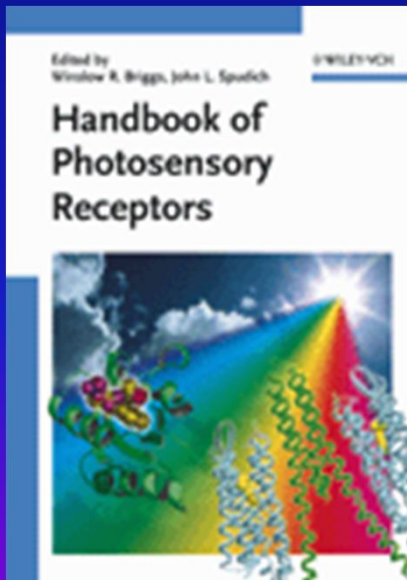


9) Fotomorfogeneze

e) Fotobiologie reakcí zprostředkovaných modrým světlem

f) Fotoreceptory

g) 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

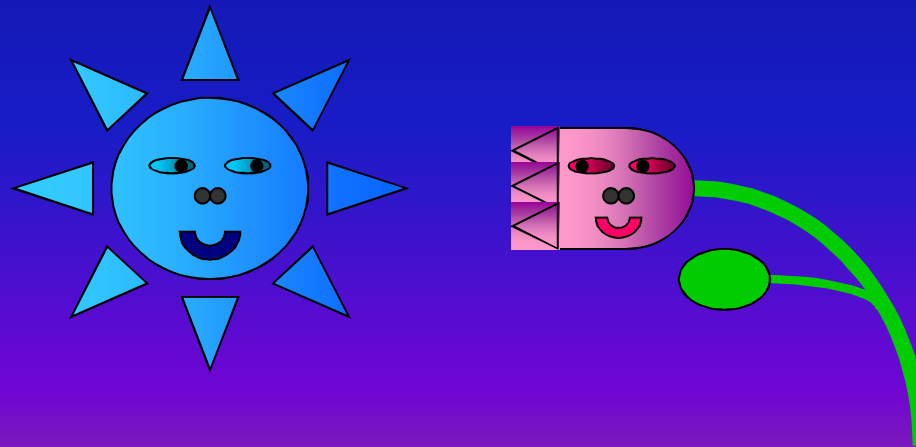


Whitelam GC, Halliday KJ (eds) (2007)
Light and Plant Development
Blackwell Publishing

e) 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

Pohyb jádra

Změna polohy listů

Reakce rychlé - sekundy (elektrické jevy na membráně)

Reakce pomalé - minuty, hodiny (stimulace biosyntézy pigmentů)

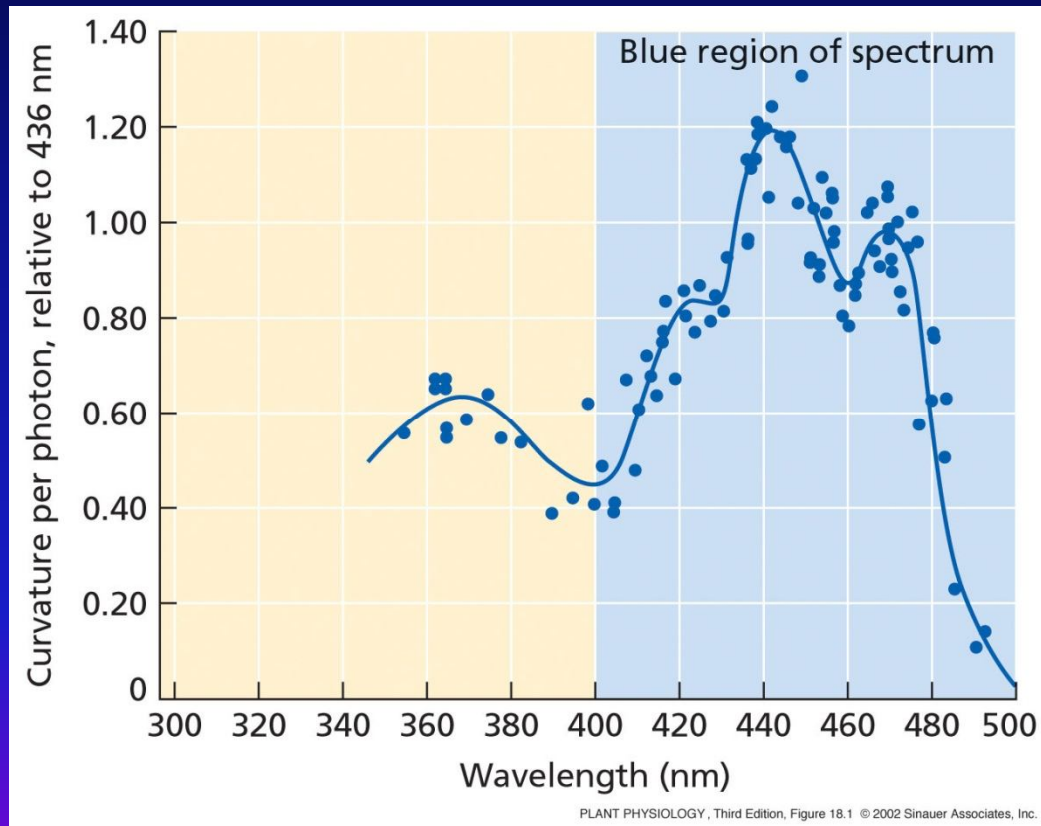
Modré světlo je absorbováno specifickými receptory modrého světla, ale také fytochromy a chlorofylem.



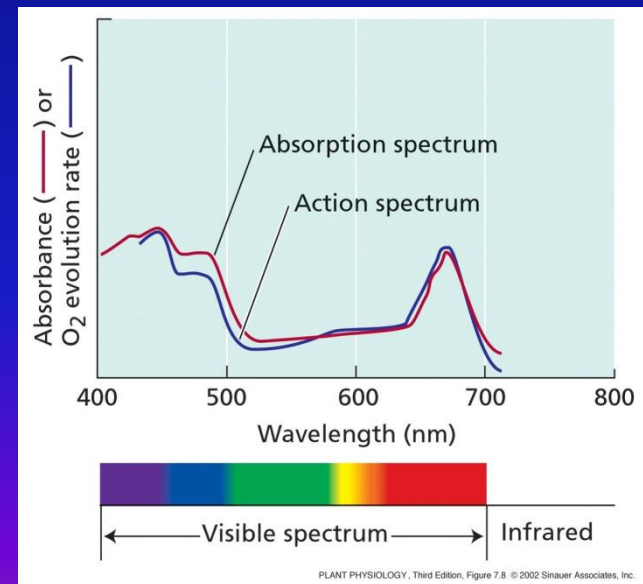
Jak odlišit specifické reakce k modrému světlu?

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

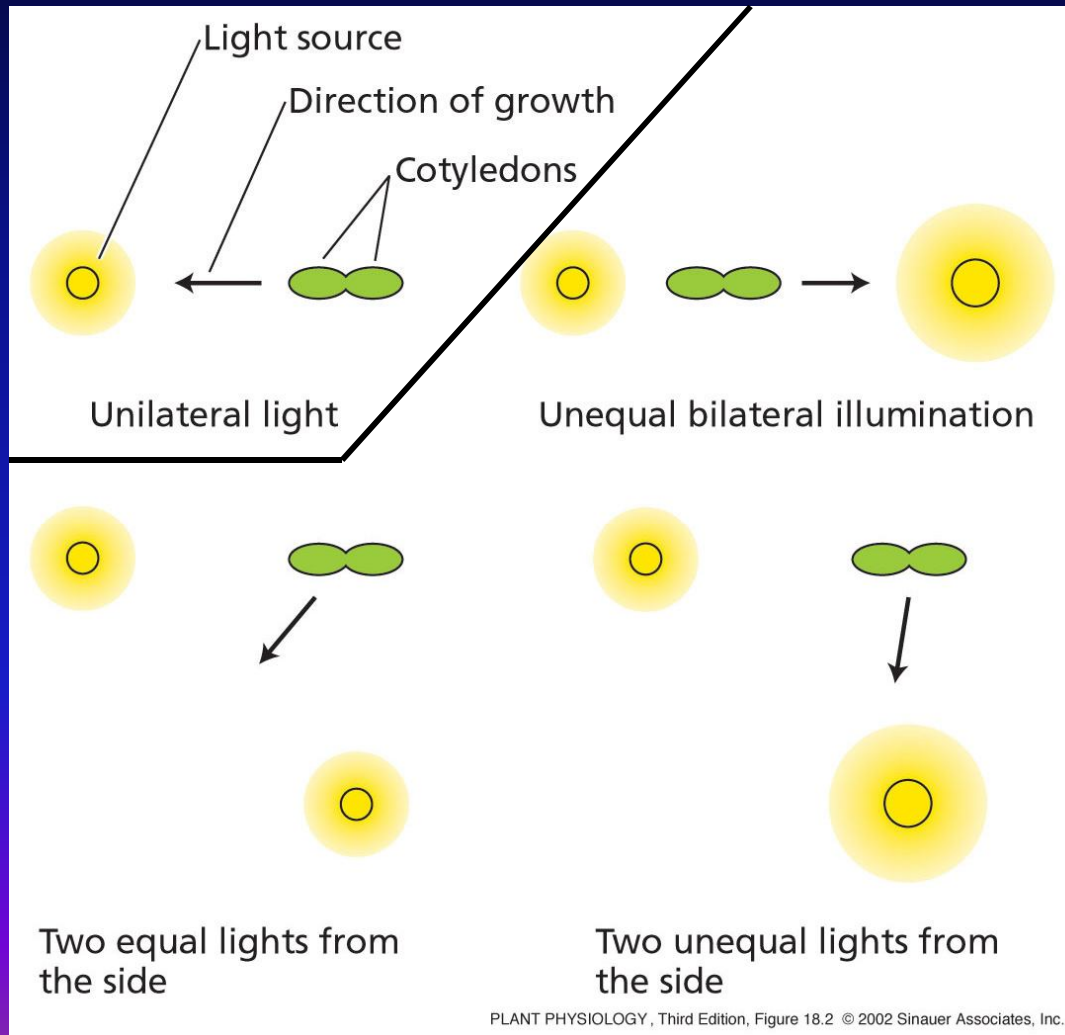
Akční spektrum - graf, který vyjadřuje závislost intenzity pozorované reakce na vlnové délce světla



Akční spektrum pro fototropismus



1) Fototropismus – asymetrický růst směrem ke světlu

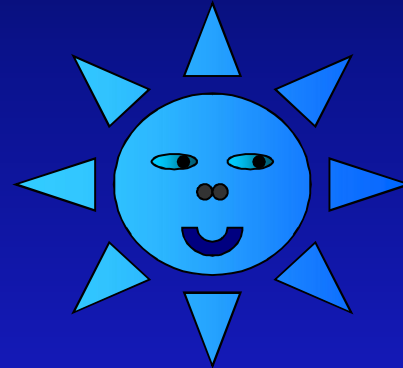
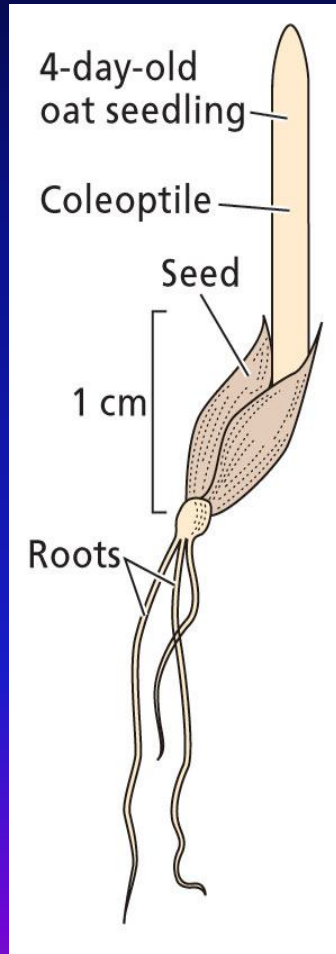


