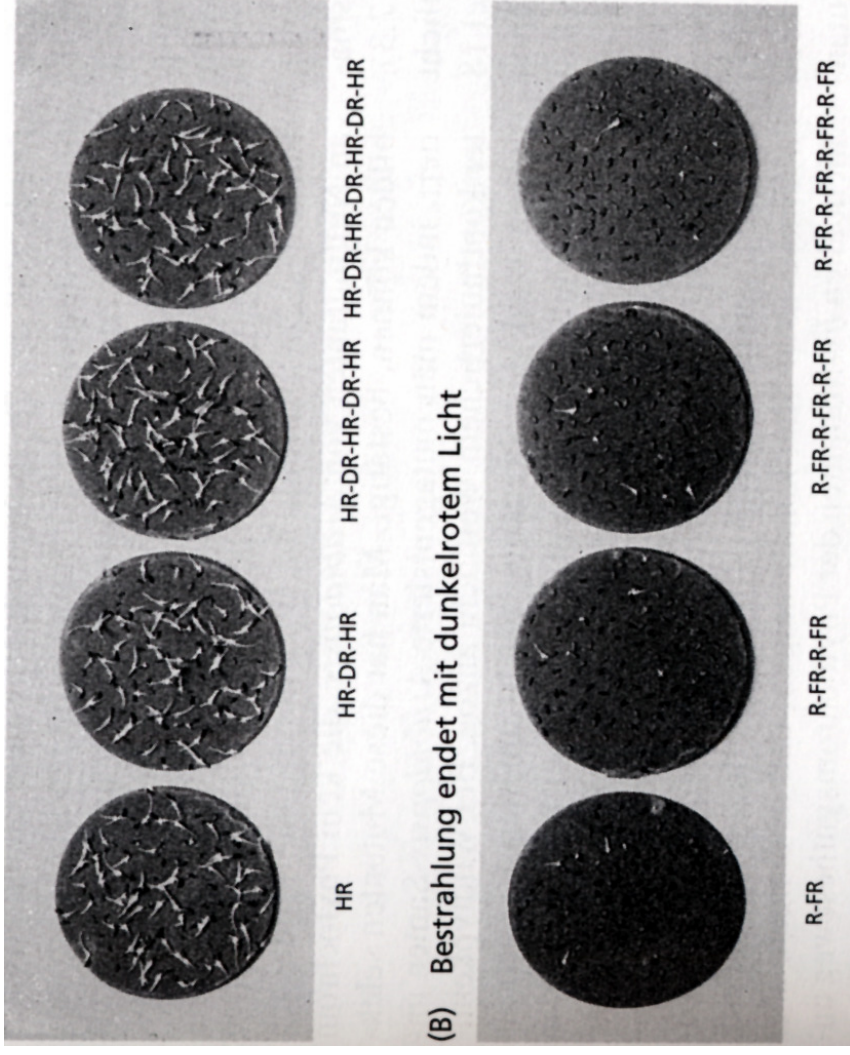


Beeinflussung der Keimung durch Licht



- Aktionsspektrum oder Wirkungsspektrum:
 - Welche Wellenlänge beeinflusst die Keimung am effizientesten?

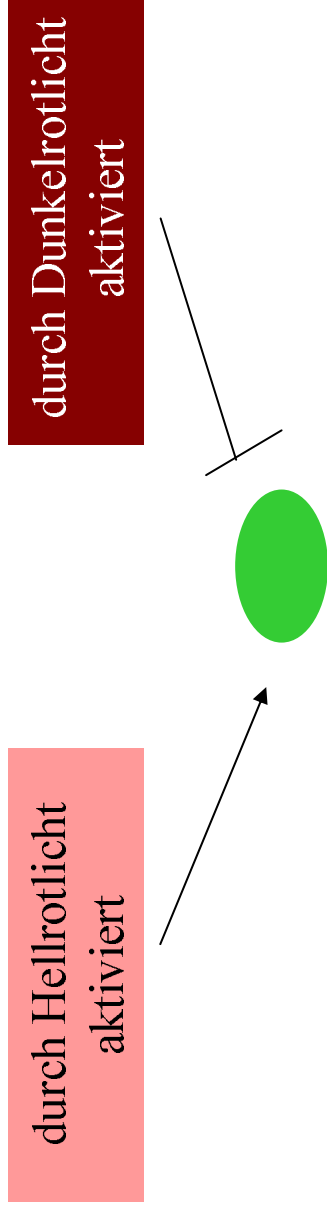
Keimung der Salatachänen:
HR: Hellrotes Licht, 660 nm
DR: Dunkelrotes Licht, 730
5 minütige Lichtpulse



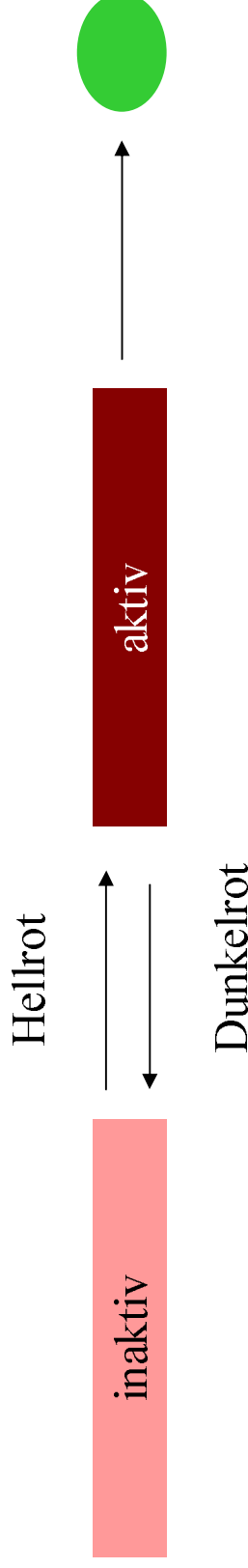
Modellvorstellungen zur Erklärung der Photoreversibilität



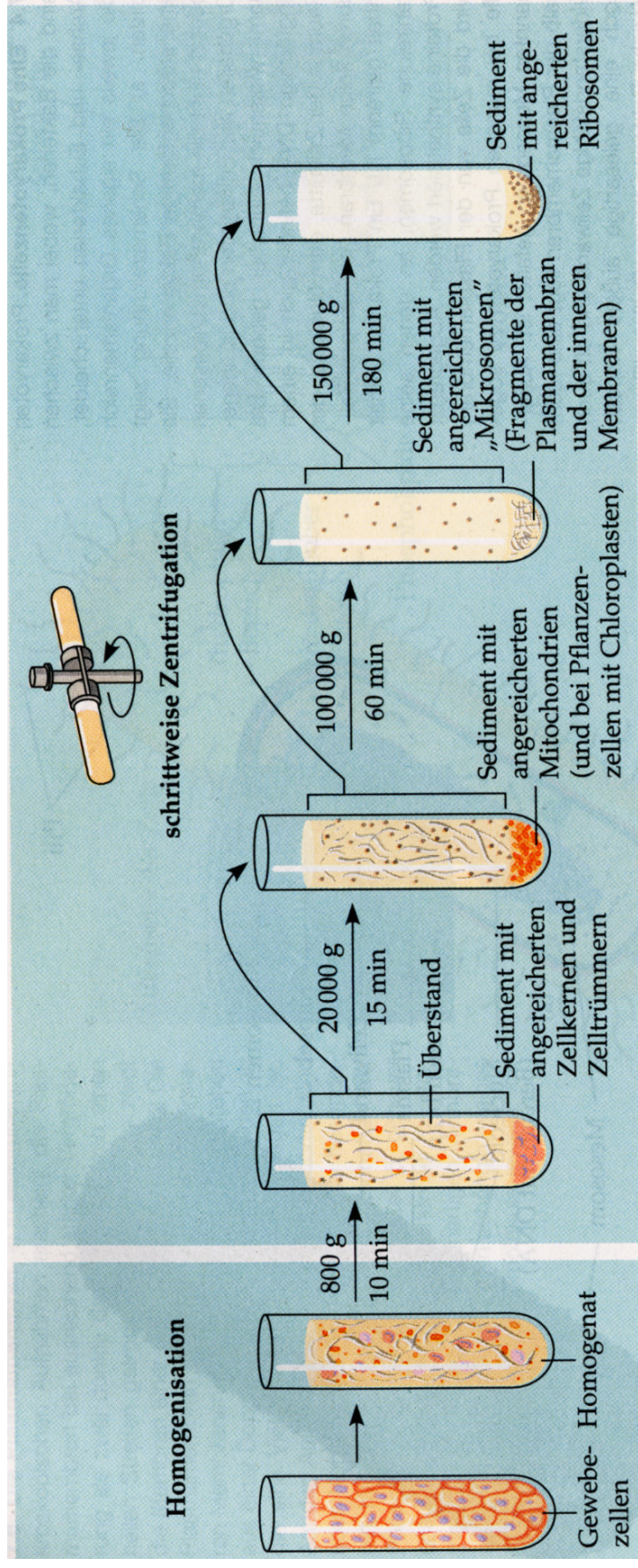
- 2 antagonistisch wirkende Photorezeptoren



- 1 Photorezeptor, der in 2 Konformationen vorkommt, die in einander überführbar sind.



