje prodloužení světelného impulsu či kontinuální světlo o vysoké intenzitě

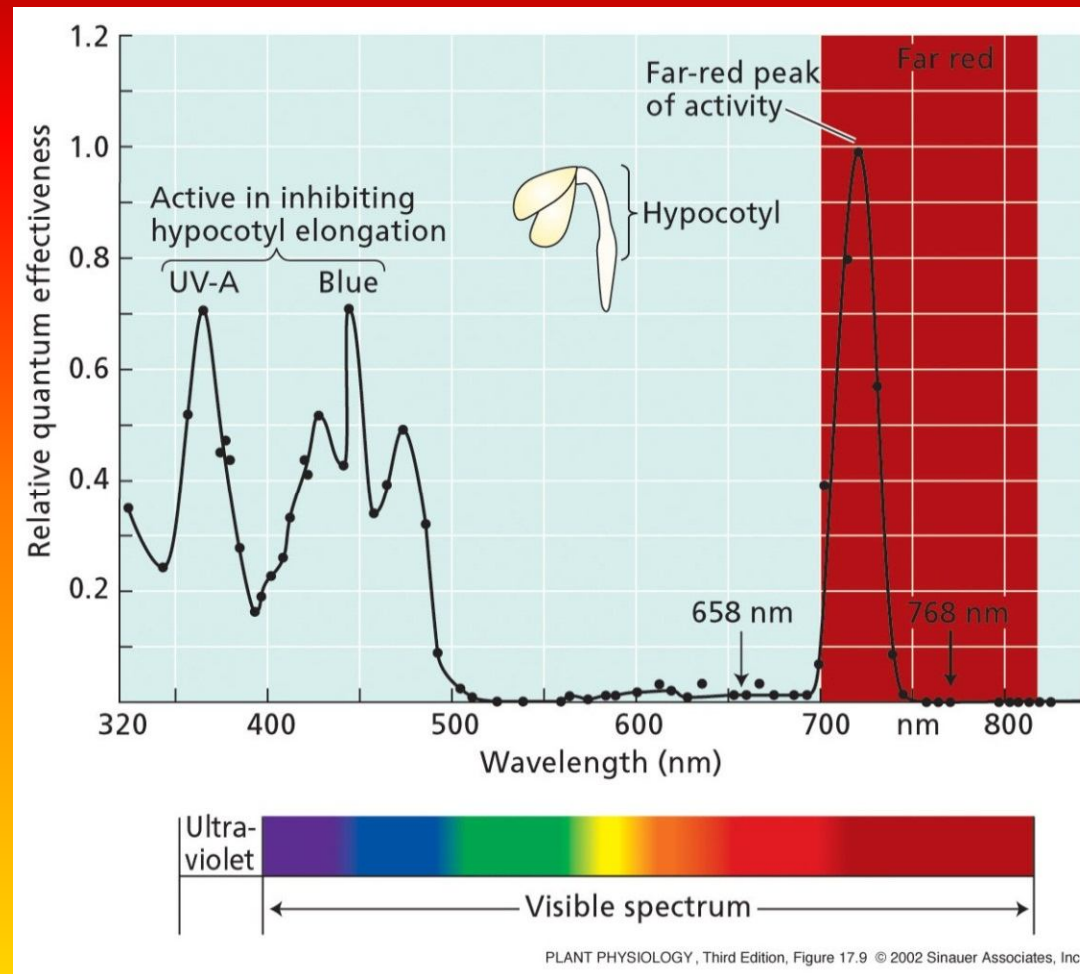
- Indukce syntézy antokyaninů
- Inhibice růstu hypokotylu
- Indukce kvetení
- Indukce produkce etylénu



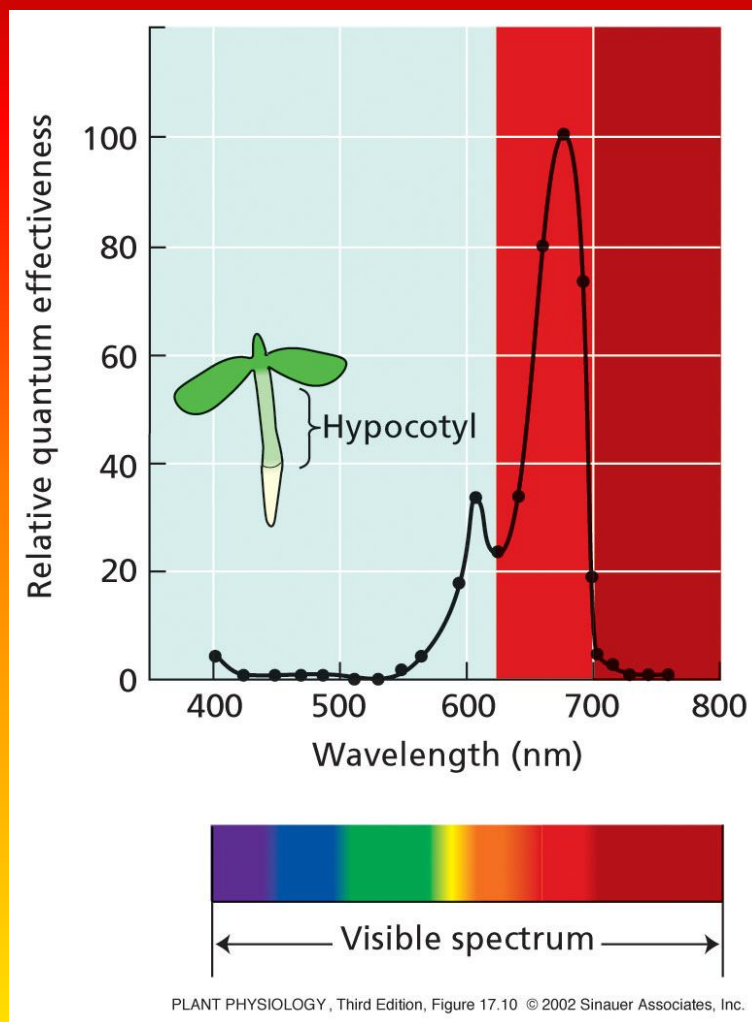
Akční spektrum LFR pro fotoreverzibilní stimulaci a inhibici klíčení *Arabidopsis* semen



Akční spektrum HIR pro inhibici prodlužování etiolizovaného hypokotylu



Akční spektrum HIR pro inhibici prodlužování zeleného hypokotylu



Reakce rostlin k FR se snižuje tím víc, čím více se rostlina stává zelenější.



Akční spektrum HIR u zelených rostlin se posunuje do červené oblasti.

Ztráta citlivosti zelených rostlin k FR koreluje s úbytkem fytochromu typu I = phyA.