- houby

- kapradiny

- vyšší rostliny

Koleoptile (coleoptile) – modifikované listy u jednoděložných

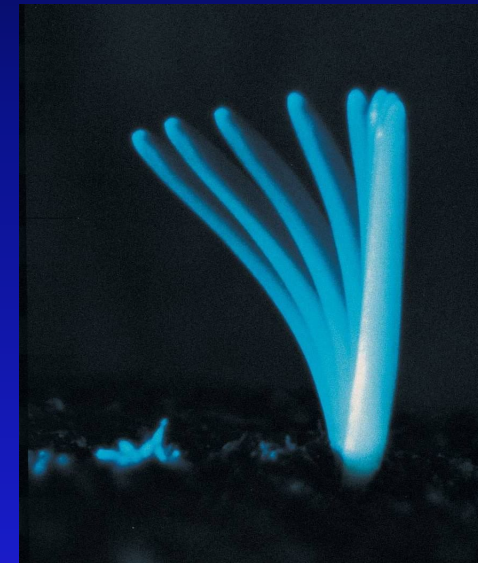


Auxinový gradient



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

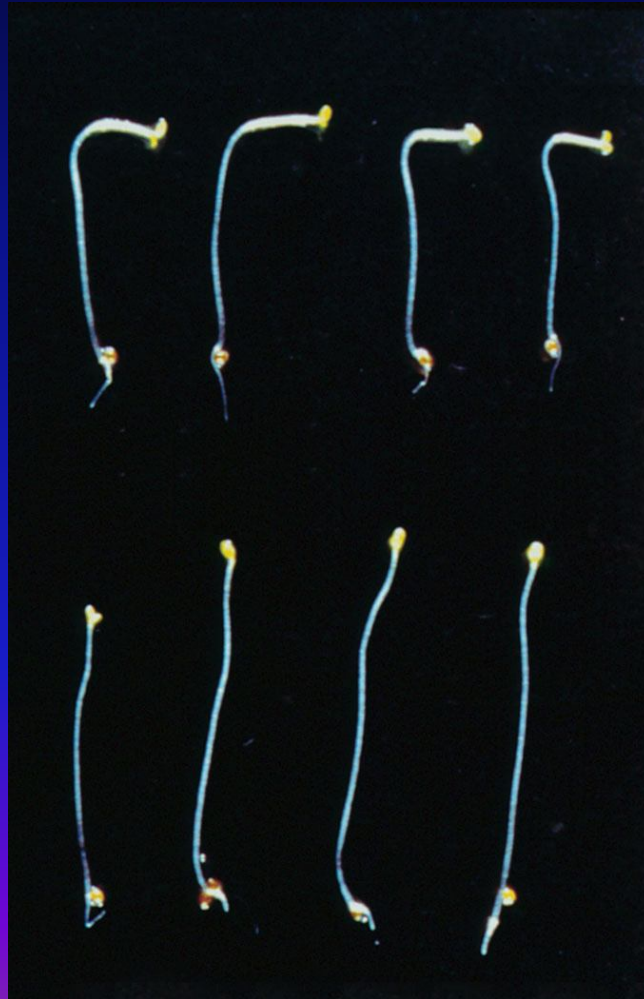
~ 180 minut



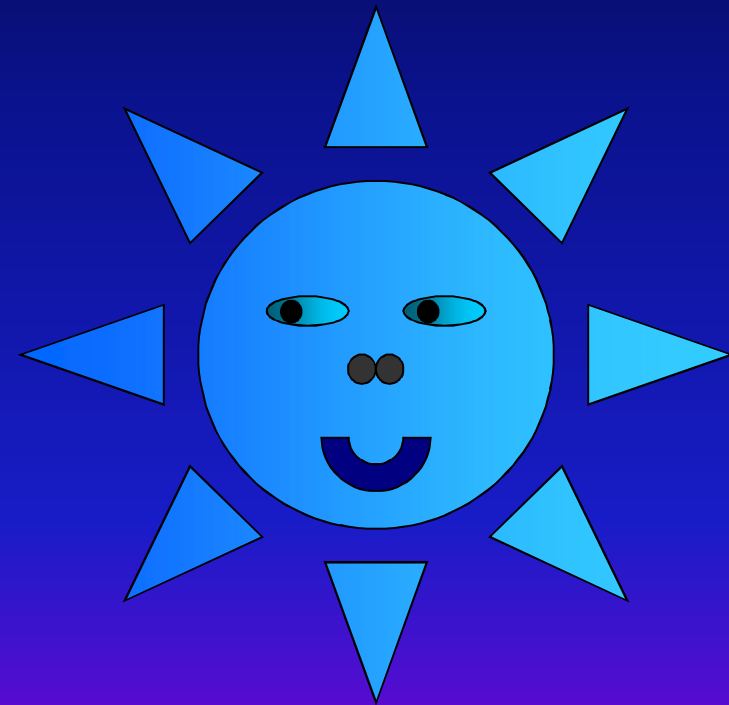
Zakřivení koleoptile

Arabidopsis mutant *phot1* s defektem ve fototropismu

WT

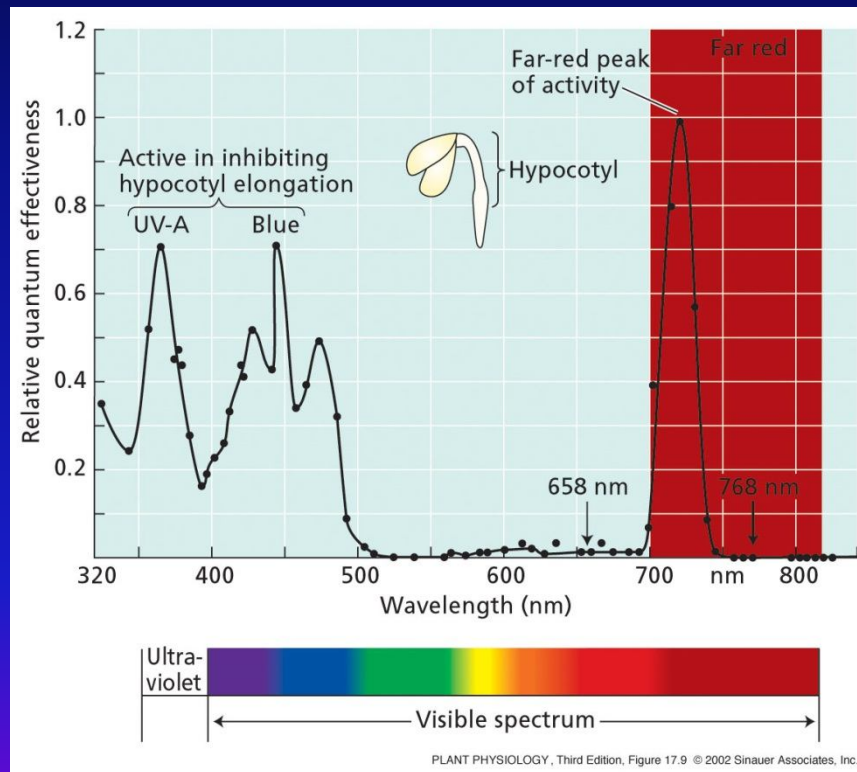


phot1

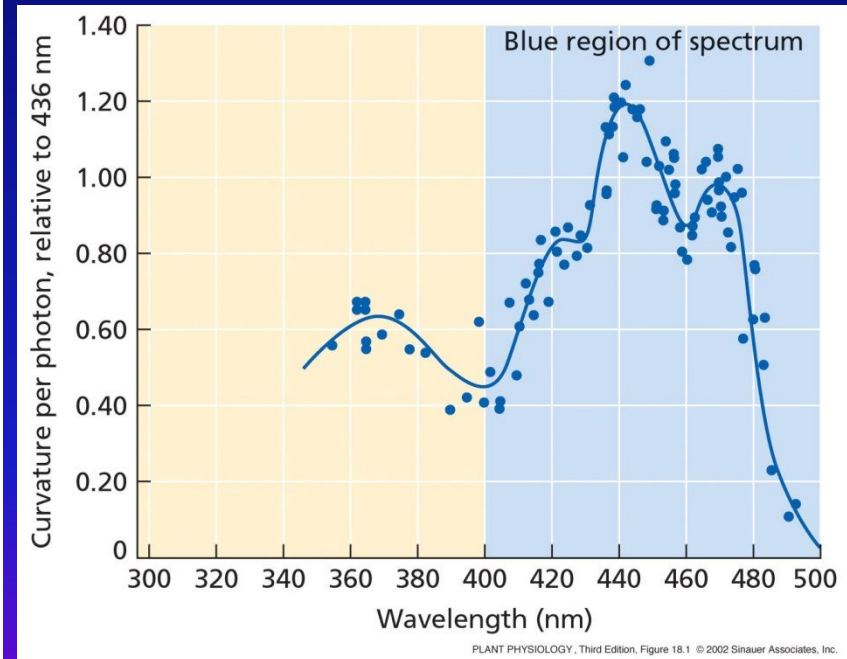


2) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu

Klíčení \longrightarrow Proniknutí z půdy \longrightarrow Fotomorfologická reakce = inhibice růstu



Akční spektrum pro inhibici růstu etiolovaných rostlin



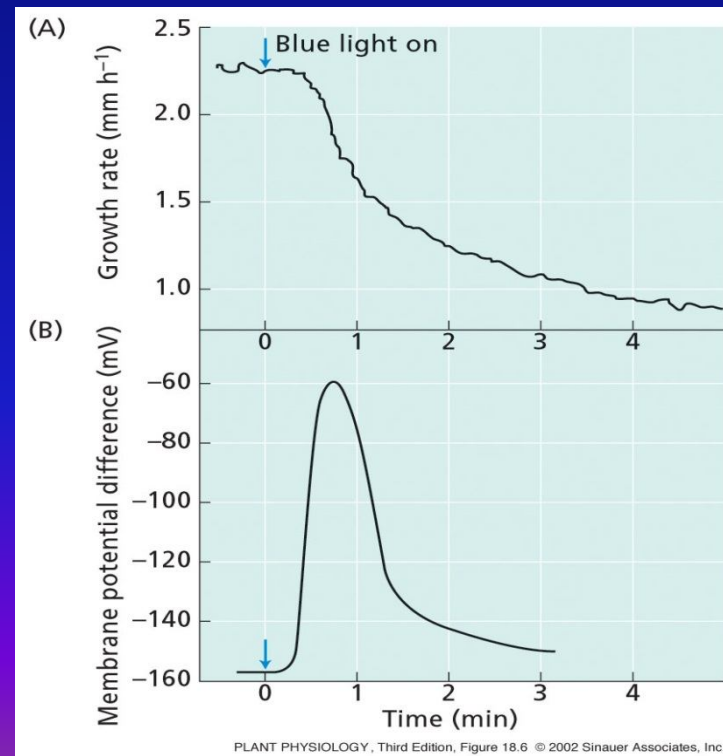
Akční spektrum pro fototropismus

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

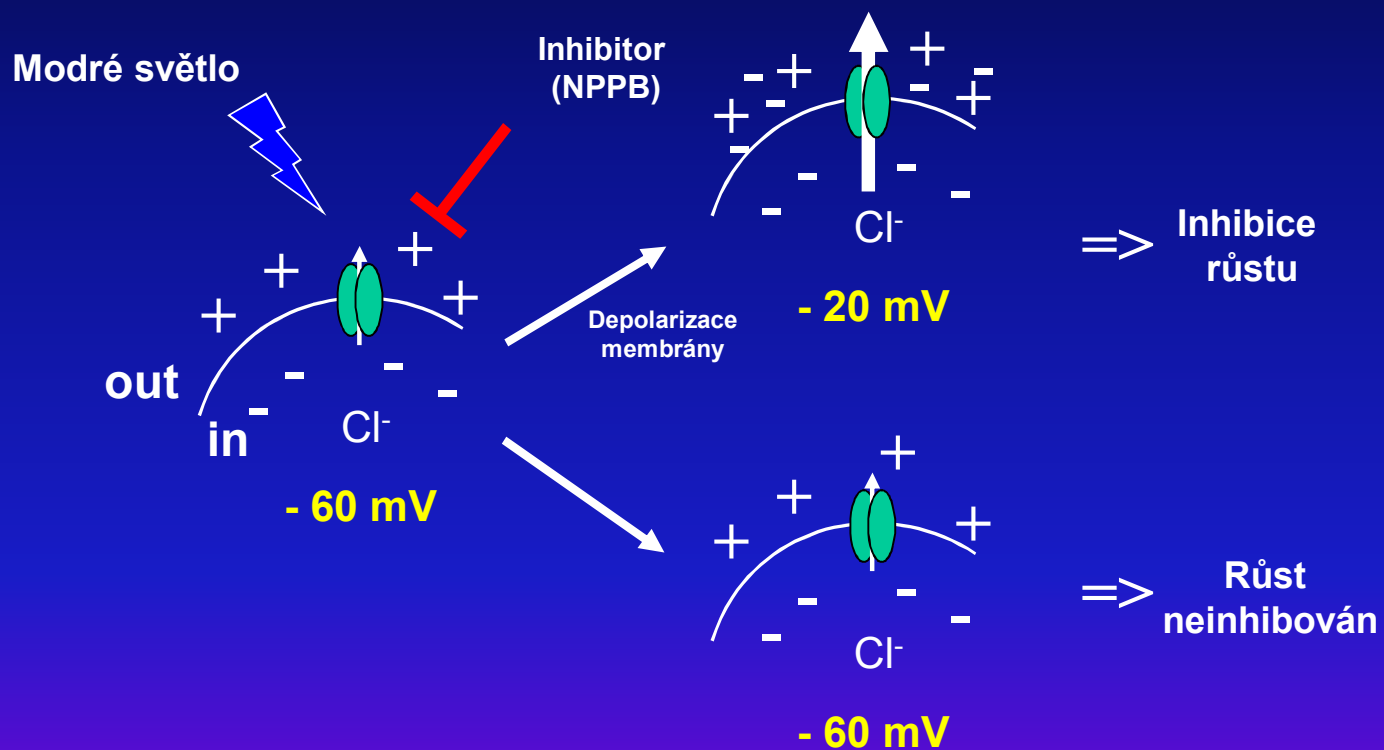
1) Aplikace silného žlutého světla => saturovaná inhibice růstu ~ 50%, stabilní Pr:Pfr. Následná aplikace slabého modrého světla => další inhibice růstu specificky zprostředkovaná fotoreceptory pro modré světlo.

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⁻ kanálů.



Aniontové kanály zprostředkují inhibici růstu modrým světlem



3) Aktivace genové exprese

Modré světlo indukuje expresi genů, které kódují řadu 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 *SIG* je aktivováno nesespecificky modrým i červeným světlem

c) Fotoreceptor CRY1 je regulován modrým světlem

Modré světlo zvyšuje jak množství mRNA, tak i proteinu BnCRY1. Promoter genu *CRY1* nese cis-acting sekvence reagující k modrému světlu.

