**FYSIOLOGIE FOTOBIOLOGIE: Signalen uit zonlicht**

1. Inleiding

* Zonlicht
  + Levert EN + informatie
    - Informatie over richting & kleur, kwaliteit (golflengte) vh invallend licht
  + Verschillende fysiologische reacties gekoppeld aan lichtkwaliteit
    - 1) **Heliotropie** 
      * = Solar Tracking
      * = het zich oriënteren van bladeren naar invallend licht
      * = bladoriëntatie invallend licht
      * Vb: bladschijf
    - 2) **Fotomorfogenese** 
      * = de controle over groei & ontwikkeling oiv licht
      * = ontwikkeling organisme oiv licht
      * Vb: etiolatie (in donker => abnormale planten)
    - 3) **Fototropie** 
      * = aanpassen vd groei in richting vh invallend licht
      * = groeioriëntatie
      * Vb: maiscoleoptiel (stengels)
    - 4) **Fotonastie** (openen) **& Nyctinastie** (sluiten)
      * = openen en sluiten vh blad tijdens dag en nacht
    - 5) **Fotoperiodiciteit** 
      * = synchroniseren van fysiologische functies met daglengte
    - 6) **Fotoreceptoren** 
      * = moleculen voor licht perceptie / ku licht waarnemen
      * => waargenomen licht vertalen naar fysiologische functie (signalen doorgeven)
      * Vb: chlorofyl,…

2. Fotoreceptoren

2.1 Fotoreceptoren

* Aantal fysiologische processen
  + ~ informatie van het licht (richting, kwaliteit, kleur)
  + ≠ van de Energie vh licht
* Planten fotoreceptoren
  + => verschillen in welk deel vh spectrum de moleculen licht absorberen
  + Belangrijkste pigmenten betrokken in de perceptie van fotonen & omzetting naar specifieke fotoreacties zijn:
    - **1) Fytochroom** 
      * = voor perceptie van rood (R) en donkerrood ( far red, FR) licht
        + (650-700nm)
      * = ook voor perceptie van blauw licht (350-500nm) en UV-A stralen (320-400nm)
      * Functie: controleren aspecten vd vegetatieve en reproductieve ontwikkeling
    - **2) Cryptochroom** 
      * = absorbeert UV & blauw licht
      * Functie: speelt rol in fotomorfogenese
    - **3) Fototropine** 
      * = UV/blauw licht receptor
      * Functie: betrokken in fototropie, chloroplast beweging en stomata opening
    - **4) ZEITLUPE (ZTL)**
      * = UV/blauw licht receptor
      * Functie: betrokken in controle van circadiaanse ritmen
    - **5) UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8)**
      * = voor UV-B perceptie
  + Figuur 1: werking fotoreceptor fytochroom
    - Rood licht => fytochroom AANzetten = activatie
    - Donkerrood licht => fytochroom UITzetten = inactivatie
    - => kieming van sla-zaden w bepaald door de laatste lichtbehandeling
      * R stimuleert kieming & FR onderdrukt kieming
      * Vb: eerst R, dan FR, dan R = kieming
  + Figuur 2: Voorstelling planten fotoreceptoren tov het zichtbaar licht spectrum