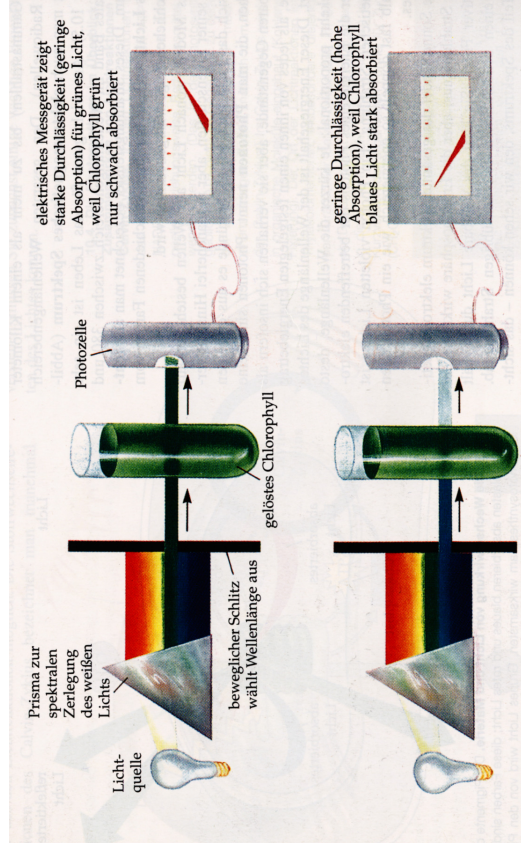
Isolierung des Photorezeptors



Isolierung des Photorezeptors

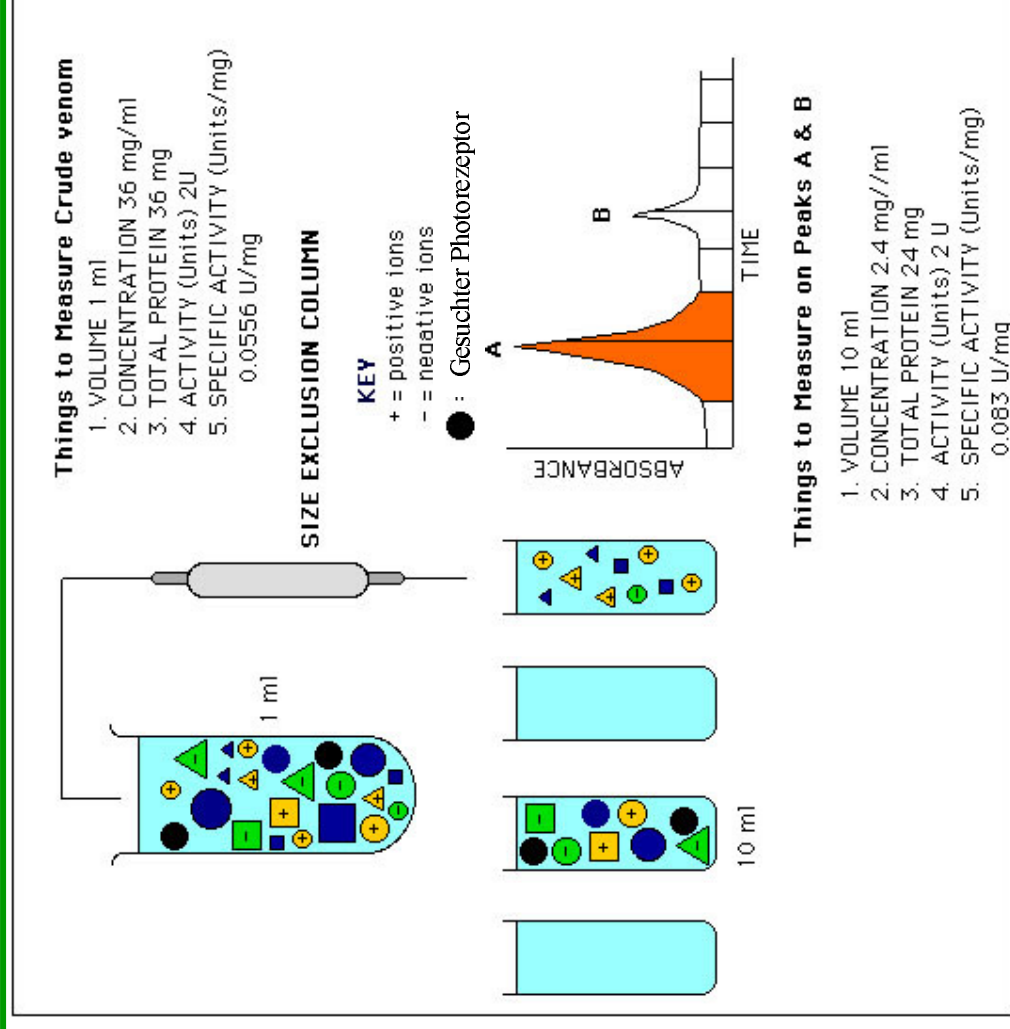


- Wie erkennt man ihn?
 - Das Protein sollte Rotlicht absorbieren



- Ausgangsmaterial
 - Etiolierte Haferkeimlinge, da wenig Chlorophyll

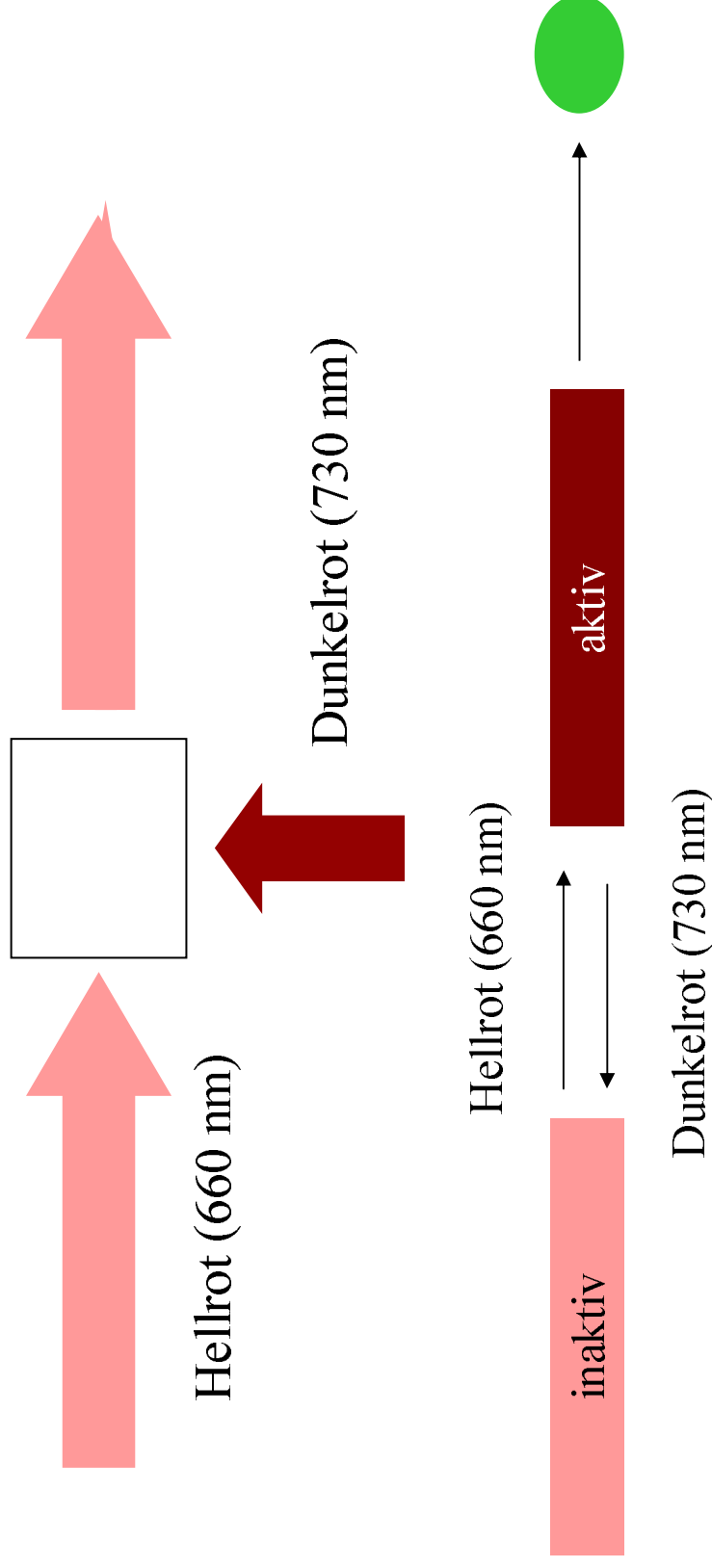
Proteinreinigung



Aktivitätsnachweis



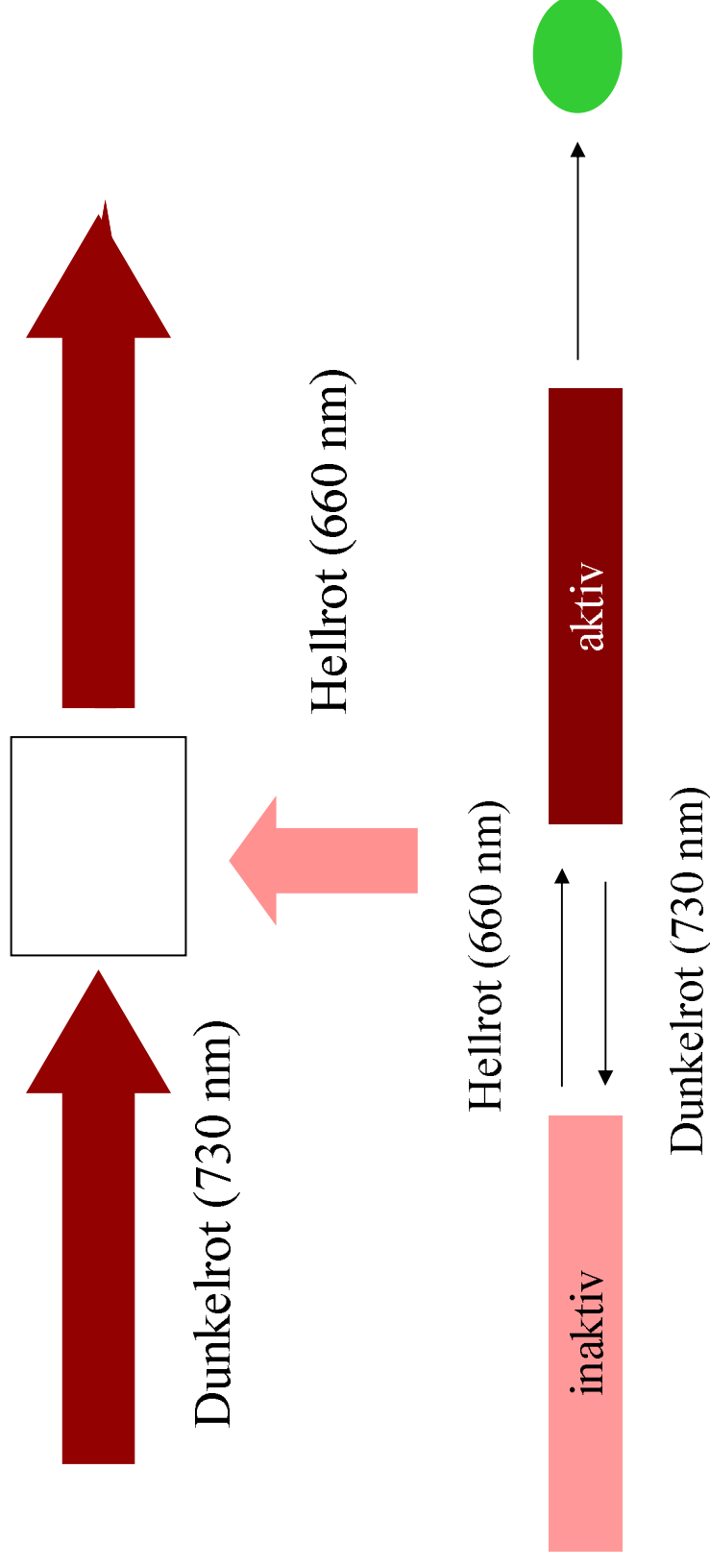
- Absorption bei 660 nm (Aktivitätsmaximum beim Aktionsspektrum)