HIR etiolizovaných rostlin je zprostředkována phyA

ALE

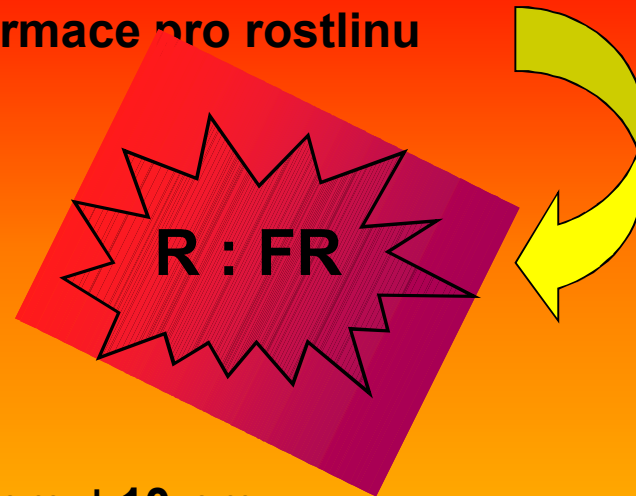
HIR zelených rostlin je zprostředkována phytochromem phyB

c) Ekologické funkce fytochromů

R/FR reverzibilní pigment



Vlnové délky R a FR = informace pro rostlinu



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

R : FR v různých prostředích

TABLE 17.3
Ecologically important light parameters

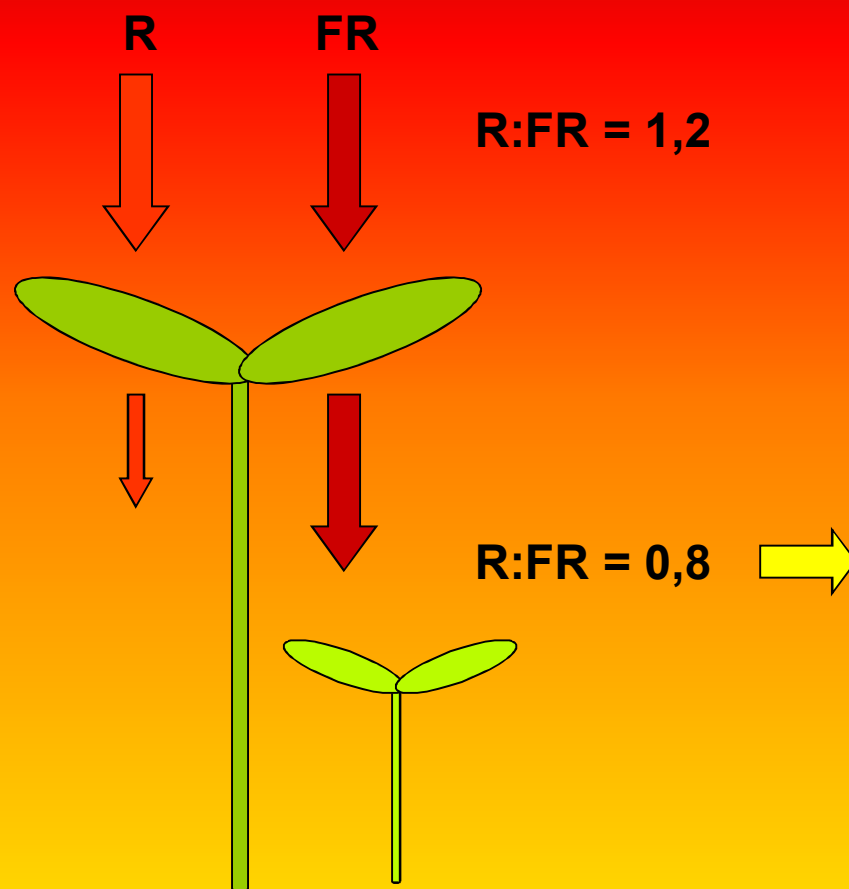
	Photon flux density ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	R/FR ^a
Daylight	1900	1.19
Sunset	26.5	0.96
Moonlight	0.005	0.94
Ivy canopy	17.7	0.13
Lakes, at a depth of 1 m		
Black Loch	680	17.2
Loch Leven	300	3.1
Loch Borrallie	1200	1.2
Soil, at a depth of 5 mm	8.6	0.88

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.

^aAbsolute 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

- nezávislé na teplotě => funkční v různých klimatických podmínkách
- modulovány světlem => denní rytmus: 24 hodin



Specializace fytochromů

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

PHYB – identifikován analýzou mutanta *hy3* (nyní *phyB*): dlouhý hypokotyl na bílém světle; *PHYB* mRNA redukována, protein phyB není syntetizován.

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

PhyA je receptor pro kontinuální FR.

Mutant *phyA*:

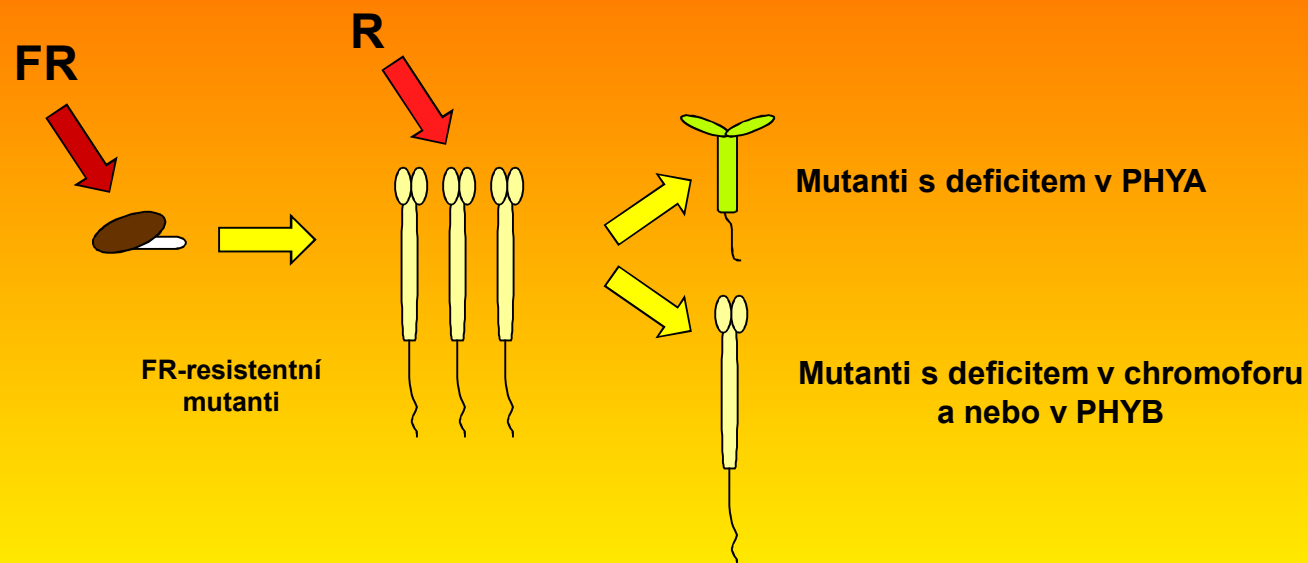
- neukazuje reakci k FR
- vytváří vysoký a tenký fenotyp

