

ADRIANA SZMIDT-JAWORSKA, KRZYSZTOF JAWORSKI i JAN KOPCEWICZ

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin,
ul. Gagarina 9, Toruń 87-100
e-mail: asjawors@eagle.biol.uni.torun.pl*

GENETYCZNE I MOLEKULARNE PODSTAWY FUNKCJONOWANIA FITOCHROMU U ROŚLIN

WPROWADZENIE

Rozwój organizmu roślinnego zależy od zawartej w nim informacji genetycznej oraz wpływu środowiska zewnętrznego. Najważniejszym czynnikiem środowiskowym jest światło. Wpływ energii świetlnej na organizmy roślinne jest wielokierunkowy. Z jednej strony światło warunkuje syntezę związków organicznych w procesie fotosyntezy, z drugiej zaś, wpływa na procesy wzrostu i rozwoju w procesach fotomorfogenezy. Fotomorfogeneza jest to niezależny od fotosyntezy wpływ światła na wzrost, rozwój i różnicowanie się roślin. Procesy fotomorfogenetyczne zachodzą podczas całego cyklu życiowego rośliny i obejmują dojrzewanie i kiełkowanie nasion, wzrost łodygi, powiększanie się liści, rozwój chloroplastów, syntezę chlorofilu oraz całego szeregu ważnych związków organicznych, jak również kwitnienie, owocowanie i starzenie się roślin. Ważnym zagadnieniem jest więc poznanie mechanizmów, za pomocą których światło kontroluje całokształt procesów wzrostu i rozwoju u roślin. Wiadomo, że w procesach fotomorfogenetycznych istnieje pewna podstawowa sekwencja zdarzeń. Światło zostaje zaabsorbowane przez specyficzny fotoreceptor, którego właściwości ulegają zmianie. Powoduje to inicjację określonych procesów biofizyczno-biochemicznych oraz ekspresję aktywności niektórych genów. Konsekwencją jest pojawienie się kierunkowych zmian rozwojowych.

Zakres fotomorfogenetycznie aktywnego światła znajduje się między 320 a 800 nm. W tym zakresie spektralnym energia kwantów

światlnych nie jest zbyt duża, nie powoduje jonizacji, wystarcza jednak do zmian elektronowych poziomów energetycznych atomów i cząsteczek. Odbiorcami sygnałów świetlnych są wyspecjalizowane fotoreceptory roślinne. Oprócz powszechnie znanych: chlorofilu, karotenoidów, ksantofili — barwników uczestniczących w fotosyntezie, występują także barwniki fotomorfogenetyczne: fitochrom, receptory światła niebieskiego (kryptochrom) bliskiego (UV-A) oraz dalekiego (UV-B) ultrafioletu (QUAIL 1994). Najważniejszym i najlepiej poznanym wśród nich jest fitochrom; fotoreceptor absorbujący światło czerwone i daleką czerwień (CYMERSKI i KOPCEWICZ 1995, TRETYN i współaut. 1994). Obecność fitochromu stwierdzono w komórkach roślin niższych i wyższych. Morfogenezę roślin niższych i grzybów indukuje przede wszystkim światło ultrafioletowe i niebieskie. U roślin wyższych zasadniczą rolę odgrywa światło czerwone i daleka czerwień. Wydaje się, że ewolucja fotoreceptorów roślinnych zaczęła się wraz z powstaniem prymitywnych form autotroficznych w środowisku wodnym. Jedynie wysokoenergetyczne światło krótkofalowe jest zdolne do penetrowania głębszych warstw wody. Można zatem przypuszczać, że pierwotne rośliny wodne nabyły zdolności do percepcji i morfogenetycznej odpowiedzi na promieniowanie krótkofalowe. Właściwość ta przetrwała i funkcjonuje u współcześnie występujących roślin wodnych. Wraz z wyjściem roślin na ląd i kształtowaniem się atmosfery ziemskiej coraz większą rolę, jako źródło informacji dla roślin,

zaczęło odgrywać niedestrukcyjne światło czerwone i daleka czerwień. U całkowicie przystosowanych do środowisk lądowych roślin niższych i wyższych dominującą rolę w regulacji ich rozwoju spełnia fitochrom. Efekt działania światła krótkofalowego zwykle sprowadza się do współdziałania z tym barwnikiem lub do kontroli procesów akomodacji.

Fitochrom został wykryty na początku lat pięćdziesiątych przez Borthwicka, Hendricksa i

współpracowników (BORTHWICK i współaut. 1952). W trakcie 46 lat, które upłynęły od tego czasu badania, koncentrowały się na poznaniu budowy i określeniu fizjologicznej roli fitochromu w regulacji procesów fotomorfogenezy. Ostatnie lata przyniosły poznanie genów fitochromowych oraz przybliżyły molekularne mechanizmy funkcjonowania fotoreceptora. Zagadnienia te są przedmiotem niniejszego opracowania.

MOLEKULARNE ASPEKTY BUDOWY I FUNKCJONOWANIA FITOCHROMU

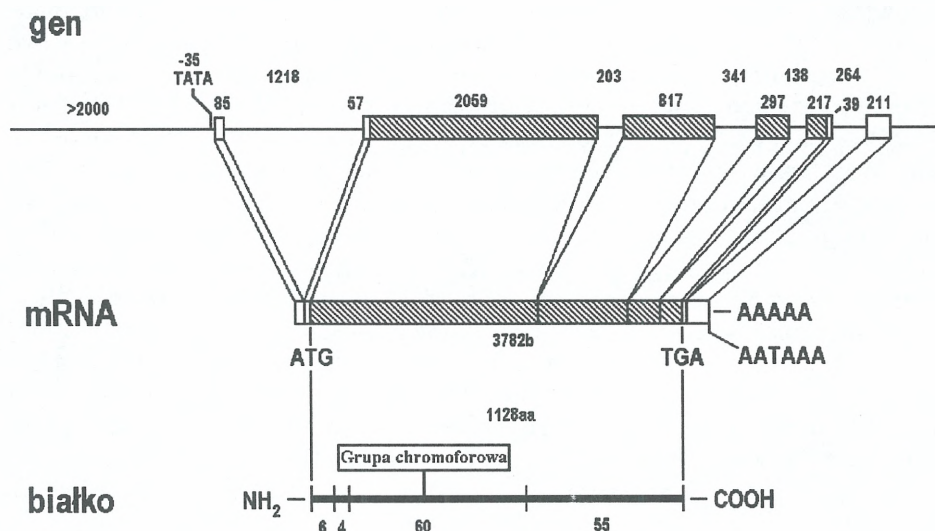
MOLEKULARNA BUDOWA FITOCHROMU

Pod względem chemicznym fitochrom jest dużą, rozpuszczalną w wodzie chromoproteiną o charakterystycznym niebieskim zabarwieniu, która jak każdy fotoreceptor roślinny funkcjonuje w komórce w postaci kompleksu barwnika z apoproteiną. Łańcuch polipeptydowy cząsteczki połączony jest za pomocą wiązań kowalencyjnych z otwartą tetrapiolową grupą chromoforową. W zależności od gatunku rośliny masa niezdegradowanej cząsteczki tego barwnika waha się od 116 do 129 kDa, przy czym natywną postacią jest homodimer o masie około 253 kDa (FURUYA i SONG 1994).

W toku dotychczasowych badań najlepiej poznano budowę fitochromu izolowanego z etiolowanych siewek owsa (*Avena sativa*). U rośliny tej stwierdzono obecność co najmniej 5 genów kodujących fitochrom, a od kilku lat znana jest szczegółowa budowa genu *PHYA3* i powstającego na jego bazie transkryptu oraz pełna sekwencja białkowego składnika fitochromu (QUAIL i współaut. 1989) (Ryc. 1).

Gen *PHYA3* owsa zbudowany jest z 5.94 kpz i składa się z 6 eksonów (sekwencji kodujących)

i 5 intronów (sekwencji niekodujących). Transkrypcja mRNA rozpoczyna się od tandemowej sekwencji TATA, leżącej w promotorowym odcinku genu. Dojrzały, powstały w wyniku transkrypcji, mRNA zbudowany jest z 3.78 kpz (łącznie z 3'-kończową sekwencją poli-A). Pierwszy (142 pz) i ostatni (252 pz) odcinek mRNA nie podlegają translacji, zaś centralny fragment liczący 3387 pz zawiera sekwencje kodujące białko. Dojrzały mRNA posiada kodon inicjujący (ATG) i kończący (TGA) transkrypcję (QUAIL 1994). Powstające na bazie opisanego mRNA białko fitochromu składa się z 1128 aminokwasów (124 kDa). W wyniku potranslacyjnej obróbki do 321 reszty aminokwasowej polipeptydu (cysteiny), poprzez wiązanie kowalencyjne, przyłączona zostaje osobno syntetyzowana grupa chromoforowa w wyniku czego powstaje funkcjonalnie pełnowartościowa cząsteczka fitochromu (FURUYA i SONG 1994). Skład aminokwasów został ustalony na podstawie analizy odpowiedniego cDNA. U owsa produkty trzech spośród pięciu genów kodujących cząsteczki fitochromu wykazują 98% homologię składu aminokwasów. Tak duża homologia struktury pierwszorzędowej istnieje również między białkami fitochromu izolowanymi z innych gatun-



Ryc. 1. Budowa genu *PHYA3* fitochromu owsa, dojrzałego transkryptu oraz produktu translacji z przyłączoną grupą chromoforową.