2.2 Reacties op licht worden bepaald door lichtkwaliteit

* Reacties op licht worden bepaald door lichtkwaliteit
  + Probleem: versch. fotoreceptorsystemen interageren
    - Gevolg: bepalen rol receptors in fysiologische reacties is moeilijk
    - Vb: de-etiolatie w gecontroleerd door fytochroom, maar ook cryptochroom & chlorofyl dragen bij aan de fysiol. Reactie
  + Oplossing: actiespectra & absorptiespectrum
    - Doel: Om fotoreceptoren van fysiologische reacties te identificeren
    - **Actiespectra** 
      * = fysiologische reactie in fie van golflengte
      * Fig: licht door prisma => breken => in water met wier => O2 gevoelige bacteriën aanbrengen => zwemmen naar hoge O2 conc.
      * Conclusie: waar bacteriën zijn = blauw & rood licht
        + => daar activiteit = O2 productie
    - **Absorptiespectra** 
      * = absorptie van pigment moleculen in fie vh licht
      * = molecuul-specifiek
        + Bepaalde moleculen hebben bep. spectra
      * Gaat altijd over moleculen die in oplossing zijn gebracht (extract)
  + Vergelijken actiespectra en absorptiespectra
    - Levert info op over aard vd fotoreceptor
    - Voorbeeld: voor fotosynthese (p3 boven)
      * Acties-O2 productie & absorptiespectrum van geïsoleerde chloroplasten overlappen sterk
      * => rood van chlorofyl absorptie & actie van fotosynthese komen overeen
      * Conclusie: absorptie van licht in chloroplasten w bepaald door chlorofyl als pigment/fotoreceptor
    - Voorbeeld: voor zaadkieming (fytochroom) (p3 onder)
      * Acties- en absorptiespectrum vh fytochroom overlappen (Pr en Pfr)
      * => actiespectrum van AAN en UITzetten fytochroom
      * => probleem: actie weinig overlap & absorptie: veel overlap
    - Voorbeeld: voor fototropie (fototropine)
      * Acties- en absorptiespectrum van fototropines overlappen
  + Omgekeerd: indien actiespectrum => is er dan een molecule die absorptie hiervoor heeft? JA

3. Fytochroom

3.1 Fytochroom is de belangrijkste rood en donkerrood licht receptor

* Fytochroom
  + = eiwit (125kDa)
  + = belangrijkste rood en donkerrood lichtreceptor
    - **Rood licht** (620-700) activeert Fytochroom
    - **Donkerrood licht** (710-850- inactiveert Fytochroom
  + = dimeer met als chromofoor **fytchromobiline** (tetrapyrolketen) op elk eiwit
  + => absorberen licht door chromofoorgroep eraan
  + Functie: betrokken in uiteenlopende fysiologische processen
    - Vb: zaadkieming, de-etiolatie, primordia vorming, bloemremming
  + Bouw: domeinstructuur
    - 3 domeinen
      * **PAS** (Per, Arnt, Sim) , **GAF** (cGMP-specific fosfodiesterase, adenylyl cyclase, FhIA), **PHY**( fytochroom)
      * => binden chromofoor (thioether)
      * => stabiliseren molecule in de Pfr vorm
    - Andere domeinen
      * **PRD** (PAS-related domain) betrokken in translocatie van fytochroom naar nucleus
      * **HKRD** (histidine kinase achtig)
    - Chromofoor
      * Met 4 heterogene N basen covalent gebonden aan GAF domein met zwavel => chromofoor covalent met eiwit
    - Evolutionair oude molecule
      * Heeft homologen in bacteriën
        + Dus goed geconserveerd/bewaard
        + Homologen = structuren die goed op het oorspr. lijken
        + In fytochroom ontbreekt kinasedomein (zie fig)
* Tabel ppt waarnemingen
  + 1) Brede spreiding groepen => fytochroom komt veel voor
  + 2) Veel effecten in zaailingen
  + 3) processen gecontroleerd door fytochroom
    - Groei verandering, chloroplast oriëntatie => voldoen aan AAN/UIT
* **Fytchromobiline** 
  + = chromofoor van fytochroom
  + = gesynthetiseerd in chloroplast
  + Structuur: tetrapyrolketen
    - bestaat uit 1,2,3,4 heterocyclische N basen => ionen coördineren
    - belangrijk voor
  + Absorbeert in zichtbare golflengten want alternerende bindingen
  + Hangt covalent aan eiwit cysteine 259