=

fenotyp mutantů s defektem
v chromoforu či phyB



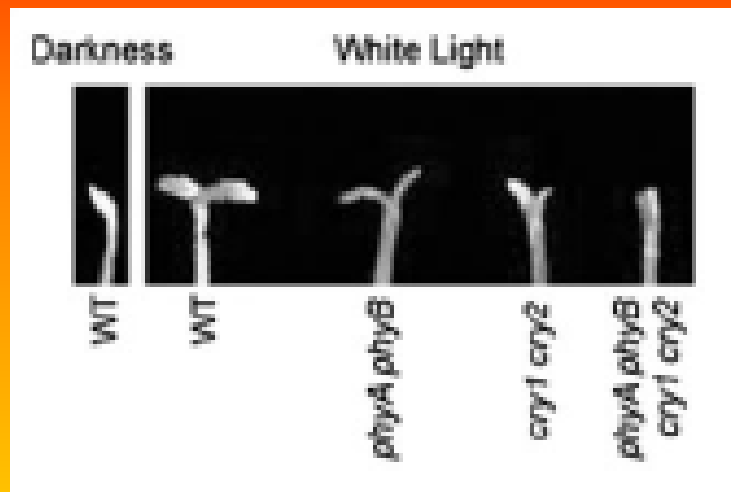
Obtížné selektovat mutanta se specifickým defektem pouze v proteinu PHYA



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 quadruple mutanta *phyAphyBcry1cry2* = fenotyp rostlin rostoucích ve tmě

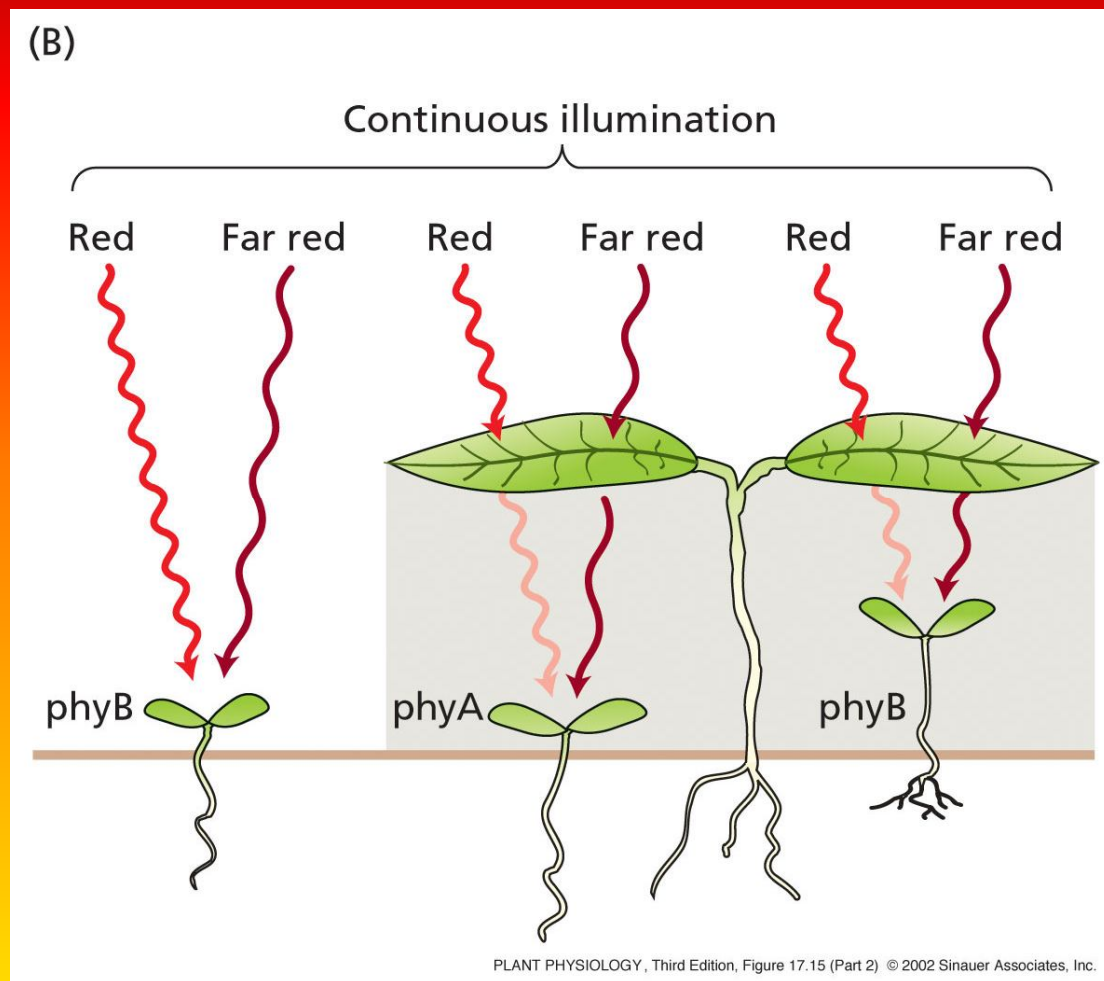


ALE transkripční analýza ukázale expresi světlem regulovaných genů!!! Mutant ukazuje reakce denního cyklu!!!



