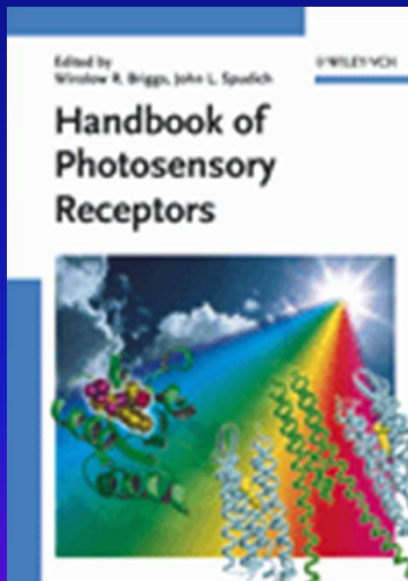


4) Reakce rostlin k modrému světlu

b) Fotoreceptory

c) 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

Martin Fellner

Laboratoř růstových regulátorů
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

19. století

Charles a Francis Darwin → Studium fototropismu koleoptile

Počátek 90. let → Identifikace fotoreceptorů

Identifikace genů regulujících fototropismus
a inhibici prodlužovacího růstu

Charakterizace proteinů

b) Fotoreceptory modrého světla:

Kryptochromy (cryptochromes) – inhibice růstu

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

Zeaxantin (zeaxanthin) – otevírání stomat

UPDATE 2015

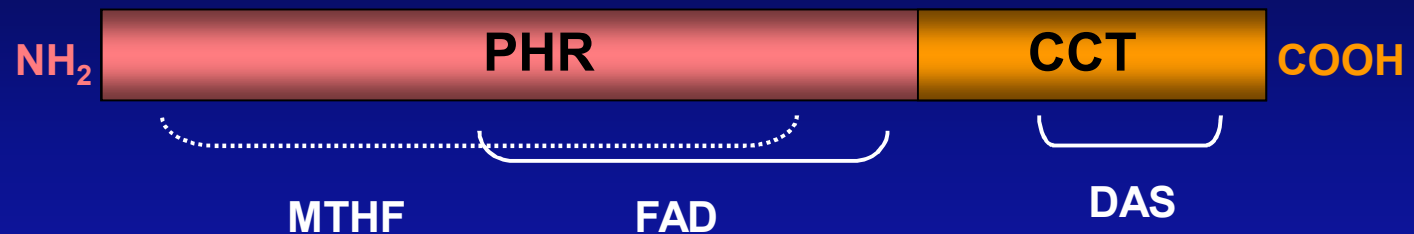
Christie JM et al. (2015) Plant Cell Physiol 56: 401-413

Review o fotoreceptorech.

Kryptochromy (cryptochromes)

Arabidopsis mutant *hy4* – hypokotyl není inhibován modrým světlem

Gen *HY4* => protein, monomer 75 kDa

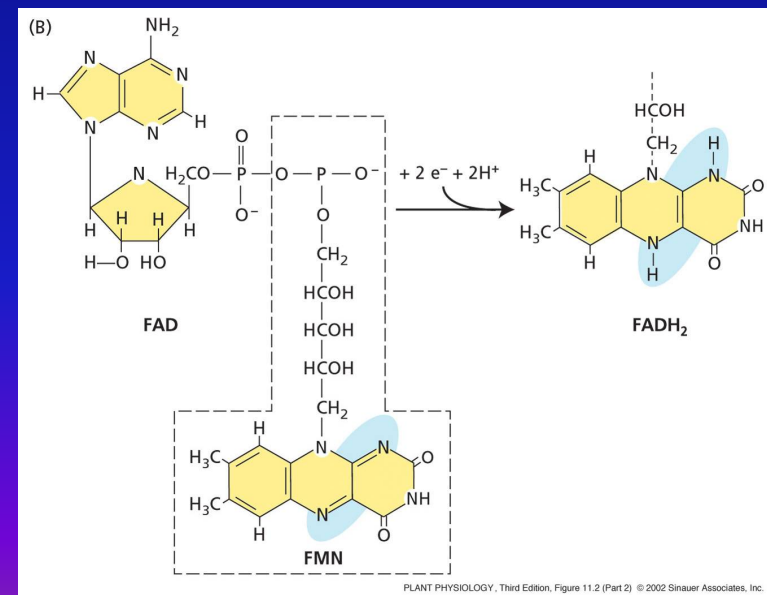


PHR = Photolyase-related doména; N-terminální doména; homologní k DNA fotolyáze; váže dva typy chromoforu:

MTHF = methyltetrahydrofolate (Pterin)

FAD = flavin adenine dinucleotide (Flavin)

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



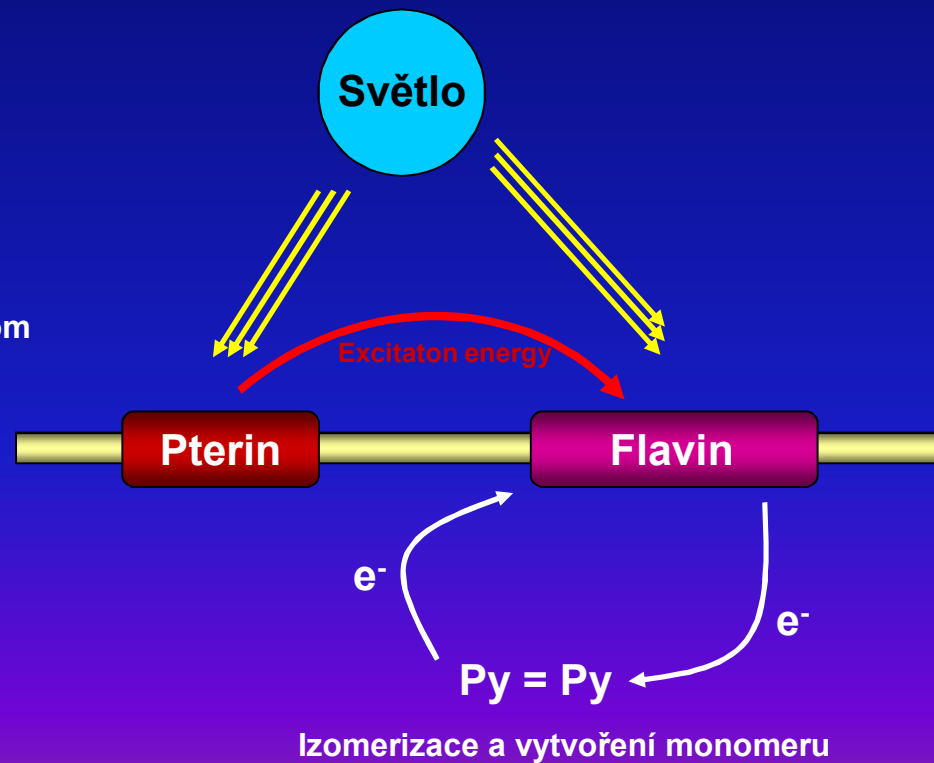
Exprese *HY4* v *Echerichia coli* – chybí fotolyázová aktivita

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.

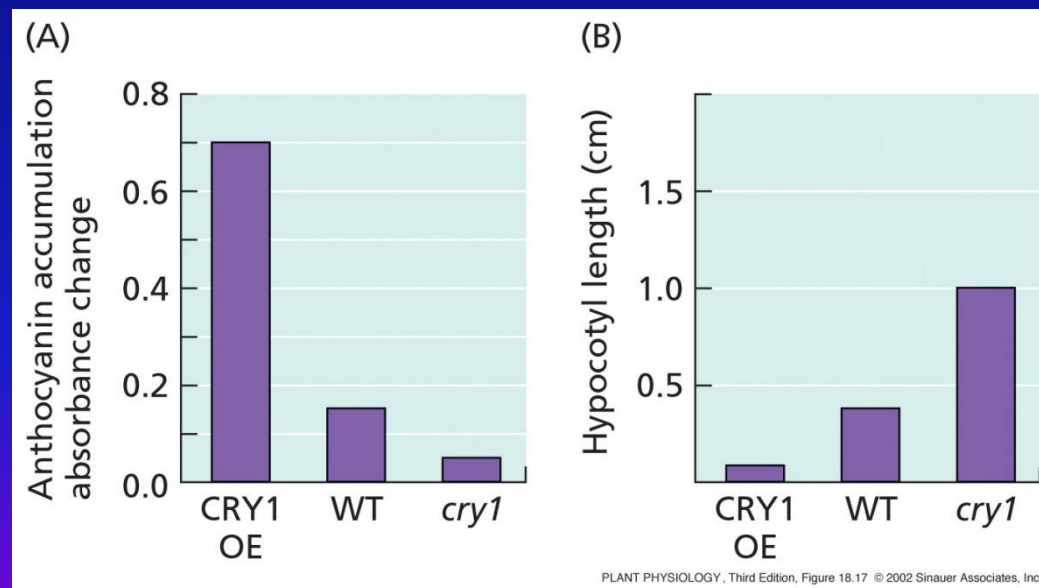
↓
Odlišné funkce těchto proteinů



**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 s CRY1; na světle nestabilní

Na BL dochází k aktivaci deubiquitináz UBP12 a UBP13, které fyzicky interagují s CRY2 a prostřednictvím deubiquitinace COP1 urychlují jeho degradaci (Lindback et al. 2022).

Transgenní rostliny overexprimující CRY2

- slabá inhibice prodlužovacího růstu modrým světlem
- zvětšený růst děloh indukovaný modrým světlem

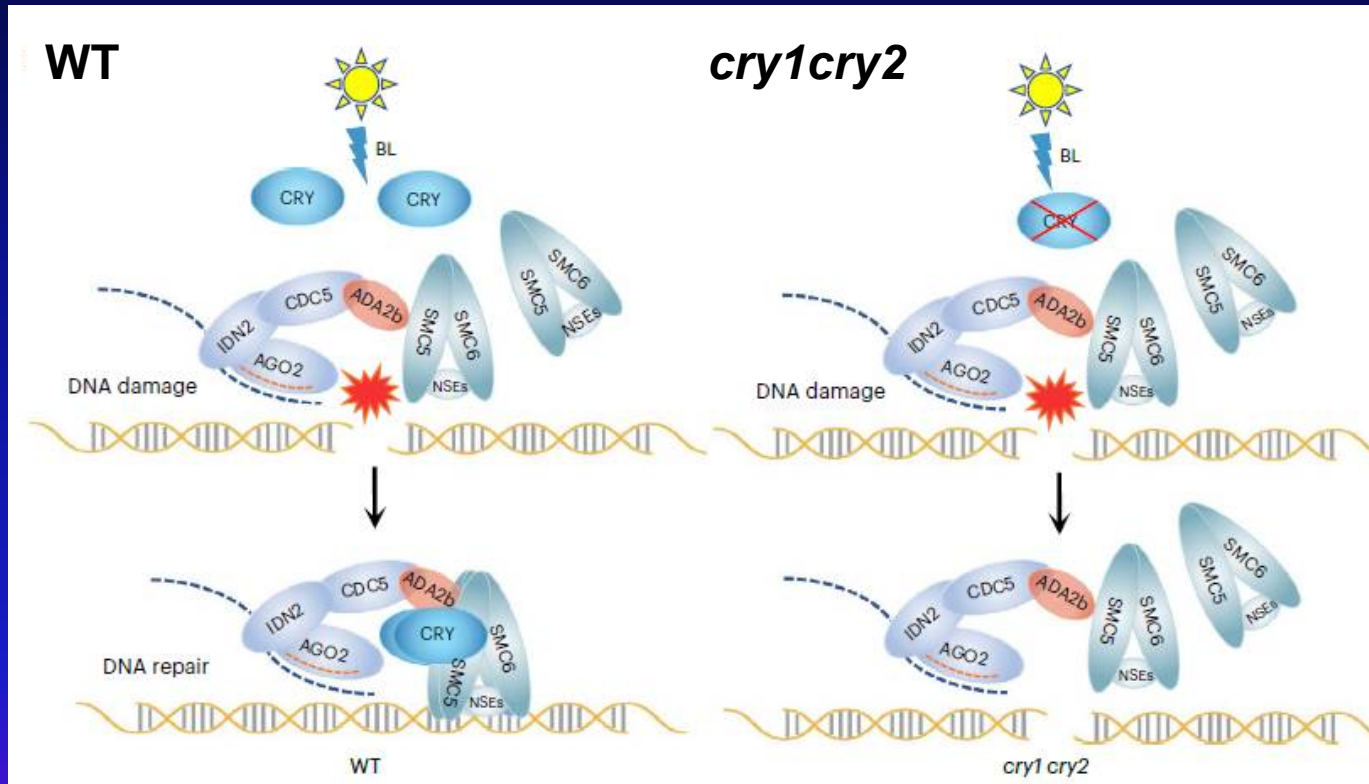
CRY1 a CRY2 – hrají roli v indukci kvetení a denním rytmu

2003 - identifikace genu CRY3 → **Funkce CRY3 ?**

CRY3 patří ke CRY-DASH enzymům s fotolýzovou aktivitou; stabilizuje cyclobutan-pyrimidinové dimery.

Guo T et al. (2023) Nature Plants 9: 1280–1290

Klíčový objev – zapojení kryptochromů a modrého světla v opravě zlomů DNA prostřednictvím ADA2 a SMC5



ADA2b je konzervovaná složka komplexu acetyltransferázy Spt-Ada-Gcn5. ADA2b u *Arabidopsis* a jeho homology u kvasinek a *Drosophily* jsou zapojeny v reakcích na poškození DNA.

SMC5/6 – Structural Maintenance of Chromosome 5/6 (komplex strukturní údržby chromozomu 5/6)

Fototropiny (phototropins)



Winslow Russel Briggs († 11.2. 2019)

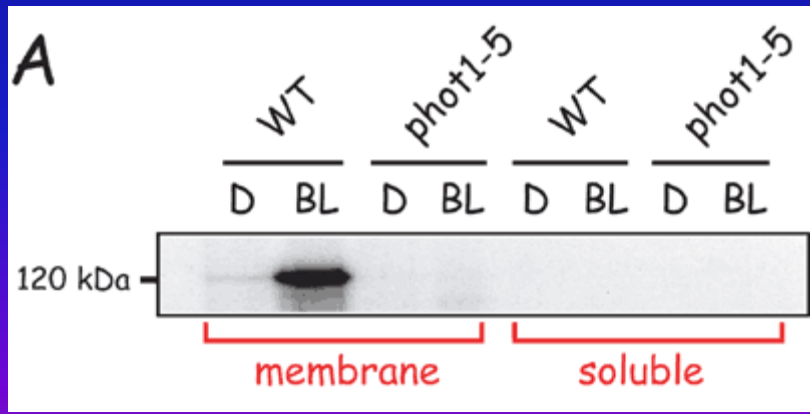


Austin, TX, 2012

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)



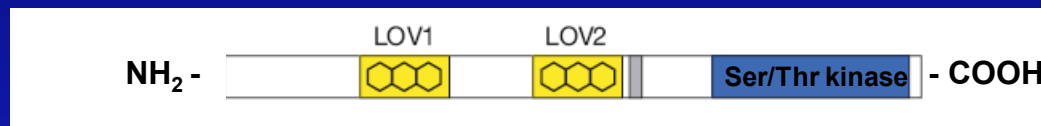
Struktura

(1997-1998)



Struktura PHOT1

- 966 aminokyselin
- hydrofilní protein; připojený k membráně – mechanismus není znám
- 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 – 21 fosforylačních míst

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



PHOT2

- podobný k PHOT1; 29 fosforylačních míst.
- 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