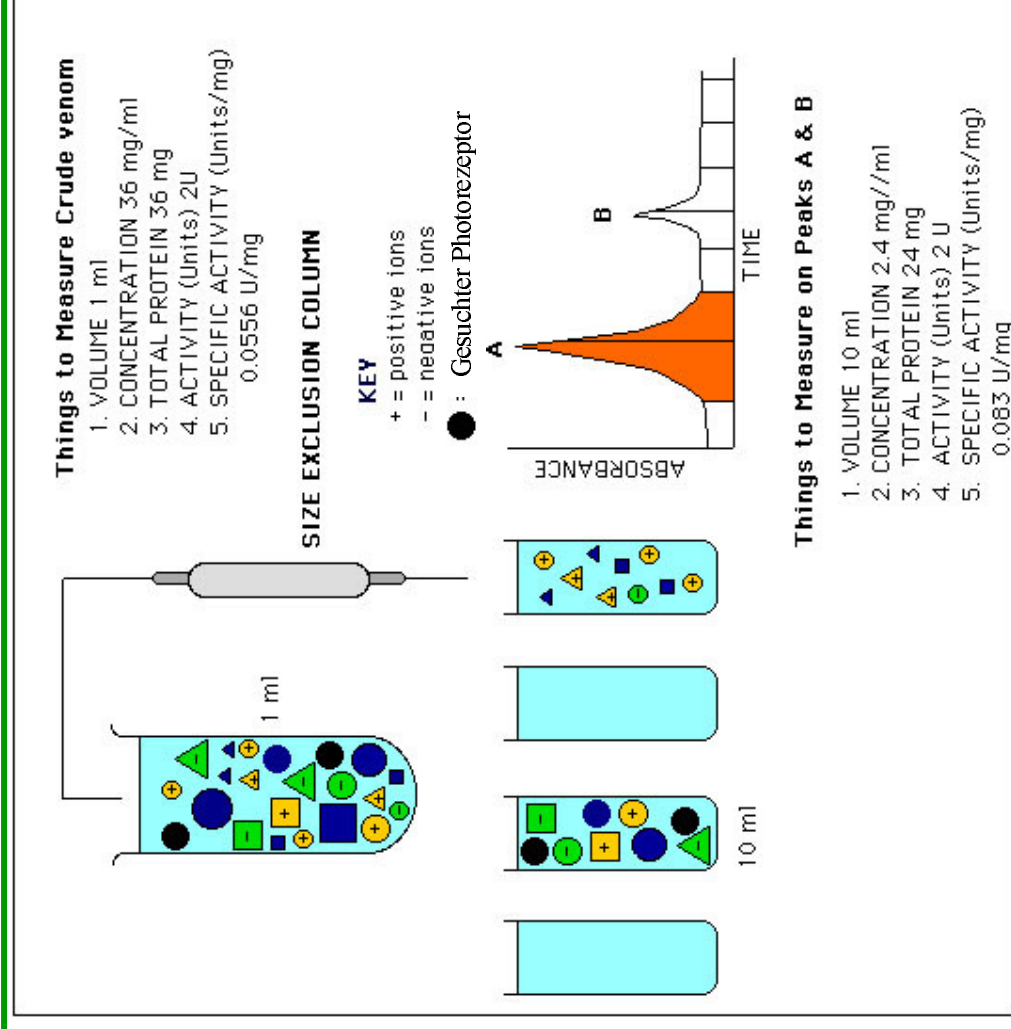
Aktivitätsnachweis



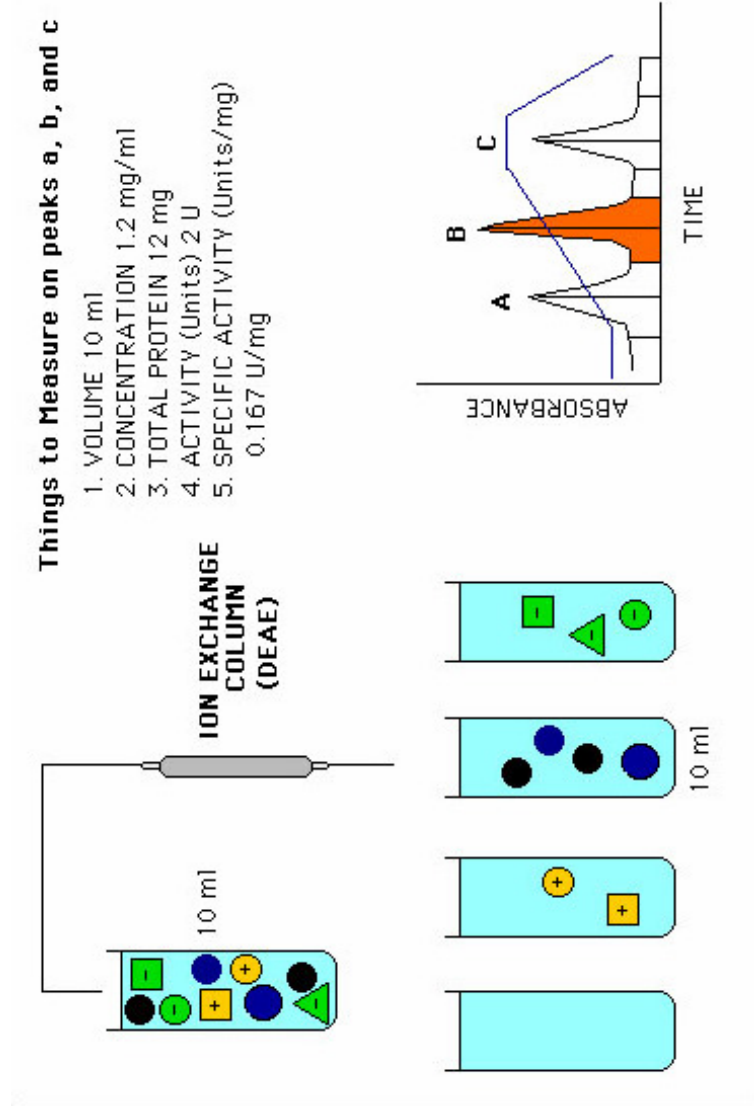
- Absorption bei 730 nm (Aktivitätsmaximum beim Aktionsspektrum)



Trennung nach Größe



Trennung nach Ladung



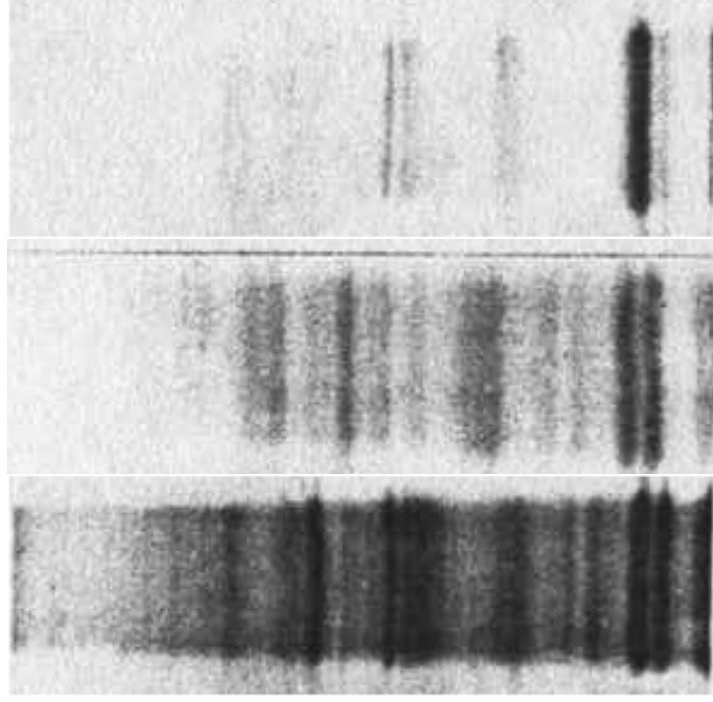
DEAE:

Positiv geladenes
Säulenmaterial.

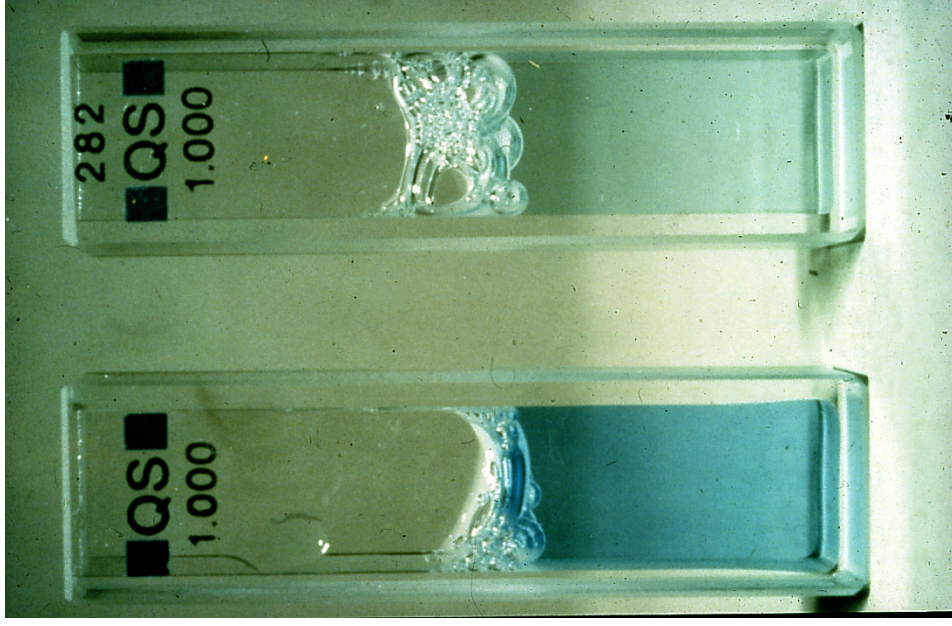
Elutionspuffer:

Steigende
Konzentration von
negativen Ionen.

SDS-Gelelektrophorese

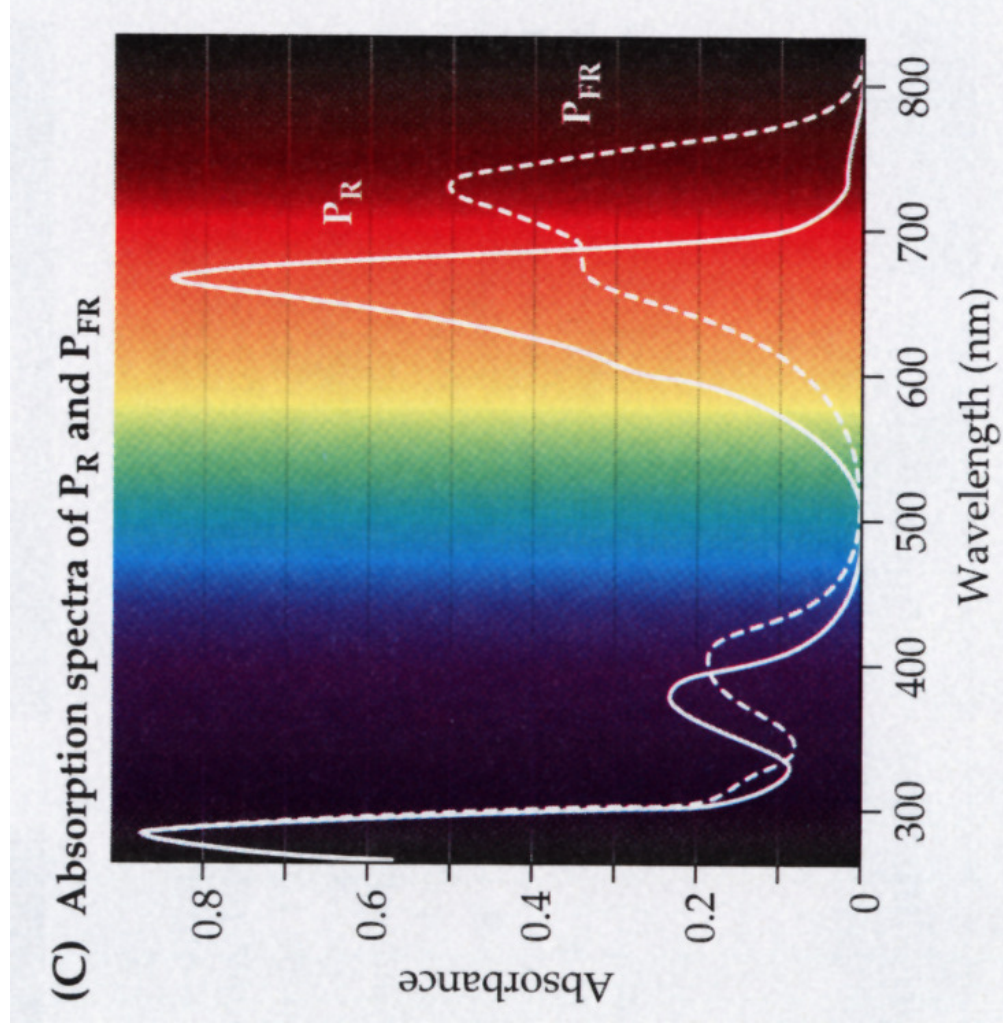


Aufreinigung des Photorezeptors



- Links:
inaktive Form, die Hellrot absorbiert: Pr
- Rechts
aktive Form, die Dunkelrot absorbiert: Pfr