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

Interakce phyA a phyB v shade-avoidance reakci



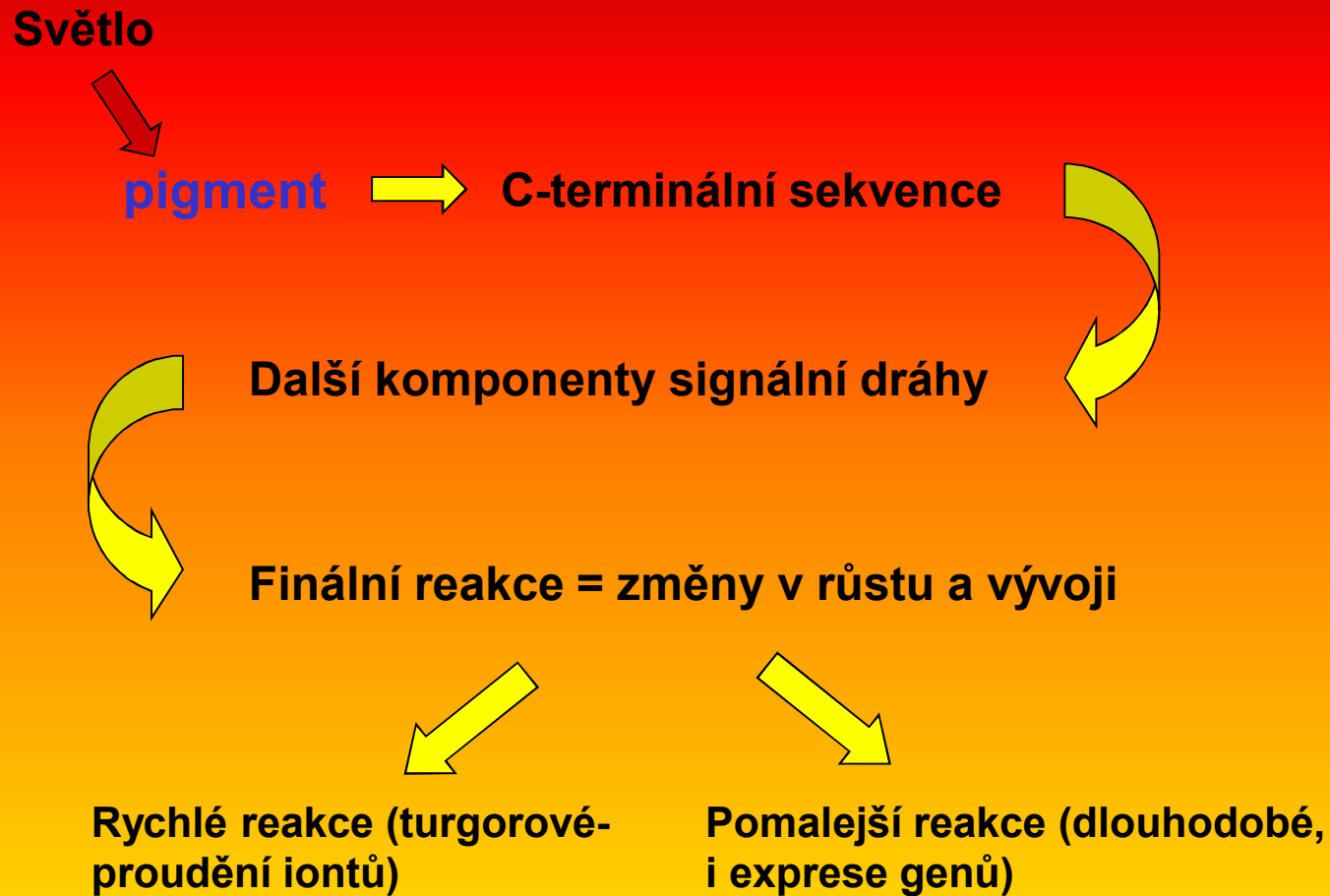
Přímé sluneční světlo:

Hodně R => de-etiolizace
řízena phyB

Stín:

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

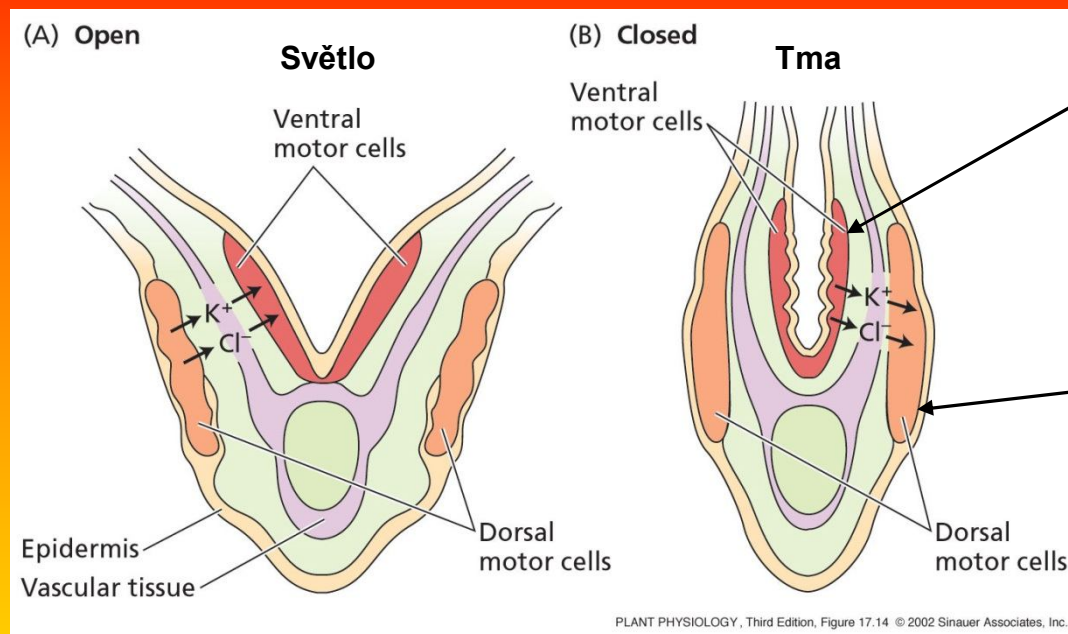
d) Buněčný a molekulární mechanismus funkce fytochromů



Rychlé reakce

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



Lístek Citlivky stydlivé (*Mimosa*)



H⁺ pumpa ventrálních buněk je ve tmě deaktivována

Akumulace H⁺ uvnitř buňky => pH apoplastu se zvyšuje

Ztráta K⁺ a Cl⁻

H⁺ pumpa dorzálních buněk je ve tmě aktivována

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

Akumulace K⁺ a Cl⁻ v buňce

Pomalé reakce

Fytochrom reguluje expresi genů



Phytochromy řídí aktivaci transkripčních faktorů (TF). TF vstupují do jádra a stimulují transkripci specifických genů.

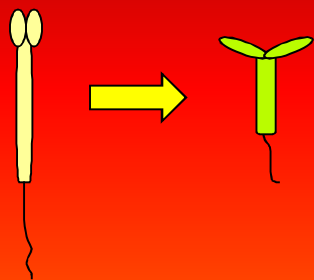
Expese ranných genů = genů primární reakce (primary response genes) - nezávislá na syntéze proteinů (*MYB* geny)

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

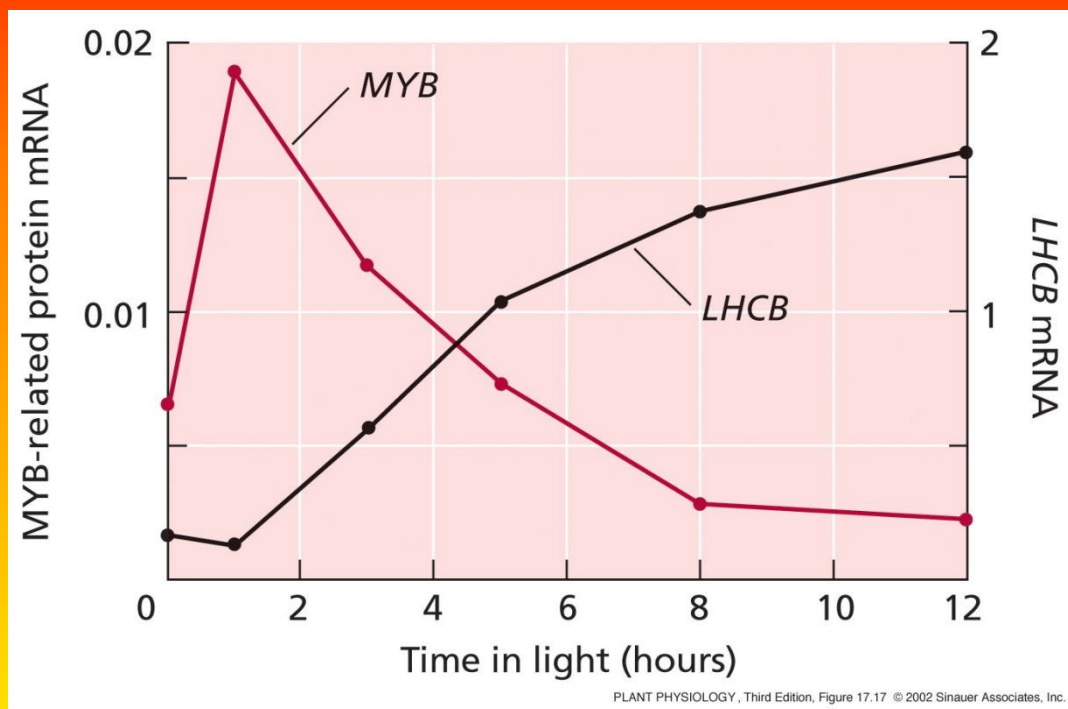
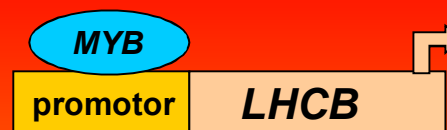
Fytochromem řízená regulace exprese genů *MYB* a *LHCB*