4) Stimulace otevírání průduchů (stomat)

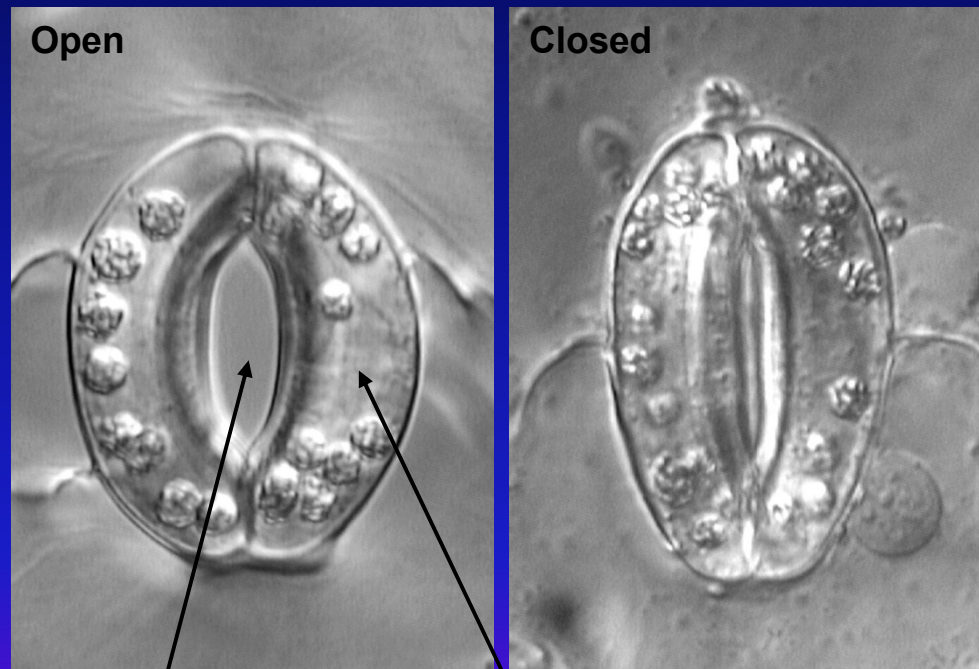
Průduchy hrají hlavní regulační roli ve výměně plynů v listech

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

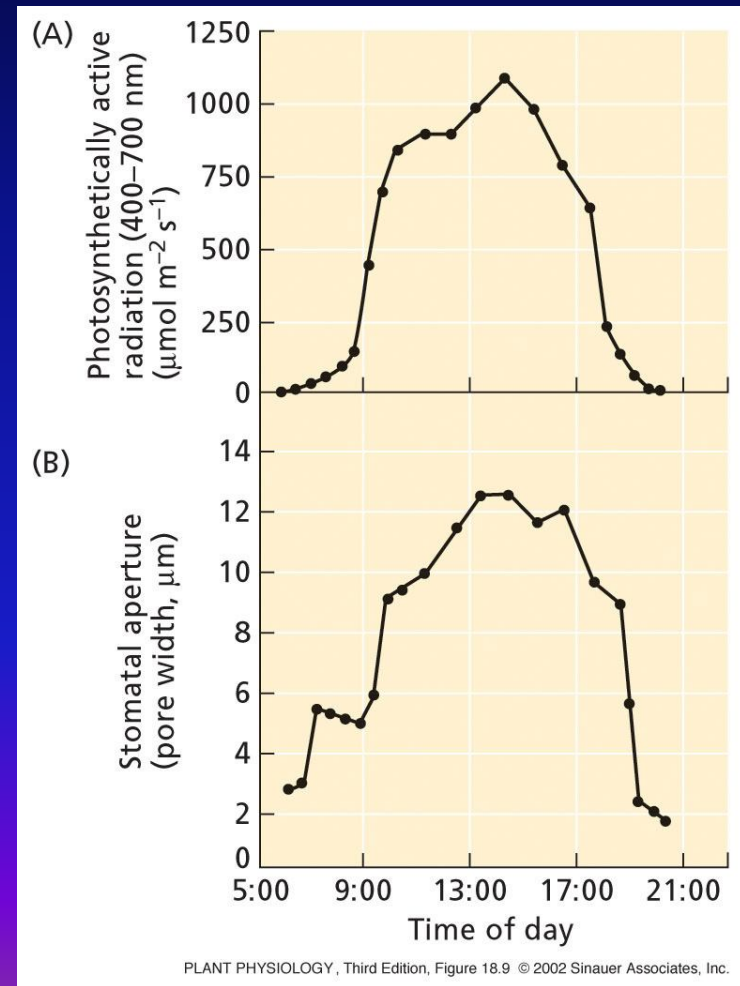
Světlo je dominantní faktor regulující otevírání a zavírání stomat dopadem na epidermální buňky listu.

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 světlem indukovaném otevírání stomat



Nefotosyntetická složka stomatální reakce ke světlu

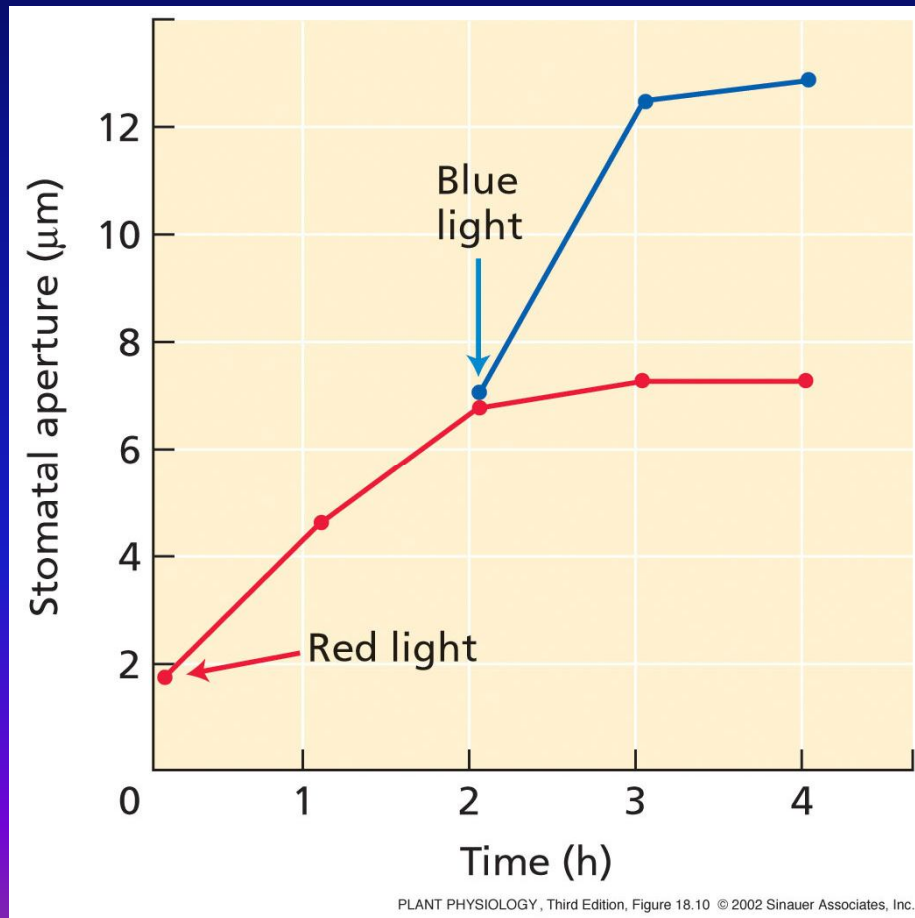


Světlo aktivuje dvě výrazné reakce svěracích buněk:

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

Specifická stomatální reakce

Modré světlo způsobuje současně fotosyntetickou a specifickou nefotosyntetickou reakci

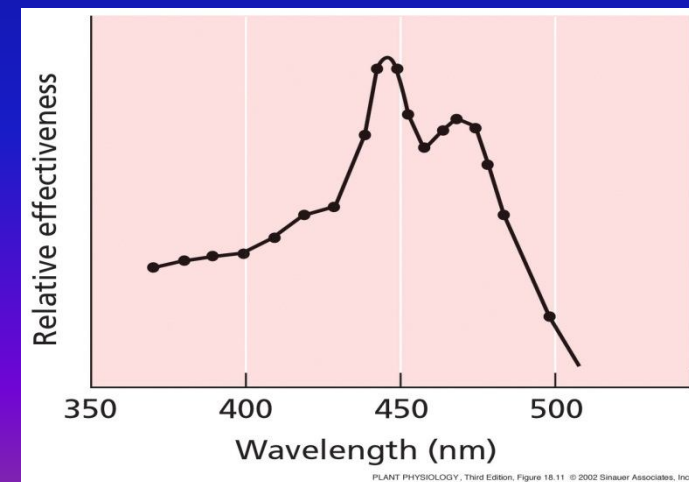


1) Saturace fotosyntetické reakce silným červeným světlem => částečné otevření stomat

2) Aplikace slabého modrého světla



Další, nefotosyntetické, otevření stomat vyvolané modrým světlem

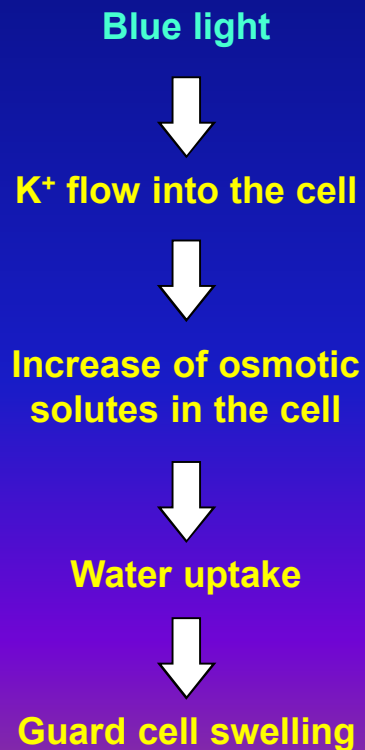


Modré světlo indukuje zvětšování protoplastů izolovaných ze svěracích buněk průduchů



Světlo je opravdu vnímáno svěracími buňkami

Odhalení mechanismu fungování svěracích buněk, tj. otevírání a zavírání průduchů



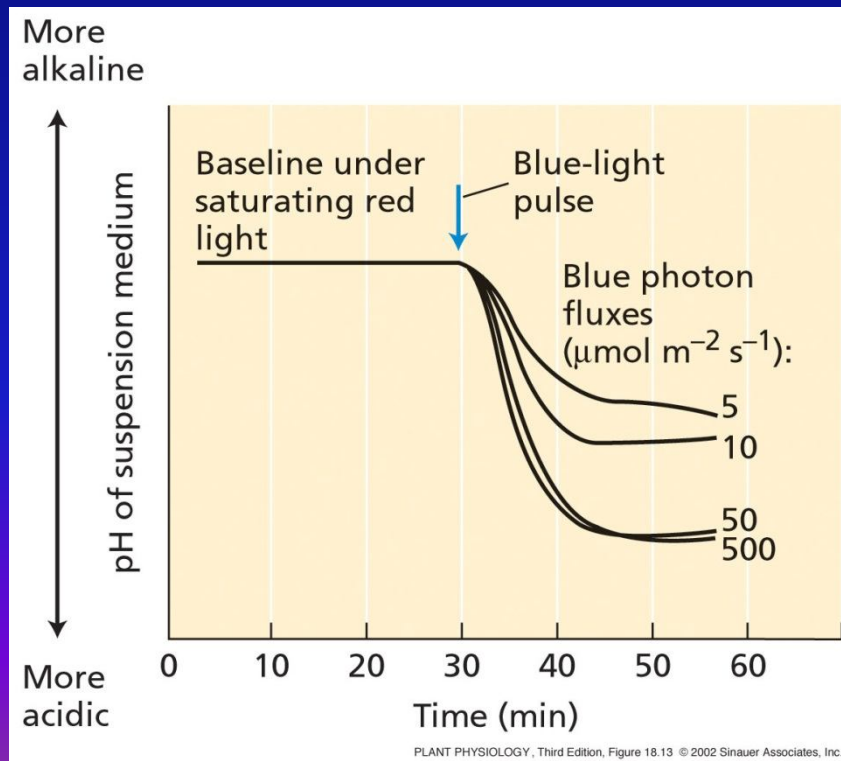
Modré světlo



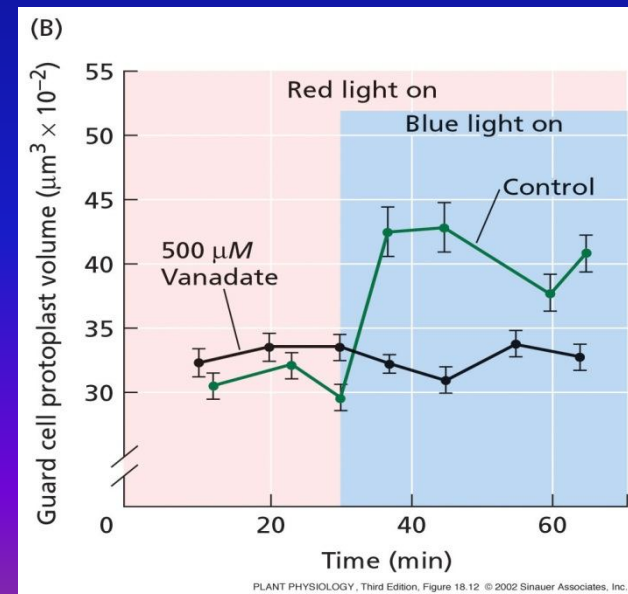
Modré světlo aktivuje protonovou pumpu (H^+ - ATPase)