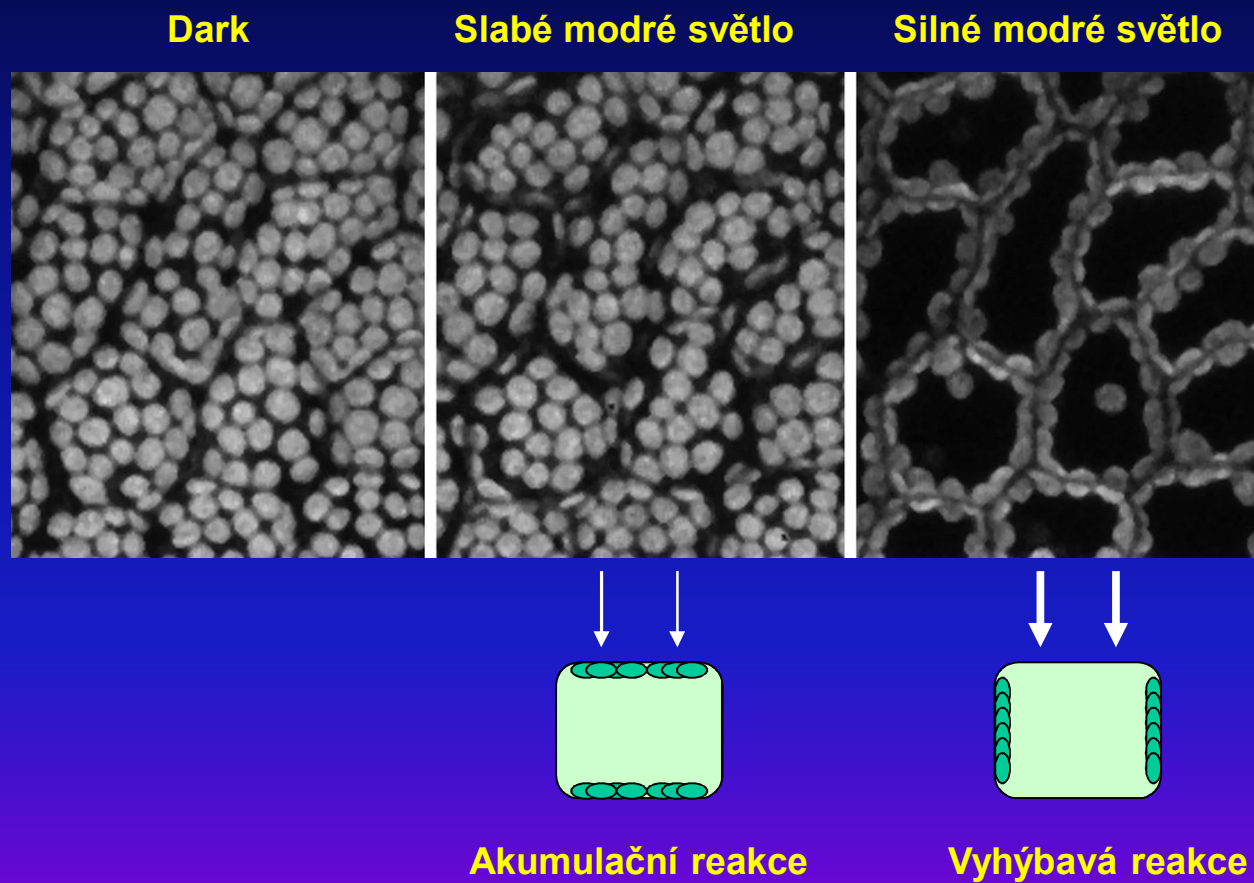
Mutant *phot1/phot2*:

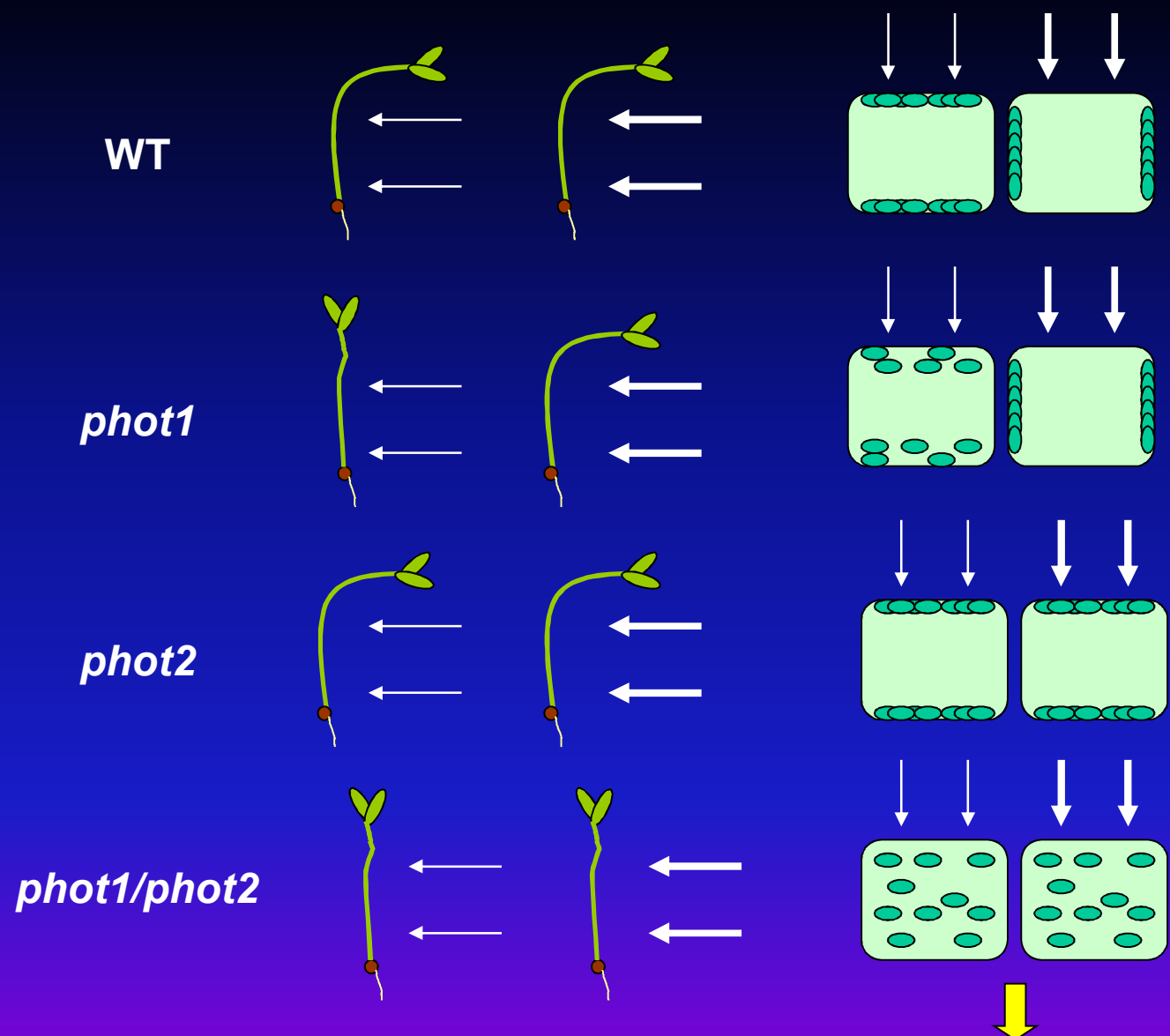
- nereaguje fototropicky k modrému světlu obou intenzit



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

Fototropiny hrají roli v pohybu chloroplastů

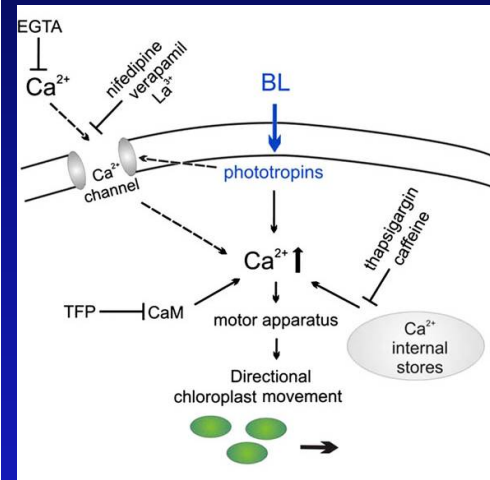
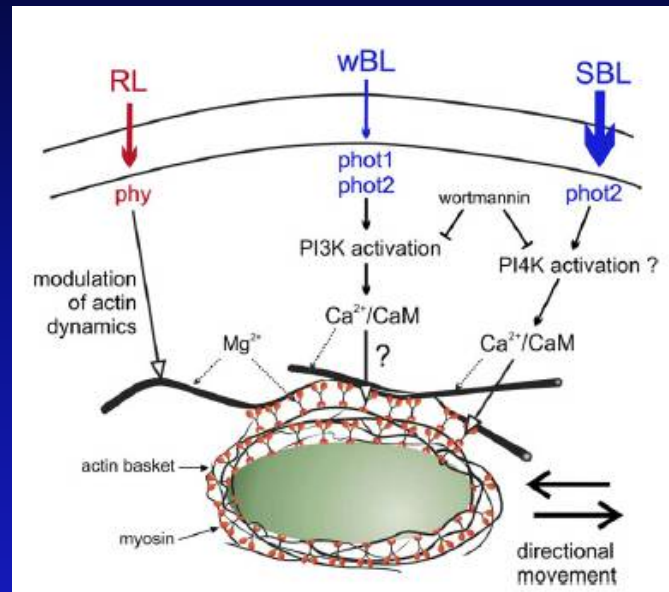




Podle:
Briggs WR, Christie JM (2002) TIPS 7: 204-210

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

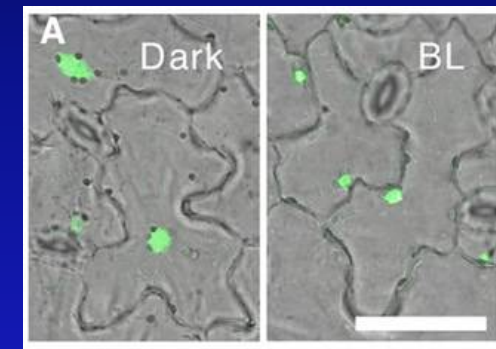
Pohyb chloroplastů je realizován pomocí dvou typů proteinů: myosinu a aktinu



UPDATE 2014

Higa T et al. (2014) PNAS 111: 4327-4331

Chloroplasty se připojují k jádru a regulují jeho pohyb - ochrana jádra proti nadměrnému osvětlení.



Mechanismy pohybu chloroplastů vlivem re-orientace myosinu a aktinu však nejsou dosud známy.

Identifikace regulačních proteinů:

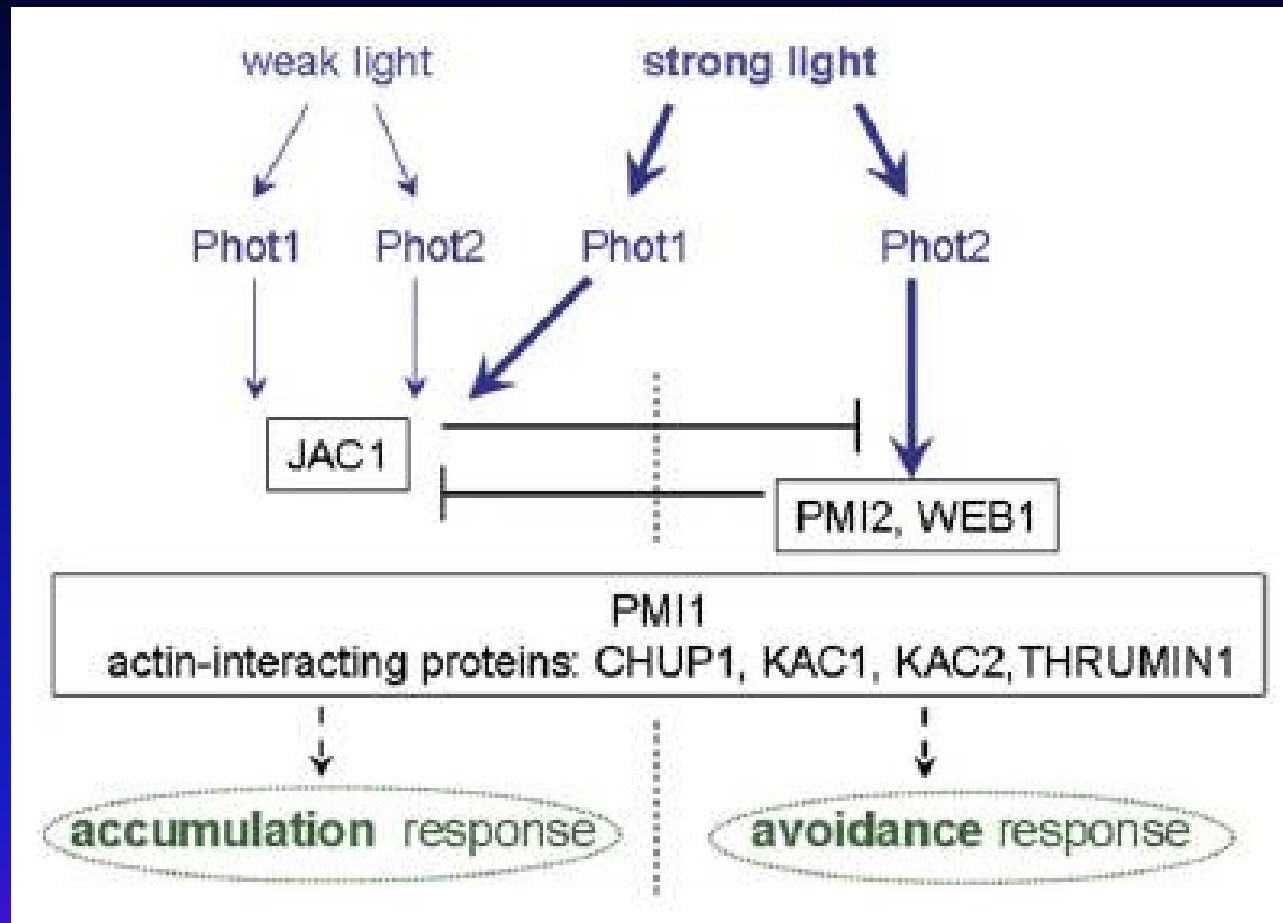
CHUP1 (Chloroplast Unusual Positioning 1) – actin-binding protein

PMI1, 2 (Plastid Movement Impaired 1, 2)

JAC1 (J-domain required for chloroplast ACcumulation response 1)

} Funkce neznámé

Zapojení regulačních proteinů v pohybu chloroplastů indukovaných BL

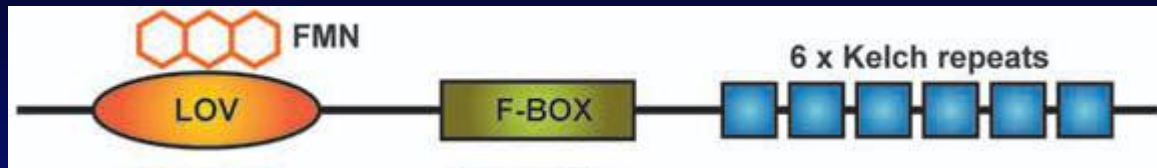


UPDATE 2022

Labuz J et al. (2022) J Exp Botany 73: 6034-6051

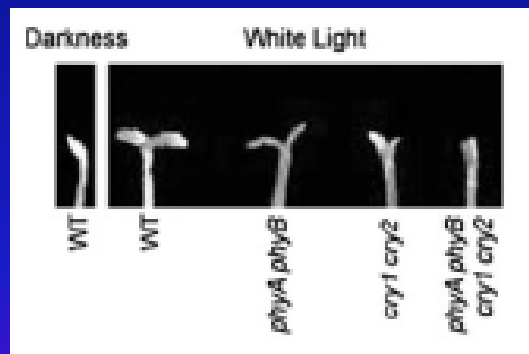
Review o molekulárních základech mechanismů pohybů chloroplastů.