Tma

Světlo



Fytochrom \rightarrow Transkripční faktor MYB \rightarrow *LHCB*



MYB – geny primární reakce

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

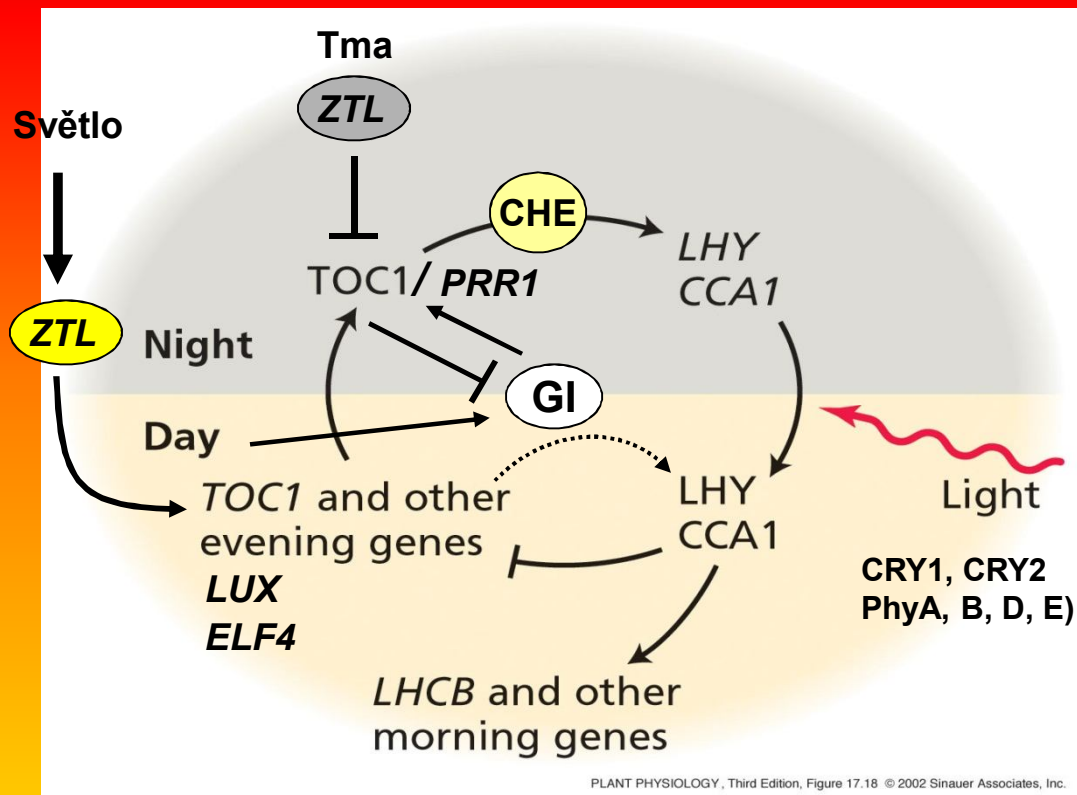
LHY (*Late elongated HYpocotyl*) (patří k *MYB* genům) – transkript osciluje s denním rytmem



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

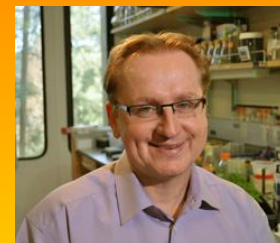
Denní oscilátor u *Arabidopsis*



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*



Steve Kay



C. Robertson McClung

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*.