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

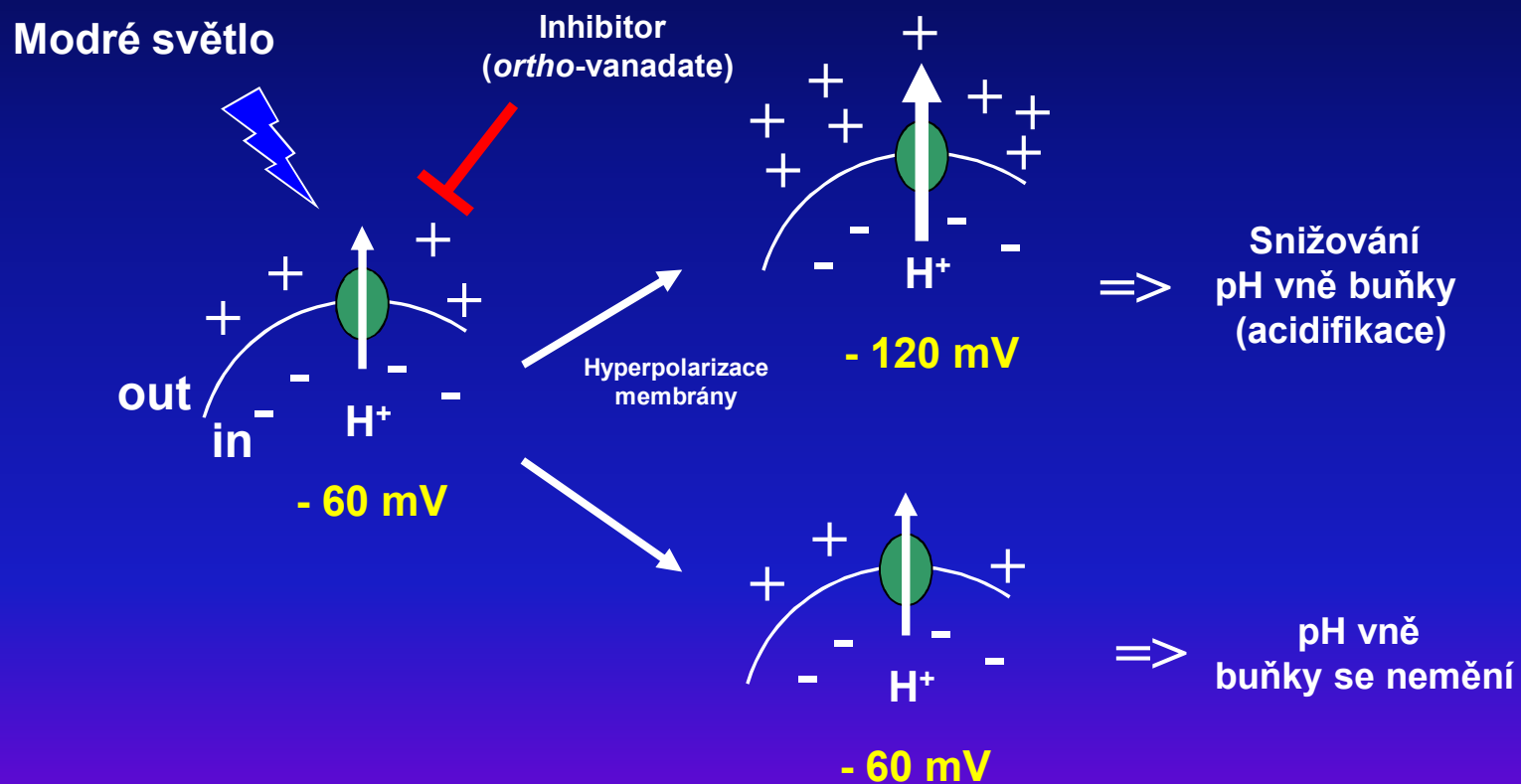
Acidifikace může být blokována aplikací CCCP (blokátor tvorby pH gradientu) nebo vanadatem (inhibitor protonové pumpy)



Acidifikace je způsobena aktivací protonové pumpy modrým světlem



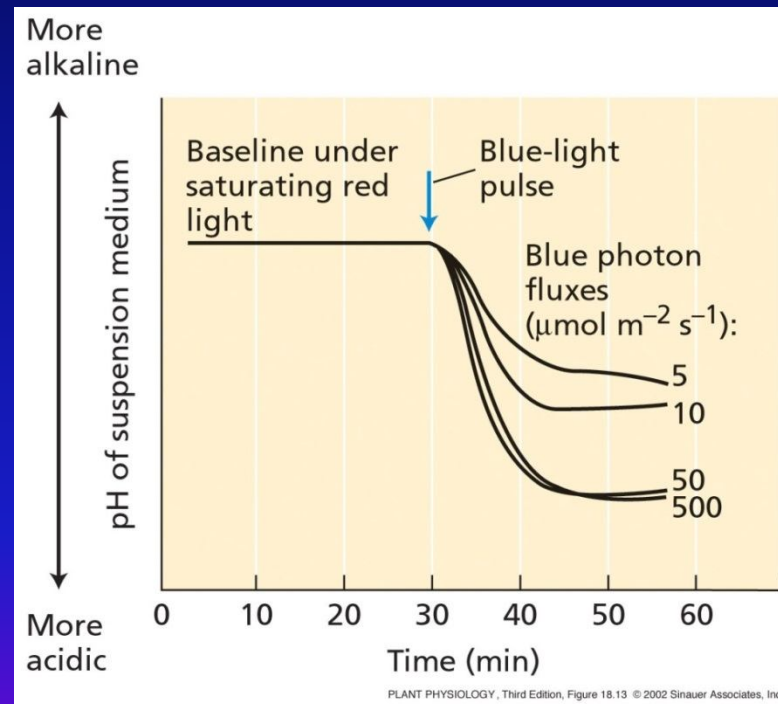
Aktivace protonové pumpy modrým světlem



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



Reakce stomat funguje jako senzor fotonů

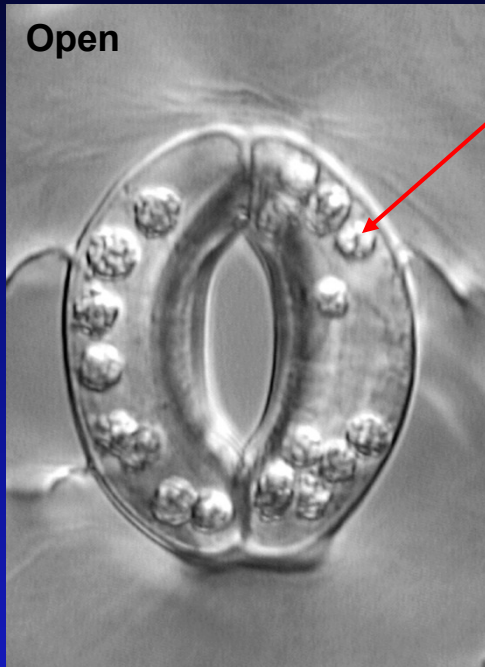


UPDATE 2014

Wang Y et al. (2014) PNAS 111: 533-538

Transgenic *Arabidopsis* plants with overexpressed H^+ -ATPase show increased light-induced opening of stomata





Chloroplasty – obsahují škrobová zrna

Škrob je nerozpustný vysokomolekulární polymer glukózy – není osmoticky aktivní



Když se průduchy otevírají, začíná hydrolyza škrobu. Škrob – zvyšuje se hladina cukrů – osmoticky aktivní



Osmotický tlak ↑ (osmotický potenciál ↓)



Další otevření průduchů

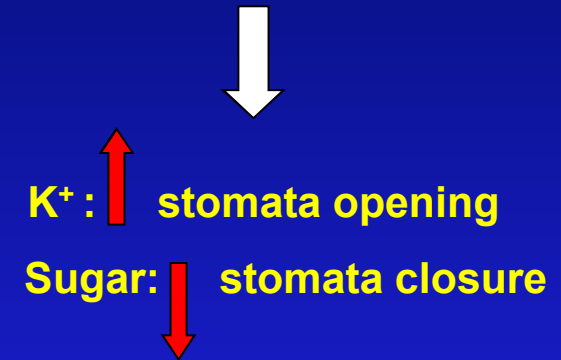
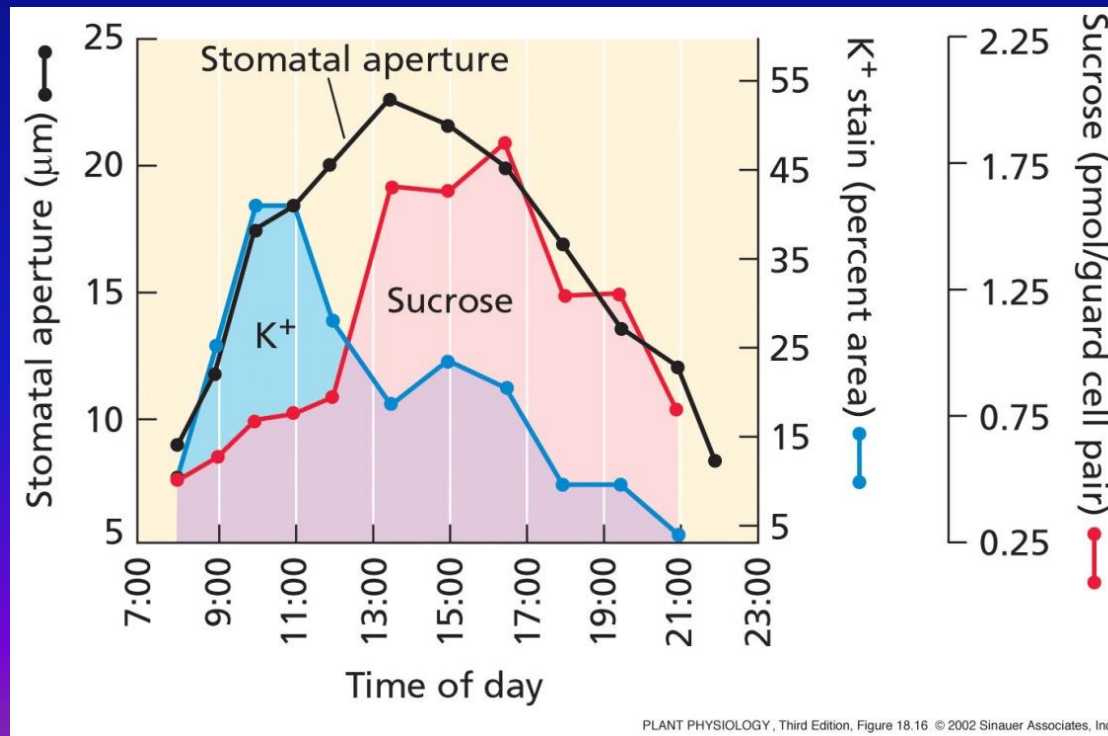
Zavírající se stomata: syntéza škrobu → Osmotický tlak ↓ (osmotický potenciál ↑)

Současný model osmoregulace ve svěracích buňkách

K^+ se zvyšuje ráno a průduchy se otevírají; obsah cukru se pomalu zvyšuje.

K^+ se snižuje odpoledne, ale otevírání stomat pokračuje díky zvyšování obsahu cukru.

Odpoledne se obsah cukru snižuje, což koresponduje se zavíráním průduchů.



19. století

Charles a Francis Darwin → Studium fototropismu koleoptile

Počátek 90. let → Identifikace fotoreceptorů

Identifikace genů regulujících fototropismus
a inhibici prodlužovacího růstu

Charakterizace proteinů

f) Fotoreceptory modrého světla:

Kryptochromy (cryptochromes) – inhibice růstu

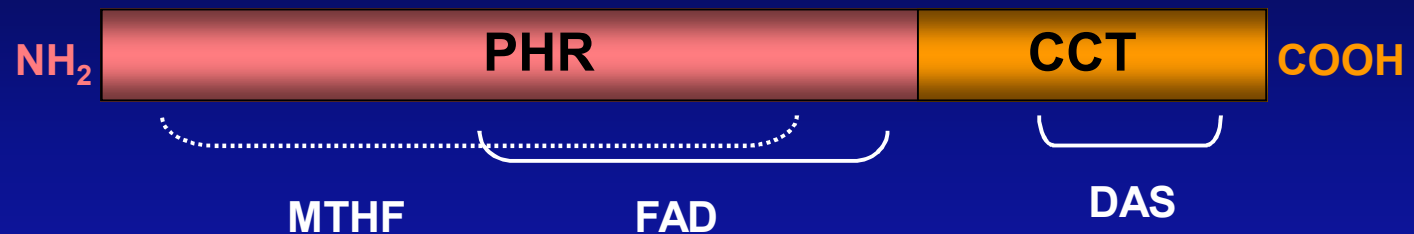
Fototropiny (phototropins) – fototropismus, pohyb chloroplastů,
otevírání průduchů

Zeaxantin (zeaxanthin) – otevírání stomat

Kryptochromy (cryptochromes)

Arabidopsis mutant *hy4* – hypokotyl není inhibován modrým světlem

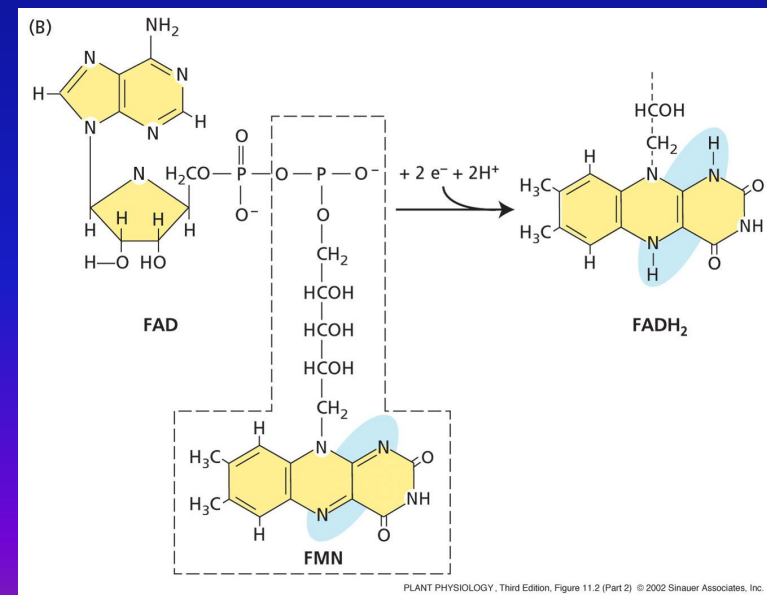
Gen *HY4* => protein, monomer 75 kDa



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)



