

Fototropina2 - regulacja i funkcja

Olga Sztatelman

Fototropiny są receptorami odpowiedzialnymi za ruchowe reakcje roślin na zmiany warunków świetlnych. *Arabidopsis thaliana* posiada dwa geny kodujące fototropiny, *PHOT1* i *PHOT2*; produkty obu tych genów różnią się wrażliwością na światło, ale ich funkcje są w dużej mierze podobne: pośredniczą w m.in. fototropizmie, reakcji akumulacji chloroplastów w słabym świetle i otwieraniu aparatów szparkowych. Spektakularnym wyjątkiem jest reakcja ucieczki chloroplastów pod wpływem silnego światła niebieskiego, którą wywołuje wyłącznie fototropina2.

Wobec podobieństw funkcjonalnych obu fotoreceptorów zaskakująca jest ich odmienna regulacja przez światło: po naświetleniu etiolowanych siewek obserwowano wzrost poziomu mRNA i białka fototropiny2, podczas gdy ilość transkryptu i białka fototropiny1 ulega zmniejszeniu. W niniejszej pracy badano, który z mechanizmów kontroli ekspresji genów pod wpływem światła jest odpowiedzialny za zmiany poziomu mRNA fototropin w *Arabidopsis thaliana*. W tym celu wykorzystano mutanty różnych fotoreceptorów: fitochromówA i B, kryptochromów1 i 2 oraz fototropin. Metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym oznaczano zmiany poziomu transkryptów fototropin pod wpływem światła niebieskiego i czerwonego w dorosłych liściach roślin typu dzikiego i mutantów. Regulacja poziomu mRNA fototropiny1 zależała od obecności kryptochromu1 i fitochromuB. Natomiast poziom RNA fototropiny2 zwiększał się pod wpływem światła we wszystkich badanych mutantach; jedyne obserwowane różnice były natury ilościowej, wskazując na zaangażowanie większości badanych fotoreceptorów w regulację ekspresji *PHOT2*. Doświadczenia z użyciem inhibitora fotosyntetycznego transportu elektronów (DCMU) wykazały brak wpływu fazy jasnej fotosyntezy na zmiany poziomu transkryptów fototropin pod wpływem światła.

Fototropiny składają się z dwóch funkcjonalnych fragmentów: N-końcowej części sensorycznej oraz C-końcowej domeny efektorowej - kinazy serynowo-treoninowej. W ciemności kinaza jest nieaktywna. Absorbacja światła w domenie sensorycznej powoduje zmiany konformacyjne białka, prowadzące do aktywacji kinazy. Pierwszym celem kinazy fototropinowej jest ona sama i dla fototropiny1 autorosforylacja jest niezbędna do przekazu sygnału. Fosforylowana fototropina2 ulega defosforylacji przez fosfatazę białkową 2A; upośledzenie aktywności tej fosfatazy skutkuje zwiększeniem amplitudy reakcji fototropicznej siewek zależnej od phot2.

Ponieważ dostępne dane dotyczą wyłącznie fototropizmu, zbadano wpływ inhibitorów fosfataz białkowych (endotalu i kantarydyny) na ruchy chloroplastów. Wykazano, że inhibitory te w stężeniu 50 μ M (kantarydyna) i 60 μ M (endotal) niemal całkowicie hamują przemieszczenia chloroplastów. Natomiast po zastosowaniu trzykrotnie niższych stężeń obserwowano częściową inhibicję zarówno ucieczki, jak i akumulacji chloroplastów. Nie zaobserwowano różnic w ruchach chloroplastów w odpowiedzi na światło ciągłe i impulsy silnego światła w mutantach z upośledzoną ekspresją podjednostek fosfatazy białkowej PP2A (RCN1, B' γ , B' η). Dane te wskazują, że defosforylacja białek jest niezbędna w procesie ruchu chloroplastów, jednakże

zaangażowane fosfatazy, jak i defosforylowane białka wciąż pozostają nieustalone.