Zeitlupe (ZTL)



Skupina ZTL/FKF1/LKP2 fotoreceptorů s proteinovým motivem „kelch“

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



Perelman et al. (2003)
Plant Physiol 133: 1717-1725

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



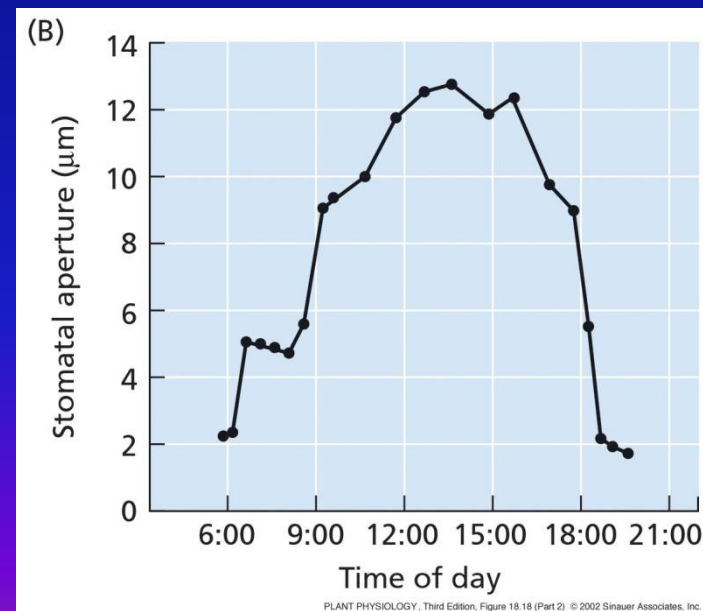
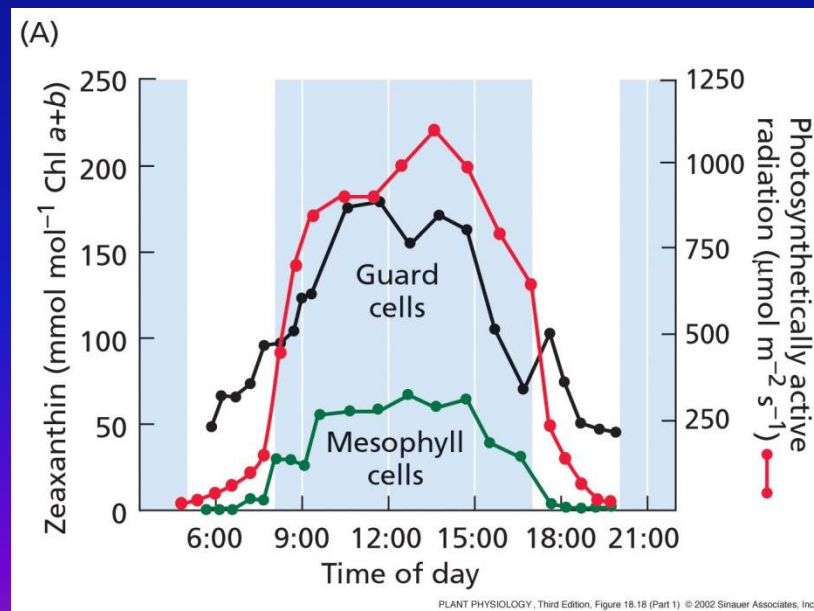
Nový receptor ZEITLUPE zprostředkuje tuto expresi a reakce denního cyklu – moduluje akumulaci proteinu TOC1 (viz [SFR3c-d](#)), který je klíčovým proteinem v regulaci denního rytmu.

ZTL obsahuje LOV doménu, která je podobná vazebnému místu pro chromofor flavin u fototropinů.

Zeaxantin (zeaxanthin)

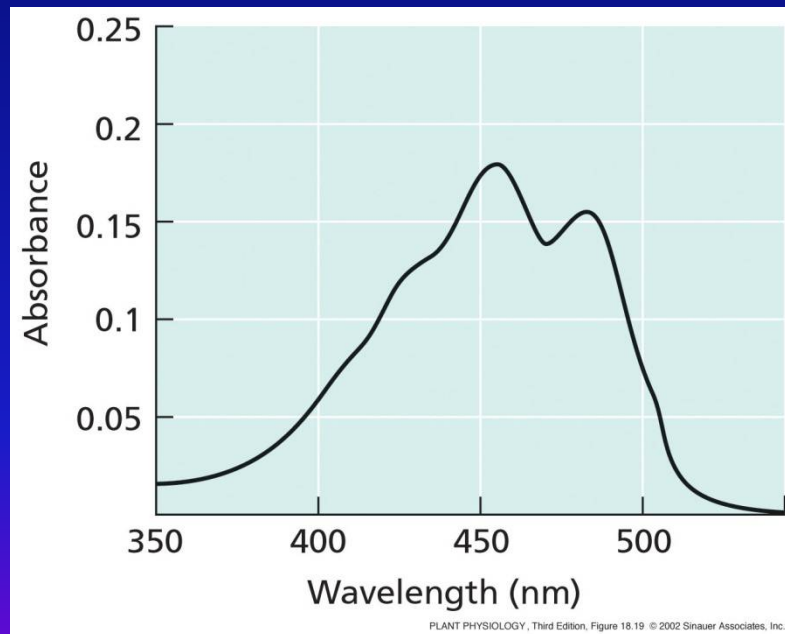
Zeaxantin – karotenoid; komponenta xantofylového cyklu v chloroplastech mezofylových buněk - chrání fotosyntetické pigmenty před nadměrným světlem.

Zeaxantin ve svěracích buňkách funguje jako receptor zprostředkující otevírání stomat

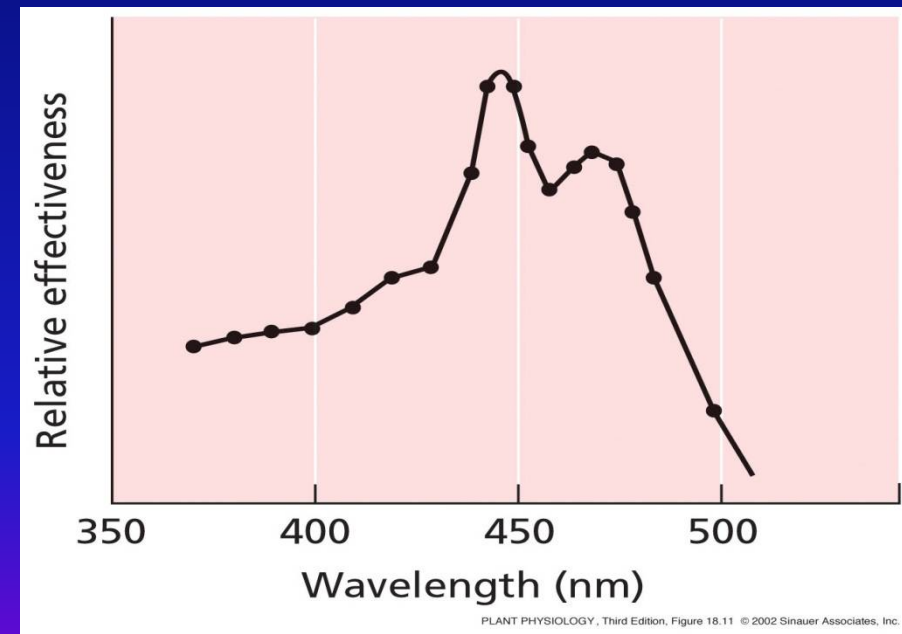


Důkazy potvrzující úlohu zeaxantinu jako fotoreceptoru ve stomatech:

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



Absorpční spektrum zeaxantinu

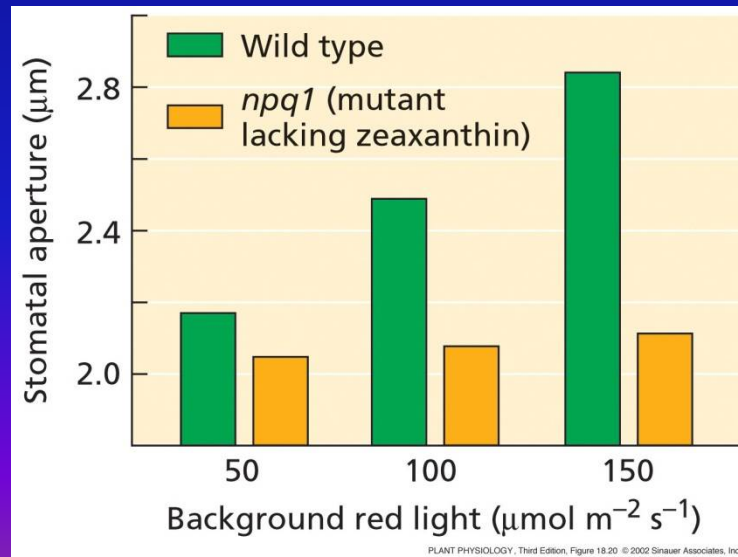


Akční spektrum otevírání stomat

- 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

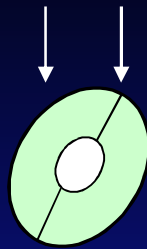
Arabidopsis mutant *npq1* (*nonphotochemical quenching*)



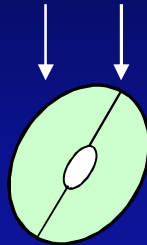
npq1 neakumuluje zeaxantin v chloroplastech
=> chybí specifické otevírání stomat
indukované modrým světlem

npq1 ukazuje pouze bazální otevírání stomat
indukované fotosyntézou

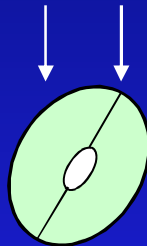
WT



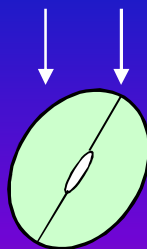
Do procesu otevírání stomat jsou zapojeny kromě zeaxantinu i fototropiny

phot1

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

phot2

Mechanismus interakce PHOTs se zeaxantinem není znám.

phot1/phot2

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

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

Otevírání stomat indukované modrým světlem:

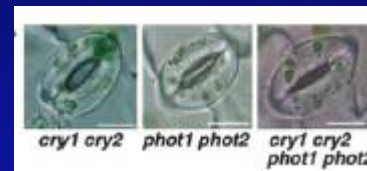
WT > *cry1* = *cry2* > *cry1cry2*



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



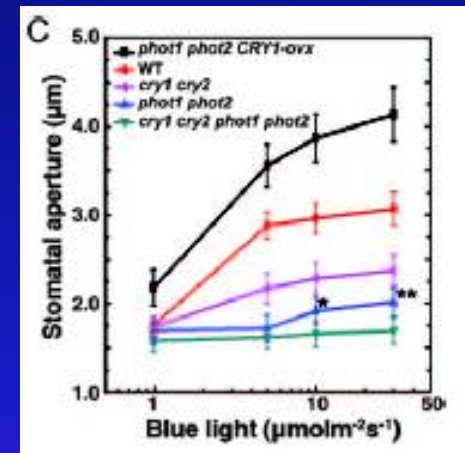
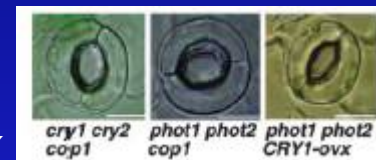
cry1cry2 > *phot1phot2* > *cry1cry2phot1phot2*



WT < *cop1*



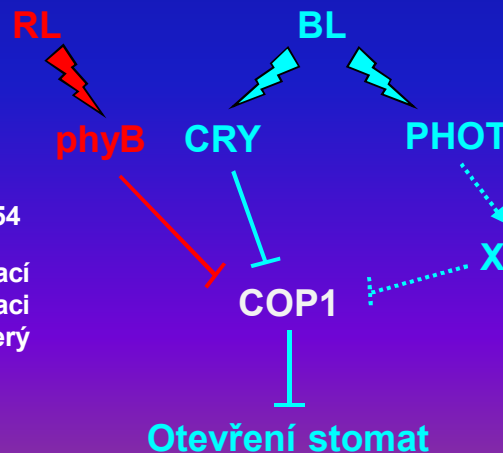
cry1cry2cop1 = *phot1phot2cop1* > *phot1phot2CRY1-ovx*



UPDATE 2014

Khanna et al. (2014) Mol Plant 7: 1441-1454

Uzavírání průduchů nastává degradací tubulinu ve 26S proteazomu. Degradaci tubulinu zprostředkuje COP1, který ubiquitínuje tubulin.