3.2 Fytochroom converteert tussen Pr en Pfr

* Naamgeving
  + Pr = naam van fytochroom gevoelig aan rood
  + Pfr = naam van fytochroom gevoelig aan donkerrood licht (capteert lange golflengte)
* **Fotoreversibiliteit**
  + = Fytochroom converteert tussen Pr en Pfr
  + = het AAN/Uit zetten fytochroom
  + In donker gekweekte zaailingen: fytochroom in Pr vorm = cyaanblauw
    - => door donkerroodlicht omgezet naar cyaan-groen Pfr = actieve vorm
    - <= in donker reverseert Pfr langzaam naar Pr
    - <= of door bestralen met rood licht reverseert Pfr snel naar Pr
* Cis-Trans verandering & draaiing
  + Pr blootstellen aan rood licht
    - => Cis-Trans verandering & draaiing in het chromofoor **fytochromobiline**
    - => conformatieveranderingen in eiwit
      * Gevolg: kinasedomein komt vrij => fytochroom is actief
* **Foto-stationaire toestand** 
  + = het bereikte evenwicht in bepaalde lichtcondities
  + Er zijn golflengten waarbij overlappende absorptiespectra groot zijn
    - => conversie Pr ⬄ Pfr nooit volledig
      * Bij verzadiging met R => 88% in Pfr vorm
      * Bij verzadiging met FR => 98% Pr en 2% Pfr
    - => foto-stationaire toestand bereikt
* Pr/Pfr ratio varieert
  + Verdeling vd lichtkwaliteit in omgeving kan variëren vb door bewolking, begroeiing

3.3 Pfr herverdeelt tussen de kern en cytoplasma

* Fytochoom
  + = dimeer met als chromofoor fytchromobiline op elk eiwit
  + Functie/werking
    - 1) interageren met membraanprocessen
    - 2) activeren genprocessen: transcriptie/translatie
* Herverdeling Pfr tussen kern en cytoplasma => activatie genprocessen
  + 1) Signaaltransductie: **activatie Pr** (dimeer)
    - 1) Fytchromobiline gesynthetiseerd in de chloroplast
    - 2) Fytchromobiline bindt autokatalytisch met het PHY apoproteïne in thioether binding met Cys op fytochroom Pr
    - 3) Dimeer fytochroom Pr => rood licht => activatie Pr
  + 2) Door activatie Pr
    - => Pr ondergaat ∆conformatie => Pfr
      * Gevolg: opening => domein vrij
    - => FHY1 associatie/binding met Pfr in opening (vrij domein)
      * FHY1= FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL1
  + 3) na activatie migreert actief complex FHY1-Pfr naar nucleus/cytoplasma
    - in nucleus: **genexpressie** controleren (transcriptie/translatie)
      * PRD domeinen zijn betrokken bij translocatie naar nucleus
    - In cytoplasma: fytochroom ~ **ionenfluxen, membraanpotentiaal**

4. Fytochroom-gecontroleerde reacties

* Fytochroom gecontroleerde reacties
  + Reacties op rood licht
    - variëren in fie van lichthoeveelheid, intensiteit, richting, kwaliteit,..
    - Hebben uiteenlopende lag-fasen: minuten tot weken
  + Fluence = maat voor intensiteit vh licht
  + 3 Typen reacties
    - **Very low fluence responses** (VLFR)
      * = reactie start bij zeer lage lichtintensiteit (sterren, vuurvliegjes)
      * => resulteren in minder dan 0,02% omzetting naar Pfr
      * **≠ reversibel** door donkerroodlicht
      * Vb: zaadkieming in Arabidopsis
    - **Low-fluence responses** (LFR
      * = reactie start bij medium lichtintensiteit
      * **= reversibel** door donkerroodlicht
      * Vb: remming hypocotylgroei, regulatie in bladbeweging
    - **High irradiance responses** (HIR
      * = reactie w geïnduceerd door langdurige blootstelling aan hoge lichtintensiteit
      * **≠ reciprociteit** toepasbaar
      * Vb: inductie van anthocyaansynthese en flavonoïd synthese
    - => geen lineaire relatie tussen I en respons van fytochroom
  + **Reciprociteitwet** 
    - = gelijke lichtdosis (intensiteit x tijd) => induceert gelijke reactie
      * Wanneer I vermindert/vermeerderd maar tijd van blootstellen vergroot/ verkleint
        + => lineair effect
    - VLFR en LFR (maar niet HR) voldoen aan reciprociteit wet
    - HR ~ fluence rate (fotonen/sec)