Gen: eksony oznaczono jako prostokąty (niewypełnione — nie podlegają translacji, wypełnione — podlegają); introny ilustruje linia prosta (według QUAIL 1994).

ków roślin. Częsteczki fitochromu labilnego (phyA) są bardzo do siebie podobne pod względem molekularnym. Stopień identyczności składu aminokwasowego cząsteczek fitochromu labilnego (phyA) różnych gatunków roślin sięga 65–90%. Natomiast fitochromy stabilne (phyB i phyC) wykazują jedynie 50% identyczność względem siebie i w stosunku do fitochromu labilnego (CLACK i współaut. 1994). W przypadku krótkiego 11-aminokwasowego odcinka, w skład którego wchodzi cysteina, wiążąca grupę chromoforową, homologia ta może być jednak 100%.

Badania biochemiczne wykazały, że w natywnej chromoproteinie można wyróżnić dwie główne domeny: większą, globularną N-końcową domenę zawierającą grupę chromoforową, o masie cząsteczkowej około 74 kDa oraz krótszy fragment C-końcowy o masie około 55 kDa (FURUYA i SONG 1994). Globularna domena N-końcowa oprócz wiązania grupy chromoforowej, odpowiada za spektralne właściwości fitochromu (FURUYA i SONG 1994).

Cząsteczki chromoproteiny wykazują właściwości białka rozpuszczalnego, chociaż istnieją regiony polipeptydu o przewadze aminokwasów natury hydrofobowej. Region taki występuje pomiędzy 80 a 315 aminokwasem (licząc od N-końca) białka fitochromowego. Przedzielony jest on krótkim, hydrofilnym fragmentem wiążącym chromofor. Odcinek końca N (6 kDa), uważany za niezbędny w oddziaływaniu między grupą chromoforową a resztą białkową, wykazuje zdecydowanie hydrofilne właściwości i dlatego może on występować na powierzchni cząsteczki fitochromu. Istnieją jeszcze trzy silnie hydrofilne regiony zawarte między 343 a 365 aminokwasem oraz w okolicach 691 i 1079 aminokwasu. Prawdopodobnie również i te fragmenty polipeptydu są rozmieszczone na powierzchni cząsteczki fitochromu (FURUYA i SONG 1994).

Fitochrom wyizolowany z etiolowanych siewek owsa (natywny) występuje w formie dimeru. Dwie 124 kDa cząsteczki tej chromoproteiny łącząc się wiązaniami jonowymi i siłami elektrostatycznymi, tworzą dimer o masie cząsteczkowej 253 kDa (FURUYA i SONG 1994, QUAIL 1994). Jak wykazano, proces dimeryzacji odbywa się w wyniku oddziaływań zachodzących pomiędzy C-końcowymi domenami poszczególnych monomerów fitochromu, zawartymi między 756 a 800 aminokwasem (QUAIL i współaut. 1987). Dodatkowo analiza delecji w końcu C wskazuje, że aminokwasy pomiędzy 981 i 1161 są niezbędne do powstawania dimeru (CHERRY i współaut. 1993). Cząsteczki fotoreceptora wchodzące w skład dimeru są ze sobą luźno

związane i łatwo dysocjują pod wpływem rozтворów o dużej sile jonowej. Podczas takiej dysocjacji nie obserwuje się zmian widma czynnościowego poszczególnych cząsteczek fitochromu (FURUYA i SONG 1994).

Za pomocą mikroskopii elektronowej i analizy rentgenowskiej wykazano, że cząsteczka fitochromu jest trójdzielną strukturą zbliżoną budową do litery Y (NAKASAKO i współaut. 1990). W modelu strukturalnym zaproponowanym przez Romanowskiego i Songa wyróżnia się 11 strukturalnych podjednostek, tworzących dwie domeny — chromoforową i niechromoforową (PARKER i współaut. 1991). Przy użyciu przeciwciał monoklonalnych, specyficznych dla form Pr, HOLDSWORTH i WHITELAM (1987) wykazali, że *in vitro* mogą istnieć homodimery Pr:Pr i Pfr:Pfr oraz heterodimery Pr:Pfr. Uważa się, że dimeryzacja jest procesem niezbędnym dla uzyskania aktywności biologicznej fitochromu.

MOLEKULARNE FORMY FITOCHROMU

U roślin etiolowanych fitochrom jest syntetyzowany i akumulowany w formie Pr. Ta bardzo stabilna w ciemności forma fotoreceptora po naświetleniu rośliny światłem czerwonym przekształca się w podlegającą szybkiej degradacji formę Pfr. Obok niej u roślin rosnących na świetle pojawia się także druga frakcja Pfr — oporna na degradację (QUAIL 1994). Na podstawie różnic w tempie degradacji Pfr wyróżniono dwie fizjologiczne formy fitochromu: labilną i stabilną (FURUYA 1993). Badania wykazały, że labilna pula fitochromu dominuje u roślin etiolowanych i podlega szybkiej degradacji na świetle (PRATT i współaut. 1991). Ten fitochrom nazwany został fitochromem I (PI) (FURUYA 1993) lub fitochromem A (phyA) (QUAIL 1994). Stabilna pula fitochromu, która dominuje w roślinach zielonych, nazwana została fitochromem II (PII) (FURUYA 1993) lub fitochromem B (phyB) (QUAIL 1994).

Badania nad strukturą i ekspresją genów fitochromowych u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) wykazały, że fitochromy labilny i stabilny kodowane są przez odmienne geny. Tylko jeden z pięciu genów fitochromowych zidentyfikowanych u tej rośliny (oznaczony jako *PHYA*) koduje cząsteczki fitochromu labilnego. Cztery pozostałe (*PHYB-E*) odpowiadają za powstawanie fitochromu stabilnego (QUAIL 1994, CLACK 1994). Produkty wymienionych genów oznaczono jako fitochrom A, B, C, D i E (QUAIL i współaut. 1989).

Prawie wszystkie dotąd poznane geny fitochromowe wykazują podobieństwo strukturalne do genów *PHYA* i *PHYB* *Arabidopsis* (QUAIL

1994, CLACK i współaut. 1994). Na tej podstawie zaproponowano, że fitochrom labilny (PI), kodowany u roślin przez geny o strukturze zbliżonej do *PHYA* rzodkiewnika, oznaczony będzie jako fitochrom A (phyA tj. P_rA i P_{fr}A), natomiast fitochrom stabilny (PII) określony jako fitochrom B (phyB tj. P_rB i P_{fr}B) itd. (QUAIL 1994).

Różnice pomiędzy fitochromem labilnym (PI) i stabilnym (PII) wykazały również doświadczenia biochemiczne (CORDONNIER 1989). Fitochrom phyB wykazuje maksimum absorpcji przy 652 nm, a fitochrom phyA przy 660 nm. Ciężar cząsteczkowy monomeru fitochromu A wynosi 124 kDa (u *Avena sativa*). Występujący w zielonych siewkach monomer fitochromu B ma masę rzędu 118 kDa i wykazuje odmienną wrażliwość na działanie proteaz w porównaniu z fitochromem izolowanym z roślin etiolowanych (u *Avena sativa*). Fitochrom izolowany z zielonych roślin nie stanowi jednorodnej frakcji, lecz składa się z kilku różnych populacji. Analiza sekwencji aminokwasów obu form potwierdziła, że phyA i phyB różnią się strukturą I-rzędową (FURUYA 1993). Natomiast struktura IV-rzędowa jest podobna dla obu form fitochromu (PRATT i współaut. 1991). Ponadto w tkankach roślin zielonych wykazano obecność dwóch form fitochromu phyB o masie cząsteczkowej monomeru 123 kDa i 125 kDa (u *Avena sativa*) (PRATT i współaut. 1991).

Dowodów na istnienie różnic pomiędzy oboma pulami fitochromu dostarczyły również doświadczenia immunochemiczne (SHIMAZAKI i PRATT 1985, 1986). Przeprowadzone prace polegały na badaniu powinowactwa przeciwciał monoklonalnych (o wysokiej specyficzności) i poliklonalnych (o różnej specyficzności) do fitochromu izolowanego z etiolowanych i zielonych siewek owsa oraz grochu (*Pisum sativum*). Podstawą tych badań było ustalenie, iż przeciwciała wytworzone przeciwko fitochromowi z jednych roślin, działają z fitochromem z innych (PRATT 1992).

W toku doświadczeń stwierdzono, że monoklonalne przeciwciała mysie wytworzone przeciwko fitochromowi z etiolowanych siewek owsa wiążą ten fitochrom w ilości około 90%. Wartość ta jest porównywalna ze stopniem wiązania fitochromu z etiolowanych siewek owsa przez poliklonalne przeciwciała królicze. Inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku fitochromu izolowanego z siewek zielonych. Przeciwciała monoklonalne uzyskane przeciwko fitochromowi z etiolowanych siewek owsa, a skierowane przeciwko fitochromowi z siewek zielonych, łączyły się z nim w ilości około 30%, a nawet mniejszej, podczas gdy poliklonalne przeciwciała królicze w ilości około 11% (SHIMAZAKI i PRATT

1985). Wnioskować więc można o wysokiej specyficzności przeciwciał do fitochromu labilnego i niskiej specyficzności do fitochromu stabilnego.

Dla porównania badano również reakcję immunologiczną fitochromu izolowanego z etiolowanych i zielonych siewek owsa z antysurowicą (nieoczyszczone przeciwciała królicze). Procent wiązania fitochromu z roślin etiolowanych był porównywalny z wynikami uzyskanymi w doświadczeniach prowadzonych z przeciwciałami oczyszczonymi (około 90%). Natomiast fitochrom z zielonych siewek owsa reagował z antysurowicą w ilościach 45–75% (SHIMAZAKI i PRATT 1986).