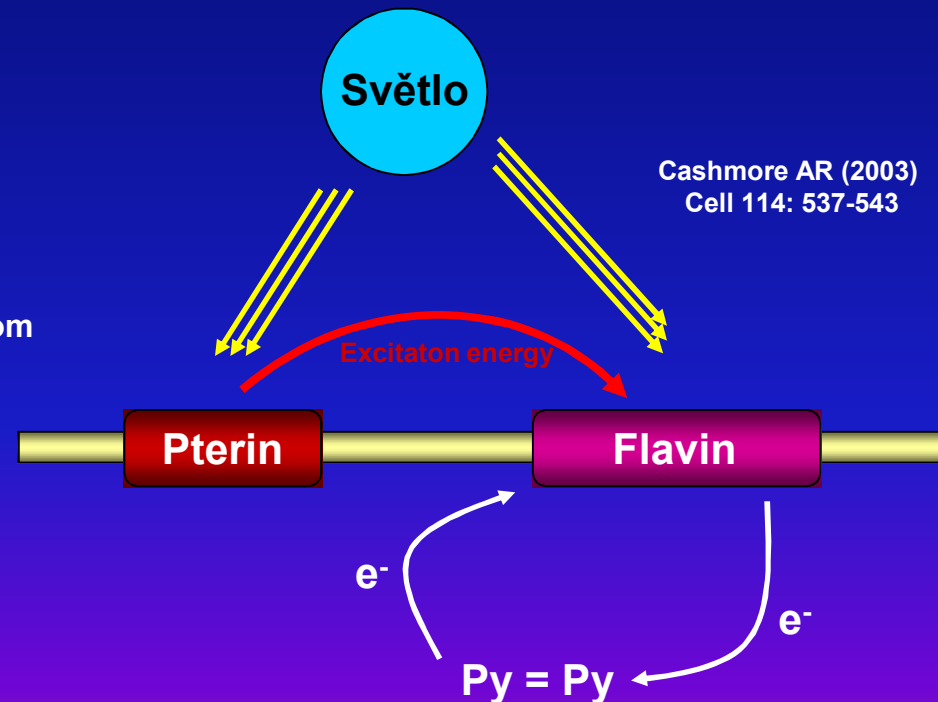
Exprese *HY4* v *Echerichia coli* – chybí fotolyázová aktivita

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.

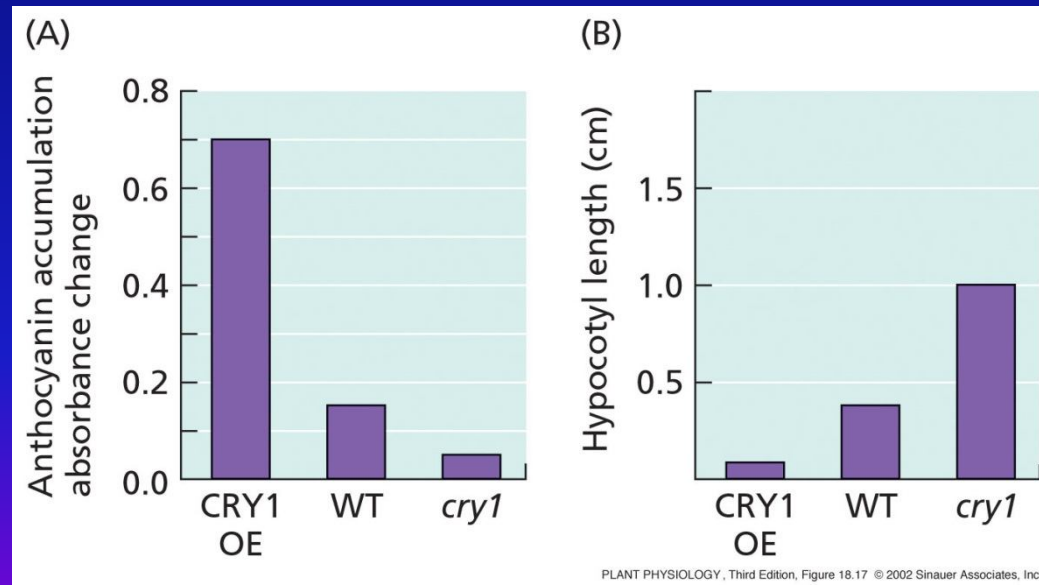
↓
Odlišné funkce těchto proteinů



**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

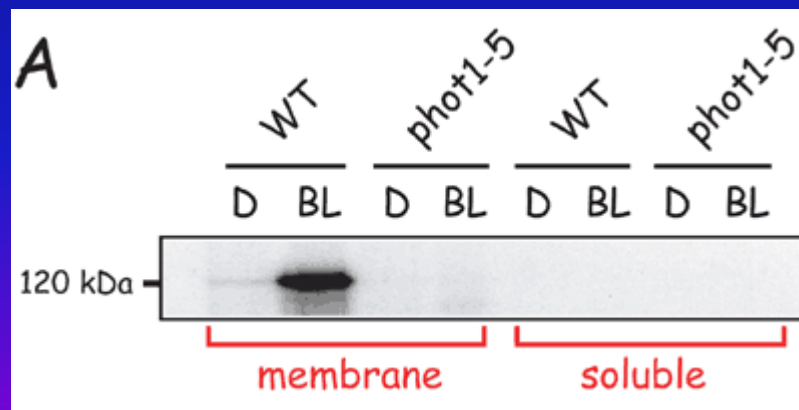
2003 - identifikace genu CRY3 → Funkce CRY3 ?

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

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)

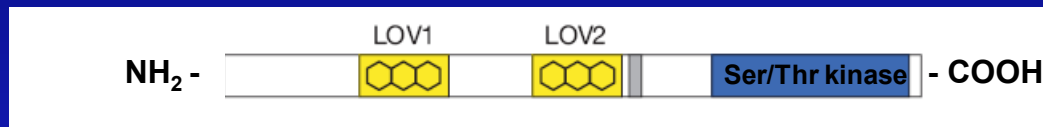


Struktura



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.



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

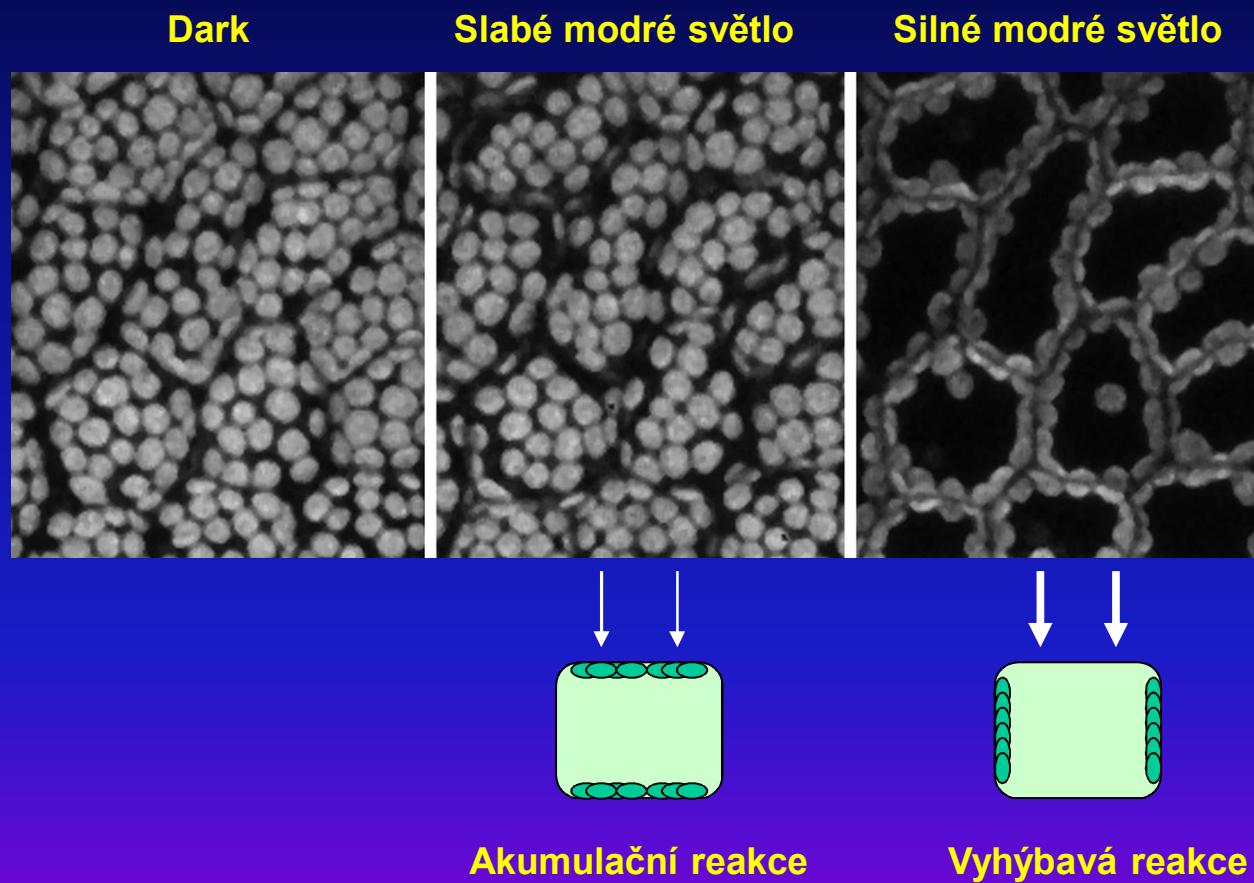
Mutant *phot1/phot2*:

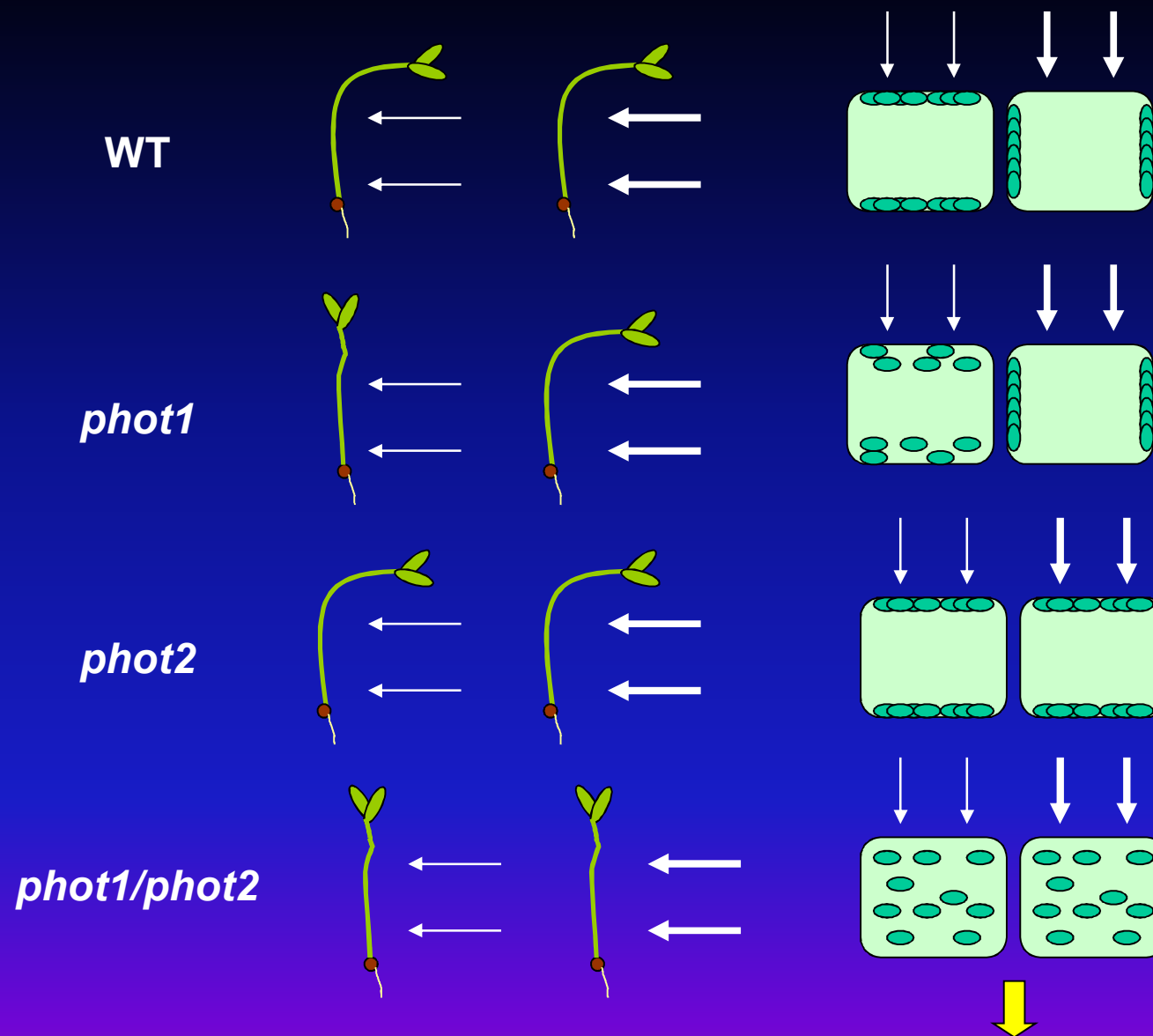
- nereaguje fototropicky k modrému světlu obou intenzit