5. Fytochroom signaaltransductie

5.1 Algemeen Signaaltransductie

* Reacties door fotoreceptors omvatten ionenfluxen of veranderingen in genexpressie
* Fytochroom werking in
  + **1) Ionenflux** => **∆membraanpotentiaal**
    - Als snelle reactie op rood licht
    - veronderstelt PM lokalisatie van fytochroom moleculen
    - ionenflux = veranderende ionenstroom
  + **2) Genexpressie** door **PIFs** 
    - Principe: fytochroom activatie => leid tot verandering genexpressie van genen betrokken in fotomorfogenese
    - fytochroom activiteit / Regulatie van genexpressie
      * 1) wordt gereguleerd door PIFs
        + = fytochroom interagerende eiwitten
        + Bewerkt de genen => ku ze activeren/onderdrukken
        + Sommige zijn transcriptiefactoren

In donker fungeren als repressor of activator

Door interactie met Pfr geïnactiveerd

* + - * 2) wordt gereguleerd door fosforylering
    - Ppt
      * 1) activeren
        + Nacht: genen actief gehouden door PIF
        + Dag: Pfr associeert met PIF’s => eiwitten w weggevoerd voor afbraak => genen stoppen met activiteit
      * 2) repressor
        + Nacht: PIF onderdrukt genen
        + Dag: afbraak => genen w actief

5.2 Eiwitdegradatie is betrokken in de fytochroom geïnduceerde fotomorfogense

* Signaaltransductie wegen
  + Werken vaak via geïnduceerde afbraak v/e repressor eiwit
    - PHYA w actief afgebroken na activatie
  + COP1
    - Ontdekking: door mutantenonderzoek in Arabidopsis
    - = constitutive fotomorfogenese1
    - = onderdeel vh COP1/SPA eiwitafbraak complex
      * **COP1/SPA1**
        + = op niveau vd kern de eiwitexpressie reguleren
        + = ku eiwitten taggen voor afbraak ~ ubiquitine
    - Functie: werkt als ubiquitine ligase E3 => eiwitten getagd voor afbraak in proteosoom
      * Inactivatie COP1 => remming degradatie & accumuleren van eiwitten (transcriptiefactoren) voor de expressie van fotomorfogenese genen

6. Cryptochroom

6.1 De geactiveerde FAD chromofoor veroorzaakt een conformatieverandering (1)

* Cryptochroom (CRY/HY4
  + = UV/ blauw-licht receptoren
  + = 75kDA eiwit
  + Functie: speelt rol in fotomorfogenese
    - Vb: onderdrukken hypocotylgroei, expansie cotylen bevorderen, veroorzaken membraan depolarisatie, remming vd bladsteelgroei veroorzaken, synthese anthocyanen beïnvloeden & rol in afstemming vd circadiaanse klok
  + Bouw
    - Fotolyase domein
      * Genoemd naar enzyme **fotolyase** 
        + = DNA repair enzyme na blootstelling UV licht
        + = repareren DNA in zoogdieren onder schedelpan waar geen licht is
    - Chromoforen **FAD, pterine** 
      * Cryptochroom bindt niet covalent FAD (= flavine adenine dinucleotide) & pterine als chromoforen
    - **Cryptochroom c-terminaal domein** 
      * = CCT domein
      * = essentieel voor cryptochroom signaaltransductie / interactie met andere eiwitten
  + In Arabidopsis: 3iso-vormen CRY1 en CRY2 in nucleus & CRY3 in chloroplast en mitochondriën
* **FAD** 
  + = 1° chromofoor voor cryptochroom activiteit
  + = niet covalent gebonden aan Cyrpotchroom
  + Fotonabsorptie => resulteert in **∆redoxstatus FAD**  => ∆ eiwitconcentratie
    - Deze verandering => initieert binding met andere eiwitten (signaaltransd)
    - Uitleg 1ste stap: FAD => blauw licht => FAD activatie = radicalair intermediair
* **Pterine** 
  + = 2° chromofoor voor cryptochroom activiteit
* Grafieken
  + WT = wild type
  + Cryptochroom hoofdletter CRY1 = dominante expressie
  + Cryptochroom kleine letter cry1 = uitgeschakelde expressie = gen is uitgeschakeld
  + OE = overexpressie => maken overexpressors door promotor te veranderen die altijd hoge conc. fixt
  + Conclusie: veel hogere CRY1 in OE