Podobne doświadczenia prowadzono na fitochromie z etiolowanych i zielonych siewek grochu, gdzie uzyskano podobne rezultaty (SHIMAZAKI i PRATT 1985). Wyniki badań immunochemicznych świadczą więc o tym, że fitochrom uzyskany z roślin etiolowanych różni się antygenowo od fitochromu z roślin zielonych. Przyczyn tych różnic należy się dopatrywać w odmienności genów i co jest z tym związane odmienności powstających na ich bazie białek (SHIMAZAKI i PRATT 1985).

Tak więc, w tkankach roślin współistnieją dwie pule fitochromu phyA i phyB. Zawartość phyA zmienia się pod wpływem warunków świetlnych w czasie rozwoju rośliny. Zawartość phyB pozostaje stała niezależnie od warunków świetlnych (LOPEZ-JUEZ i współaut. 1992, FURUYA 1993).

GENY FITOCHROMOWE I ICH EWOLUCJA

Budowę genu kodującego białkowy składnik fitochromu poznano u przedstawicieli kilkunastu gatunków roślin niższych i wyższych (PRATT 1992, QUAIL 1994, QUAIL i współaut. 1989). Rośliny okrytozależkowe zawierają kilka rodzajów fitochromów kodowanych przez odmienne geny. Najlepiej pod tym względem poznаныmi roślinami są rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*) (PRATT 1992, QUAIL 1994), pomidor, sorgo (PRATT 1992) i owies (QUAIL 1994). U pomidora, rzodkiewnika i owsa występuje co najmniej 5 genów kodujących fitochrom. Genom sorgo zawiera trzy (ADAM i współaut. 1997), natomiast ryżu, tytoniu i ziemniaka dwa odmienne geny fitochromowe (PRATT 1992, QUAIL 1994). U *Pharbitis nil* wykryto 4 geny kodujące fitochrom (ZHENG i O'NEILL 1996). U *Arabidopsis* zidentyfikowane geny oznaczono jako *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* i *PHYE* (CLACK i współaut. 1994). Dominację transkryptów genu fitochromu labilnego (*PHYA*) obserwuje się w tkankach roślin etiolowanych, a obniżenie ich poziomu

indukowane jest światłem czerwonym (QUAIL 1994). Inne geny — *PHYB*, *PHYC* (SHARROCK i QUAIL 1989), *PHYD*, *PHYE* (CLACK i współaut. 1994) — kodują odpowiednie apoproteiny fitochromu, które po włączeniu grupy chromoforowej stają się funkcjonalnymi cząsteczkami fitochromu stabilnego typu phyB (QUAIL 1994, SMITH 1995).

Na podstawie wydedukowanego składu aminokwasowego ustalono, że największą homologię (ok. 80% identyczności) wykazują geny *PHYB* i *PHYD*. Stopień identyczności między pozostałymi parami genów fitochromowych waha się w granicach od 46 do 55% (SHARROCK i QUAIL 1989, QUAIL 1994, CLACK i współaut. 1994).

Ostatnio zsekwencjonowano pięć genów kodujących białkowy składnik fitochromu u pomidora, z których jeden jest bardzo podobny do genu *PHYA* rzodkiewnika. Dwa kolejne geny (oznaczone jako *PHYB1* i *PHYB2*) zbliżone są do genu *PHYB* wspomnianej rośliny. Natomiast dwa pozostałe (*PHYE* i *PHYF*) nie odpowiadają żadnemu z genów dotychczas przebadanych roślin (PRATT 1992). Z badań prowadzonych w pracowni L. H. PRATTA wynika ponadto, że u pomidora oprócz wymienionych pięciu genów może jeszcze funkcjonować od czterech do ośmiu dotąd niezidentyfikowanych genów fitochromowych, przy czym jeden z nich prawdopodobnie odpowiada genowi *PHYC* rzodkiewnika (PRATT 1992). We wspomnianej pracowni wykazano również, że geny fitochromowe u sorgo są odpowiednikami *PHYA*, *PHYB* i *PHYC* u *Arabidopsis* (PRATT 1992).

Pełne sekwencje genów fitochromowych poznano także u niektórych mszaków (*Ceratodon*, *Physcomitrella*) i paprotników (*Psilotum*, *Adiantum* i *Selaginella*) (THÜMLER i współaut. 1992, SCHNEIDER-POETSCH i współaut. 1994). Ponadto częściowo zsekwencjonowano geny kodujące cząsteczki fitochromu u glonów (*Mougeotia*, *Mesotaenium*), mchów, skrzypów, paproci i kilku roślin nagozalążkowych (SCHNEIDER-POETSCH i współaut. 1994).

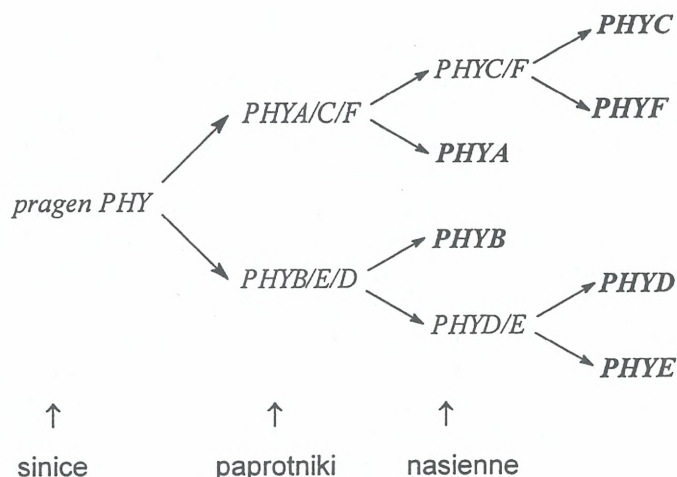
W przypadku dwóch roślin niższych: *Ceratodon* (mszak) i *Adiantum* (paprotnik) cząsteczki fitochromu posiadają unikalne właściwości — regulowanej przez światło kinazy białkowej (THÜMLER i współaut. 1992). Okazało się, że na bazie genu *PHY* powstaje białko o masie 145 kDa, posiadające dwójakiego rodzaju właściwości molekularne. Jego domena N-końcowa odpowiada właściwościom fitochromu. Natomiast w końcu-C występują sekwencje aminokwasowe homologiczne do eukariotycznych kinaz serynowo/treoninowo/tyrozynowych (THÜMLER i współaut. 1992). Jak dotąd nie

stwierdzono jednak by poza *Ceratodon* (THÜMLER i współaut. 1992) i *Adiantum* (WADA i współaut. 1997) inne fitochromy, nawet te funkcjonujące w komórkach roślin niższych, posiadały podobną budowę molekularną.

KANEKO i współaut. (1996) oraz KEHOE i GROSSMAN (1996) zidentyfikowali geny, które u dwu różnych sinic kodują białko wykazujące duże podobieństwo do fitochromu. Z drugiej zaś strony, C-końiec tego białka jest w 50–58% podobny do bakteryjnych kinaz histydynowych (KANEKO i współaut. 1996, KEHOE i GROSSMAN 1996). W komórkach bakterii kinazy histydynowe stanowią podstawowy element tzw. dwuskładnikowego systemu. Można zatem uważać, że układy transdukcji sygnałów u bakterii i sinic, to jest organizmów prokariotycznych, są bardzo podobne do siebie.

Biorąc pod uwagę podobieństwo między grupą chromoforową fitochromu, a fikocyjaninami, barwnikami występującymi w komórkach sinic, sugeruje się, że sinice były prawdopodobnie pierwszymi organizmami, które posiadały układ percepcji bodźców świetlnych podobny do funkcjonującego u wszystkich roślinnych organizmów eukariotycznych i że to u nich właśnie pojawił się określony pragen, który w trakcie ewolucji podlegał procesowi duplikacji, co dało początek całej rodzinie genów fitochromowych. Przebieg tego procesu przedstawia Ryčina 2.

Początkowo na podstawie przeprowadzonych analiz wysunięto wnioski, że rozdział genów *PHYA*, *B*, *C* miał miejsce jeszcze u paprotników. To jednak nie jest zgodne z danymi filogenetycznymi oraz poglądem, że paprotniki ewoluowały wolniej niż rośliny wyższe. SHARROCK i QUAIL (1989) wykazali, że pierwotna duplikacja zaszła w genach paproci nasiennych, ponieważ zarówno rośliny dwu-, jak i jednoliściennne posiadają odpowiedniki genów *PHYA*, *PHYB* oraz *PHYC*. Od tego momentu ewolucja genów miała odmienny przebieg. U roślin jednoliściennnych ewolucji podlegał gen *PHYA*, którego duplikacje doprowadziły do powstania wielu kopii tego genu np. pięć genów *PHYA* (A1–A5) kodujących izoformy fitochromu labilnego (HERSHEY i współaut. 1987). U roślin dwuliściennych duplikacje dotyczyły głównie genów *PHYB* i *PHYC*, które dały początek genom *PHYD* i *PHYE* u rzodkiewnika oraz *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* i *PHYF* u pomidora. Nie wszystkie duplikacje prowadziły do powstania funkcjonalnych genów fitochromowych. U grochu i kukurydzy stwierdzono także występowanie niefunkcjonalnych genów *PHYA* o niepełnej długości (PRATT 1995).