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

Fototropiny hrají roli v pohybu chloroplastů



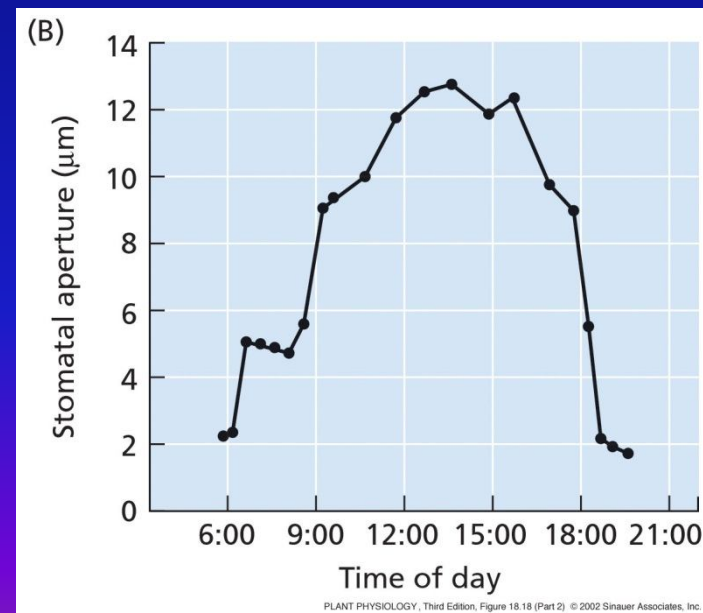
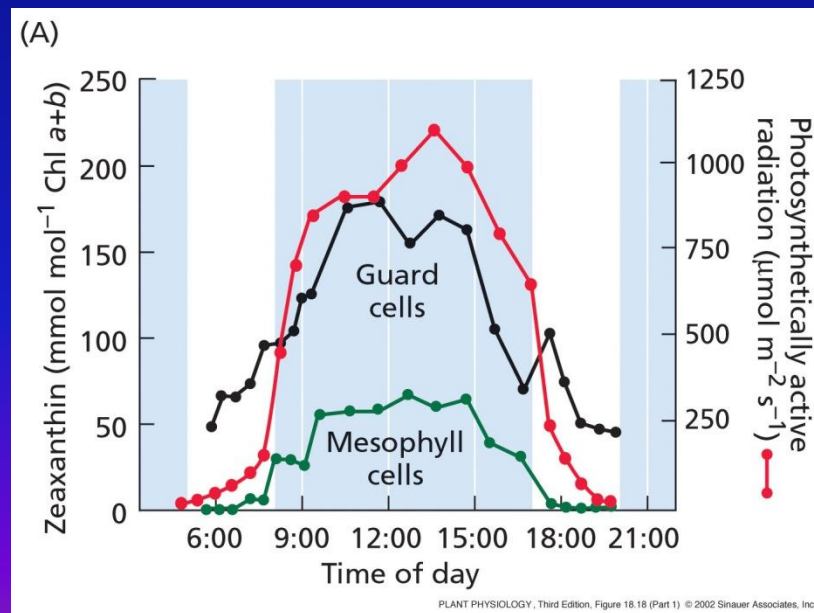


PHOT2 hraje roli ve vyhýbavé reakci
 Oba geny, *PHOT1* a *PHOT2* hrají roli v akumulární reakci

Zeaxantin (zeaxanthin)

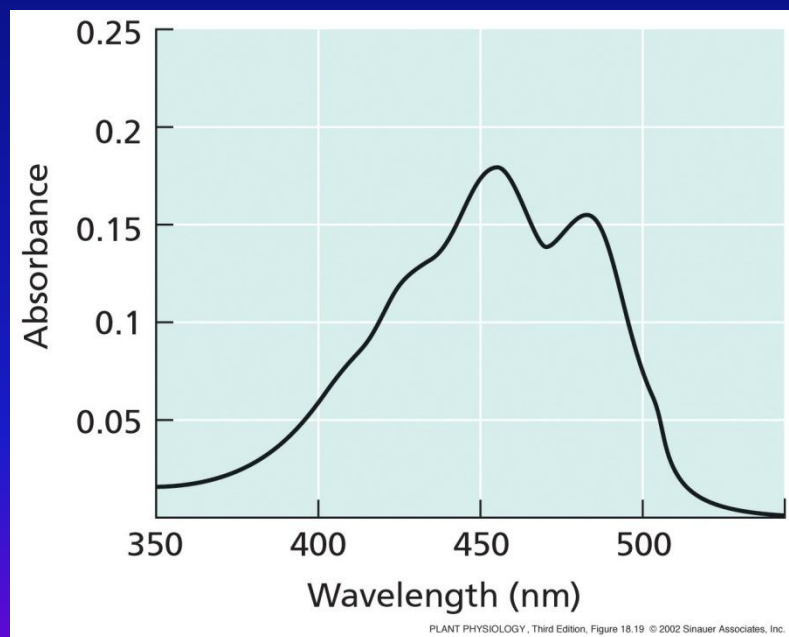
Zeaxantin – karotenoid; komponenta xantofilového cyklu v chloroplastech mezofylových buněk - chrání fotosyntetické pigmenty před nadměrným světlem.

Zeaxantin ve svěracích buňkách funguje jako receptor zprostředkující otevírání stomat

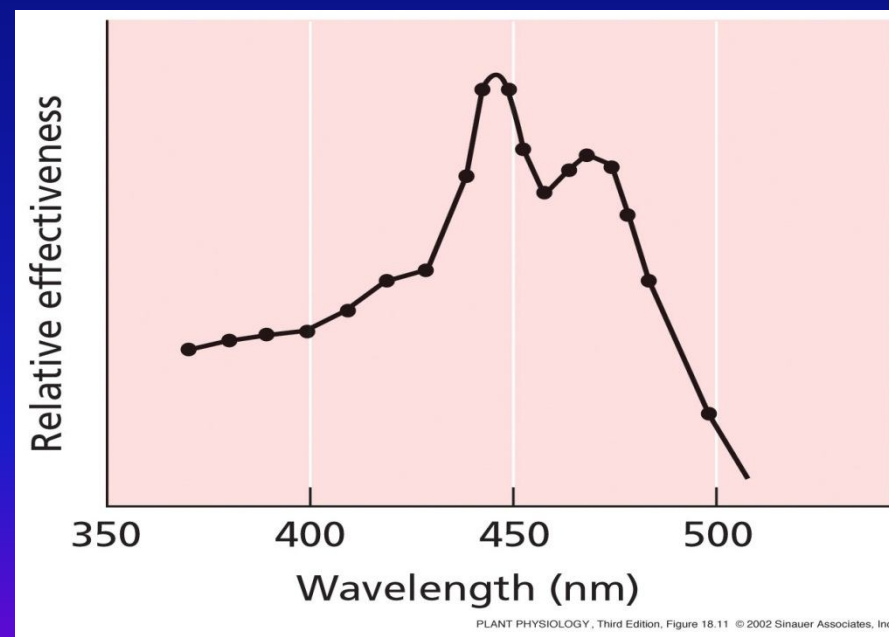


Důkazy pro roli zeaxantinu jako fotoreceptoru ve stomatech

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



Absorpční spektrum zeaxantinu

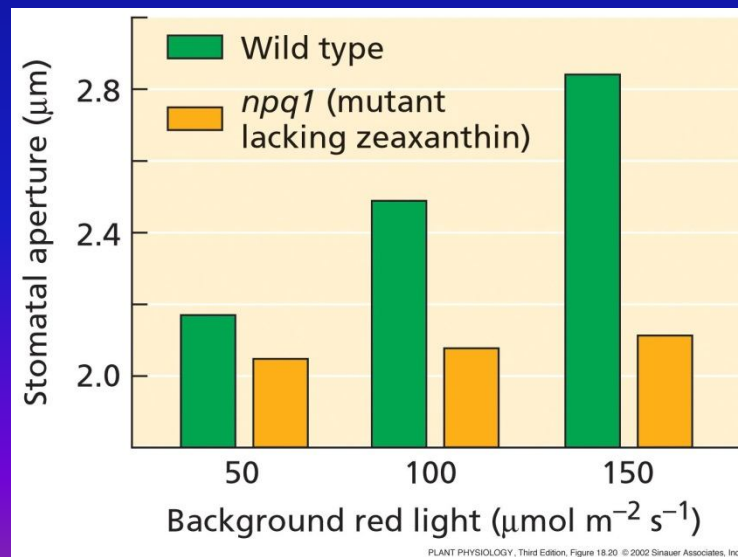


Akční spektrum otevírání stomat

- 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 jeho koncentraci

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

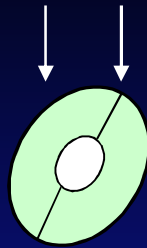
Arabidopsis mutant *npq1* (*nonphotochemical quenching*)



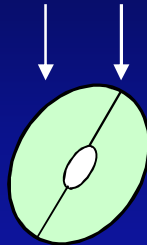
npq1 neakumuluje zeaxantin v chloroplastech
=> chybí specifické otevírání stomat
indukované modrým světlem

npq1 ukazuje pouze bazální otevírání stomat
indukované fotosyntézou

WT

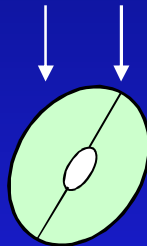


Do procesu otevírání stomat jsou zapojeny kromě zeaxantinu i fototropiny

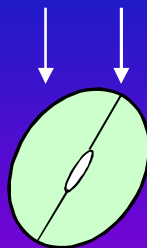
phot1

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

Mechanismus interakce PHOTs se zeaxantinem není znám.

phot2

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

phot1/phot2

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

Otevírání stomat indukované modrým světlem:

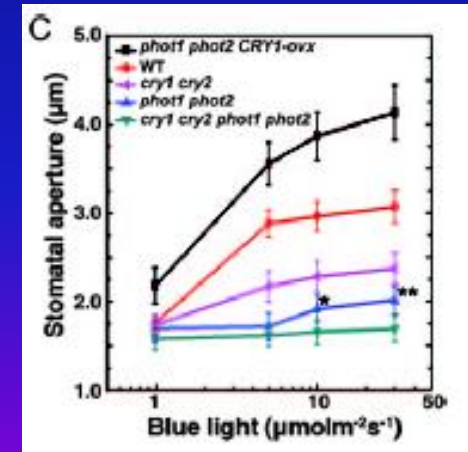
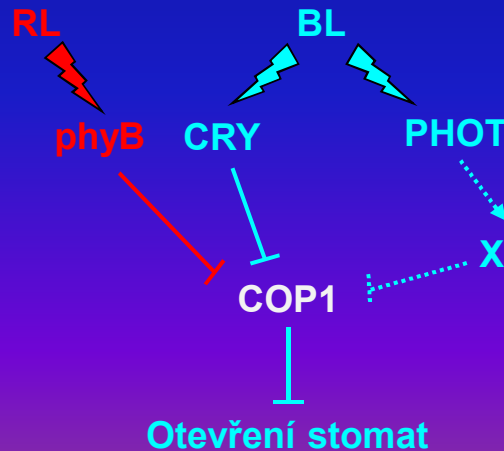
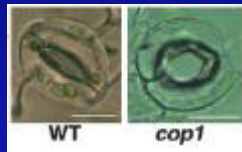
WT > cry1 = cry2 > cry1cry2

WT < CRY1-ovx = CRY2-ovx

cry1cry2 > phot1phot2 > cry1cry2phot1phot2

WT < cop1

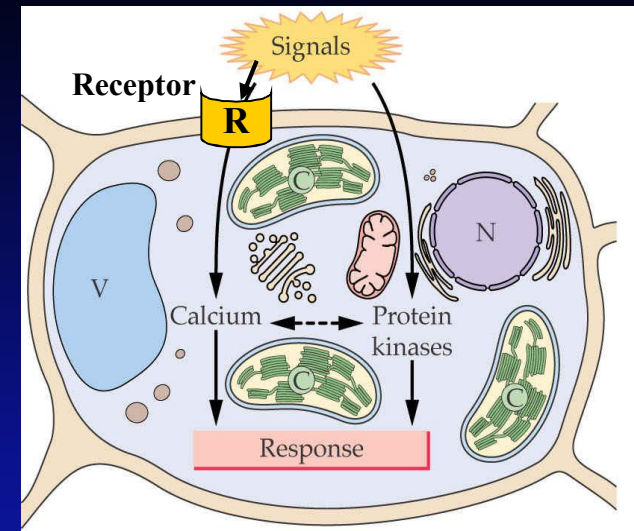
cry1cry2cop1 = phot1phot2cop1 > phot1phot2CRY1-ovx