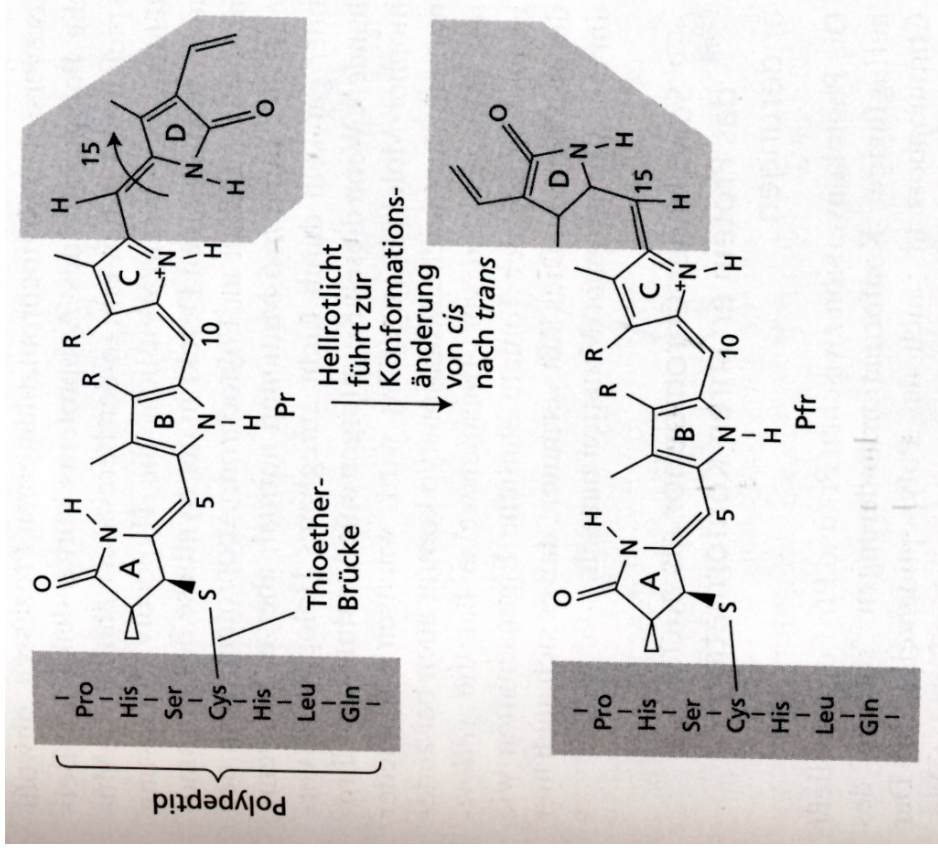
Absorptionsspektrum von Pr und Pfr



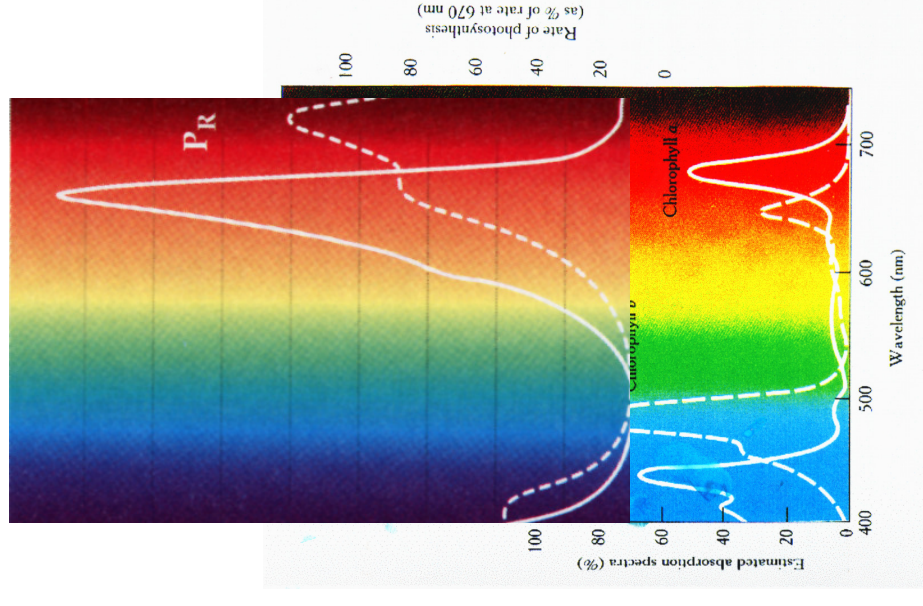
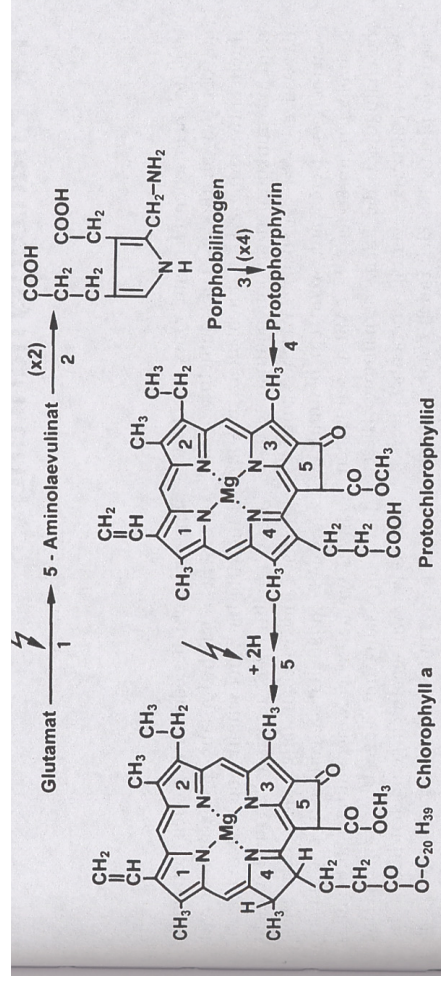
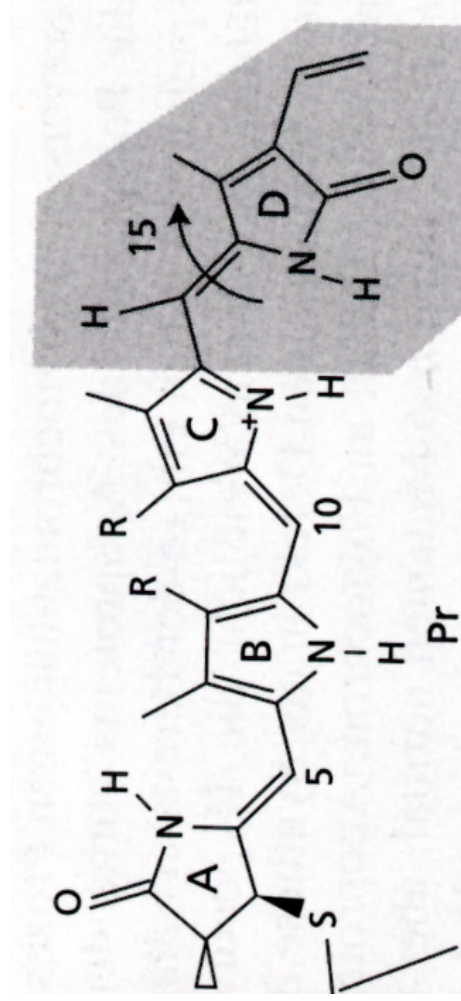
Chromophor: Phytochromobilin



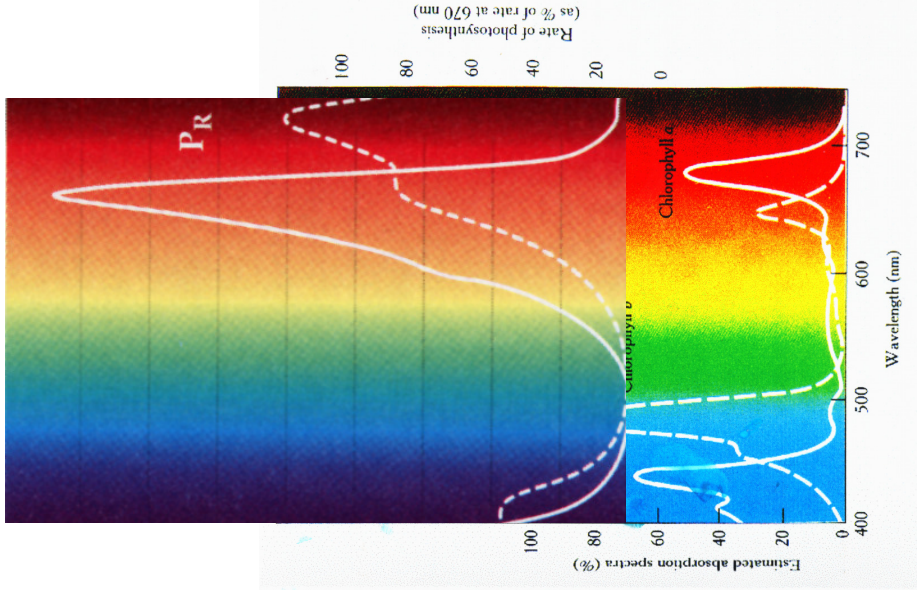
- Offenes Tetrapyrrolringssystem
- Biosynthese in den Chloroplasten
- Proteinanteil:
 - 124 kDa
 - Dimer