Fosforylacja białek jest tylko jednym z typów modyfikacji potranslacyjnych, które zachodzą w komórkach. Innym zjawiskiem jest kowalencyjna modyfikacja przez białka podobne do ubikwityny (Ubiquitin-like proteins, UBLs), z których jednymi z lepiej poznanych są białka SUMO (Small Ubiquitin-like Modifiers). Inaczej niż w wypadku ubikwityny, modyfikacja przez SUMO (sumoilacja) nie prowadzi do degradacji, ale raczej zmian struktury i oddziaływań międzybiałkowych.

W niniejszej pracy sprawdzano, czy fototropina2 może być celem SUMO. Ustalono, że N-końcowy fragment phot2 podlega modyfikacji przez system sumoilacji *Arabidopsis* zrekonstruowany w *Escherichia coli*. Modyfikacja była zależna od izoformy SUMO i zachodziła w kilku różnych miejscach białka. Oddziaływanie pomiędzy fototropina2 i SUMO potwierdzono także w komórkach roślinnych *Nicotiana benthamiana*, metodą bimolekularnej komplementacji fluorescencji (BiFC). MMS21, ligaza SUMO, stymulowała modyfikację fototropiny2 w komórkach bakteryjnych i oddziaływała z nią *in planta*. Sprawdzano reakcje ruchowe chloroplastów w mutantach pozbawionych aktywności poszczególnych SUMO i ligaz SUMO i zaobserwowano, że mutanty *siz1* wykazują większą amplitudę reakcji na impulsy światła niż typ dziki. Wskazuje to na możliwy udział procesu sumoilacji w funkcjonowaniu fototropiny2.

Ostatnią częścią pracy były badania nad znaczeniem odpowiedzi fizjologicznej wyróżniającej fototropinę2 - reakcji ucieczki chloroplastów. Odpowiedzi tej przypisuje się funkcję fotoprotekcyjną, chociaż przez długi czas hipoteza ta nie była potwierdzona eksperymentalnie. Po opisanu mutantów *phot2* stwierdzono, że są one bardziej wrażliwe na stres świetlny. Celem opisywanych badań było ustalenie czy zwiększona podatność na stres wynika z niewłaściwego ułożenia chloroplastów na silnym świetle, czy też zaangażowane są w to inne procesy zależne od fototropiny. Zastosowano model doświadczalny, w którym do ustawiania chloroplastów użyto światła niebieskiego, natomiast światłem stresującym było silne światło czerwone. Wykazano, że światło czerwone nie wpływa na ułożenie chloroplastów *Arabidopsis*, w związku z czym możliwe było poddawanie roślin dzikiego typu wielogodzinnemu stresowi silnego światła z chloroplastami w pozycji płaskiej lub profilowej. Podczas naświetlań badano parametry fluorescencji chlorofilu i monitorowano stan aparatu fotosyntetycznego przy użyciu parametru F_v/F_m , będącego wskaźnikiem wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII). Zaobserwowano większy spadek F_v/F_m dla chloroplastów w pozycji płaskiej niż profilowej, zgodnie z postulowaną fotoprotekcyjną funkcją reakcji ucieczki. Dla roślin *phot2*, których chloroplasty w obu warunkach są w pozycji płaskiej, większe uszkodzenie PSII zaobserwowano przy wyższych natężeniach światła niebieskiego, sugerując, że wywiera ono dodatkowy efekt przeciwny do ochronnego efektu reakcji ucieczki. Aby lepiej zinterpretować te obserwacje, wykonano analizę parametrów fluorescencji chlorofilu podczas ustawiania chloroplastów i stresu świetlnego w roślinach pozbawionych cyklu ksantofilowego lub kinazy STN7, odpowiedzialnej za fosforylację LHCII. Na tej podstawie stwierdzono silniejszy wpływ fotoinhibicyjny światła niebieskiego na komórki roślinne.