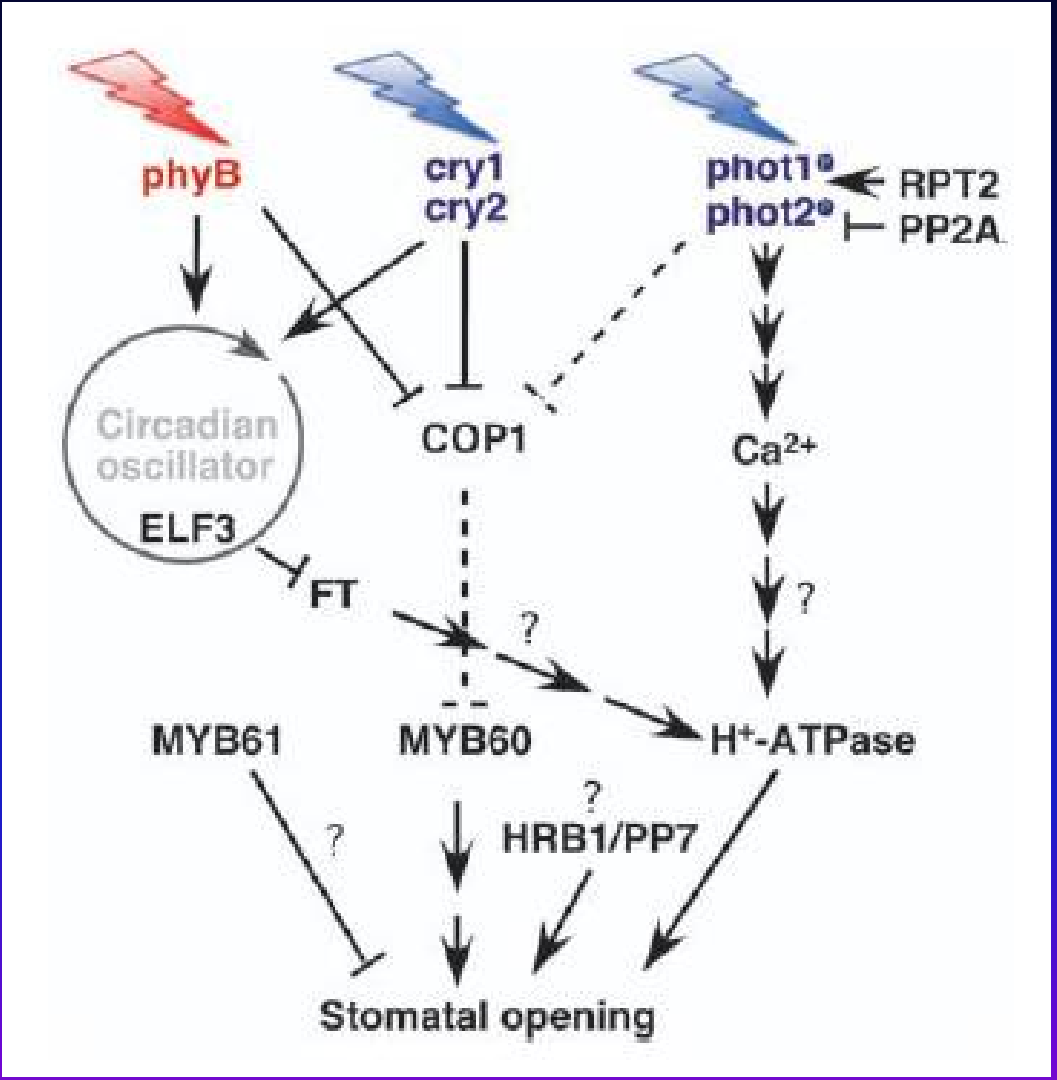


Mao J et al. (2005) PNAS 102: 446-452

UPDATE 2012

Chen C et al. (2012) Mol Plant 5: 566-572

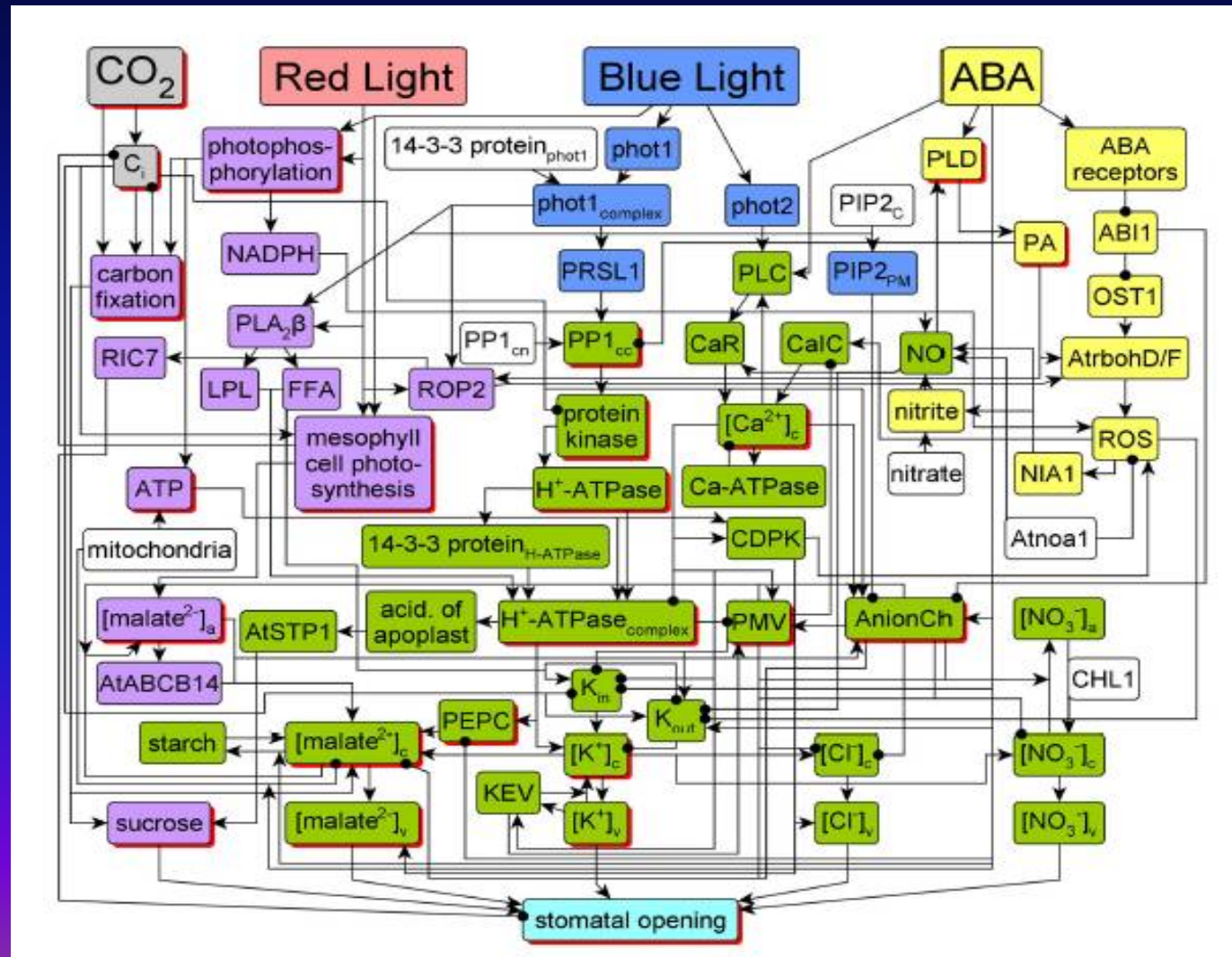
Nový model zapojení fotoreceptorů v otevírání průduchů.



UPDATE 2014

Sun Z et al. (2014) Computational Biology 10: e1003930

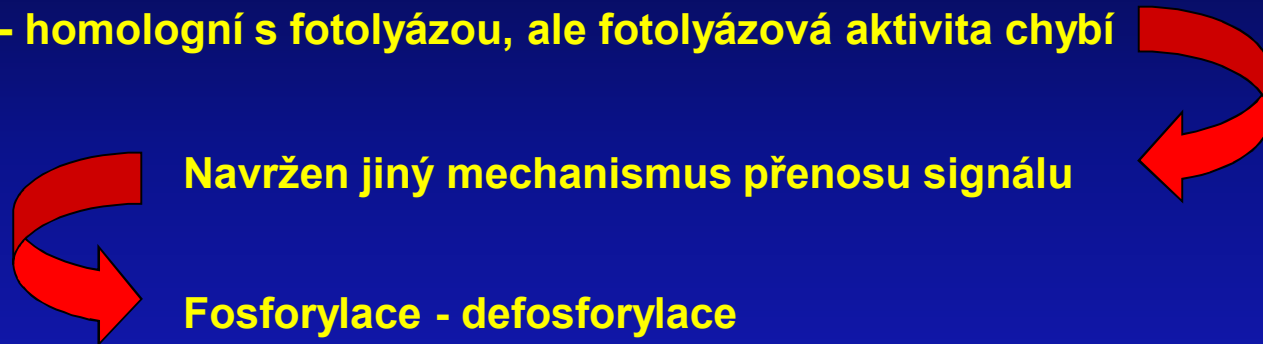
Současný model světlem indukovaného otevírání průduchů a regulace vlivem CO₂ a ABA



c) Přenos signálu

Signální dráhy zapojující kryptochromy

CRY1 a CRY2 – homologní s fotolyázou, ale fotolyázová aktivita chybí

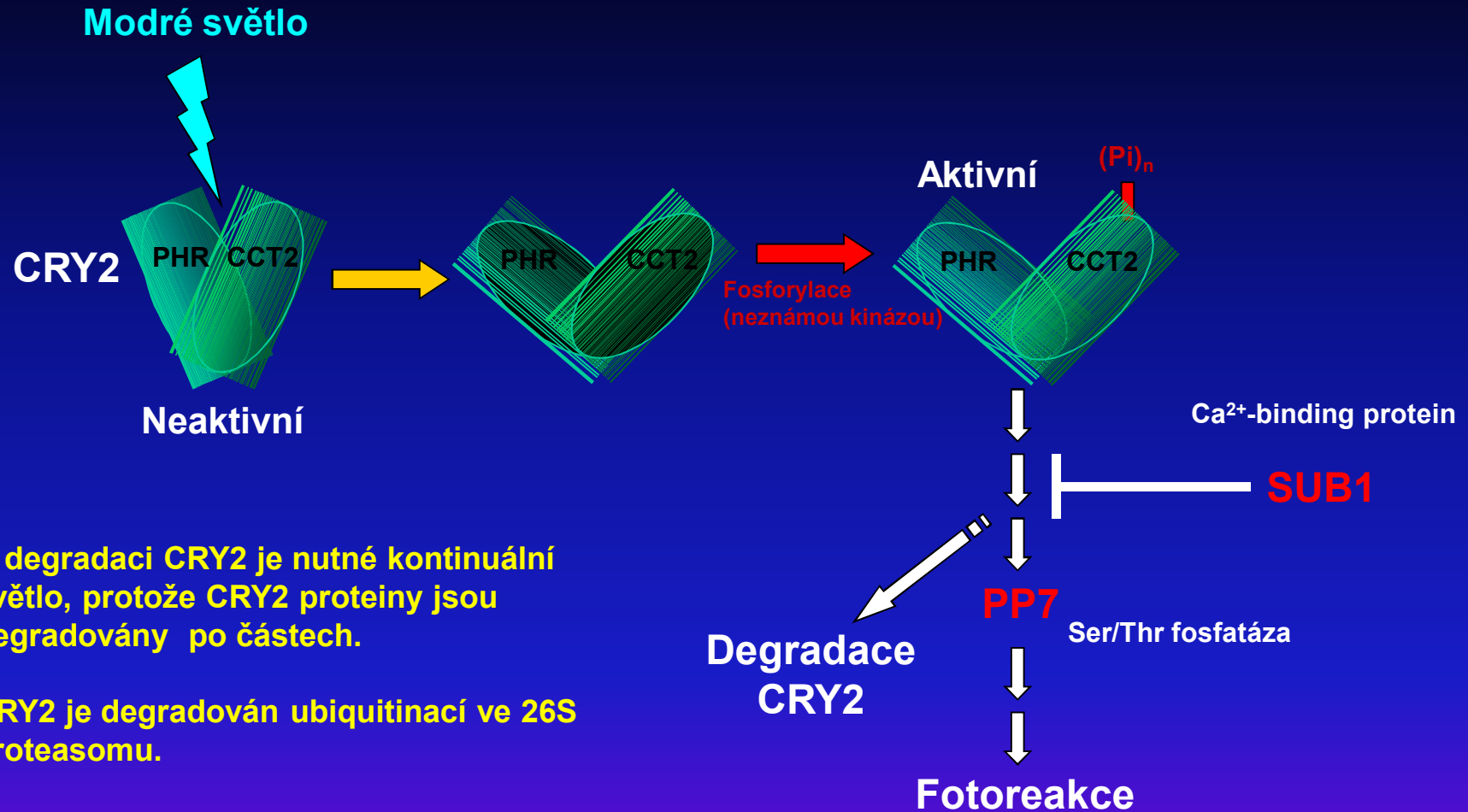


Fosforylace = připojení fosfátové skupiny k aminkokyselinovému zbytku nějakého proteinu

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

Absorbce BL N-terminální fotolyázovou doménou vede ke konformační změně C-terminální domény. C-terminální doména zprostředkuje přenos signálu. Váže se ke specifickému partnerskému proteinu (např. COP1).

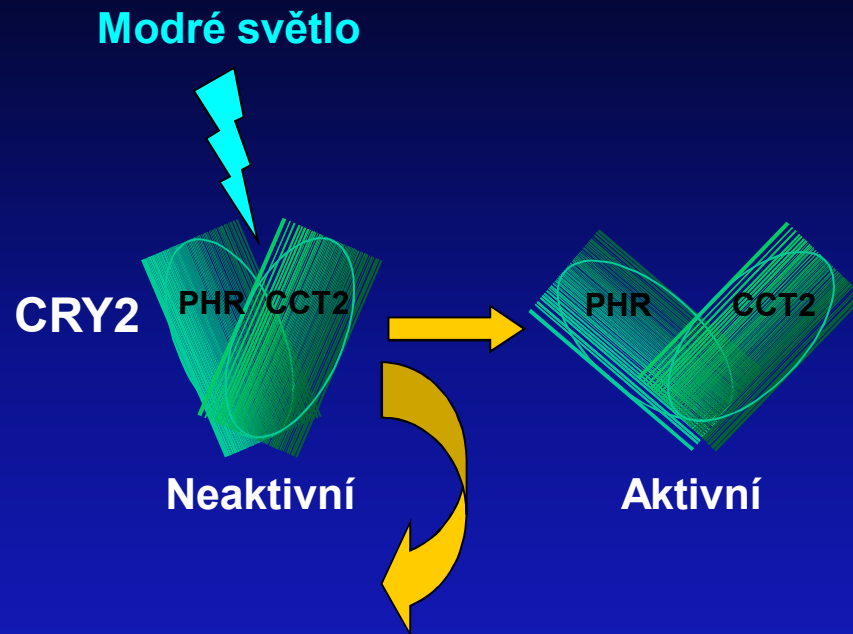
Signální dráha kryptochromu CRY2



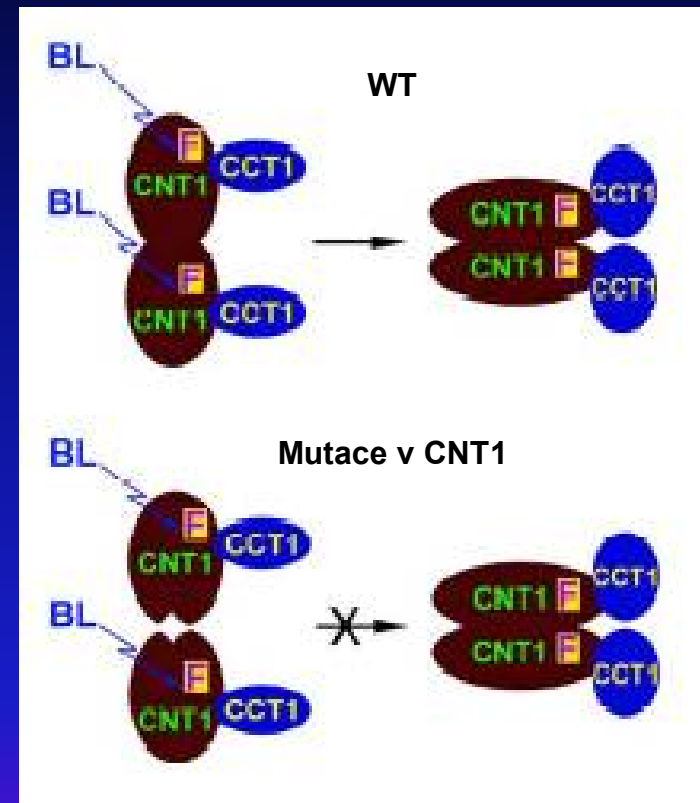
UPDATE 2016

Liu Q et al. (2016) Plant Cell Physiol 57: 2175-2186

CRY2 prochází degradací vlivem nejméně dvou E3-ubiquitin ligáz: CUL4- a CUL1-E3 ubiquitin ligáza



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.

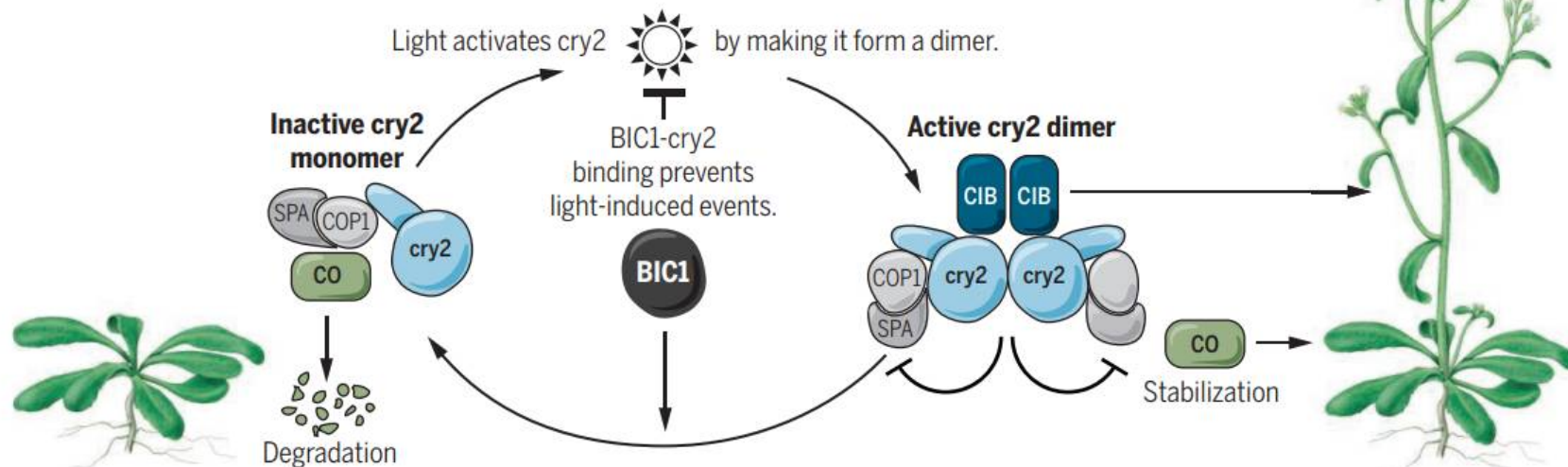


Sang et al. (2005) Plant Cell 17: 1569 - 1584

Mechanismus kontroly signalizace CRY - homodimerizace CRY2 a negativní kontrola vlivem BIC1

Light switch

Light induces homodimerization of cry2 and subsequent signaling events, including its interaction with CIB and SPA proteins. The latter interaction stabilizes CONSTANS (CO); both interactions lead to flowering. BIC1 binds to cry2 and suppresses blue light-dependent cry2 dimerization and all light-induced signaling events.