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

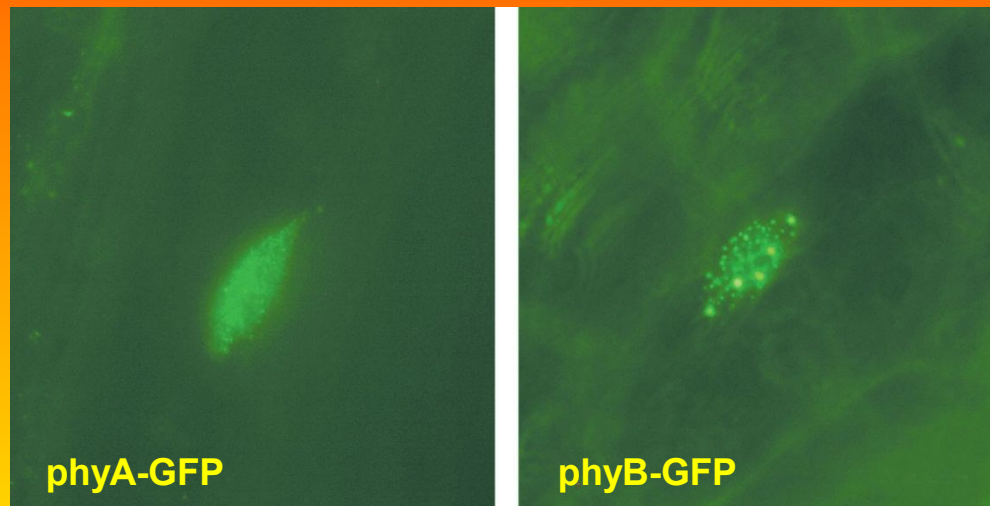


Fytochrom se přemísťuje do jádra vlivem světla

- 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

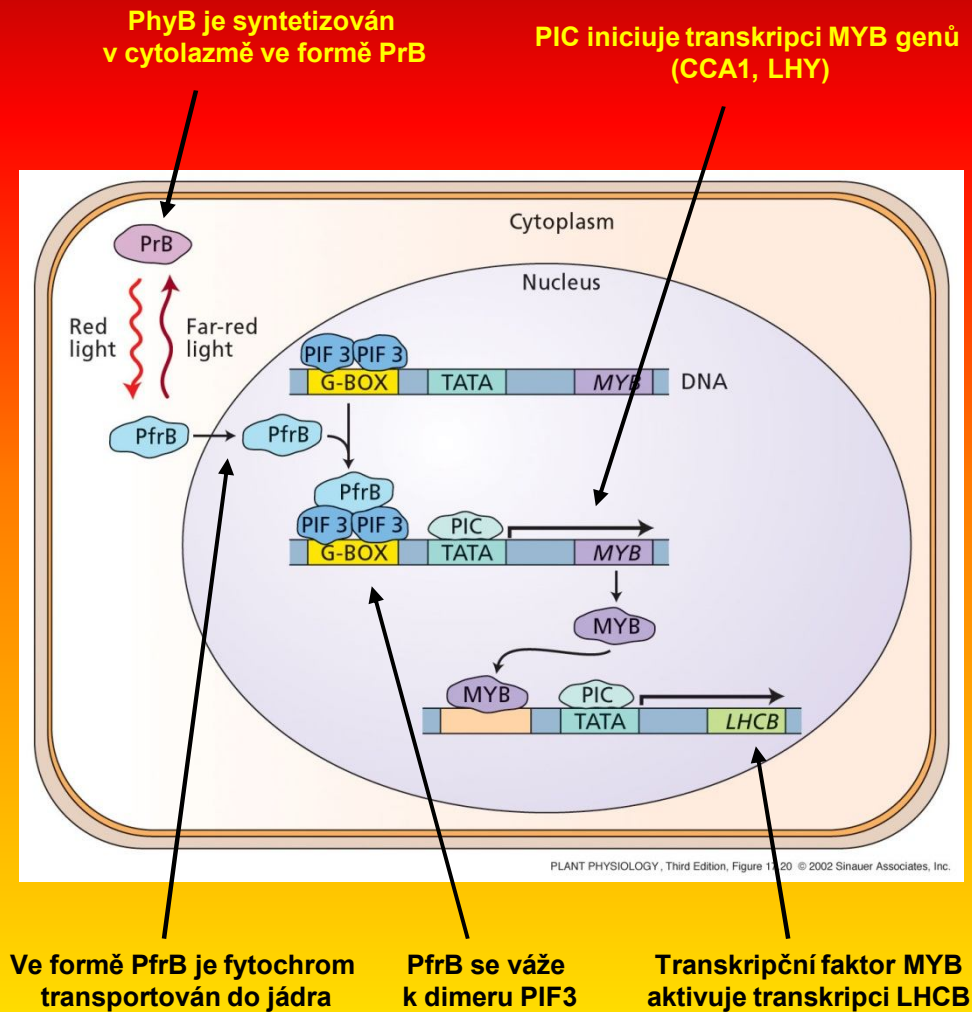


Transformace rostlin



Sledování exprese *PHYB*
v buňkách a pletivech

Regulace genové exprese fytochromem B



1) Regulace genové exprese přímo PfrB

2) Regulace genové exprese prostřednictvím PIF3

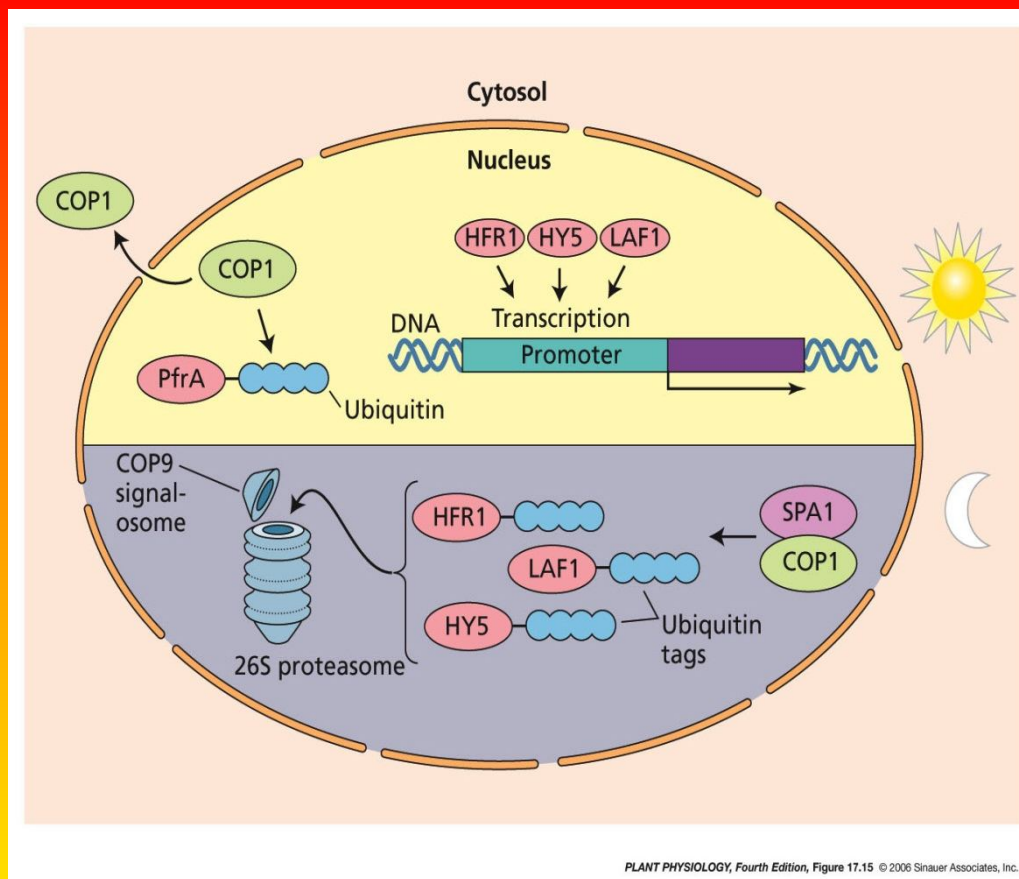
PIF3 (phytochrome interacting factor3)

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

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

Regulace genové exprese fytochromem A

- 1) přímo PfrA
- 2) prostřednictvím PIF3
- 3) prostřednictvím COP1



Tma:

Akumulace COP1 v jádře



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

Světlo:

Transport COP1 z jádra do cytoplazmy předáním ubiquitinů proteinu PfrA



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

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



Xing-Wang Deng
Yale University, New Haven



Nemutovaná rostlina

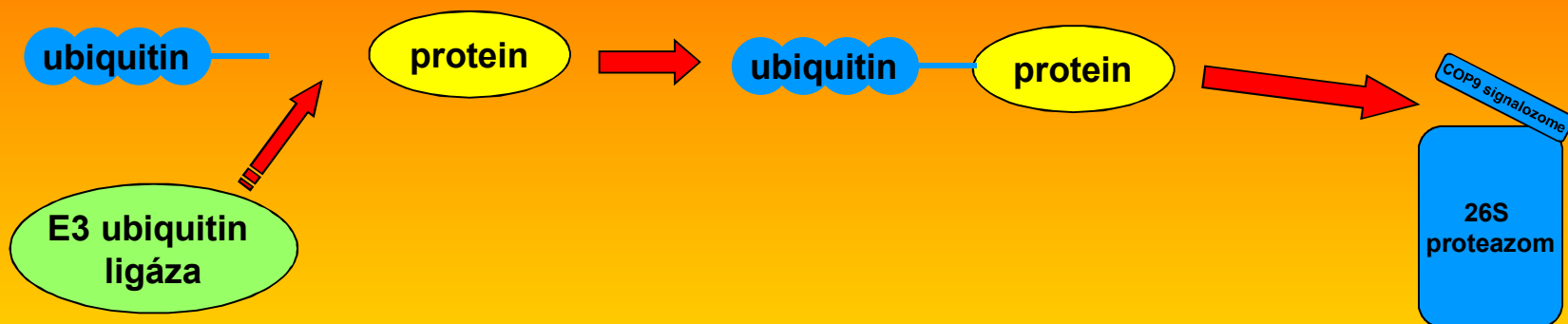
Mutant *cop1*

Zdravý (= funkční) gen *COP1* – negativní regulátor fotomorfogeneze

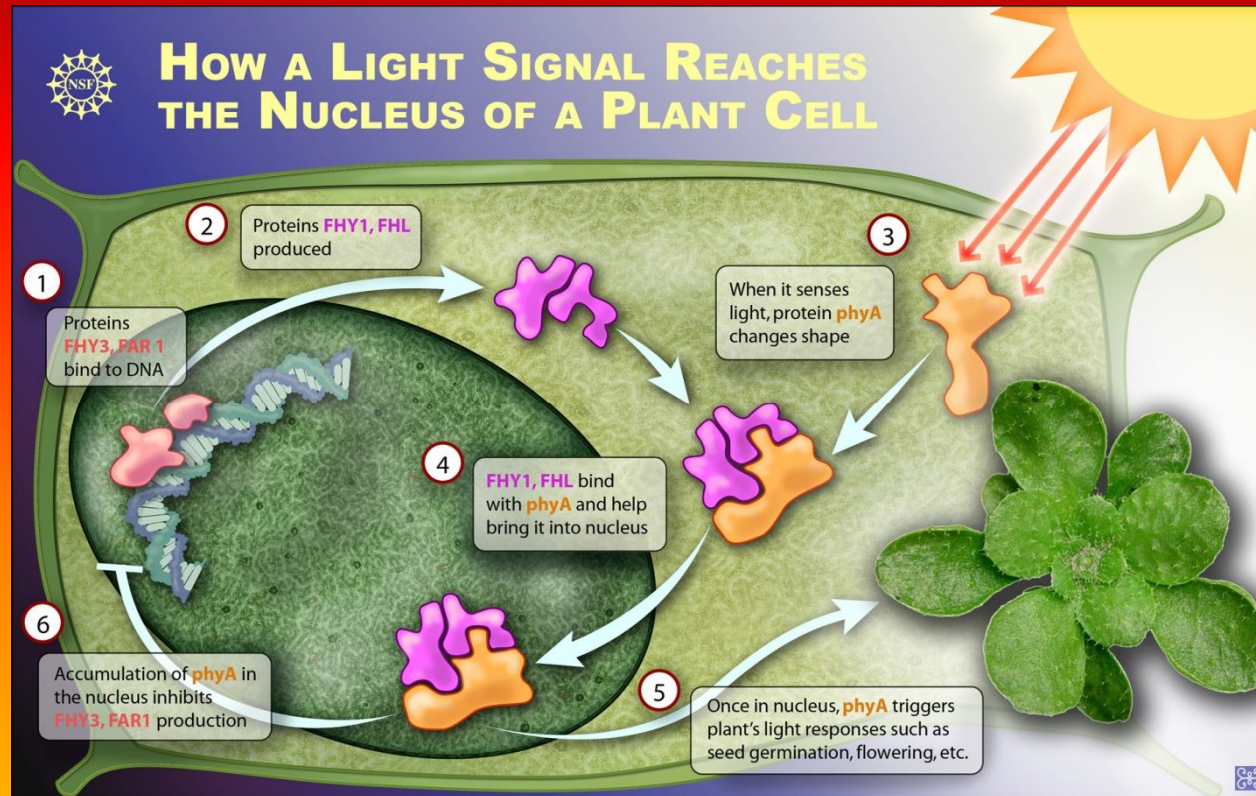
COP1 funguje jako E3 ubiquitin ligáza – enzym zajišťující v buňce degradaci proteinů (proteolýzu)

Proteolýza zprostředkovaná proteazomem vyžaduje protein **ubiquitin**.

Ubiquitinace – běžný mechanismus degradace proteinů v organizmech



Regulace transportu fytochromu A do jádra



Transkripční faktory: **FHY3** a **FAR1** – řídí (spouští) 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

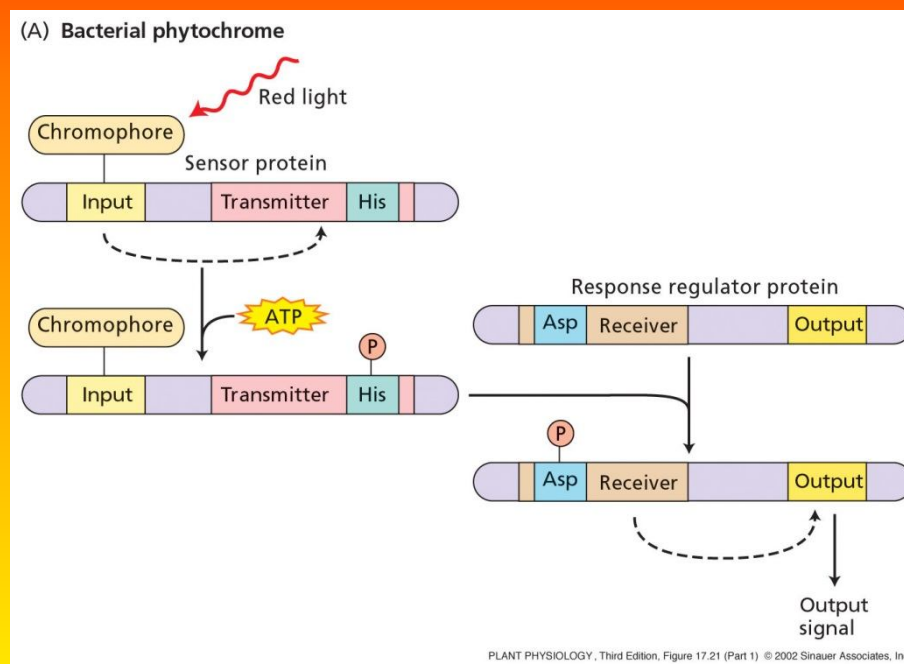
Fosforylace – důležitý mechanismus fungující v řadě signálních drah, včetně fytochromů

Fosforylace reguluje aktivitu transkripčních faktorů (a jiných enzymů)