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

g) Přenos signálu

Signální dráhy zapojující kryptochromy



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

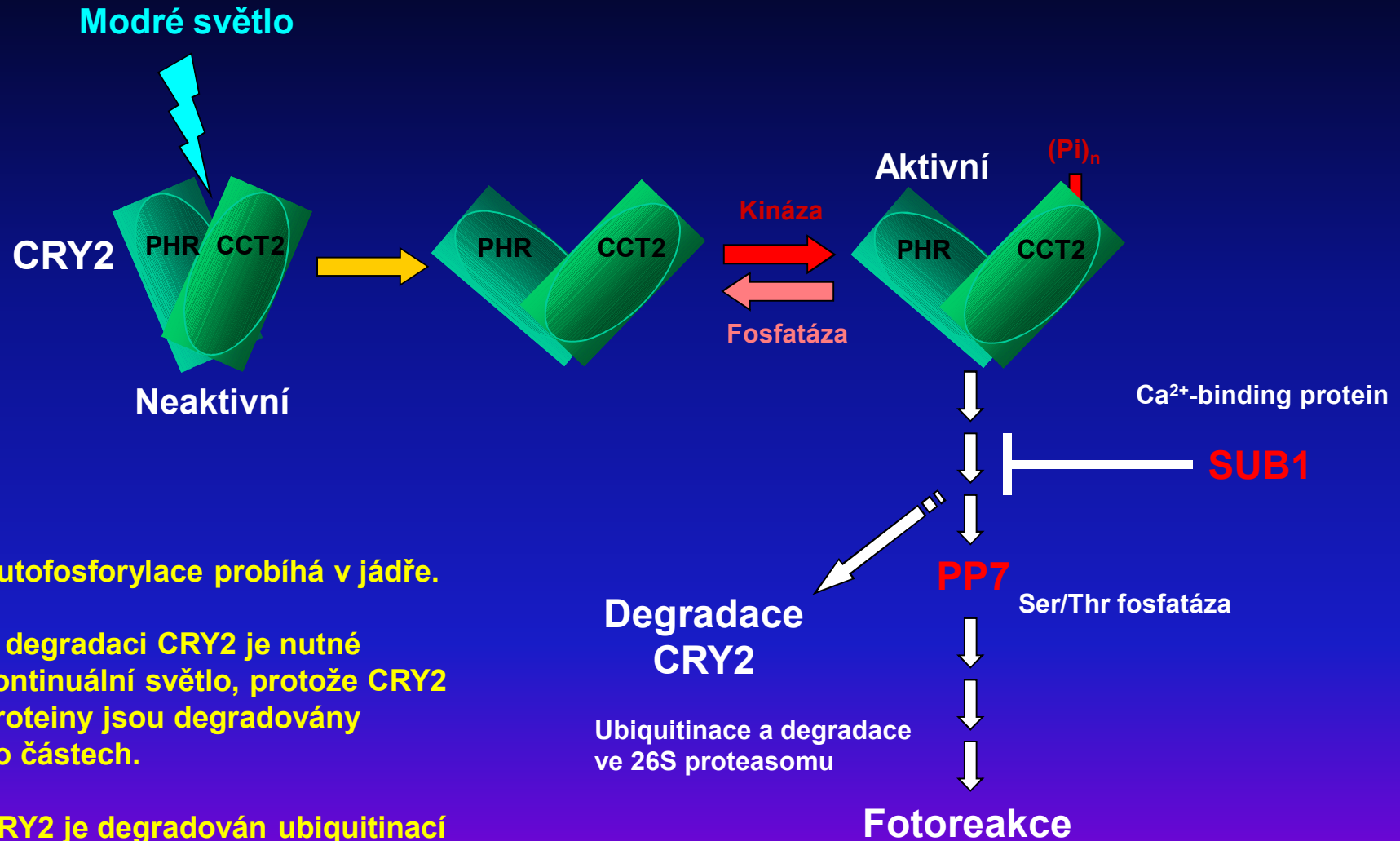
Navržen jiný mechanismus přenosu signálu

Fosforylace - defosforylace

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.

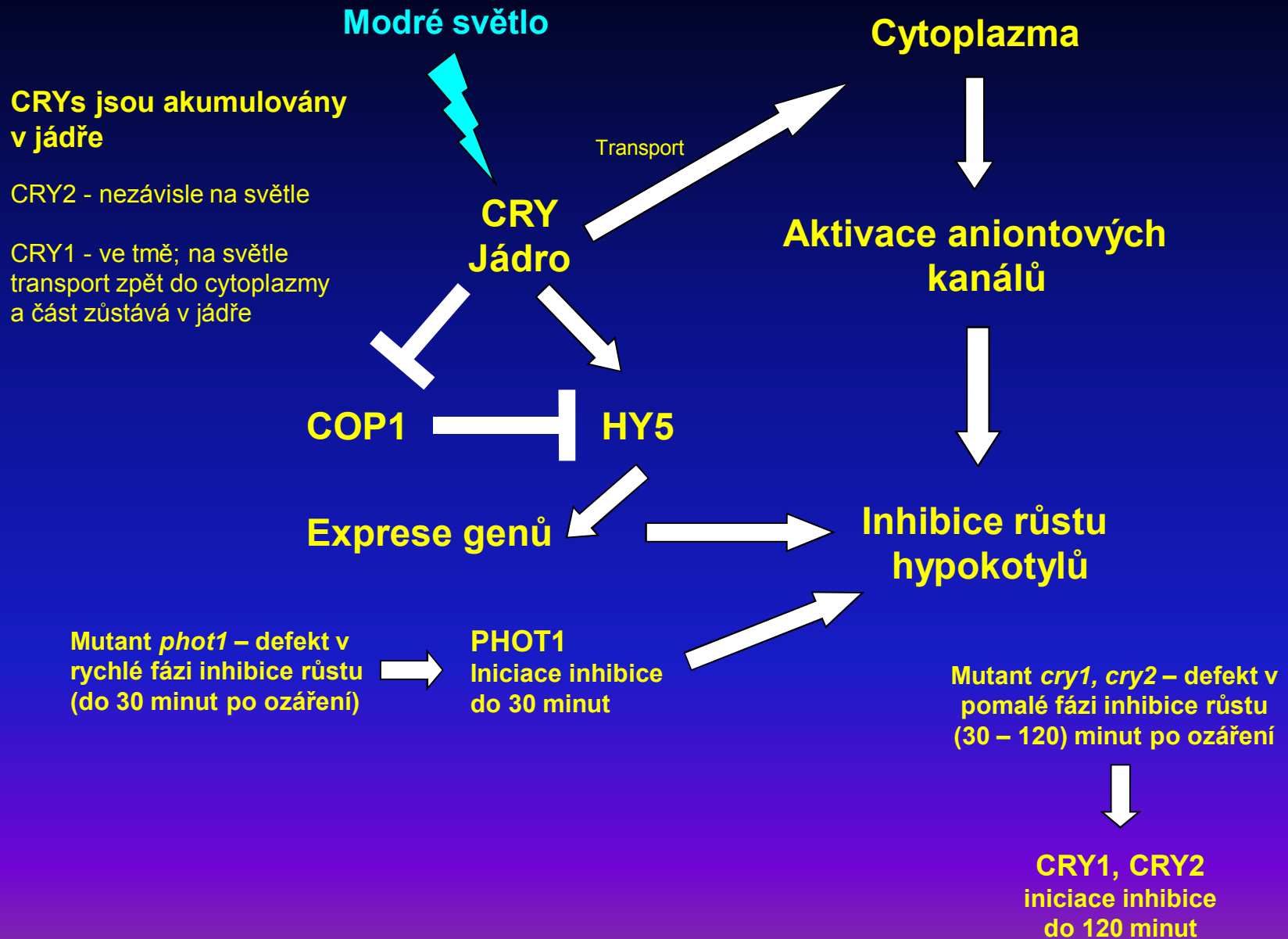
Signální dráha kryptochromů CRY



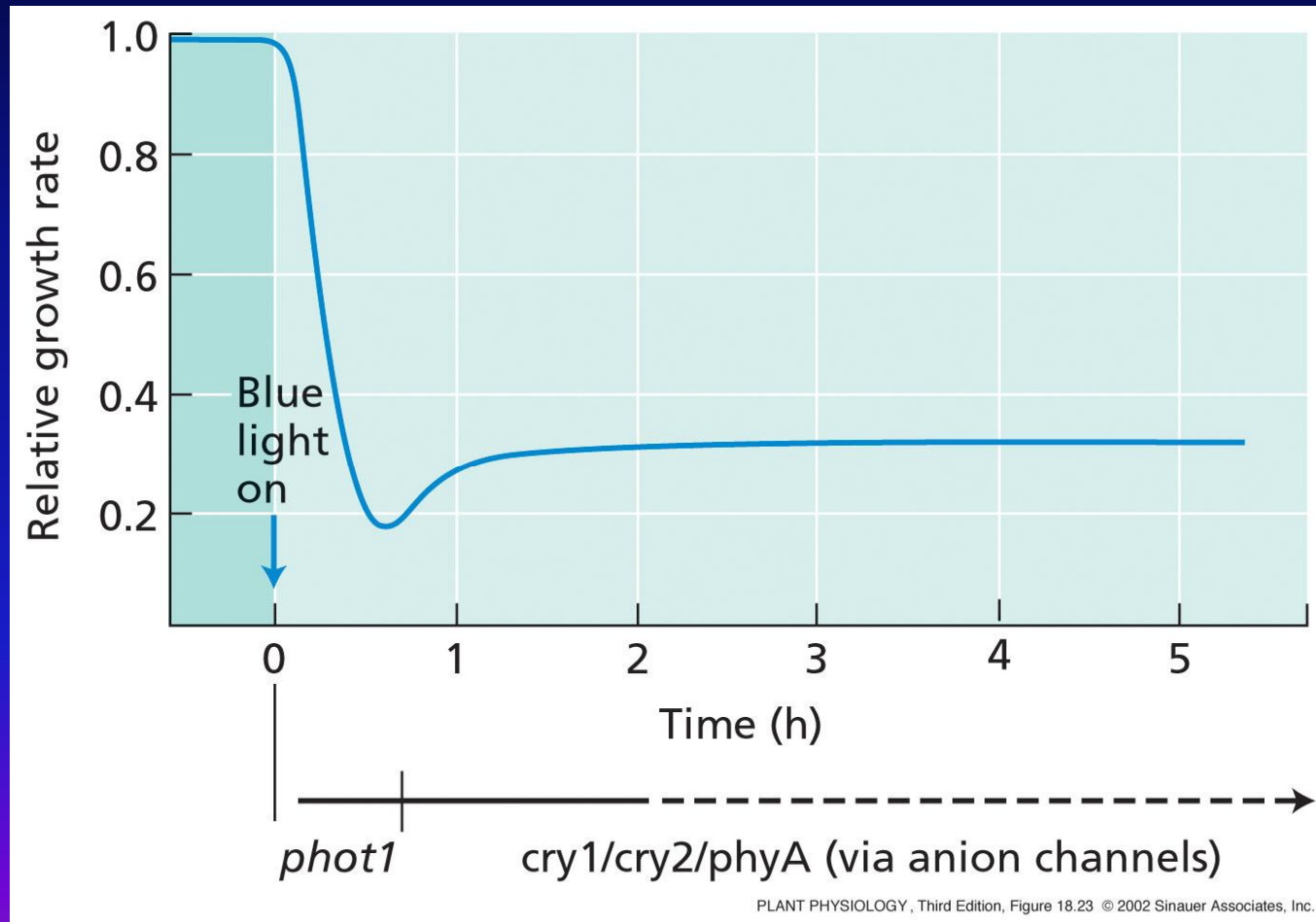
Autofosforylace probíhá v jádře.

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

CRY2 je degradován ubiquitinací ve 26S proteasomu



Zapojení *PHOT1* v inhibici růstu hypokotylu indukované modrým světlem



Signální dráha fototropinů PHOT

Modré světlo



FMN +
Flavin
mononucleotide

PHOT1
PHOT2

Autosforylace

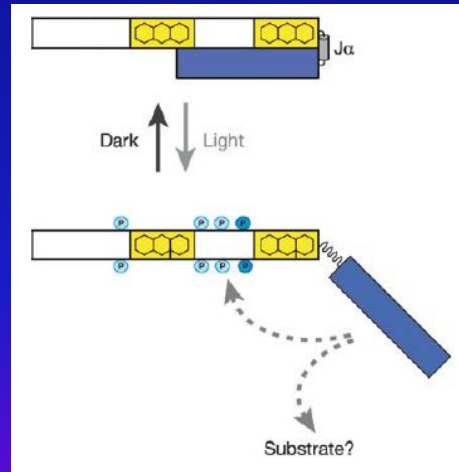
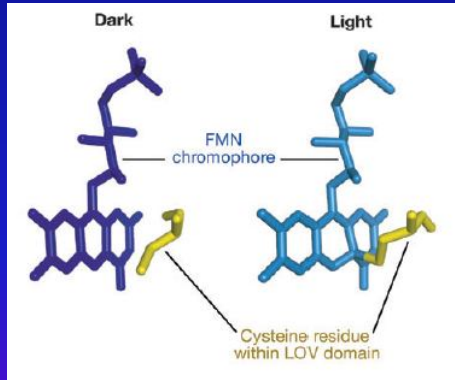
Protein
kinázy
PHOT1
PHOT2