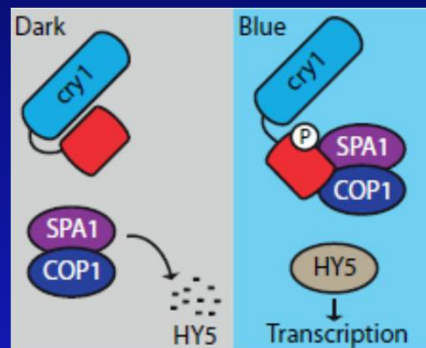
BIC1 – Blue light Inhibitor of Cryptochromes 1

Autoři navrhují, že tento systém kontroluje tu část kryptochromových receptorů, která je zapojena v buněčné signalizaci a udržování fotosensitivity, v udržování homeostázy aktivních kryptochromů.

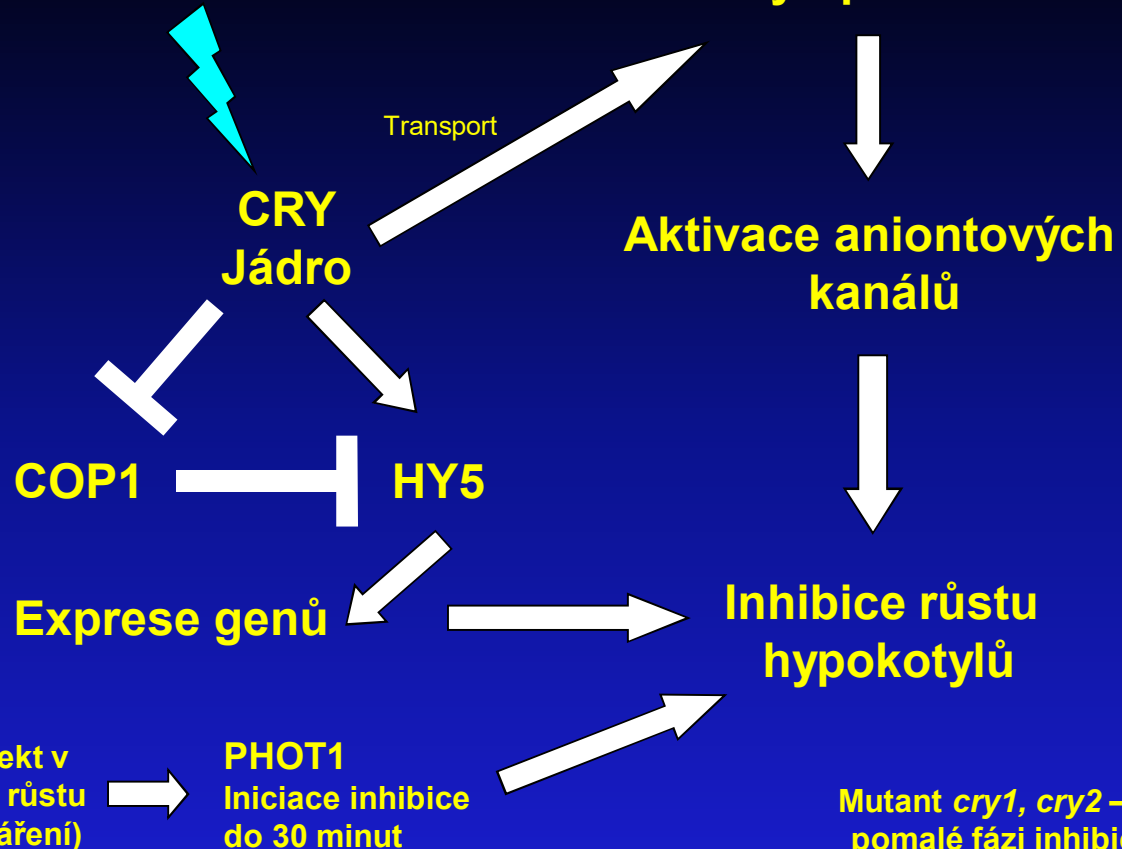
CRYs jsou akumulovány v jádře

CRY2 - nezávisle na světle

CRY1 - ve tmě; na světle transport do cytoplazmy a část zůstává v jádře



Modré světlo



Mutant *phot1* – defekt v rychlé fázi inhibice růstu (do 30 minut po ozáření)

PHOT1
Iniciace inhibice do 30 minut

Mutant *cry1, cry2* – defekt v pomalé fázi inhibice růstu (30 – 120) minut po ozáření

CRY1, CRY2
iniciace inhibice do 120 minut



Folta KM (2004) Plant Physiol 135: 1407-1416

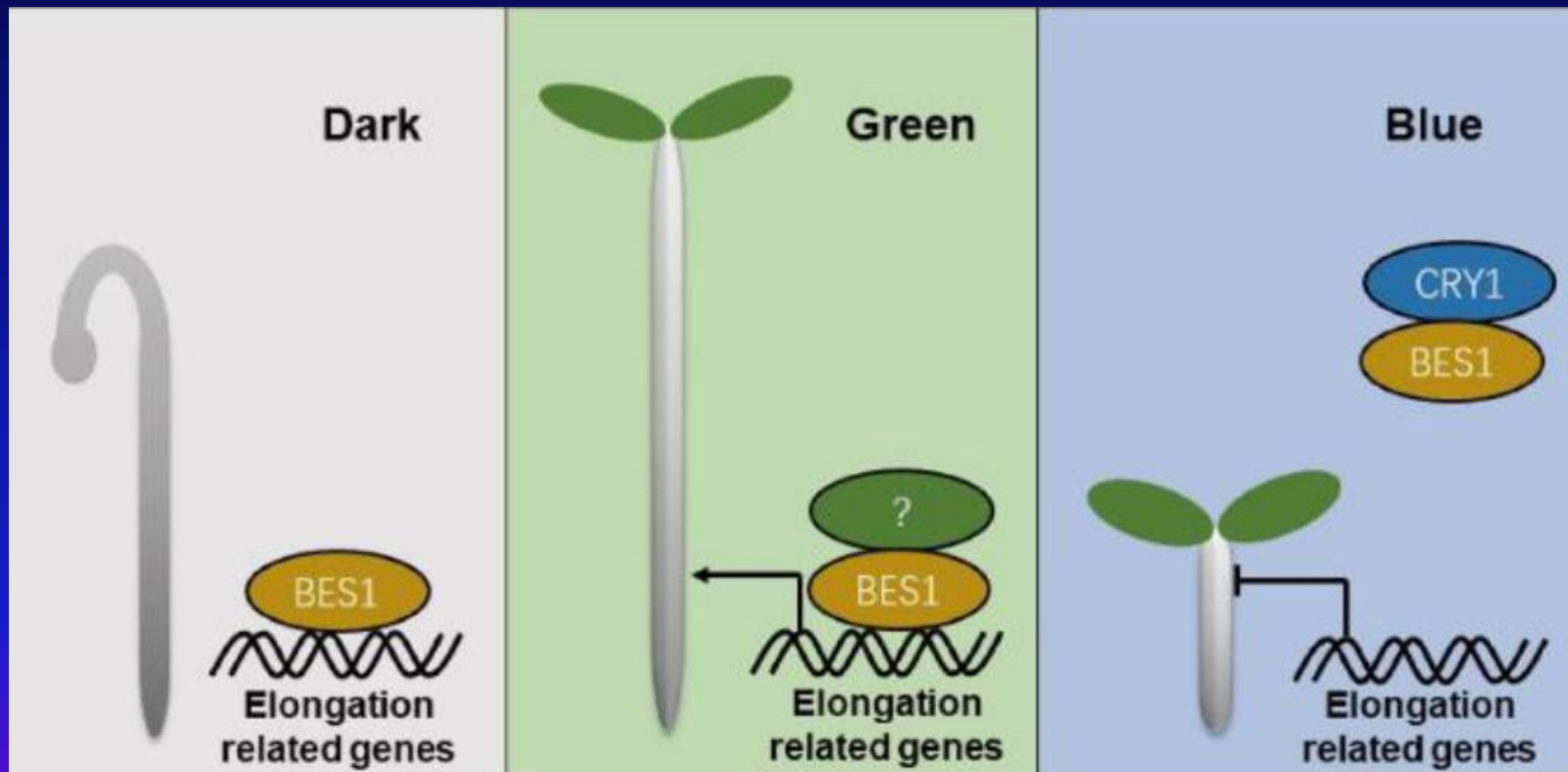
Zelené světlo stimuluje prodlužování => působí proti modrému světlu (viz blue/green reverzibilita u stomat)

UPDATE 2016

Liu B et al. (2016) J Plant Res 129: 137-148

Review of mechanizmech signalizace prostřednictvím kryptochromů.

Zelené světlo stimuluje prodlužování hypokotylu prostřednictvím signalizace brasinosteroidů.



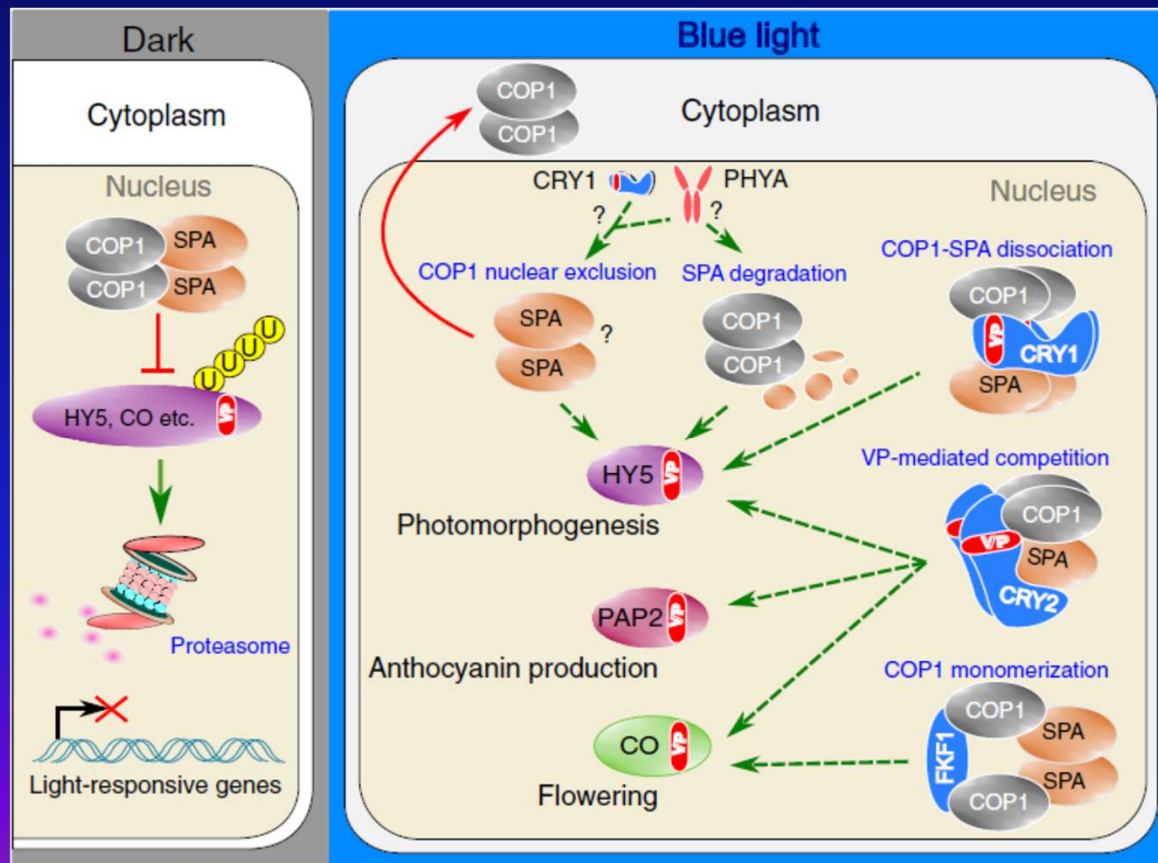
Ani jeden ze známých fotoreceptorů není receptorem zeleného světla, který aktivuje BES1!

Molekulární mechanismus inhibice COP1/SPA modrým světlem prostřednictvím kryptochromů

UPDATE 2020

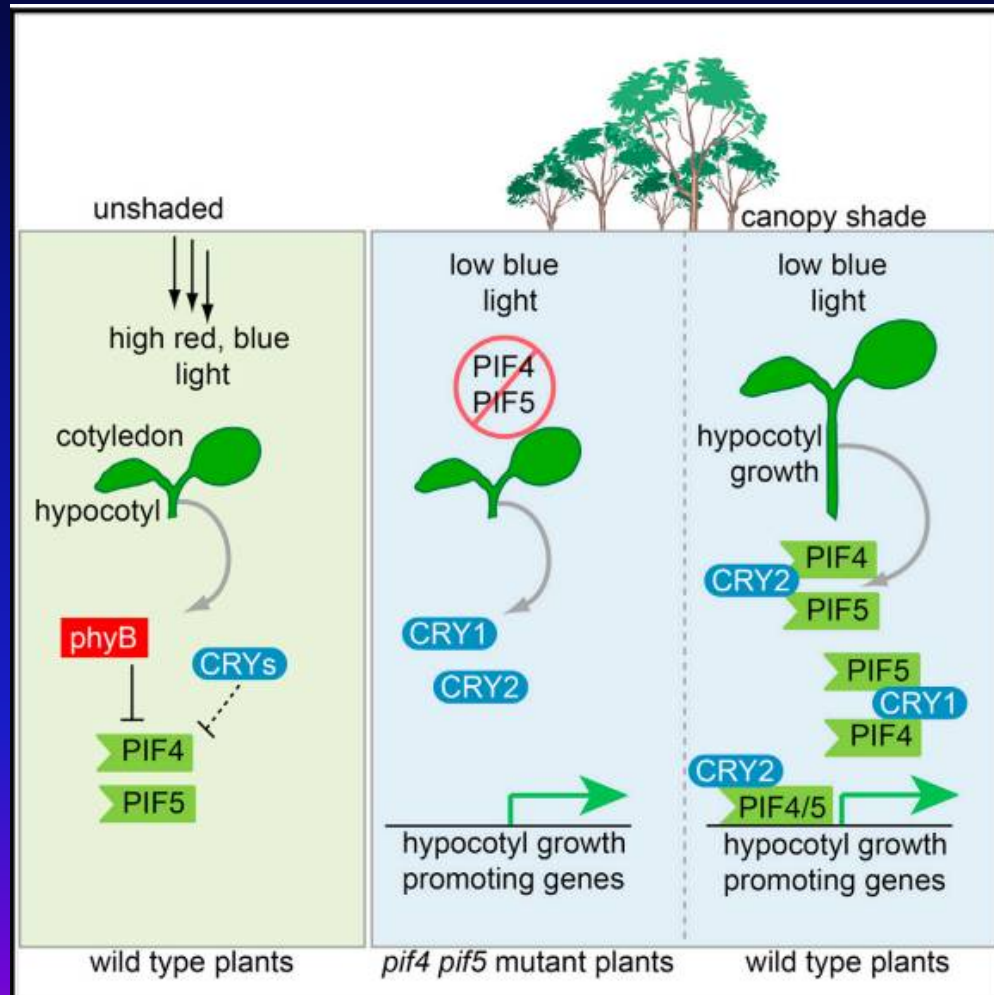
Ponnu J et al. (2019) PNAS 116: 27133-27141

Ponnu J (2020) Physiologia Plantarum 169: 418-429



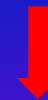
CRY obsahují valine-prolinový (VP) motiv na C-terminální doméně CRY (CCT2), který se podobá COP1-WD40 vazebné sekvenci přítomné na všech substrátech COP1.