Tetrapyrrole

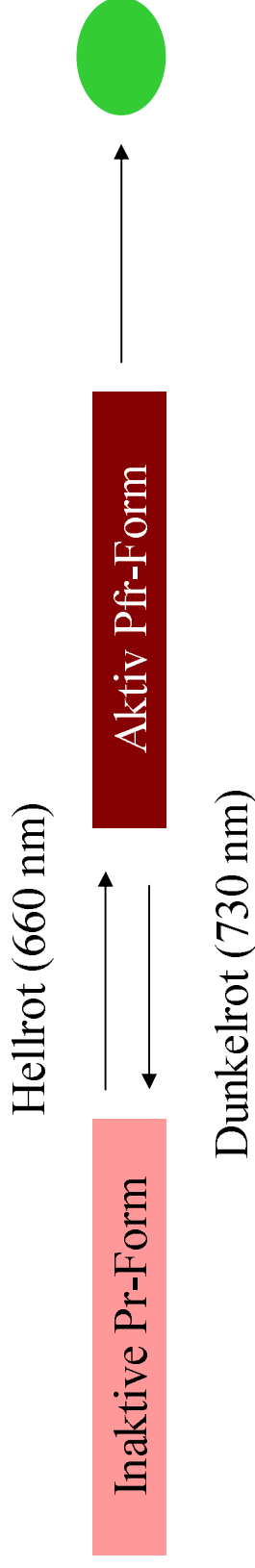


Warum gerade Rot?



- Licht unter dem Blätterdach enthält einen hohen Anteil von Dunkelrotlicht.
- In Pflanzen im Schatten liegt das Phytochromsystem in der inaktiven Pr Form vor.
- z.B. keine Keimung
- z.B. Streckung des Hypokotyls

Phytochrom

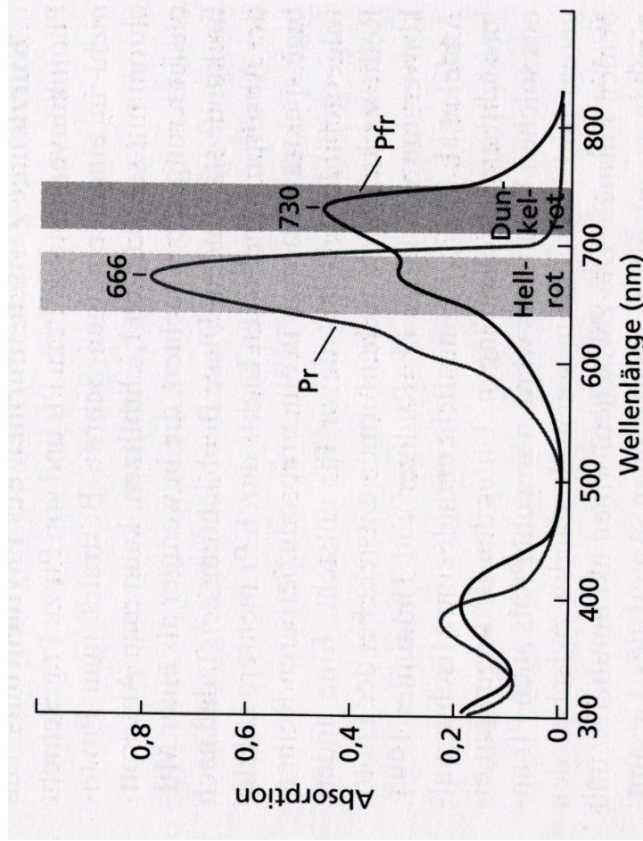


- Im Dunkeln und unter einem Blätterdach liegt das Phytochrom in der inaktiven Pr-Form vor.
- Bei Belichtung durch Licht mit einem höheren Rot-Anteil geht ein Teil des Phytochroms in die aktive Pfr-Form über.
- Das Phytochromsystem detektiert sowohl Lichtmenge als auch die spektrale Zusammensetzung des Lichts.

Überlappung der Absorptionsspektren



- Da Pfr auch im Hellrotbereich absorbiert und damit zu Pr konvertiert wird, kann nach Bestrahlung mit Hellrotlicht nie die gesamte Phytochrommenge in einer Form vorliegen.