6.2 Cryptochroom in de nucleus, verhindert COP1 geïnduceerde eiwitafbraak

* Cryptochroom in nucleus
  + => beïnvloedt ook genexpressie ~ fytochroom
  + => verhindert COP1 geïnduceerde eiwitafbraak
  + 1) Signaaltransductie
    - 1) CRY1 activatie: door licht & licht-gecontroleerde fosforylering in celkern
    - 2) CRY1 interactie met COP1/SPA1 => vormt complex
      * 1) Eiwitdegradatie w geremd
      * 2) Hierdoor verhindert de afbraak vd transcriptiefactor HY5
      * 3) Bevordert de transcriptie van fotomorfogenese betrokken genen
  + 2) **CCT** domein interageert met SPA1/COP1
    - Gevolg: planten waarin CCT tot over-expressie is gebracht gaan zowel in donker als in licht fotomorfogenese ondergaan
      * => SPA1 en COP1 altijd onderdrukt => altijd actief HYS

6.3 De circadiaanse klok wordt gereguleerd door meerdere fotoreceptoren

* Circadiaanse klok
  + Synchronisatie (training) vd interne, cellulaire klok met dag/nachtlengtes
    - ~ perceptie door fytochroom EN cryptochroom (combo)
    - ~ de activiteit vd genen ‘early flowering3’ (E3) & ‘time for coffee’ (TIC)
  + **Fotoperiodiciteit** 
    - = het vermogen van planten om cellulaire en fysiologische processen af te stemmen op daglengte
    - Fytochroom speelt rol in fotoperiodiciteit
      * Bewijs: R/FR reversie
  + Opdeling planten
    - ~ de rol die daglengte speelt in bloei inductie: bloei inductie ~ daglengte
    - **Lange dag planten (LDP)**
      * => nachtlengten moeten korter zijn dan een kritische lengte => om te ku bloeien
      * => lange dag nodig + nacht mag wel onderbroken zijn (ppt)
    - **Korte dag planten (SDP)**
      * => nachtlengten moeten langer zijn dan een kritische lengte => om te ku bloeien (dag moet korter zijn dan kritische waarde)
      * => korte dag nodig + nacht mag niet onderbroken zijn (ppt)
        + Ppt: lichtstraal in donkerperiode => groeien ze niet meer

Terug donkerrood licht => inorde

7. Fototropines

7.1 Inleiding

* **Fototropinen** 
  + **Ontdekking** 
    - **Winslow R.Briggs** 
      * Mutantenscreening: ergens gemuteerd => buigen niet af naar licht
      * Arabidopsis forotropiemutanten => leidde tot ontdekking NPH1 locus
        + = eiwitten = **fototropinen**
    - Plantenextract maken van mutanten & niet mutanten
      * => radioactieve fosfaatmolecule aangeven met of zonder blauw licht
        + => wild type extracten: zwarte band => daar zit fosfaatgroep aan eiwit => dus door blauw licht ergens gefosforyleerd
      * => mutanten: geen zwarte band
  + = UV/blauw licht receptor (2de groep naast de cryptochromen)
  + Functie: controle fototropie & optimalisatie fotosynthese en groei in lage lichtintensiteit
    - Vb: chloroplast beweging, bladoriëntatie
  + Bouw:
    - **2 LOV** domeinen (light-oxygen-voltage) + **FMN** (flavine adenine monofosfaat) + ser/thr kinase
    - FMN
      * = flavine adenine monofosfaat
      * = chromofoor van fototropine
      * = niet covalent gebonden **in** de LOV domeinen
  + In arabidobsis: PHOT1, PHOT2 (eiwitten)
    - PHOT1 = fototroop actief in lage en hoge lichtintensiteit
    - PHOT2 = enkel actief bij hogere intensiteit

7.2 Blauw licht induceert conformatieveranderingen in fototropie, die een kinasedomein toegankelijk maken

* Fototropines werking/activatie
  + Blauw licht=> Fotonenabsorptie => FMN vormt een adduct met Cys (FMN bindt covalent met eiwit) => ∆conformatie
    - => autofosforylering op meerdere Ser residu’s
    - => proteine kinase is toegankelijk/open
    - => hierdoor kan substraatfosfoylering
* Ppt: PP2A= proteine fosfatase = fosfatase die in donker eiwit terug inactief maken