Molekulární mechanismus inhibice a stimulace růstu prostřednictvím kryptochromů při různých světelných podmínkách



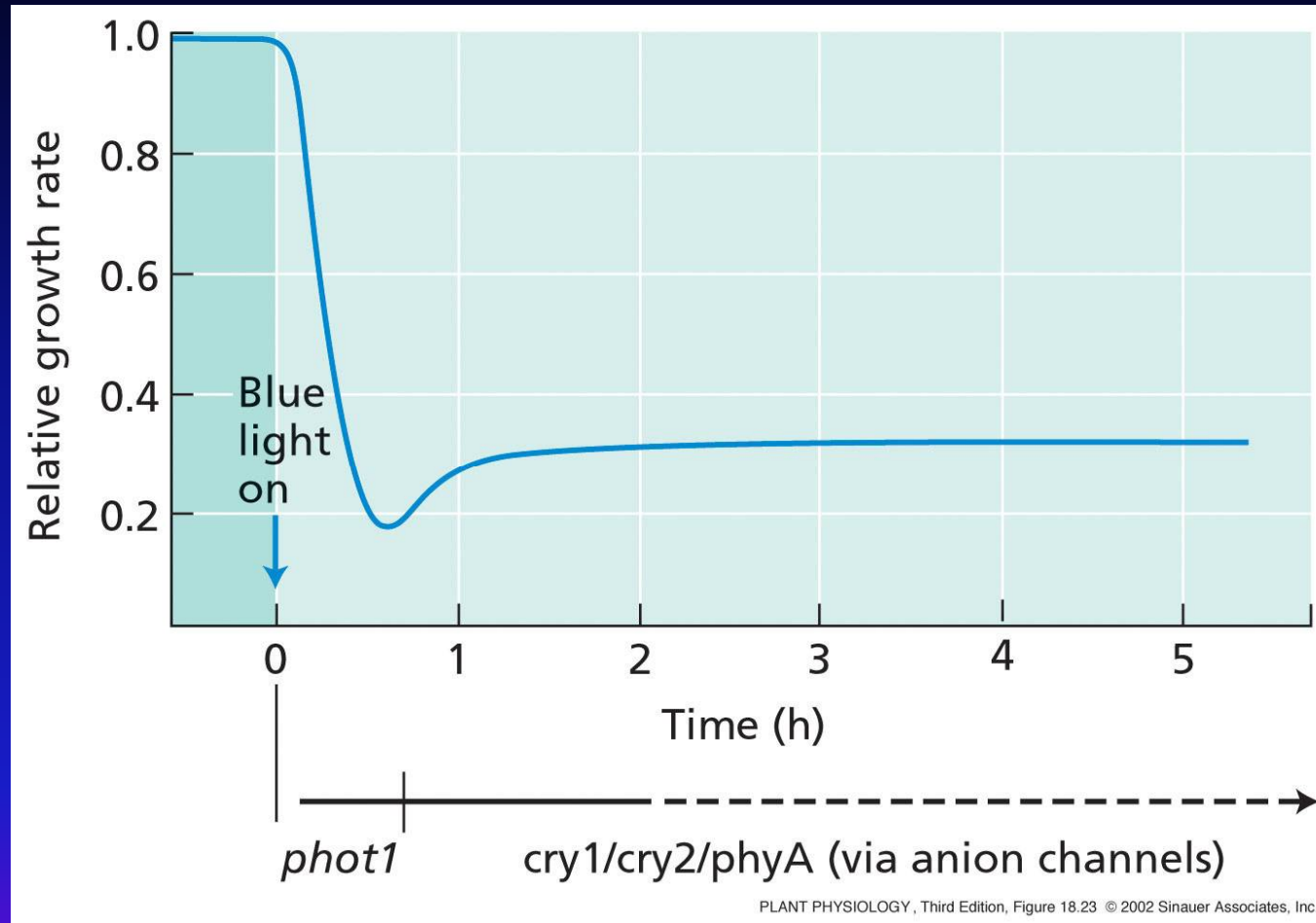
Fotoreceptory CRY vnímají různou intenzitu modrého záření. V závislosti na intenzitě světla pak regulují různým způsobem aktivitu transkripčních faktorů PIF4 a PIF 5.

Při zastínění se CRY váží k transkripčním faktorům PIF4 a PIF5 a tím aktivují jejich vazbu k promotorům genů, zapojeným v růstu hypocotylu.



Prodlužování rostliny

Inhibice růstu hypokotylu indukované modrým světlem

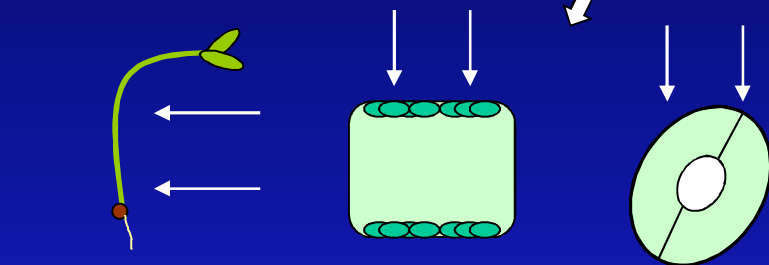
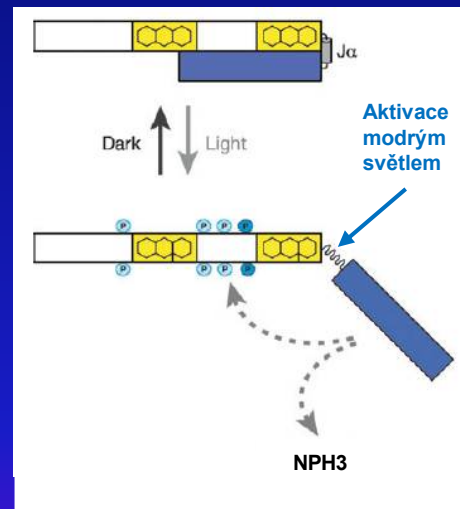
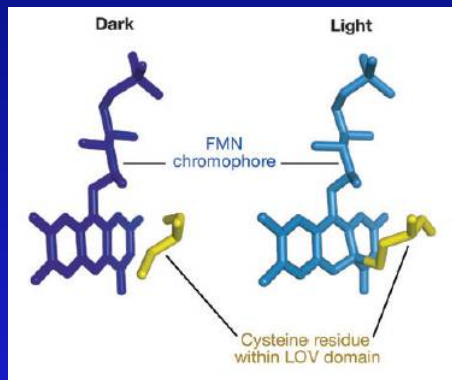
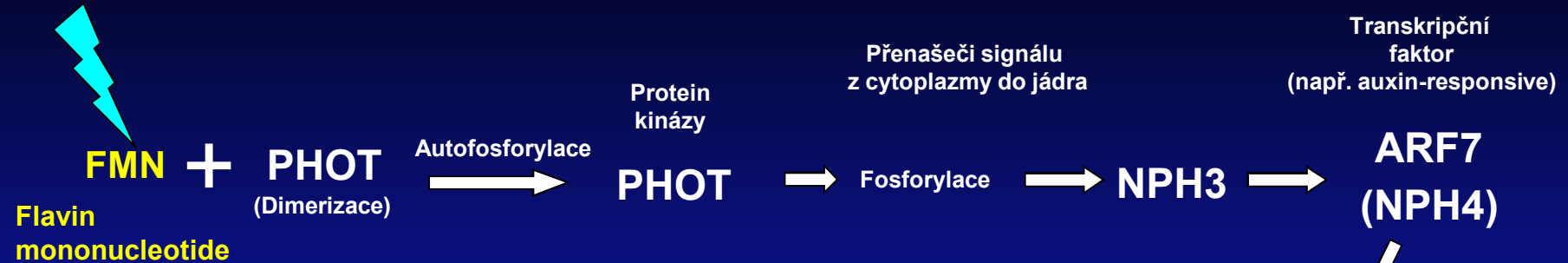


Ranná fáze zprostředkovaná *phot1* – minuty až 30 minut

Pozdní fáze zprostředkovaná CRY1, CRY2, phyA – hodina a více

Signální dráha fototropinů PHOT

Modré světlo

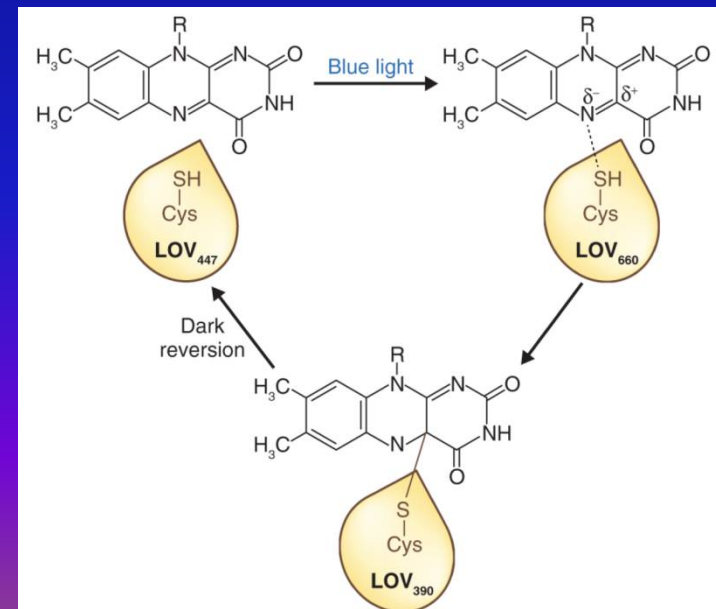


Klíčovou pro přenos signálu je autofosforylace na dvou konzervovaných Ser reziduích na C-terminální doméně (PHOT1: Ser-763 a Ser-85; PHOT2: Ser-761 a Ser 763). Ve tmě je PHOT defosforylován protein fosfatázou PP2A.

Update 2018

Christie JM (2018) Plant Physiology 176: 1015-1024

Nejnovější review o signalizaci prostřednictvím fototropinů.



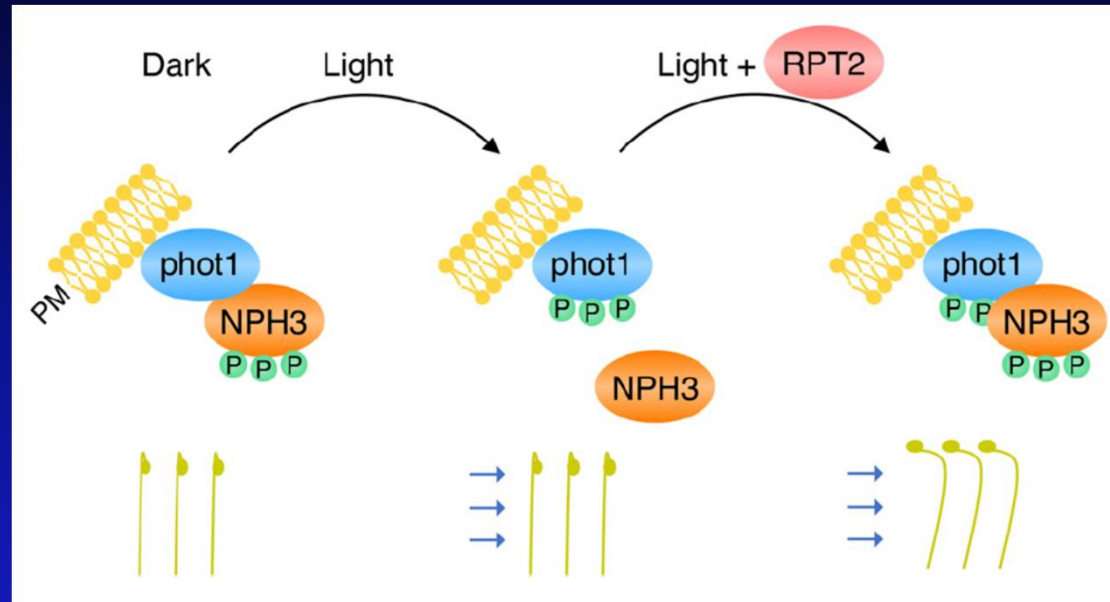
UPDATE 2018

Christie JM (2018) Plant Physiology 176: 1015-1024

Nejnovější review o signalizaci prostřednictvím fototropinů.

33

Proteiny typu NPH3/RPT2 jsou nutné pro elicitaci dalších reakcí.



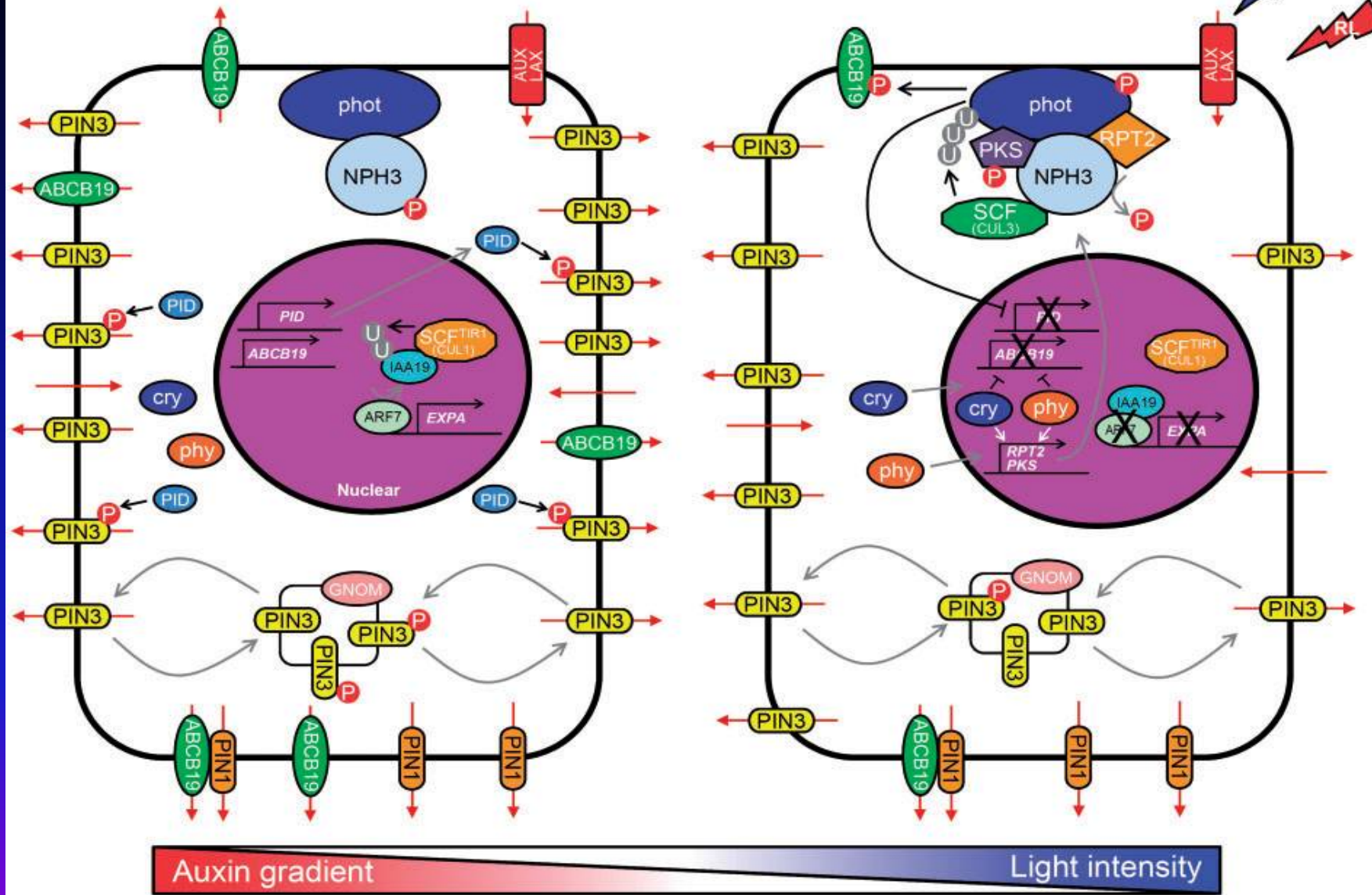
Phot1 a NPH3 vytvářejí ve tmě na plazmatické membráně komplex. Po osvětlení modrým světlem a aktivaci Phot1 se interakce mezi Phot1 a NPH3 zeslabuje a dochází k defosforylaci NPH3. Další účinná signalizace při kontinuálním modrém světle vyžaduje nové vytvoření komplexu Phot1+NPH3. To vyžaduje aktivitu proteinu RPT2.

UPDATE 2018

Zhao X et al. (2018) Journal of Integrative Plant Biology 60: 562-577

Zatímco phot1 reguluje disociaci NPH3 od plazmatické membrány, phot2 naopak zprostředkuje stabilizaci a relokaci NPH3 k plazmatické membráně v reakci k vysoké intenzitě modrého světla.