17.3 Die Absorptionsspektren der Pr- und Pfr-Form des Phytochroms überlappen sich. (Nach Vierstra und Quail 1983)

Überlappung der Absorptionsspektren

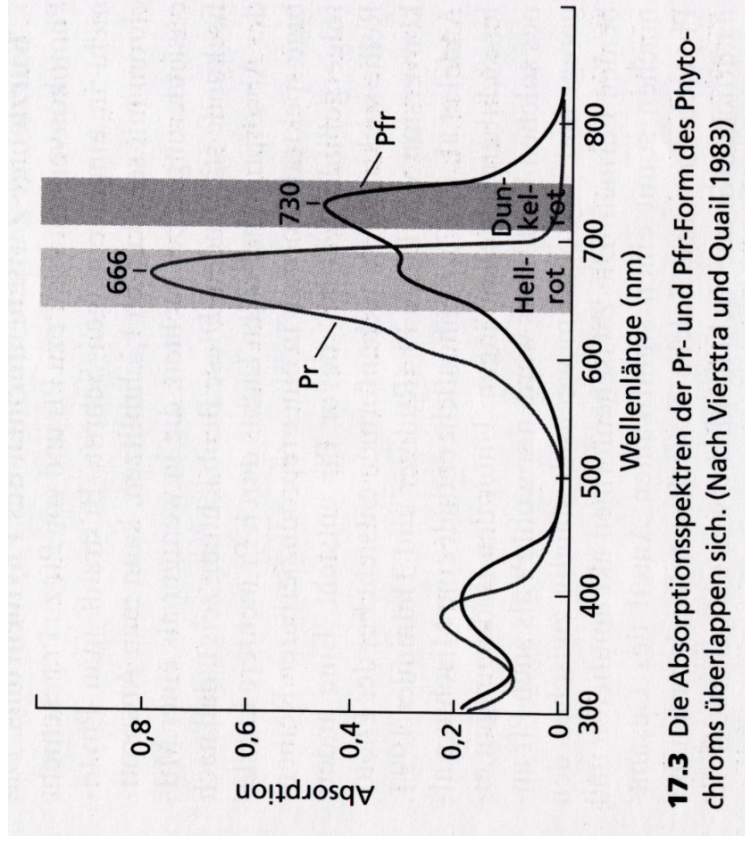


Nach 5 minütiger
Bestrahlung mit 660 nm

85% Pfr, 15% Pr

Nach 5 minütiger
Bestrahlung mit 730 nm

97% Pr, 3% Pfr



17.3 Die Absorptionsspektren der Pr- und Pfr-Form des Phytochroms überlappen sich. (Nach Vierstra und Quail 1983)

Photoequilibrium

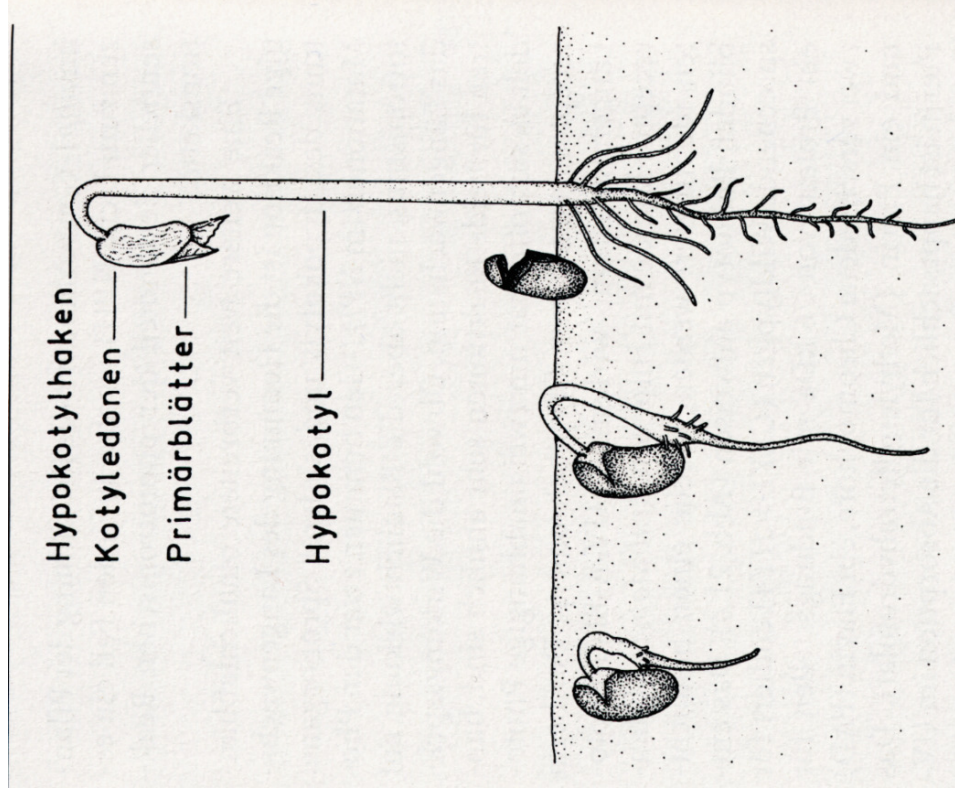