Ryc. 2. Ewolucja genów fitochromowych (według PRATTA 1995, zmodyfikowane).

REGULACJA AKTYWNOŚCI GENÓW FITOCHROMOWYCH

ANALIZA PROMOTORA *PHYA*

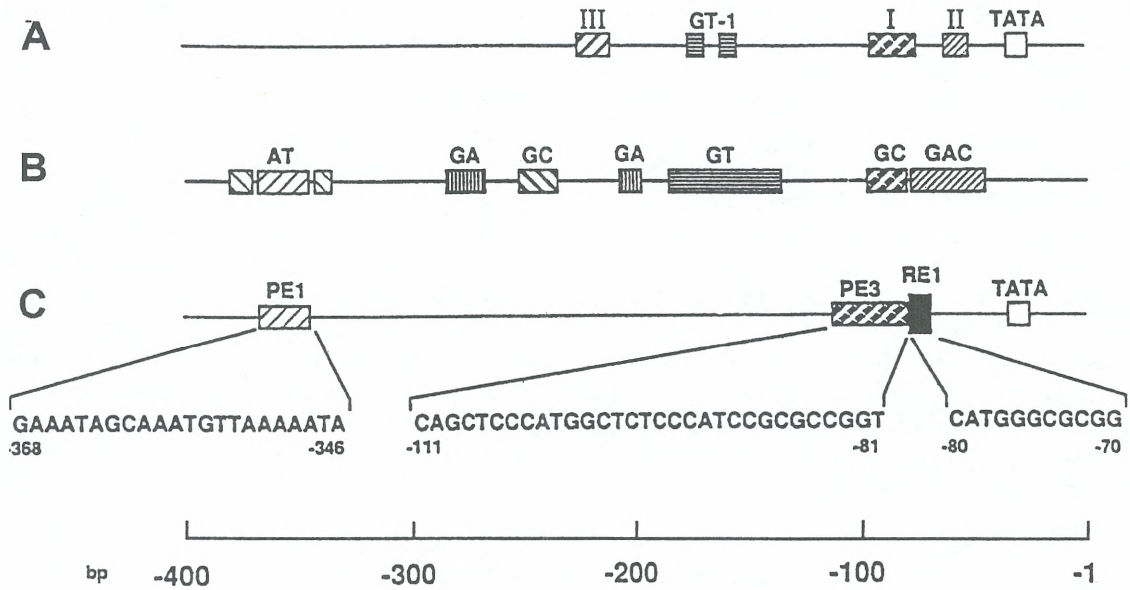
Podczas badań nad promotorem znaleziono konserwatywne motywy w sekwencjach wielu genów, których regulacja zależna jest od światła włączając w to geny *PHYA* (HERSHEY i współaut. 1987, DEHESH i współaut. 1990). Sekwencje promotorowe genów *PHYA* u ryżu i owsa oraz oddziaływanie pewnych motywów sekwencji promotorowych z białkami jądrowymi było badane przez BRUCE i współpracowników (1991) na *PHYA* ryżu oraz DEHESHA i współpracowników (1992) na *PHYA3* owsa.

Dla określenia które elementy promotorowe są istotne dla inicjacji transkrypcji transformowano rośliny zmutowanymi genami *PHYA*, które utraciły specyficzne elementy promotorowe. Na tej podstawie ustalono, że w promotorze *PHYA3* owsa (pozycja -400 bp od miejsca startu transkrypcji) występują 2 cis aktywne elementy wpływające pozytywnie na poziom transkrypcji tego genu. Są to tak zwane PE1 (leżący w pozycji -381 do -348 bp od miejsca startu transkrypcji) i PE3 (od -110 do -76 bp). Region PE3 zawiera sekwencje bogate w G i C i jest to bardzo konserwatywny element spotykany także u ryżu i kukurydzy, natomiast fragment PE1, bogaty w A i T, nie ma ścisłej homologii z pozostałymi promotorami. W trakcie tych analiz odkryto także negatywnie działający element RE1, który kieruje indukowaną przez P_{fr} represją transkrypcji. Jest to element około 11 bp bogaty w G i C, który zlokalizowany jest w okolicy -75 od

miejsca startu transkrypcji, obok PE3. Przypuszcza się, że w tym odcinku siedmio nukleotydowy fragment CATGGC odgrywa regulacyjną rolę wchodząc w skład tak zwanego Box I. Jego komplementarna sekwencja GCCATG występuje na PE3 i wydaje się, że ten odcinek może odgrywać ważną rolę w interakcji pomiędzy PE3 i RE1. Rycina 3 ukazuje budowę promotora *PHYA3* u owsa.

Model regulacji transkrypcji *PHYA3* owsa został zaproponowany przez BRUCE i współpracowników (1991). Przy nieobecności P_{fr} czynniki transkrypcyjne PF1 i PF3 wiążą się z miejscami promotorowymi genów tak zwane miejscami PE1 i PE3. Oddziaływanie z czynnikami promotorowymi pozwala na utworzenie kompleksu inicjującego transkrypcję i w ten sposób gen zostaje zaktywowany. Obecność natomiast czynnika represyjnego RF1, rozrywającego oddziaływanie pomiędzy PF1 i PF3, a miejscami promotorowymi, niszczy kompleks inicjujący, hamując tym samym transkrypcję.

Promotor genu *PHYA* u ryżu zawiera motywy podobne do PE3 u owsa, ale zamiast elementu PE1 zawiera on 3 elementy leżące powyżej miejsca startu transkrypcji tzw. elementy GT-box, z których GT2-box jest bardzo istotny dla aktywacji transkrypcji (DEHESH i współaut. 1990). Ci sami autorzy (1992) dodatkowo stwierdzili, że białko GT2 ma wysokie powinowactwo dla elementów promotora GT2-box i GT3-box, a o wiele niższe do GT1-box. Zsekwencjonowanie białka GT2 i analiza budowy wykazały, że GT2 zawiera regiony bogate w aminokwasy to jest



Ryc. 3. Budowa promotora genu *PHYA3* u owsa.

(A) Ułożenie elementów określone na podstawie podobieństwa promotorów *PHYA* u owsa, kukurydzy i ryżu. (B) Sekwencje zidentyfikowane jako miejsca wiążące białka. Zaznaczone elementy (AT, GA, GT, itd) wskazują na odcinki o dominacji tych nukleotydów. (C) Elementy zidentyfikowane jako funkcjonalne odcinki w regulacji lub ekspresji świetlnej promotora *PHYA3*.

prolinę, glutaminę, a bogactwo tych aminokwasów zostało stwierdzone także w innych białkach posiadających domeny aktywujące transkrypcję. Dodatkowo wysoko konserwatywne domeny tak zwane heliks-pętla-heliks (H-L-H) znajdują się w połowie końca C i połowie końca N. Wśród znanych czynników transkrypcyjnych struktura H-L-H jest znana jako region wiążący DNA (MURRE i współaut. 1989). Pomimo, że GT2 nie należy do tego typu czynników, wydaje się on być podobny do grupy białek tzw. homeoboks, które zawierają struktury trihelikalne oddziałujące z sekwencją hydrofobową promotora. Białko GT2 przyłącza się do obu odcinków GT2-box i GT3-box tzn., że białko to ma dwie domeny wiążące DNA, które łączą się z dwoma elementami promotora.

Badania promotorów *PHYA* u ryżu i owsa sugerują, że może istnieć rodzina funkcjonalnych *trans* działających czynników transkrypcyjnych, które oddziałują ze specyficznymi elementami promotora w procesie regulowanym przez światło.

Jest prawdopodobne, że kontrola tych czynników transkrypcyjnych, ich wiązania lub działania, jest ważnym etapem w ciągu zdarzeń zawartych pomiędzy działaniem światła, fitochromem, a zmianą ekspresji specyficznych genów wrażliwych na światło.

REGULACJA POZIOMU TRANSKRYPCJI GENU *PHYA*

Geny *PHYA* występujące u grochu (SATO 1988, TOMIZAWA i współaut. 1989) i rzodkiewnika (SHARROCK i QUAIL 1989) oraz prawdopodobnie także u innych roślin dwuliściennych, mają możliwe 3 miejsca startu transkrypcji, czego konsekwencją jest powstanie transkryptów o różnych rozmiarach. Zarówno u grochu, jak i u *Arabidopsis* najkrótszego transkryptu jest w komórkach najwięcej, a jego poziom jest regulowany przez światło.

Obecność krótkiego transkryptu u grochu (RNA1) jest regulowana w sposób odwracalny przez R/FR (TOMIZAWA i współaut. 1989), co sugeruje, że fitochrom sam jest włączony w kontrolowanie poziomu ilości obecnego transkryptu *PHYA*, na zasadzie autoregulacji. Nie wiadomo jednak czy kontrola ta zachodzi poprzez hamowanie transkrypcji, degradację RNA, czy też wspólnie poprzez oba te procesy.

Fotoregulacja poziomu transkrypcji genu *PHYA* jest silna zarówno u roślin jednoliściennych, jak i niektórych roślin dwuliściennych np. grochu (FURUYA 1989) czy ogórka (COTTON i współaut. 1990). U większości roślin dwuliściennych fotoregulacja jest jednak z reguły słaba.