Molekulární mechanismus fototropické reakce



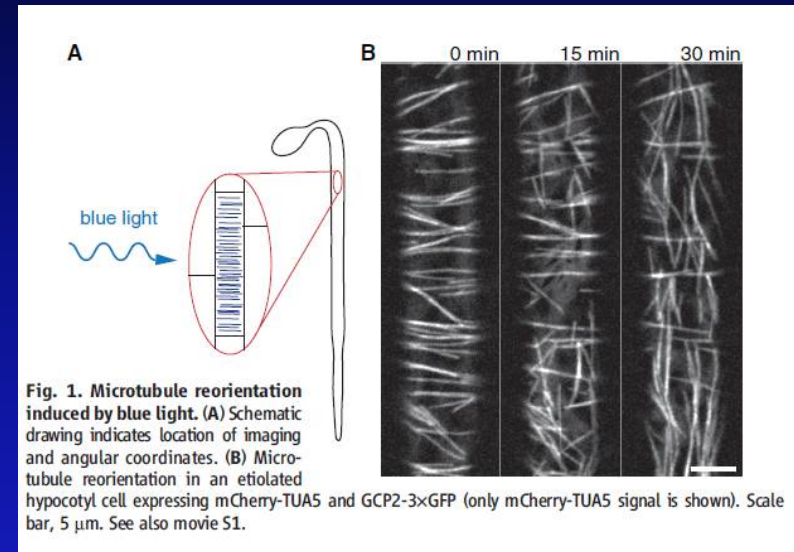
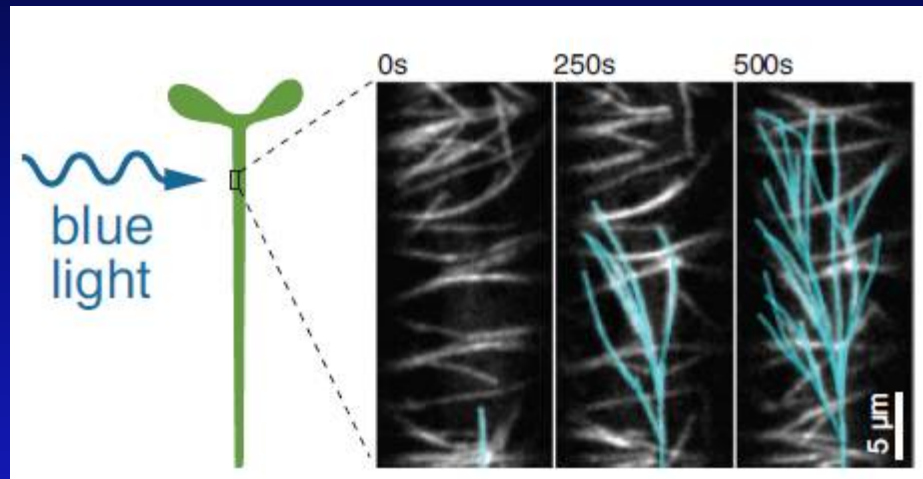
UPDATE 2012

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

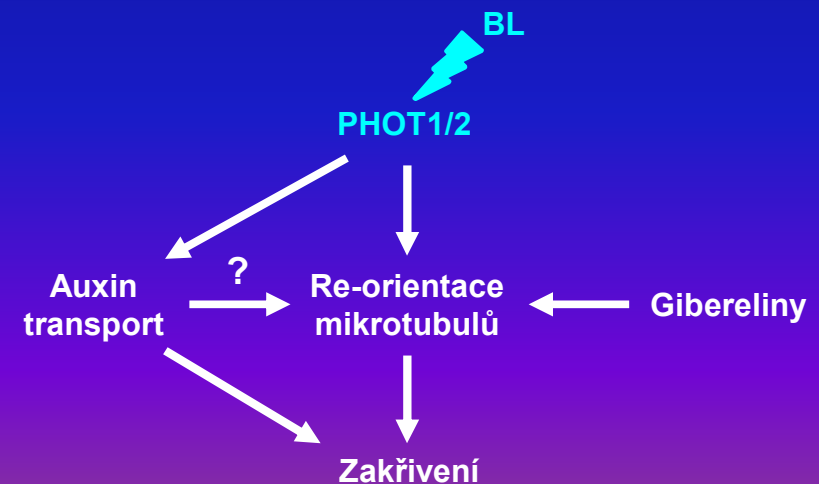
UPDATE 2013

Lindeboom JJ et al. (2013) Science 342: 1245533

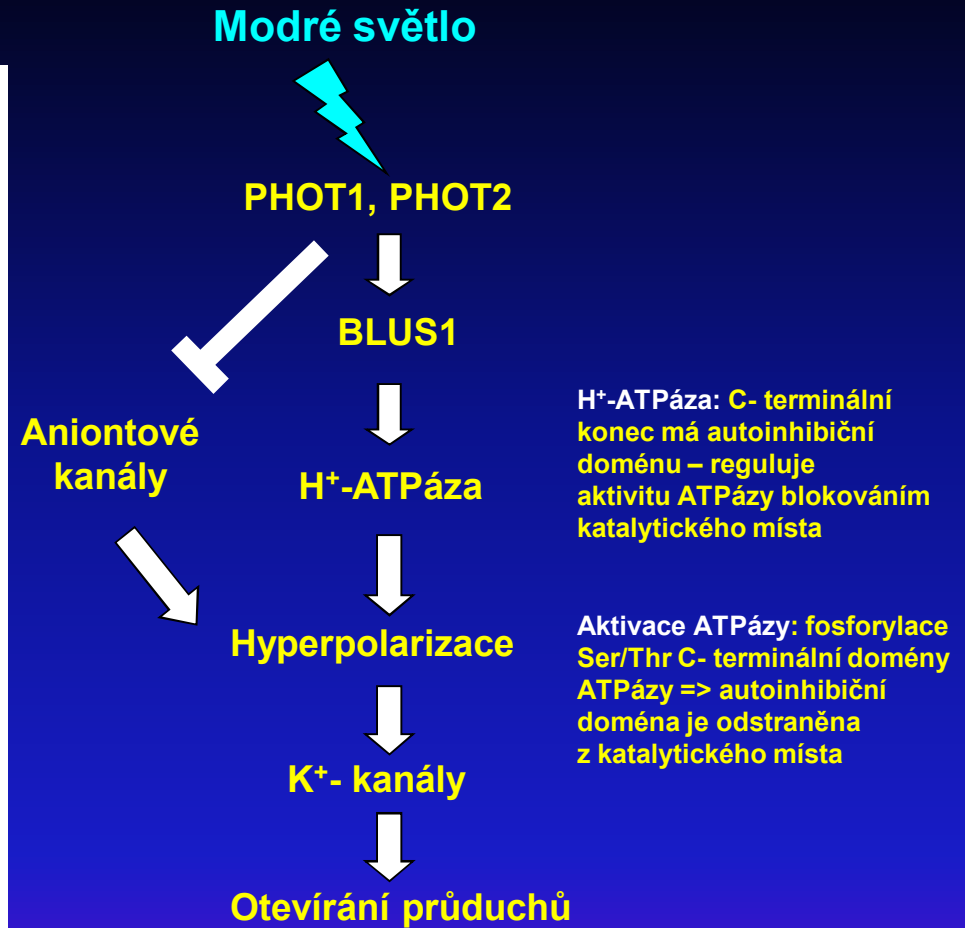
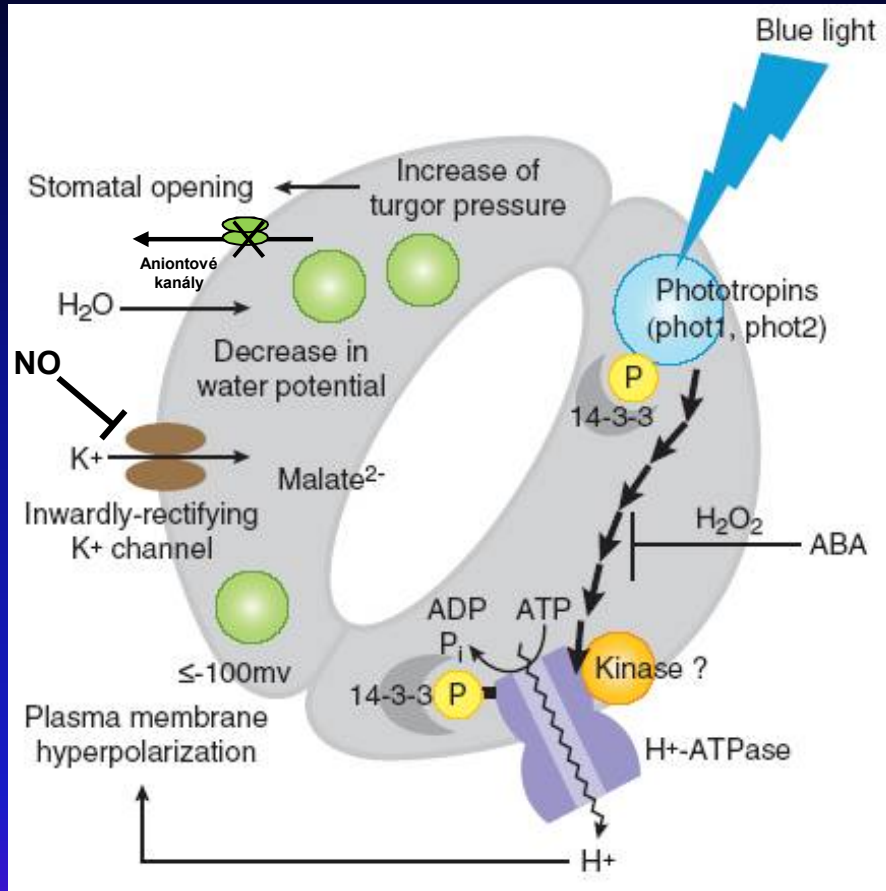
Mechanismus zakřivování způsobeného re-orientací nově vznikajících mikrotubulů epidermálních a kortikálních buněk.



Modré světlo prostřednictvím fotoreceptorů PHOT1 a PHOT2 stimuluje vznik nově orientovaných mikrotubulů. Vznik nových mikrotubulů je řízen proteinem **kataninem**, který rozděluje (rozštěpuje) existující mikrotubuly. Růst konců nově vniklých mikrotubulů vede ke vzniku **re-orientovaných mikrotubulů** v epidermálních a kortikálních buňkách. Tato re-orientace vede ke změně ukládání celulózy v nově vznikající buněčné stěně a k zakřivení.

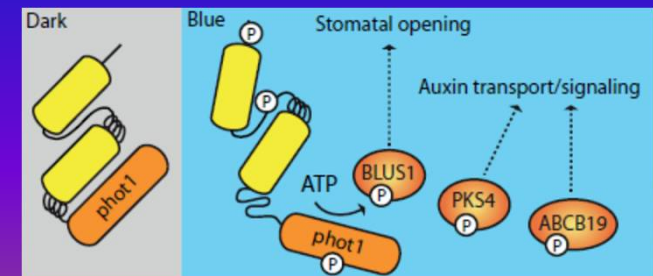


Otevírání průduchů prostřednictvím fototropinů PHOT1 a PHOT2

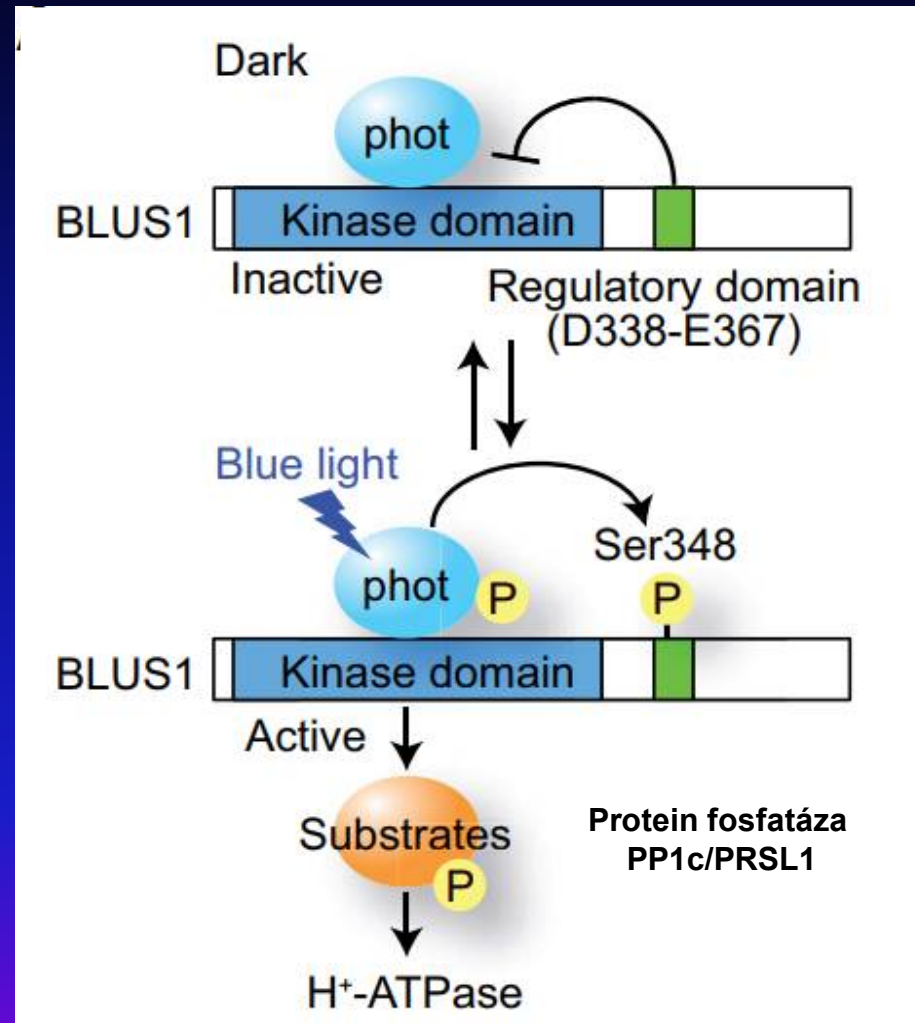


UPDATE 2016

Cotelle V and Leonhardt N (2016) Frontiers in Plant Science 6: article no: 1210
Review o úloze proteinů 14-3-3