R/FR im hellen Sonnenlicht: 1.19

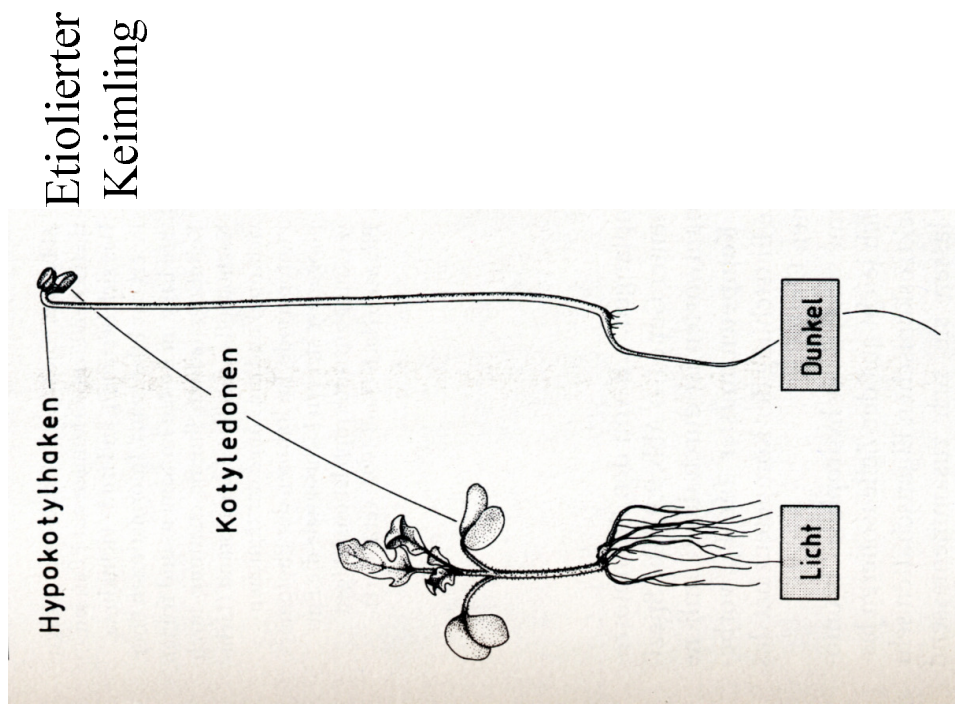
R/FR im Schatten: 0.13

Die Menge Pfr hängt vom Spektrum und der Lichtintensität ab.
Die Stärke der physiologischen Antwort hängt von der Menge gebildeten Pfr ab.

Beeinflussung der Morphogenese durch Licht

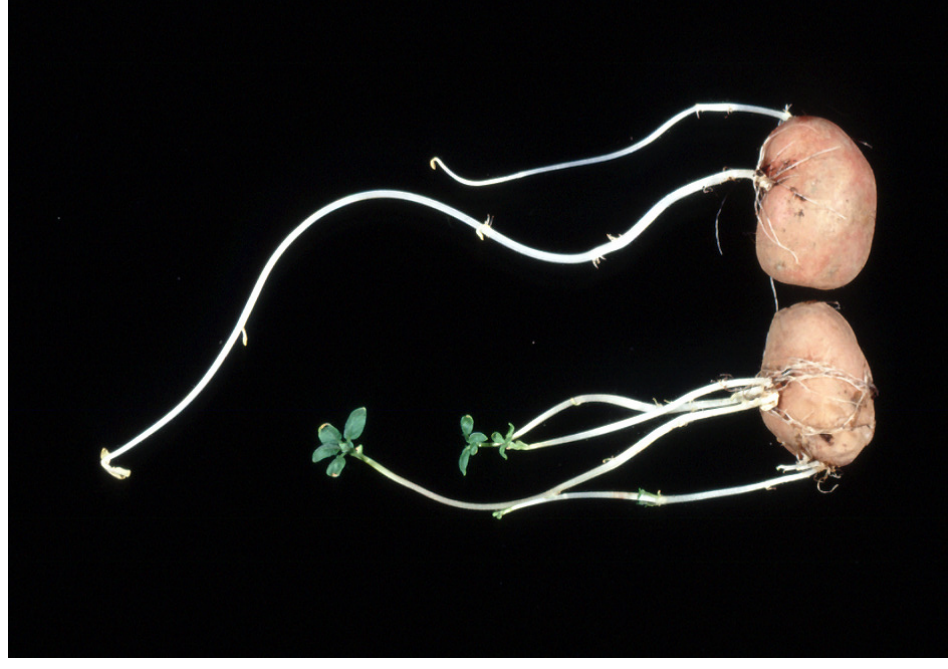
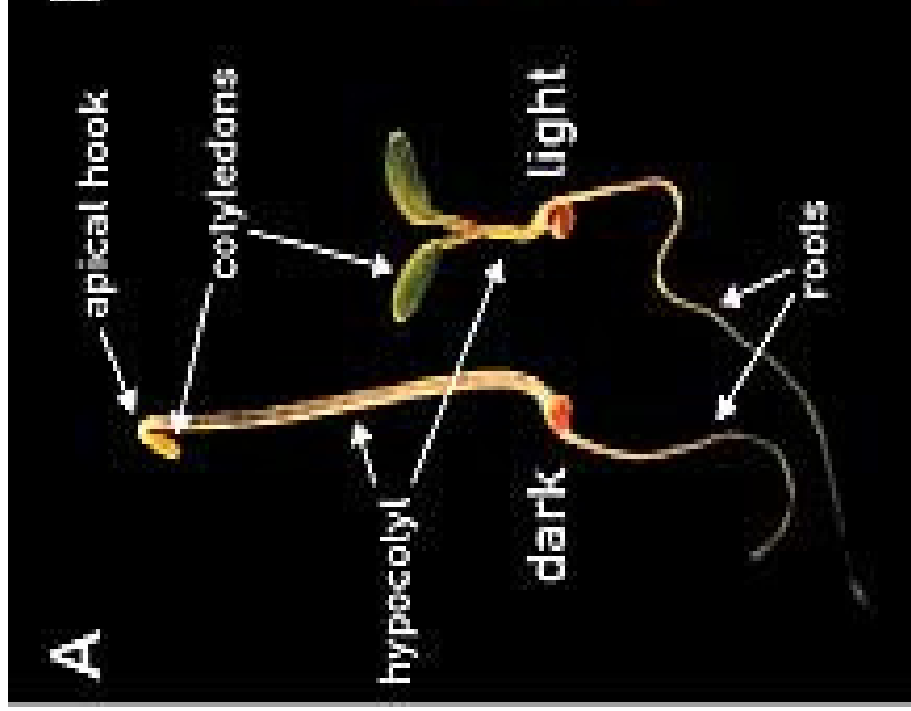


Skotomorphogenese



Photomorphogenese

Photomorphogenesis



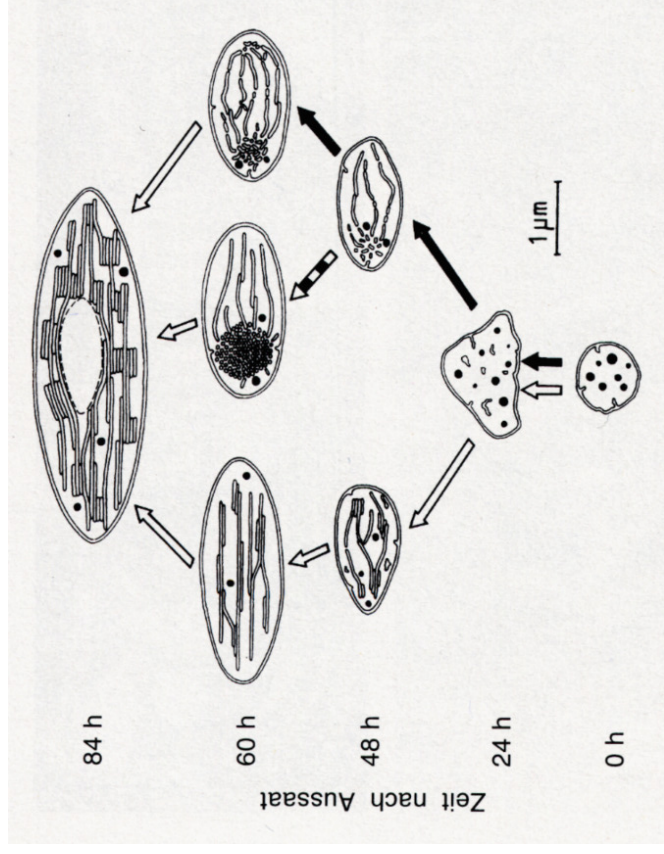
Licht-induzierte Veränderungen im Keimling