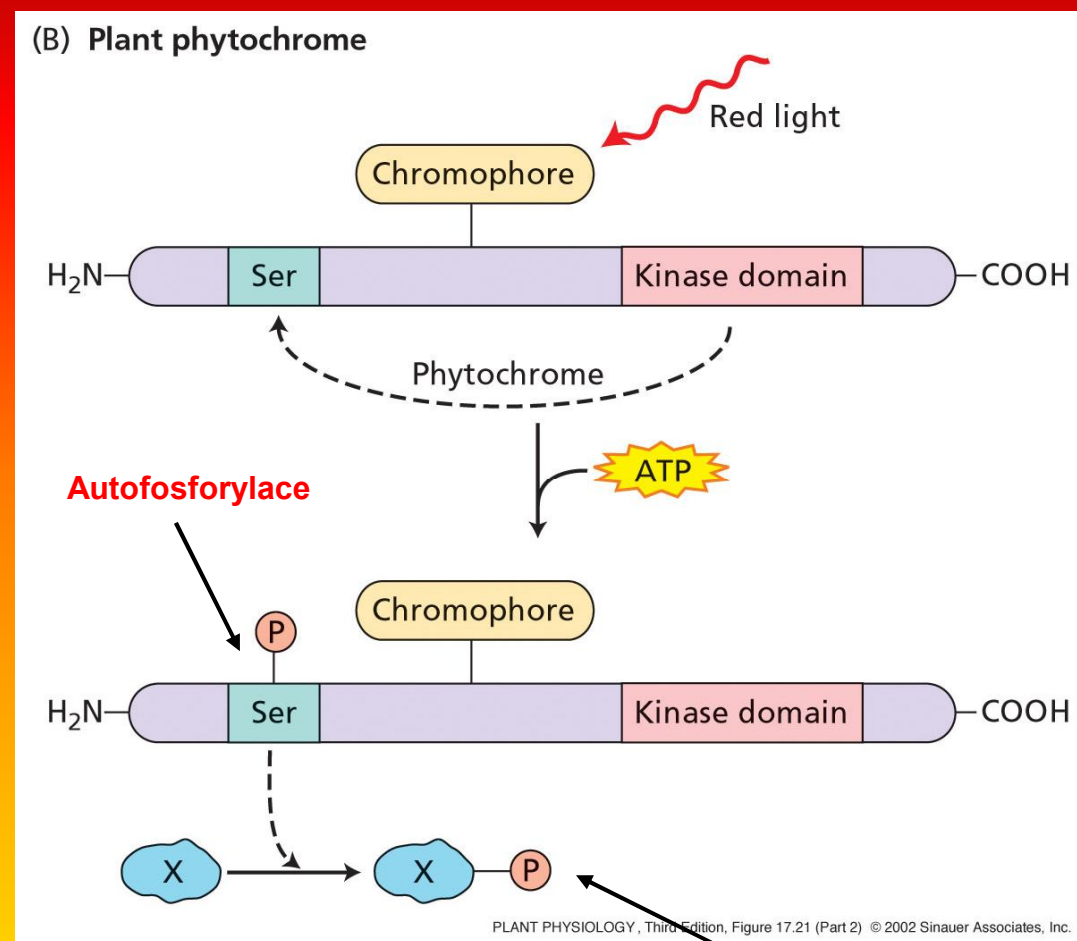
Fosforylace = připojení fosfátové skupiny k amikokyselinovému zbytku nějakého proteinu

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 regulátorový protein



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

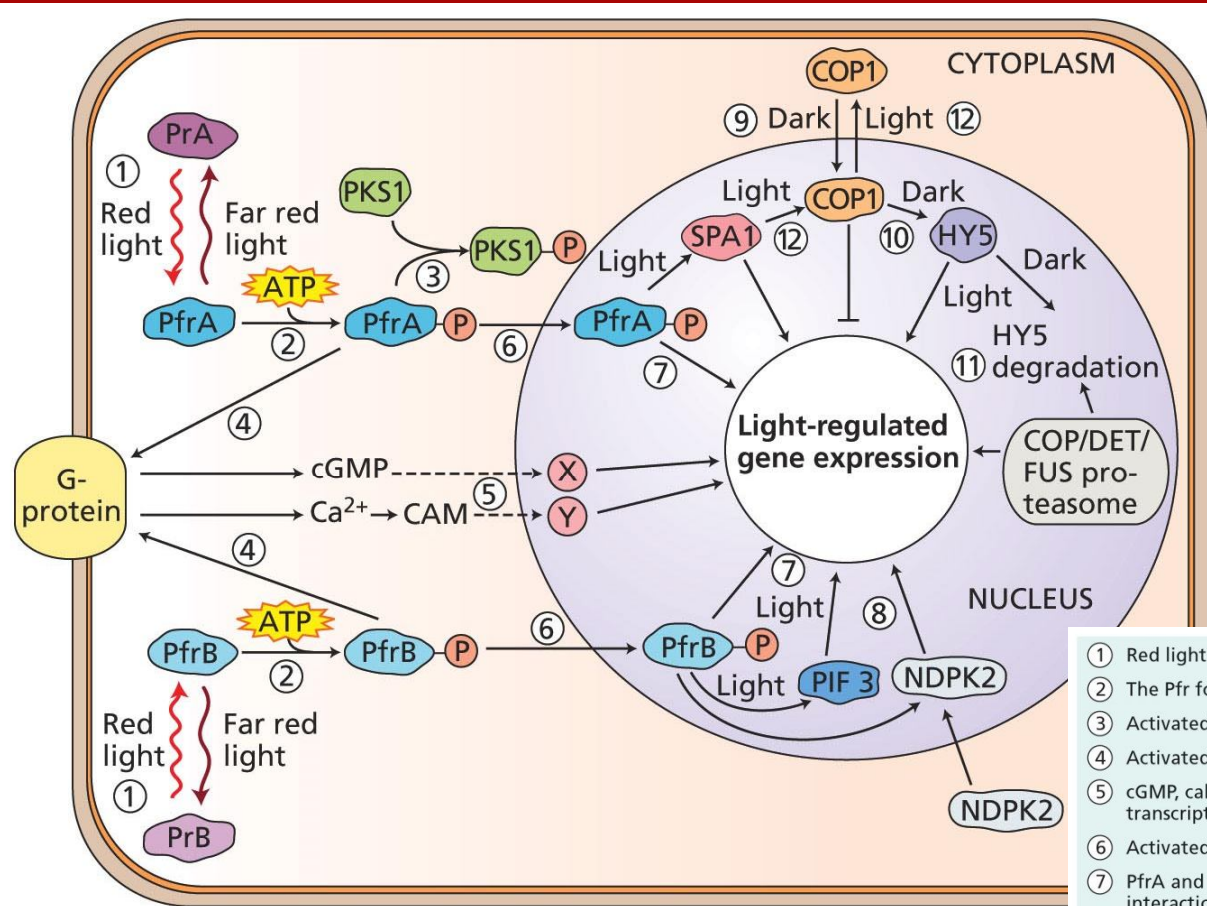


PKS1 (phytochrome kinase substrate) – protein fosforylován fytochromem A v cytoplasmě

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

Fosforylace jiného proteinu

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.