Model otevírání průduchů modrým světlem prostřednictvím regulace BLUS1



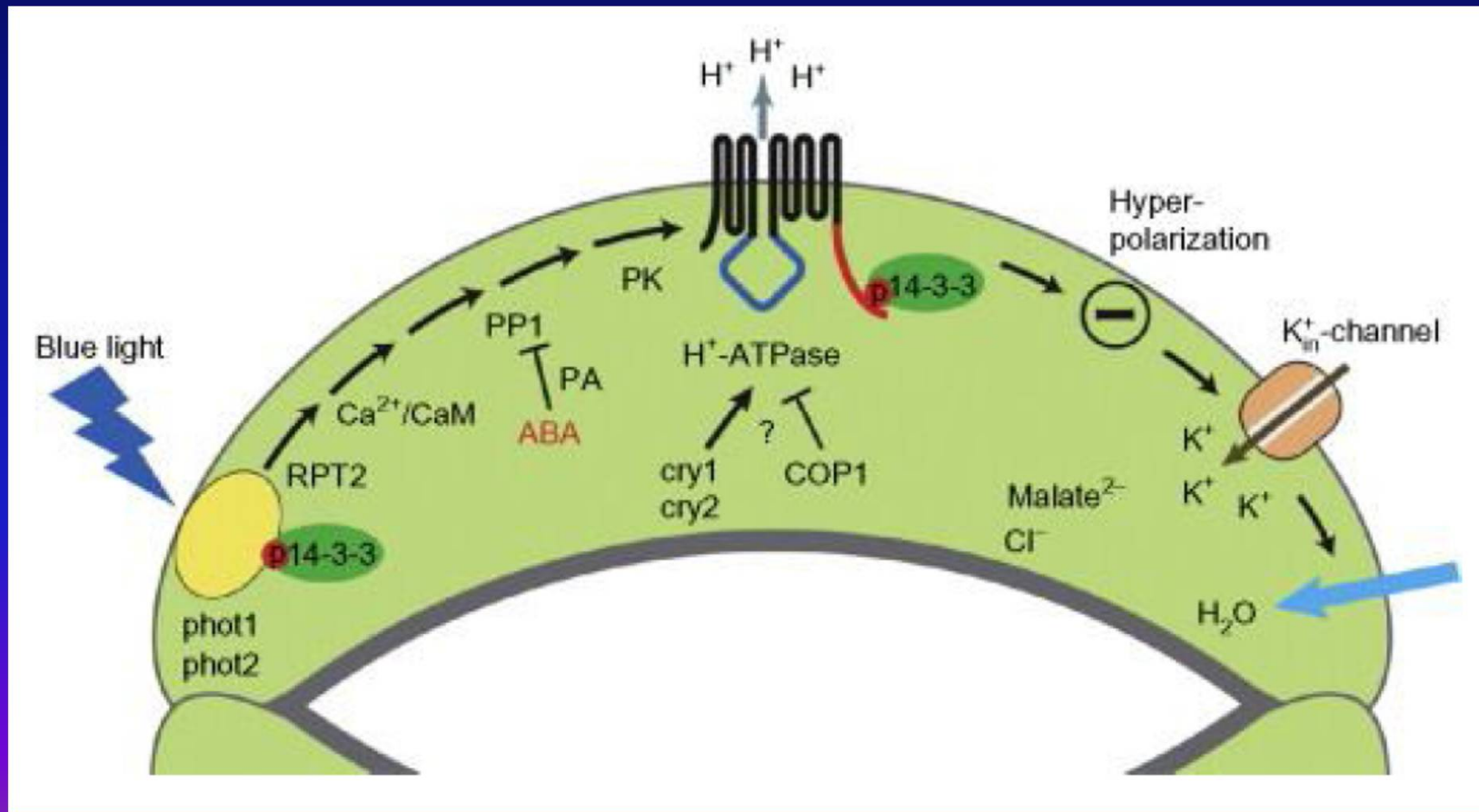
UPDATE 2021

Hosotani S et al. (2021) Plant Cell 33: 1813–1827

UPDATE 2011

Kinoshita T, Hayashi Y (2011) *Int Rev Cell Mol Biol* 289: 89-115

ABA – abscisic acid, CaM – calmodulin, PP1 – type 1 protein phosphatase, PA – phosphatidic acid, phot1, phot2 – phototropins, PK – plasma membrane-localized protein kinase, cry1, cry2 – cryptochromes, COP1 – CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1

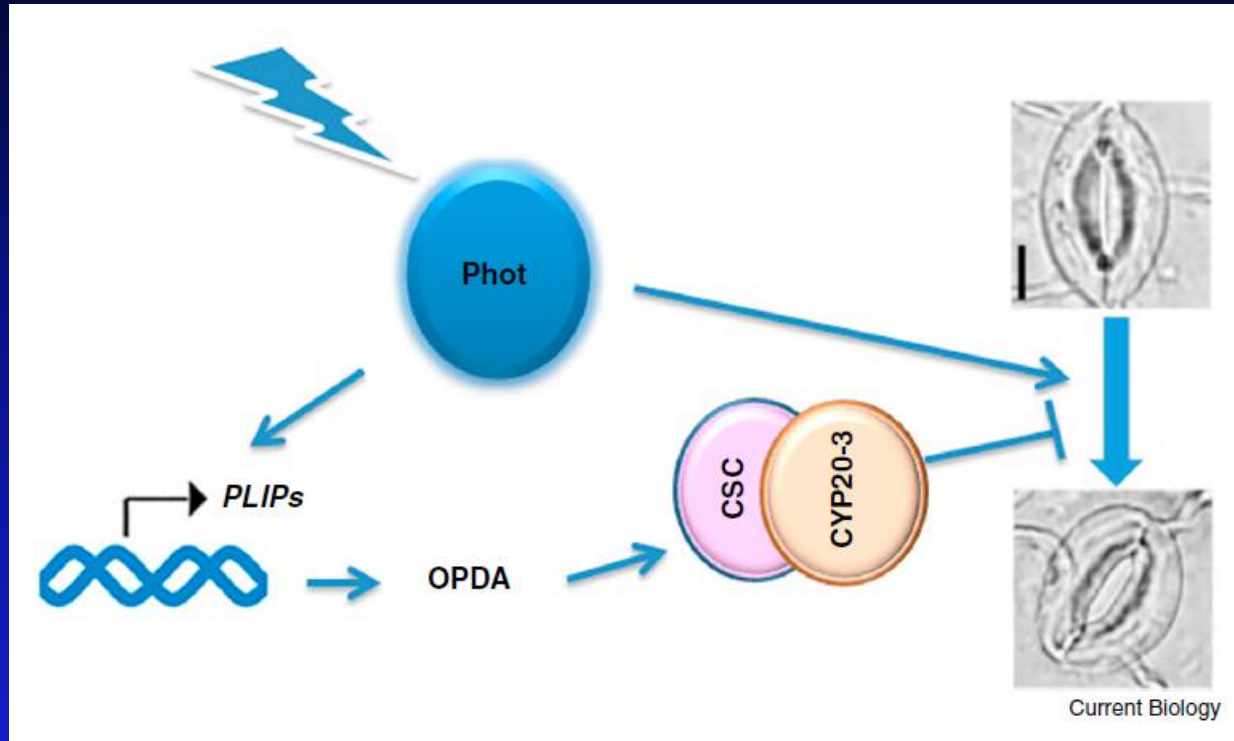


UPDATE 2023

Chang Y et al. (2023) *Current Biology* 33: 1071-1081

Liu H (2023) *Current Biology* 33: R219-R237

39

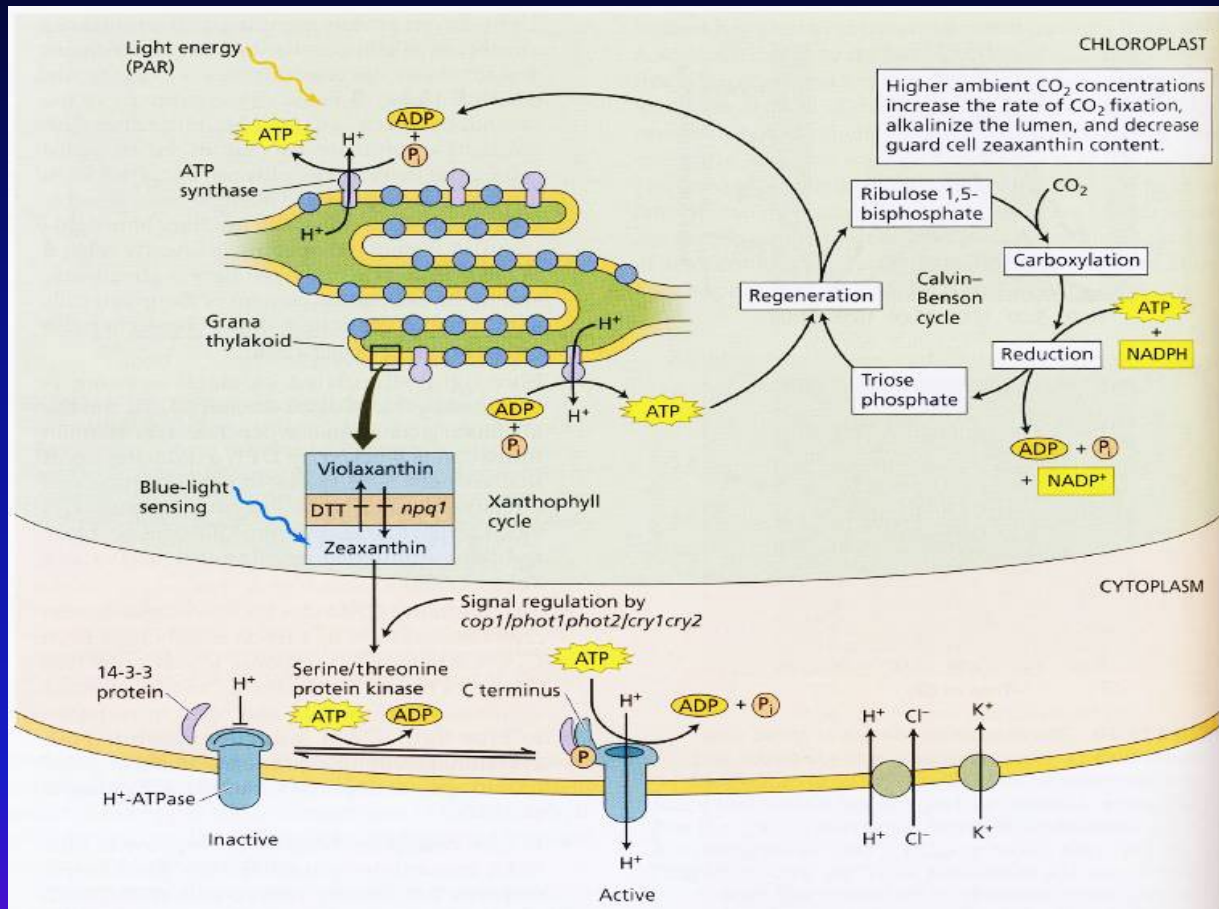


Modré světlo aktivuje fototropiny => otevření průduchů. Mezitím modré světlo aktivuje transkripci PLIPs (fosfolipáz) => akumulace OPDA (kyselina 12-oxo-ftydienová = metabolit oxylipinu) => vazba OPDA k receptorovému komplexu CSC-CYP20-3 => inhibice aktivity H⁺-ATPázy (pumpování H⁺ ze svěrací buňky ven) a transportu K⁺ do svěrací buňky.



Uzavření průduchů = „brzda“

Signální dráha zeaxantinu ve svěracích buňkách stomat



Modré světlo



Zeaxantin



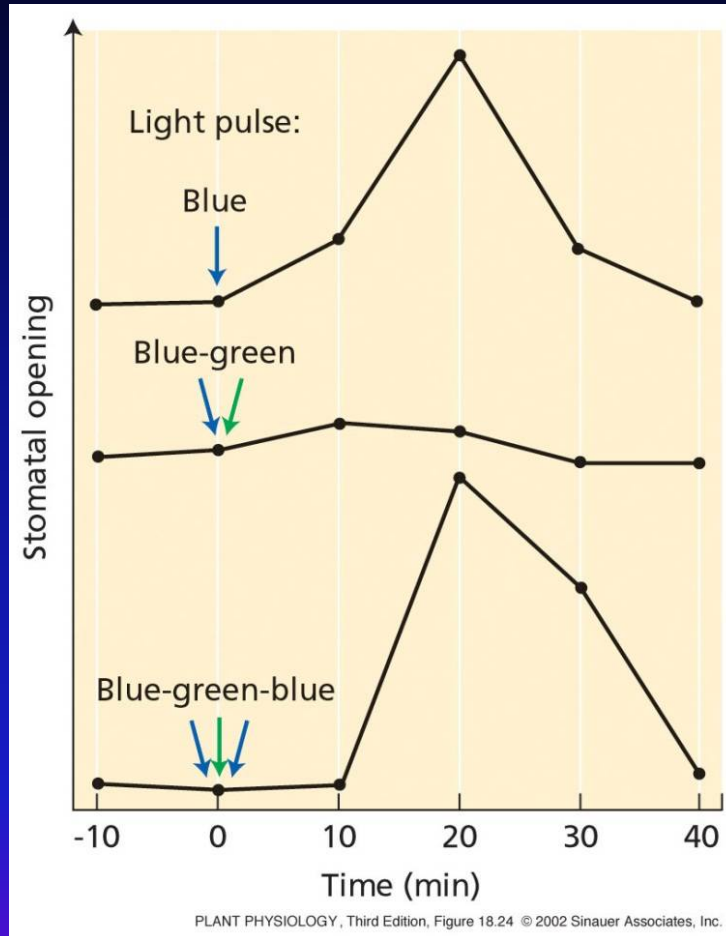
H⁺-ATPáza



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*.

Reverzibilita otevírání stomat



Akční spektra modrého (otevírání stomat) a zeleného (zavírání stomat) světla jsou posunuta o 90 nm

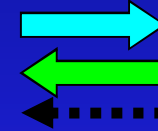
Tento posun je způsoben izomerizací zeaxantinu

Modré světlo

Zelené světlo

Trans –izomer
Zeaxantinu
(neaktivní)

Cis –izomer
Zeaxantinu
(aktivní)



Tma

UPDATE 2015

Golovatskaya IF and Karnachuk RA (2015) Russian J Plant Physiology 62: 727-740

Review of fyziologické úloze zeleného světla ve vývoji a růstu rostlin.

Fotosynteticky aktivní světlo:
červené a modré



Rychlost syntézy ATP



Calvinův cyklus
(fixace CO₂)

Violaxantin

Enzym
optimum pH 5.2
(integrální thylakoidní
protein)

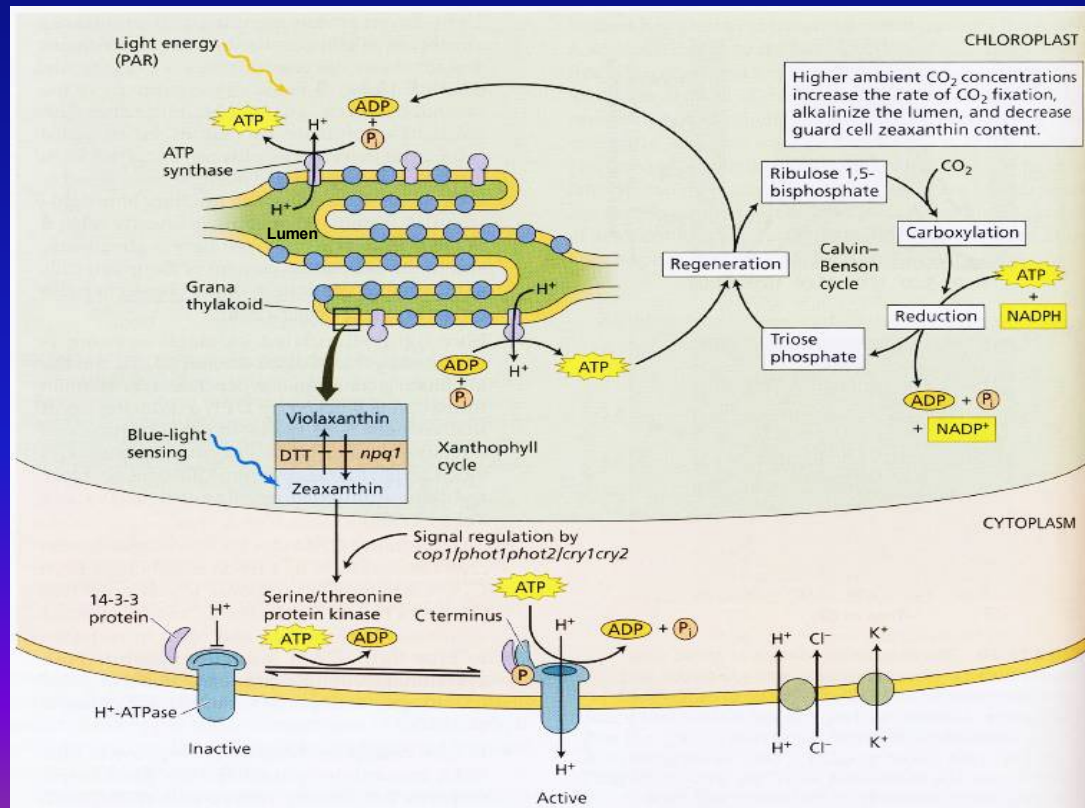


Zeaxantin



Otevírání
stomat

CO₂



Zeaxantin funguje
jako senzor CO₂ :

Vysoká [CO₂]



Vysoká fixace CO₂ =
vysoká spotřeba ATP



Alkalizace lumenu
(zvyšování pH)



Snížení obsahu zeaxantinu