Przeprowadzono doświadczenia na transgenicznej petunii, zawierającej gen reporterowy — glukuronidazy (GUS). Ten markerowy gen był połączony z promotorem genu *PHYA* z grochu. U roślin posiadających taki konstrukt stwierdzono wysoki poziom ekspresji GUS w roślinach etiolowanych, który ulegał zahamowaniu po zadziałaniu światła. Wynika z tego, że promotor jest aktywny w ciemności, a naświetlenie rośliny powoduje jego dezaktywację. To nasuwa przypuszczenie, że zarówno R jak i FR, mogą powodować gwałtowny spadek ilości transkryptu genu *PHYA* u siewek owsa rosnących w ciemności, i nawet bardzo mała ilość Pfr, która może być obecna po zadziałaniu czerwieni, wystarcza do zahamowania transkrypcji tego genu.

Wydaje się, że poziom represji transkrypcji jest taki sam zarówno po pulsie R, jak i FR, lecz

czas trwania hamowania jest znacznie dłuższy po działaniu R. Tak więc przedłużenie obecności fitochromu w formie Pfr jest potrzebne do utrzymania represji. To sugeruje, że fitochrom w formie niestabilnego Pfr jest odpowiedzialny za hamowanie transkrypcji genu *PHYA*.

Nie wydaje się jednak aby sam Pfr oddziałował z zależnymi od światła sekwencjami promotorowymi. Analiza drugorzędowej struktury białek (QUAIL i współaut. 1987) nie wykazała homologii z rozpoznawanymi czynnikami transkrypcji, które posiadają struktury wiążące DNA takie jak palce cynkowe lub domeny heliks-pętla-heliks. To wyklucza wcześniejsze założenie, że sama chromoproteina w formie Pfr wiąże się z sekwencjami promotorowymi genów fitochromowych.

MECHANIZM DZIAŁANIA FITOCHROMU

REAKCJE FITOCHROMOWE

Działające przez fitochrom światło może indukować wiele różnych reakcji fizjologicznych. Decydującą, regulatorową rolę odgrywa tu zarówno barwa, natężenie, jak i czas działania światła (SMITH 1995, SMITH i WHITELAM 1990).

Na tej podstawie wyróżnia się dwa typy reakcji: indukcyjne i wysokoenergetyczne (HIR) (FURUYA i SCHÄFER 1996).

Ponadto, pierwszy typ reakcji podzielić można na tak zwane: reakcje nisko i bardzo niskooenergetyczne (LFR i VLFR) (SMITH i WHITELAM 1990). Do wywołania reakcji VLFR wystarczają niewielkie dawki światła (w granicach $0.0001\text{--}0.1\text{ mmol} \times \text{m}^{-2}$), a odwracalność R/FR nie jest w tym przypadku możliwa. Ten typ reakcji spotykamy w siewkach rosnących w zupełnej ciemności, które nigdy jeszcze nie były ekspozowane na światło, lub w nasionach znajdujących się w glebie, nawet na głębokości 10 mm. Reakcje LFR inicjowane przez umiarkowane natężenie światła (od 1 do $1000\text{ mmol} \times \text{m}^{-2}$), są w pełni odwracane przez FR (SMITH 1995, SMITH i WHITELAM 1990), a ich efekt fizjologiczny zależy bezpośrednio od tego, która z długości fal świetlnych (R lub FR) została użyta jako ostatnia. Jak dotąd poznano ponad 100 różnych reakcji tego typu. Mają one duże znaczenie u roślin rosnących na świetle słonecznym jak i w siewkach znajdujących się bezpośrednio pod baldachimem innych roślin lub pod powierzchnią ziemi. Natomiast reakcje HIR wymagają ciągłego, wysokiego natężenia światła. Zależą one od czerwieni, dalekiej czerwieni, jak też od

stosunku obu długości fal (SMITH i WHITELAM 1990). Ten typ reakcji nie jest odwracany przez FR. Pomimo tego, że reakcje wysokoenergetyczne indukowane są poprzez długotrwałe naświetlanie roślin, najskuteczniejsze działanie ma światło długofalowe, czyli daleka czerwień.

Jak wiadomo obydwie długości fal świetlnych R i FR są aktywne fizjologicznie. Daleka czerwień inicjować może reakcje bardzo niskooenergetyczne oraz wysokoenergetyczne (QUAIL 1994, SMITH 1995). W tym wypadku FR powoduje przekształcenie niewielkiej puli P_r w Pfr, która po pochłonięciu kolejnej dawki dalekiej czerwieni wraca do formy P_r. Obok tych reakcji występować mogą jeszcze „klasyczne” reakcje fitochromowe, które wyzwalane są poprzez światło czerwone. W zależności od jego natężenia i czasu ekspozycji w tkankach roślin ustalać się mogą odmienne stany fotostacjonarne, co prowadzi do inicjacji różnych reakcji biochemicznych i morfogenetycznych (SMITH 1995, SMITH i WHITELAM 1990).

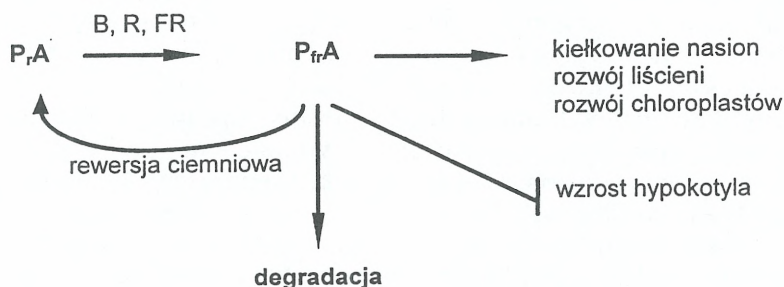
Obecnie przyjmuje się, że za kontrolę HIR oraz VLFR odpowiada fitochrom labilny natomiast reakcje LFR regulowane są przez stabilną pulę fotoreceptora (QUAIL, 1994). W pewnych jednak przypadkach przebieg tego samego procesu może podlegać kontroli przez obydwie pule fitochromu, mamy wtedy do czynienia z tzw. paradoksem fitochromowym. Wiadomo, że światło czerwone absorbowane przez fitochrom typu B indukuje deetiolację roślin. Z drugiej strony absorbowane przez fitochrom labilny światło dalekiej czerwieni reguluje także ten sam proces (poprzez reakcje HIR). Działanie fitochromu stabilnego ma miejsce u roślin pod-

danych bezpośredniemu wpływowi światła słonecznego. Natomiast u roślin rosnących pod baldachimem liści aktywowany jest fitochrom labilny. Działanie jednego typu fitochromu wyklucza jednocześnie udział drugiej puli tego fotoreceptora w kontroli tych samych reakcji fotomorfogenetycznych.

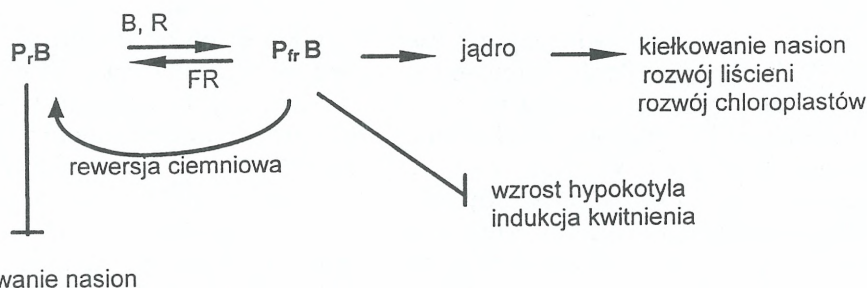
Opisane powyżej fizjologiczne właściwości fitochromu mają duże znaczenie ekologiczne. Rozwijające się w glebie siewki, gdy dotrą do jej powierzchni, poddane są głównie wpływowi światła czerwonego, które działa przez fitochrom stabilny. Natomiast gdy natężenie światła jest bardzo niskie lub gdy rozwój siewki odbywa się pod osłoną (baldachimem) liści, na-

nowy odpowiednich rezerw energetycznych, lub też przyspieszy swój wzrost i wyrośnie ponad ocieniającą ją baldachim w wyniku uruchomienia reakcji określanej mianem unikania zacielenia (ang. shade-avoidance) (SMITH i WHITELAM 1997). W tym wypadku decydującą rolę pełni fitochrom labilny (CASEL i współaut. 1997). Różne typy fitochromu są aktywne w kolejnych stadiach rozwojowych rośliny. Phy B kontroluje wszystkie etapy począwszy od kiełkowania nasion, a na indukcji kwitnienia kończąc (CHORY 1997). Phy A funkcjonuje głównie we wczesnych etapach rozwoju osobniczego rośliny. Obok nich pewne procesy mogą być dodatkowo kontrolowane przez inne geny fito-

A.



B.



Ryc. 4. Podstawowe procesy regulowane przez fitochromy labilny i stabilny.

(A) Zależności regulowane przez fitochrom A, (B) Zależności regulowane przez fitochrom B. Strzałki wskazują na proces indukcyjny, podczas gdy linie proste procesy hamowane przez fitochrom. Skróty oznaczają barwę światła: R, czerwoną; B, niebieską; FR, daleką czerwień.

siona lub kiełkujące siewki ekspozowane są na światło wzbogacone w daleką czerwień, która absorbowana jest przez fitochrom labilny. Stąd też bez względu na warunki świetlne otoczenia roślina otrzymuje sygnał niezbędny do zainicjowania procesu deetiolacji. Zazielenienie się siewki to kluczowy etap jej dalszego rozwoju. Tak więc, gdy roślina rozwija się w warunkach pełnego dostępu światła, dominującą funkcję w jej rozwoju spełnia fitochrom stabilny (SMITH 1995). Jednakże, jeśli jest ona zaciéniana przez liście innych roślin, to albo zginie z braku od-

chromowe, kodujące fitochrom stabilny. Wzorcowe procesy regulowane przez obie pule fitochromu zostały przedstawione na Rycinie 4.