Fosforylace
NPH3

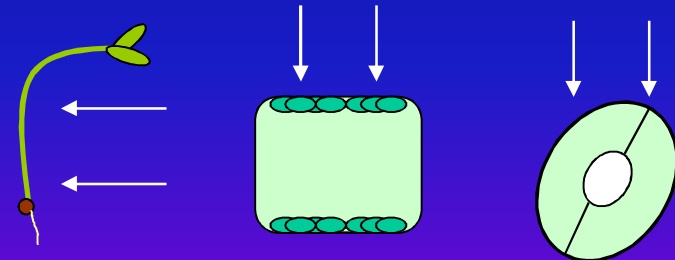
Přenašeči signálu
z cytoplazmy do jádra

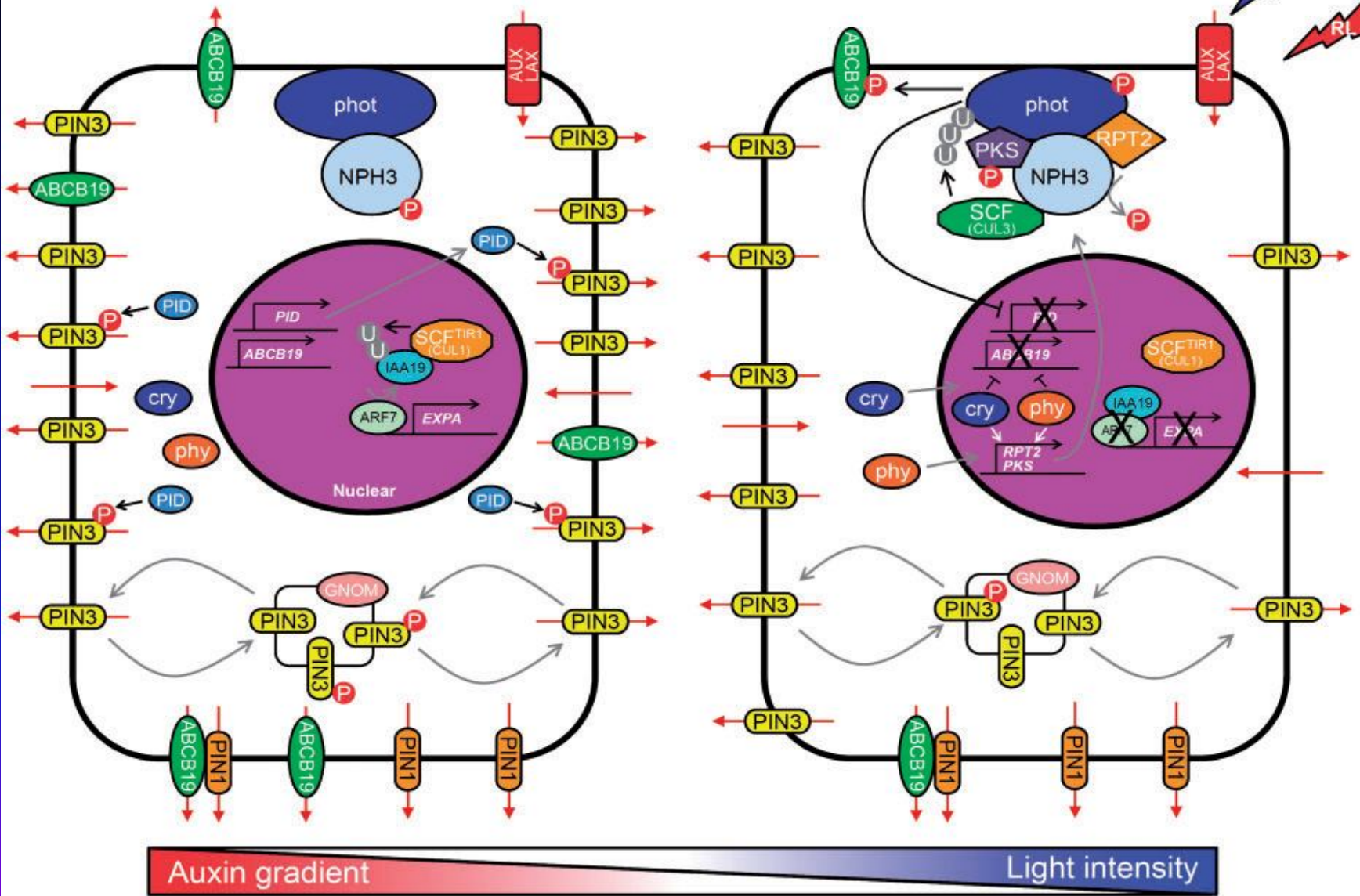
Transkripční
faktor
(auxin-responsive)

ARF7
(NPH4)



Fototropismus
Pohyb chloroplastů
Otevírání stomat

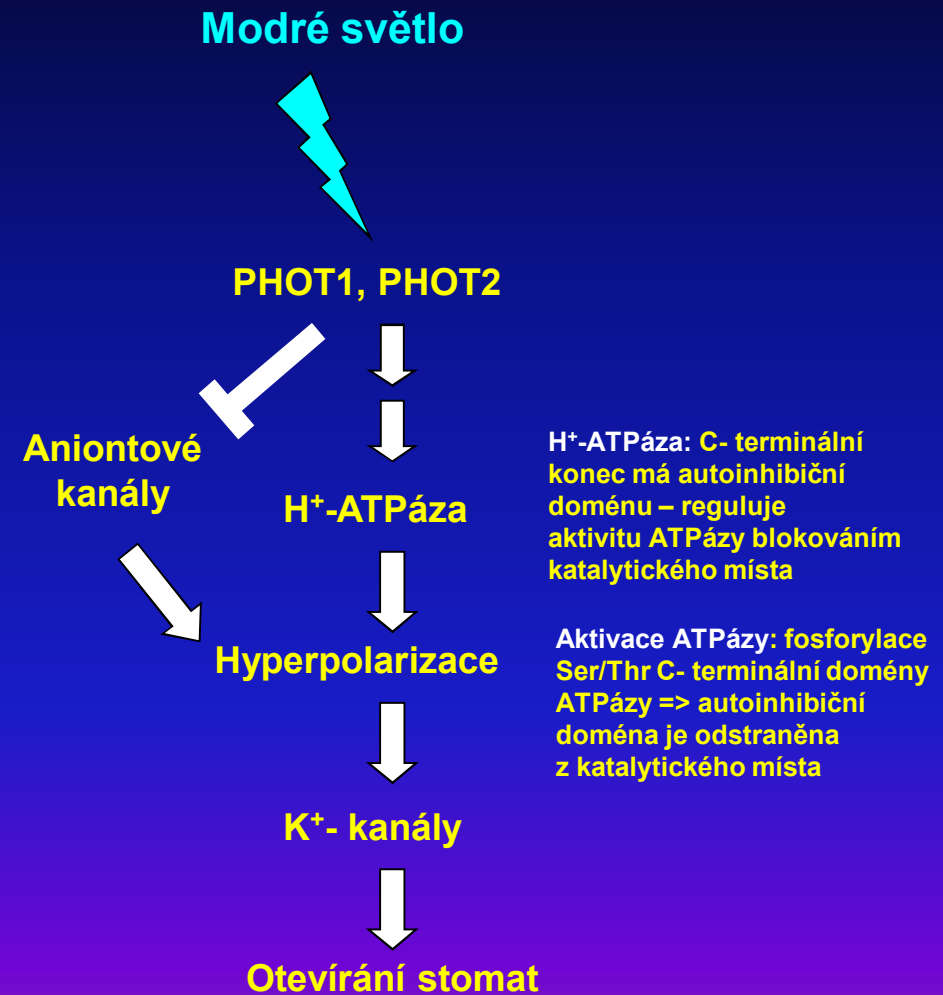
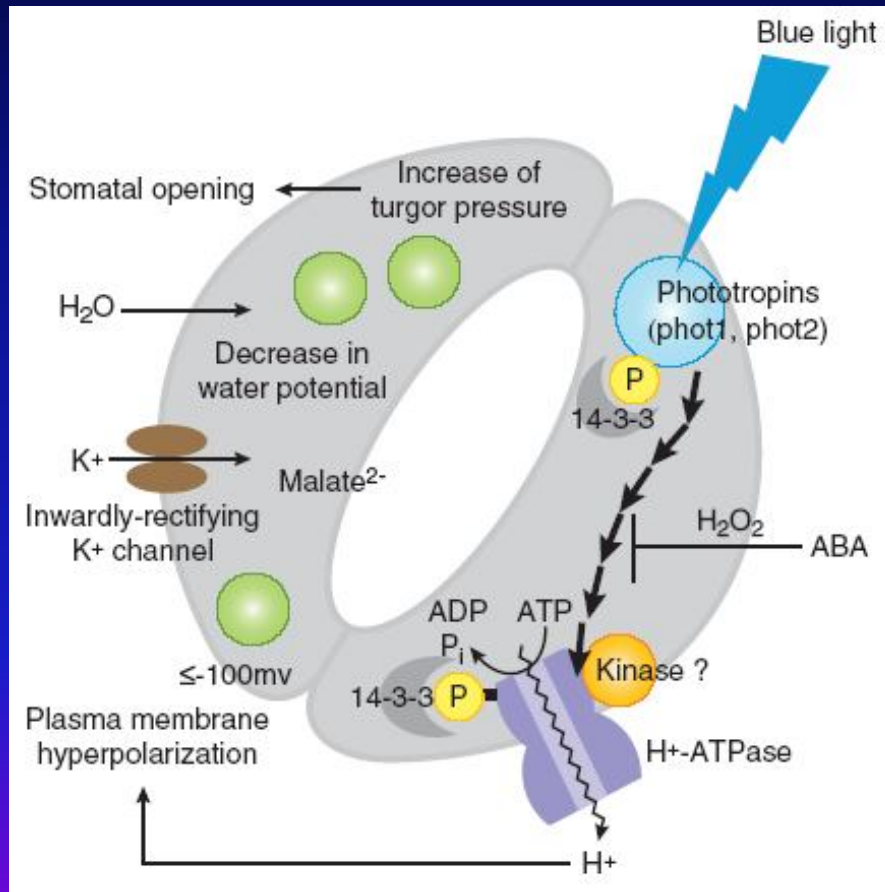




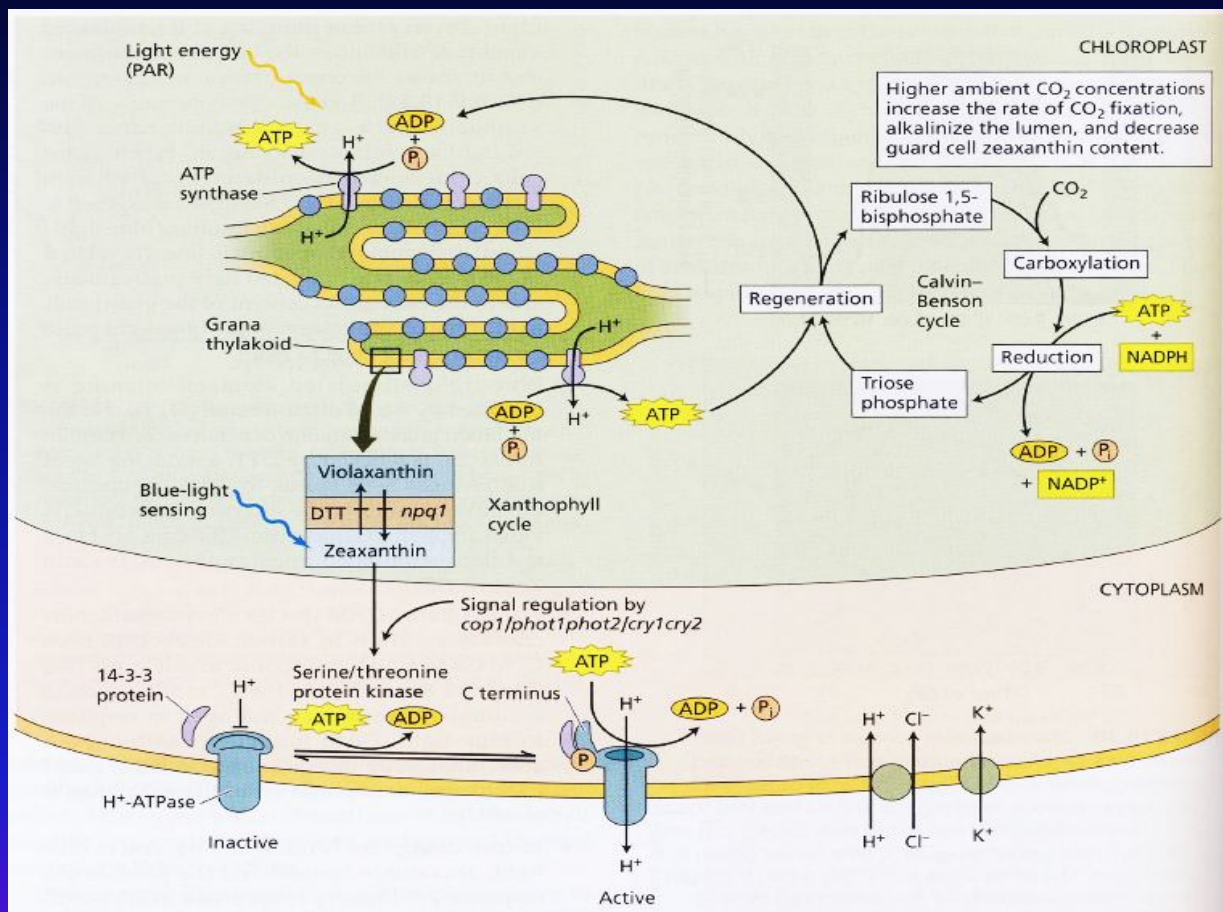
UPDATE 2012

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

Otevírání stomat prostřednictvím fototropinů PHOT1 a PHOT2



Signální dráha zeaxantinu ve svěracích buňkách průduchů



Modré světlo



Zeaxantin



H⁺-ATPáza



Otevírání stomat

Mechanismus zapojení zeaxantinu v otevírání stomat vlivem modrého světla je třeba dále ověřit – kontroverzní výsledky v intaktních listech a protoplastech svěracích buněk u mutanta *npq1*.