7.3 Fototropines reguleren chloroplast beweging via F-actine filamenten

* Fototropines werking
  + Reguleren chloroplastbeweging via F-actine filamenten
  + Chloroplastbeweging
    - in reactie op ∆lichtintensiteit => bladcellen ku de distributie van chloroplasten aanpassen
      * Gevolg: minder foton-absorptie en optimalisatie van fotosynthese
  + Oorzaak chloroplastbeweging: CHUP1
    - **CHUP1** 
      * = chloroplast unusual positioning1
      * = nieuw F actine bindend eiwit in de chloroplast enveloppe
      * Functie: verankerd PM en chloroplast
      * Functie: brengt nieuwe actine elementen aan /filament elongatie => hierdoor chloroplast verplaatsing
  + Reden chloroplastbeweging:
    - Indien te veel licht => locatie chloroplast reguleren om te vermijden dat chloroplasten te veel licht krijgen
    - Indien te weinig licht => cel zal in weefsel de chloroplast optimaliseren

7.3 De belangrijkste stappen in de fototropine gemedieerde opening van huidmondjes zijn geïdentificeerd

* Fototropine werking
  + **Fototropine** speelt rol in opening huidmondjes
    - Bewijs: Openen/sluiten huidmondjes
      * Blauw licht stimuleert opening stomata
      * Groen licht bevordert sluiten stomata
      * => Fototropine is de 1° receptor voor blauw licht reactie
        + Conclusie: fototropine speelt rol in opening stomata
  + Proces opening huidmondjes
    - 1) signaaltransductie (bijzaak)
      * Signaaltransductie voor blauw licht verloopt via **BLUS1**
        + BLUS1= blue light signaling1
      * 1) BLUS1 w gefosforyleerd door **phot1 of phot2**
        + Phot1, 2 = membraangeassocieerde eiwitten
      * 2) BLUS1 activeert eiwit **fosfatase** PP1
        + = opgebouwd uit katalytische subeenheid PP1c & regulatorische subeenheid PRSL
      * 3) PP1 activeert kinase
      * 4) **Kinase** activeert **H+ ATPase** door fosforylatie Ser en/of Thre-
      * 5) associatie **14-3-3**
    - 2) ATPase (bijzaak)
      * Heeft een C-terminaal regulatorisch domein => schermt de katalytische site af
      * 1) ATPase pompt H+ uit cel => membraanpotentiaal vergroot => hyperpolarisatie
      * 2) membraanpotentiaal activeert voltage gated inward K+ kanaal
      * 3) K+ stroomt in cel => hogere K+ verlaagt waterpotentiaal
      * 4) openen stomata => wateropname => celvolume stijgt
    - Essentie (!)
      * Phot activeert via fosforylering kinase & ATPase
        + ATPase interageert met 14-3-3 eiwit
      * Gevolg: hyperpolarisatie + K+ in cel
        + => lagere waterpotentiaal + openen stomata voor wateropname
* Samenvatting werking fototropine
  + Chloroplastbeweging
  + Openen/sluiten huidmondjes

8. Reacties op UV-B

* UV-B
  + = als energie
  + Functie
    - Cytotoxische effecten (Schadelijke) & foto-morfogenetische effecten (genregulatie, UV-B tolerantie, flavonoïde synthese)
* UVR8
* UVR8
  + = receptor voor UV-B perceptie
  + Functie: draagt bij tot fine tuning van de circadiaanse klok
  + Structuur: dimeer of monomeer
  + Reacties (1)
    - UVR8 als dimeer = inactief
    - => dimeer absorbeert UV/BL straling => verbroken => monomeren
  + Reacties (2): Signaaltransductie
    - vrije UVR8 eiwitten /monomeren => associatie met COP1 en SPA1 in kern
      * => reguleren / activeren transcriptie (vb van HY5) & translatie
      * => eiwitten die genexpressie regelen veranderen => recupereren vd signaal naar 1 (terug)