PIERWOTNY MECHANIZM DZIAŁANIA FITOCHROMU

W latach 60-tych pojawiło się szereg hipotez, które ukierunkowały badania nad mechanizmami fotomorfogenezy roślin. We wszystkich niemal modelach postulowano oddziaływanie fitochromu z błonami komórkowymi. Oddziaływanie to może mieć różnorodny charakter, to

jest fitochrom mógłby być 1) integralnym składnikiem lub pozostawać silnie wiązany z błonami, 2) peryferycznym białkiem błonowym lub 3) występować w cytoplazmie i oddziaływać na błony poprzez wtórne przekazniki.

Fitochrom prawdopodobnie nie jest integralnym, trwale powiazanym z błonami składnikiem, jednakże wykazuje zdolność wiązania się z nimi. Postuluje się więc, że pierwotny mechanizm działania fitochromu polega na modyfikacji właściwości błon komórkowych, prowadząc do uwalniania wtórnych przekazników (VINCE-PRUE 1993).

Do najszybciej zachodzących zjawisk, zależnych od fitochromu, można zaliczyć zmiany potencjałów powierzchniowych i błonowych (patrz TRETYN 1989). Światło czerwone stymuluje depolaryzację błon komórek miękkich, podczas gdy światło dalekiej czerwieni powoduje niewielką hiperpolaryzację u długodniowego gatunku *Lemna paucicostata* (LOPPERT i współaut. 1978). Zmiany potencjałów błonowych są wynikiem zróżnicowanego wpływu światła czerwonego i dalekiej czerwieni na transport jonów przez plazmolemę. Wykazano, że fitochrom reguluje transport między innymi jonów H^+ , K^+ , Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} oraz jonów nieorganicznego fosforu (P_i) (PIWOWARCZYK 1988). Światło czerwone podwyższa tempo pobierania i akumulacji Ca^{2+} w komórkach zarodków *Onoclea sensibilis*, protoplastach etiolowanych liści kukurydzy i pszenicy oraz w wycinkach etiolowanych koleoptyli owsa. W doświadczeniach z zastosowaniem agonistów i antagonistów kanałów wapniowych oraz chelatorów jonów wapnia wykazano, że fotokonwersji P_r do P_{fr} towarzyszy również aktywacja kanałów wapniowych. Postuluje się, że w łańcuchu transdukcji sygnału świetlnego forma P_{fr} fitochromu prowadzi, poprzez szlak przemian fosfatydylinozytolu do otwierania kanałów wapniowych w plazmolemie. Jony wapniowe transportowane są do cytoplazmy zaś wzrost stężenia wolnego cytoplazmatycznego wapnia powoduje aktywację kalmoduliny i powstawanie kompleksu Ca -kalmodulina. Kompleksy te oddziałują na kinazy białkowe, co z kolei umożliwia fosforylację szeregu białek docelowych, prowadząc do aktywacji genów. Dane eksperymentalne wskazują również, że jony wapnia mogą pełnić rolę wtórnego przekazników procesie indukcji generatywnej (TRETYN i KOPCEWICZ 1989).

ŁAŃCUCH TRANSDUKCJI SYGNAŁU ŚWIETLNEGO

Absorpcja światła przez fitochrom inicjuje kaskadę określonych reakcji, które prowadzą do zmian we wzroście i rozwoju roślin. Ostatnio

poczyniono znaczny postęp w badaniach nad kontrolowanymi przez światło szlakami transdukcji sygnałów. Doświadczenia te prowadzone są zarówno na poziomie komórkowym (BOWLER 1997), jak i molekularnym (WU i LAGARIAS 1997). Powstało szereg hipotez tłumaczących te zjawiska.

Pod koniec lat osiemdziesiątych stwierdzono, że pewne sekwencje aminokwasowe fitochromu mogą odpowiadać za funkcjonowanie fitochromu jako kinazy białkowej. Wykazano, że izolowana chromoproteina posiada zdolności do autofosforylacji reszt serynowych i posiada homologię do eukariotycznych serynowo/treoninowo/tyrozynowych kinaz białkowych. Jednakże z wyjątkiem fitochromu wyizolowanego z *Ceratodon purpureus* oraz *Adiantum* żaden z badanych peptydów fitochromowych nie miał wszystkich konserwatywnych motywów przypisywanych eukariotycznym kinazom białkowym (HANKS i QUINN 1991), a wcześniej stwierdzone właściwości okazały się być artefaktami wynikającymi z niezbyt dokładnego oczyszczenia preparatów. W pracowni Lagarias (YEH i LAGARIAS 1998) po przeprowadzeniu szeregu analiz, powrócono jednak do powyższej hipotezy. Stwierdzili oni, że fitochrom organizmów eukariotycznych jest odmianą kinazy histydynowej, której enzymatyczna aktywność różni się jednak od tej obserwowanej u organizmów prokariotycznych. Zmiana ta mogła się pojawić podczas ewolucji fitochromu i być związana z procesem duplikacji.

HOFMANN i współaut. (1991) udowodnili, że fitochrom podobnie jak inne białka, jest dobrym substratem dla kinaz białkowych. W etiolowanych wierzchołkach koleoptyli owsa światło czerwone powoduje szybki wzrost fosforylacji białka o masie 32 kDa, a obniża fosforylację białka o masie 29 i 33 kDa. Światło dalekiej czerwieni odwraca ten efekt (OTTO i SCHÄFER 1988). W etiolowanych protoplastach *Avena sativa* kontrolowanej przez fitochrom fosforylacji ulegają dwa białka 27 i 32 kDa. Postuluje się więc, że fitochrom wpływa na poziom fosforylacji wielu białek w komórkach *in vivo*. Jednym z białek, którego fosforylacja jest regulowana przez światło są kinazy białkowe czynników regulatorowych działających w pozycji *trans* (trans-acting factors). Fosforylacja tych czynników odgrywa ważną rolę w kontroli ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą fitochromu.

W badaniach nad pęcznieniem etiolowanych protoplastów pszenicy z użyciem agonistów i antagonistów wykazano, że nie tylko aktywacja białka G, lecz również aktywacja fosfolipazy C, kalmoduliny, kinazy białkowej C,

enzymów zależnych od cyklicznego AMP, odgrywają istotną rolę w transdukcji sygnału od fitochromu do odpowiedzi w komórkach pszenicy.

W wyniku naświetlania tkanek światłem czerwonym obserwuje się również zmiany w metabolizmie fosfatydyloinozytolu, które są odwracane światłem dalekiej czerwieni. Okazało się, że uwalnianie IP₃ z formy związanej chemicznie wewnątrz komórek protoplastów pszenicy może zastępować światło czerwone w indukowaniu zależnego od Ca²⁺ pęcznienia tych komórek (SHACKLOCK i współaut. 1992).

Badania przeprowadzone w pracowni N.-H. Chuay (WU i LAGARIAS 1997) doprowadziły do bliższego ustalenia poszczególnych etapów kontrolowanych przez światło szlaków transdukcji sygnałów. Stwierdzono, że fitochrom A przypuszczalnie kontroluje trzy szlaki transdukcji sygnałów świetlnych (BOWLER, 1997). Pierwszy z nich jest bezpośrednio zależny od Ca²⁺, a jego uruchomienie prowadzi do aktywacji genów kodujących białka fotosystemu II i częściowego rozwoju chloroplastów. Drugi szlak, zależny od cyklicznego GMP, kontroluje aktywność transkrypcyjną syntazy chalkonowej, kluczowego enzymu katalizującego syntezę antocjanów. Na przebieg trzeciego mają wpływ zarówno jony wapnia, jak i cząsteczki cGMP, a jego aktywacja niezbędna jest do ekspresji genów kodujących składniki fotosystemu I i hamowania aktywności genu syntazy asparaginianowej. Fakt istnienia kilku różnych, kontrolowanych przez fitochrom A, szlaków transdukcji sygnału został również potwierdzony w badaniach prowadzonych na mutancie *Arabidopsis*, u którego defekt dotyczył genu FHY1 (WHITELAM i inni, 1993). Badacze ci do listy genów kontrolowanych przez fitochrom labilny dołączyli kolejne, CHI (izomeryzy chalkonowej), NR (reduktazy

azotanowej) oraz PORA (oksydoreduktazy NADPH: protochlorofilid).

Dane te dotyczą składników szlaku transdukcji sygnałów świetlnych kontrolowanych przez labilną pulę fitochromu. Jak dotąd mało wiadomo o szlakach fototransdukcji indukowanych przez fitochrom stabilny. Wyjątkiem jest praca Wagnera i innych (1997). Badaczom tym udało się wyselekcjonować mutant, u którego defekt dotyczy genu RED1, uczestniczącego w zależnej od PhyB transdukcji sygnału (WAGNER i współaut. 1996).

Należy zaznaczyć, że uruchomienie różnych szlaków transdukcji prowadzić może nie tylko do aktywacji określonych genów, ale także do represji innych.

Nowym niezwykle interesującym zagadnieniem w badaniach transdukcji sygnałów świetlnych jest kwestia współdziałania fitochromowego i węglowodanowego szlaku transdukcji sygnału. Od pewnego czasu wiadomo, że niektóre cukry regulują aktywność pewnych enzymów uczestniczących w fotosyntezie, hamują ekspresję genów związanych z fotosyntezą, a także regulują ekspresję innych. Na zainteresowanie zasługuje rola sacharozy w modulowaniu efektów wywoływanych przez światło w tym również przez układ fitochromowy. Wykazano, że sacharoza znosi ekspresję genów indukowanych przez światło, a także wyselekcjonowano mutant *sun*, u którego nie występuje represja przez sacharozę tych genów, które podlegają indukcji przez układ fitochromowy (patrz DIJKWEL i współaut. 1997).

Można przypuszczać, że w przyszłości dużo uwagi poświęconej zostanie badaniom szlaków transdukcji sygnałów kontrolowanych przez fitochrom stabilny oraz współdziałaniu fitochromu z węglowodanowymi łańcuchami transdukcji sygnału.

MUTANTY I FITOCHROMOWE ROŚLINY TRANSGENICZNE

Pierwszy potencjalny mutant fitochromowy został wykryty w 1980 roku w pracowni C. J. P. Spruita przez M. KOORNNEEFA i współaut. (1980). U części siewek, wyrosłych z naświetlanych promieniowaniem x nasion *Arabidopsis* nie stwierdzono hamującego wpływu światła białego na wydłużanie się hypocotyli. Mutanty te, oznaczone jako *hy* (od ang. hypocotyl), swoim pokrojem przypominały etiolowane siewki rzodkiewnika. Mutanty fitochromowe podzielić można na dwie zasadnicze grupy: 1) mutanty ze zmienioną budową cząsteczek fotoreceptora (chromoforu i części białkowej), 2) mutacje dotyczące różnych elementów indukowanego

przez światło i regulowanego przez fitochrom łańcucha transdukcji sygnału. Mutanty pierwszej grupy dotyczą zarówno labilnego (phyA), jak i stabilnego (phyB) fitochromu. Najbardziej znane mutanty fitochromu labilnego to: *hy1*, *hy2*, *hy6* i *hy8 Arabidopsis* oraz *au* (aurea) pomidora (TRETYN i KOPCEWICZ 1993). Rosnące w ciemności siewki tych mutantów nie odbiegają w wyglądzie od siewek form dzikich. Jednakże ich przeniesieniu na światło nie towarzyszy zahamowanie wzrostu hypocotyli, synteza chlorofilu i akumulacja antocyjanin (u *au*).

Jednym ze zjawisk kontrolowanych przez stabilną pulę fitochromu (phyB) jest tak zwany

efekt końcowodniowego naświetlania daleką czerwienią (EOD-FR). Stosowanie EOD-FR służy m.in. do selekcjonowania mutacji dotyczących stabilnej puli fitochromu. Do tej pory poznano szereg mutantów phyB. Najlepiej scharakteryzowanymi jest mutant *hy3* u *Arabidopsis* (SOMERS i współaut. 1991) i *lh* (ang. long hypocotyl) u ogórka (KOORNEEF i KNAPP 1983).

Poznano również szereg mutacji, które bezpośrednio nie wpływając na poziom fitochromu labilnego i stabilnego mają jednak zasadniczy wpływ na przebieg indukowanych przez fitochrom procesów fotomorfogenezy, dotyczą więc łańcucha transdukcji sygnałów świetlnych. Niektóre z tych mutacji, jak np. *hp* (ang. high pigment) ujawniają się w obecności światła, inne natomiast dają o sobie znać w etiolowanych siewkach. Wiele mutacji typu *det* (ang. deetiolated) i *cop* (ang. constitutively photomorphogenic) u *Arabidopsis* oraz mutacja *lip* (ang. light-independent photomorphogenesis) u grochu, prowadzą do unikalnej inicjacji procesów morfogenezy bez udziału światła (TRETYN i KOPCEWICZ 1993).

Czynione są również udane próby wprowadzania genów fitochromowych izolowanych z

roślin jedno- i dwuliściennych do innych roślin. I tak np. do tytoniu wprowadzono phyA owsa i ryżu, do pomidora phyA owsa, a do *Arabidopsis* phyB ryżu lub dodatkowy gen phyB rzodkiewnika (WAGNER i współaut. 1991). We wszystkich uzyskanych roślinach transgenicznym wprowadzony obcy gen fitochromowy włączony był do genomu gospodarza i ulegał transkrypcji.

Użycie fitochromowych mutantów oraz roślin transgenicznym jest niezwykle ważnym narzędziem służącym do bliższego poznania roli i mechanizmu działania fitochromu w kontroli wzrostu i rozwoju roślin. Badania mechanizmów fotomorfogenezy roślin oprócz fitochromu dotyczą również hormonów roślinnych. Między fitochromem a hormonami istnieją wielorakie współzależności w regulacji morfogenezy roślin. Intensywnie rozwijają się badania nad mutantami auksyn, giberelin, cytokinin, etylenu i kwasu abscysynowego. Badania te w sposób naturalny łączą się z badaniami fitochromowymi, ponieważ w wielu przypadkach zaburzenie biosyntezy bądź funkcji fitohormonów leży u podstaw wyselekcjonowania określonych mutantów fitochromowych.

GENETIC AND MOLECULAR BASIS OF PHYTOCHROME FUNCTIONING IN PLANTS

Summary

The photomorphogenetic photoreceptor has been extensively characterized at the chromophore, protein and gene level. The growth and development of higher plants is regulated by a group of phytochromes that are structurally similar but functionally distinct. Conclusive evidence for the presence of distinct types of phytochromes in a single plant species was first provided by cloning and sequencing of five genes from the *Arabidopsis* genome (*PHYA-E*). In a further step, cDNA and genomic DNA of phytochrome genes was cloned and sequenced from various seed plants, ferns, mosses and algae. The different members of the phytochrome family display a marked diversity among their amino acid sequences, and phytochrome genes are differentially expressed. Due to the isolation and analysis of mutants that

display loss of function for individual proteins of the phytochrome family, there is mounting evidence that different phytochromes play different roles in plant photomorphogenesis. Light signal-transduction pathways are a central component of the mechanism by which phytochromes regulate plant development. These pathways provide the means by which information from light at specific wavelengths may be amplified and coordinated, resulting in complex physiological and developmental responses. This review focuses upon recent approaches towards establishing the intermediates that transmit signals from phytochrome to target elements in the promoters of light-regulated genes.

LITERATURA

- ADAM E., KOZMABOGNAR L., SCHFER E., NAGY F. 1997. *Tabbaco phytochromes genes, structure and expression*. Plant Cell Environ. 20, 678-684.
- BORTHWICK H. A., HENDRICKS S. B., PARKER M. W., 1952. *The reaction controlling floral initiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 38, 929-934.
- BOWLER C., 1997. *The transduction of light signals by phytochrome*. [W:] *Signal Transduction in Plants*. ADUCCI P. (red.) Basal, Birkhäuser Verlag. 137-152.
- BRUCE W.B., DENG X.W., QUAIL P.H., 1991. *A negatively acting DNA sequence element mediates phytochrome-directed repression of PHYA gene transcription*. EMBO J. 10, 3015-3024.
- CASEL J. J., SANCHEZ R. A., YANOWSKY M. J., 1997. *The function of phytochrome A*. Plant Cell Environ. 20, 813-819.
- CHERRY J. R., HONDRED D., WALKER J. M., KELLER J. M., HERSHEY H. P., VIERSTRA R. D., 1993. *Carboxy-terminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity*. Plant Cell 5, 565-575.
- CHORY J., 1997. *Light modulation of vegetative development*. Plant Cell 9, 1225-1234.
- CLACK T., MATHEWS S., SHARROK A., 1994. *The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE*. Plant Mol. Biol. 25, 413-427.
- CORDONNIER M.-M., 1989. *Monoclonal antibodies: molecular probes for the study of phytochrome*. Photochem. Photobiol. 49, 821-831.
- COTTON J. L. S., ROSS C.W., BYRNE D. H., COLBERT J. T., 1990. *Down-regulation of phytochrome mRNA abundance by*

- red light and benzyladenine in etiolated cucumber cotyledons. *Plant Mol. Biol.* 14, 707-714.
- CYMERSKI M., KOPCEWICZ J., 1995. *Labile phytochrome and photoperiodic flower induction in Pharbitis nil* Chois. *The irreversible phytochrome hypothesis*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 63: 275-279.
- DEHESH K., BRUCE W. B., QUAIL P. H., 1990. A trans-acting factor that binds to a GT-motif is a phytochrome gene promoter. *Science* 250, 1397-1399.
- DEHESH K., HUNG H., TEPPERMAN J., QUAIL P. H., 1992. A transcription factor with two autonomous DNA-binding domains of closely related but different target sequence specificity. *EMBO J.* 11, 4131-4144.
- DIJKWELL P. P., HUIJSER C., WEISBEEK P. J., CHUA N-H., SMEEKENS S. C. M., 1997. Sucrose control of phytochrome A signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9, 583-595.
- FURUYA M., 1989. Molecular properties and Biogenesis of phytochrome I and II. *Adv. Biophys.* 25, 133-167.
- FURUYA M., 1993. Phytochromes: their molecular species, gene, families and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 617-645.
- FURUYA M., SCHÄFER E., 1996. Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *TIPS* 1, 301-307.
- FURUYA M., SONG P-S., 1994. Assembly and properties of holophytochrome. [W:] *Photomorphogenesis in Plants*. KENDRICK R. E., KRONENBERG G. H. M. (red.) Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, str. 105-140.
- HANKS S. K., QUINN A. M., 1991. Protein kinase catalytic domain sequences database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. [W:] *Protein Phosphorylation, Part A, Protein Kinases: Assays, Purification, Antibodies, Functional Analysis, Cloning and Expression*. HNTERT T, SEFTON B. M. (red). San Diego, Academic Press, str. 38-62.
- HERSHEY H. P., BARKER R. F., IDLER K. B., MURRAY M. G., QUAIL P. H., 1987. Nucleotide sequence and characterization of a gene encoding the phytochrome polypeptide from *Avena*. *Gene* 61, 339-348.
- HOFMANN E., GRIMM R., HARTEK K., SPETH V., SCHÄFER E., 1991. Partial purification of sequestered particles of phytochrome from oat *Avena sativa* L. seedlings. *Planta* 183, 265 - 273.
- HOLDSWORTH M. L., WHITELAM G. C., 1987. A monoclonal antibody specific for the red-absorbing form of phytochrome. *Planta* 172, 539-547.
- KANEKO T., SATO N., KOTANI H., TANAKA A., ASAMIZU E., NAKAMURA Y., MIYAJIMA N., HIROSAWA M., SUGIURA M., SAKAMOTO S., KIMURA T., HOSOUCHI T., MATSUNO A., MURAKI A., NAKAZAKI N., NARNO K., OKIMURA S., SHIMPO S., TAKEUCHI C., WADA T., WATANABE A., YAMADA M., YASUDA M., TABATA S., 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109-136.
- KEHOE D. M., GROSSMAN A. R., 1996. Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273, 1049-1411.
- KOORNNEEF M., KNAPP B. J., 1983. Another long hypocotyl mutant at the lh locus. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 6, 13-14.
- KOORNNEEF M., ROLFF E., SPRUIT C. J. P., 1980. Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* L. HEYNH. *Z. Pflanzenphysiol.* 100, 147-160.
- LOPEZ-JUEZ E., NAGATANI A., TOMIZAWA K-I., DEAK H., KERN R., KENDRICK R. E., FURUYA M., 1992. The cucumber long hypocotyl mutant lacks a light-stable phy B-like phytochrome. *Plant Cell* 4, 241-251.
- LOPPERT H., KRONENBERGER W., KANDLER R., 1978. Phytochrome-mediated changes in the membrane potential of subepidermal cells of *Lemna paucicostata* 6746. *Planta* 138, 133-136.
- MURRE C., MCCAW S. P., BALTIMORE D., 1989. A new DNA-binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, myoD and myoE proteins. *Cell* 56, 777-783.
- NAKASAKO M., WADA M., TOKUTOMI S., YAMAMOTO K. T., SAKAI J., KATAOKA M., TOKUNAGA F., FURUYA M., 1990. Quaternary structure of pea phytochrome I dimer studied with small-angle X-ray scattering and rotary-shadowing electron microscopy. *Photochem. Photobiol.* 52, 3-12.
- OTTO V., SCHÄFER E., 1988. Rapid phytochrome-controlled protein phosphorylation and dephosphorylation in *Avena sativa*. *Plant Cell Physiol.* 29, 1115-1121.
- PARKER W., ROMANOWSKI M., SONG P-S., 1991. Conformation and its functional implications in phytochrome. [W:] *Phytochrome properties and biological action*. THOMAS B., JOHNSON C. B. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. NATO ASI series H: Cell Biol. 50, str. 85-112.
- PIWOWARCZYK W., 1988. The effect of red and far-red light on proton secretion from mesophyll-cell protoplasts of *Vicia faba* L. *Planta* 173, 42-45.
- PRATT L. H., 1992. Antibodies and the Study of Phytochrome. [W:] *Plant Physiology*. SALISBURY F. B., ROSS C. W. (red.) Wadsworth Publishing Company Belmont, California, 4-th edition, str. 444-447.
- PRATT L. H., STEWART S. J., SHIMAZAKI Y., WANG Y., CORDONNIER M-M., 1991. Monoclonal antibodies directed to phytochrome from green leaves of *Avena sativa* L. cross-react weakly or not at all with the phytochrome that is most abundant in etiolated shoots of the same species. *Planta* 184, 87-95.
- QUAIL P. H., 1994. Phytochrome genes and their expression. [W:] *Photomorphogenesis in Plants*. KENDRICK R. E., KRONENBERG G. H. M. (red.) Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, str. 71-104.
- QUAIL P. H., BARKER R. F., COLBERT T. J., DANIELS S. M., HERSHEY H. P., IDLER K. B., JONES A. M., LISSEMORE J. L., 1987. Structural features of the phytochrome molecule and feedback regulation of the expression of its and genes in *Avena*. [W:] *Molecular Biology of Plant Growth Control*. FOX J. E., JACOBS M. (red.) Alan R. Liss, New York, str. 425-439.
- QUAIL P. H., GATZ C., HERSHEY H. P., JONES A. M., LISSEMORE J-L., PARKS B. M., BARKER R. F., IDLER K., MURRAY M. G., KOORNNEEF M., KENDRICK R. E., 1989. [W:] *Phytochrome and Photoregulation in Plants*. FURUYA M., (red.) Academic Press Inc., Tokyo, str. 23-37.
- SATO N., 1988. Nucleotide sequence and expression of the phytochrome gene in *Pisum sativum*: Differential regulation by light of multiple transcripts. *Plant Mol. Biol.* 11, 697-710.
- SCHNEIDER-POETSCH H.A.W., MARK S., KOLUKISAOGU H., HANDEL S., BRAUN B., 1994. Phytochrome evolution: phytochrome genes in ferns and mosses. *Physiol. Plant.* 91, 241-259.
- SHACKLOCK P. S., REED N. D., TREWAVAS A. J., 1992. Cytosolic free calcium mediated red light-induced photomorphogenesis. *Nature* 358, 753-755.
- SHARROCK R. A., QUAIL P. H., 1989. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* 3, 1745-1757.
- SHIMAZAKI Y., PRATT L. H., 1985. Immunochemical detection with rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies of different pools of phytochrome from etiolated and green *Avena* shoots. *Planta* 164, 333-344.
- SHIMAZAKI Y., PRATT L. H., 1986. Immunoprecipitation of phytochrome from green *Avena* by rabbit antisera to

- phytochrome from etiolated Avena*. *Planta* 168, 512–515.
- SMITH H., 1995. *Physiological and ecological function within the phytochrome family*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 289–315.
- SMITH H., WHITELAM G. C., 1990. *Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles*. *Plant Cell Environ.* 13, 695–707.
- SMITH H., WHITELAM G. C., 1997. *The shade avoidance syndrome – multiple responses mediated by multiple phytochromes*. *Plant Cell Environ.* 20, 840–844.
- SOMERS D. E., SHARROCK R. A., TEPPERMAN J. M., QUAIL P. H., 1991. *The hy3 long hypocotyl mutant of Arabidopsis is deficient in phytochrome B*. *Plant Cell* 3, 1263–1274.
- THÜMMLER F., DUFNER M., KREISEL M., DITTRICH P., 1992. *Molecular cloning of a novel phytochrome gene of the moss Ceratodon purpureus which encodes a putative light-regulated protein kinase*. *Plant Mol. Biol.* 20, 1003–1017.
- TOMIZAWA K. I., SATO N., FURUYA M., 1989. *Phytochrome control of multiple transcripts of the phytochrome gene in Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* 12, 295–99.
- TRETYN A., KOPCEWICZ J., 1993. *Mutanty fitochromowe w badaniu fotomorfogenezy roślin*. *Post. Biol. Kom.* 20: 435–446.
- TRETYN A., KOPCEWICZ J., 1989. *Rola wapnia w mechanizmie działania fitochromu*. *Wiad. Bot.* 33, 2, 65–78.
- TRETYN A., CZAPLEWSKA J., CYMERSKI M., KOPCEWICZ J., KENDRICK R. E., 1994. *The mechanism of calcium action on flower induction in Pharbitis nil*. *J. Plant Physiol.* 144: 562–568.
- VINCE-PRUE D., 1993. *The duration of light and photoperiodic responses*. [W:] *Photomorphogenesis in plants*. Kluwer Academic Publisher.
- WADA M., KANEGAE T., NOZUE E., FUKUDA Y., 1997. *Cryptogam phytochromes*. *Plant Cell Environ.* 20, 685–690.
- WAGNER D., TEPPERMAN J. M., QUAIL P. H., 1991. *Overexpression of phytochrome B induces a short hypocotyl phenotype in transgenic Arabidopsis*. *Plant Cell* 3, 1275–1288.
- WAGNER D., KOLOSZVARI M., QUAIL P. H., 1996. *Two small spatially distinct regions of phytochrome B are required for efficient signalling rates*. *Plant Cell* 8, 859–871.
- WHITELAM G. C., JOHNSON E., PENG J., CAROL P., ANDERSON M. L., COWL J. S., HARBERD N. P., 1993. *Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wide-type phenotype in white light*. *Plant Cell* 5, 757–768.
- WU S. H., LAGARIAS J. C., 1997. *The phytochrome photoreceptor in the green alga Mesotaenium caldariorum – implication for a conserved mechanism of phytochrome action*. *Plant Cell Environ.* 20 691–699.
- YEH K.-C., LAGARIAS J. C. 1998. *Eukaryotic phytochrome: Light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13976–13981.
- ZHENG C.-C., O'NEILL S. D., 1996. *Structure and expression of four phytochrome genes in Pharbitis nil, a model photoperiodic system*. *Plant Physiol.* 6, 43.