	Dunkel	Licht
Hypokotyl	lang	kurz
Hypokotylhaken	gekrümmt	offen
Kotyledonen	klein/gelb	expandiert/grün
Plastiden	Etioplasten	Chloroplasten
Anthocyane	-	+
Haare	-	+
Stoffwechsel	heterotroph	autotroph

Genexpressionsmuster sehr verschieden

Morphogenese der Plastiden



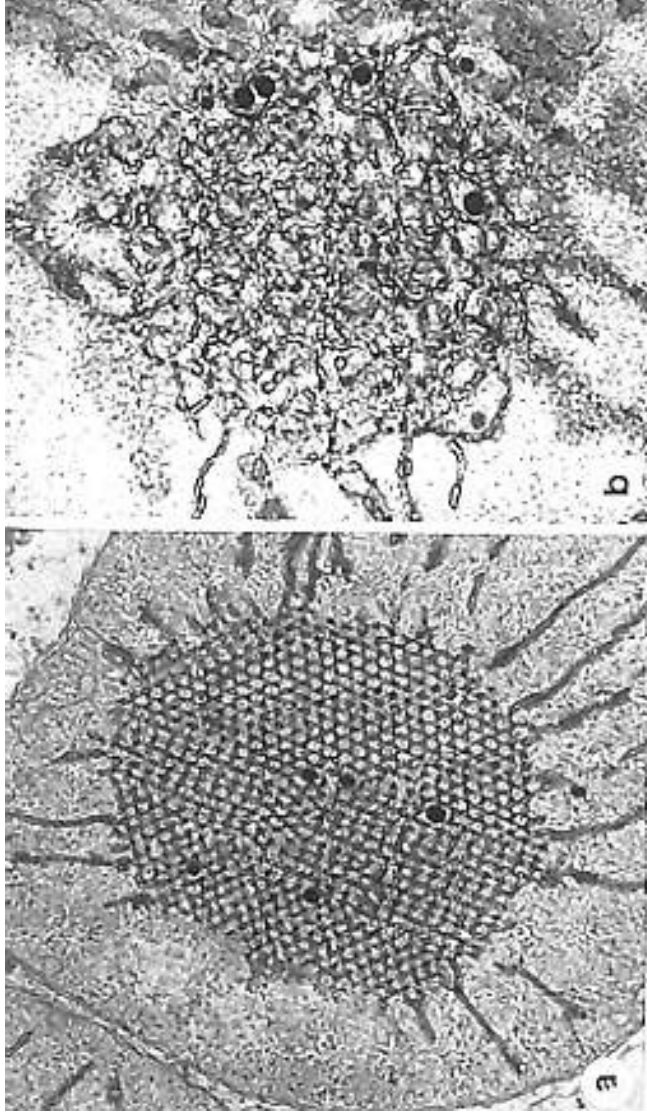
Chloroplast mit Grana- und Stromathylakoiden.

Etioplast mit Prolamellarkörper (röhrenförmige Membranen mit Chlorophyllvorstufe Protochlorophyllid)

Proplastid (Doppelmembran mit wenig strukturiertem Stroma).

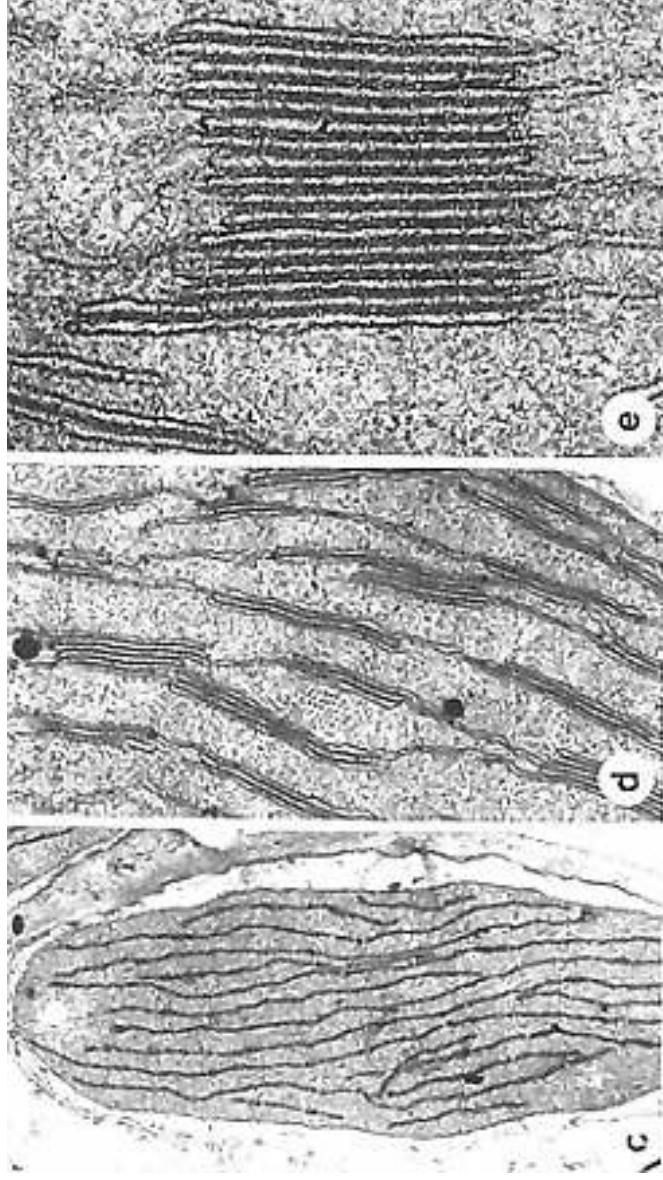
Im Embryo aus zurückgebildeten Chloroplasten, ca. 20 pro Zelle

Entwicklung des Chloroplasten



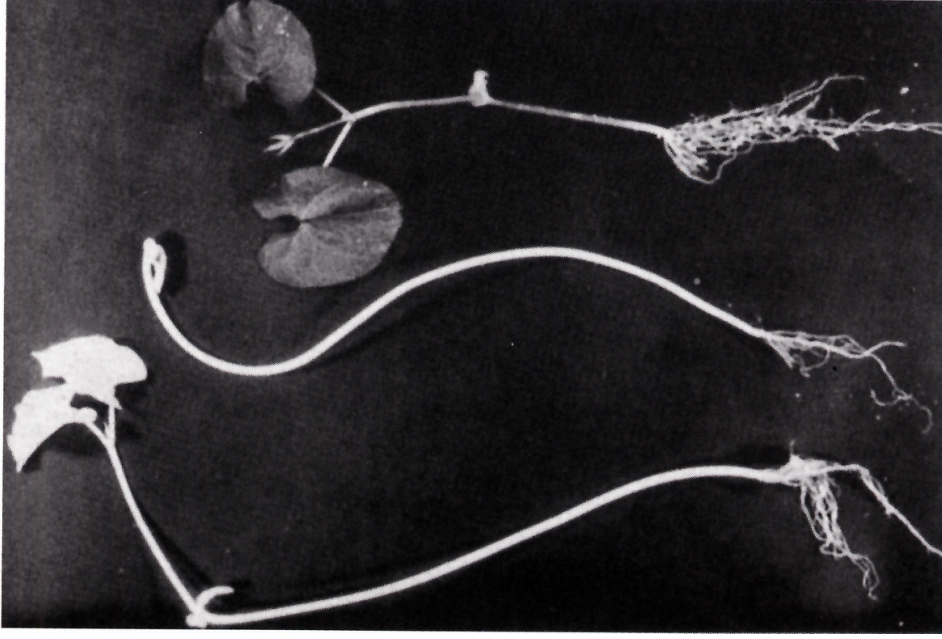
- a. Prolammellarkörper im Etioplasten.
- b. Röhrentransformation: Prolammellarkörper nach einer Minute Belichtung.

Entwicklung der Chloroplasten



- c. Dispersion des Prolamellarkörpers in primäre Lamellenschichten.
- d. Granabildung: nach 24 Stunden kontinuierlicher Belichtung.
- e. Granum eines ausdifferenzierten Chloroplasten.

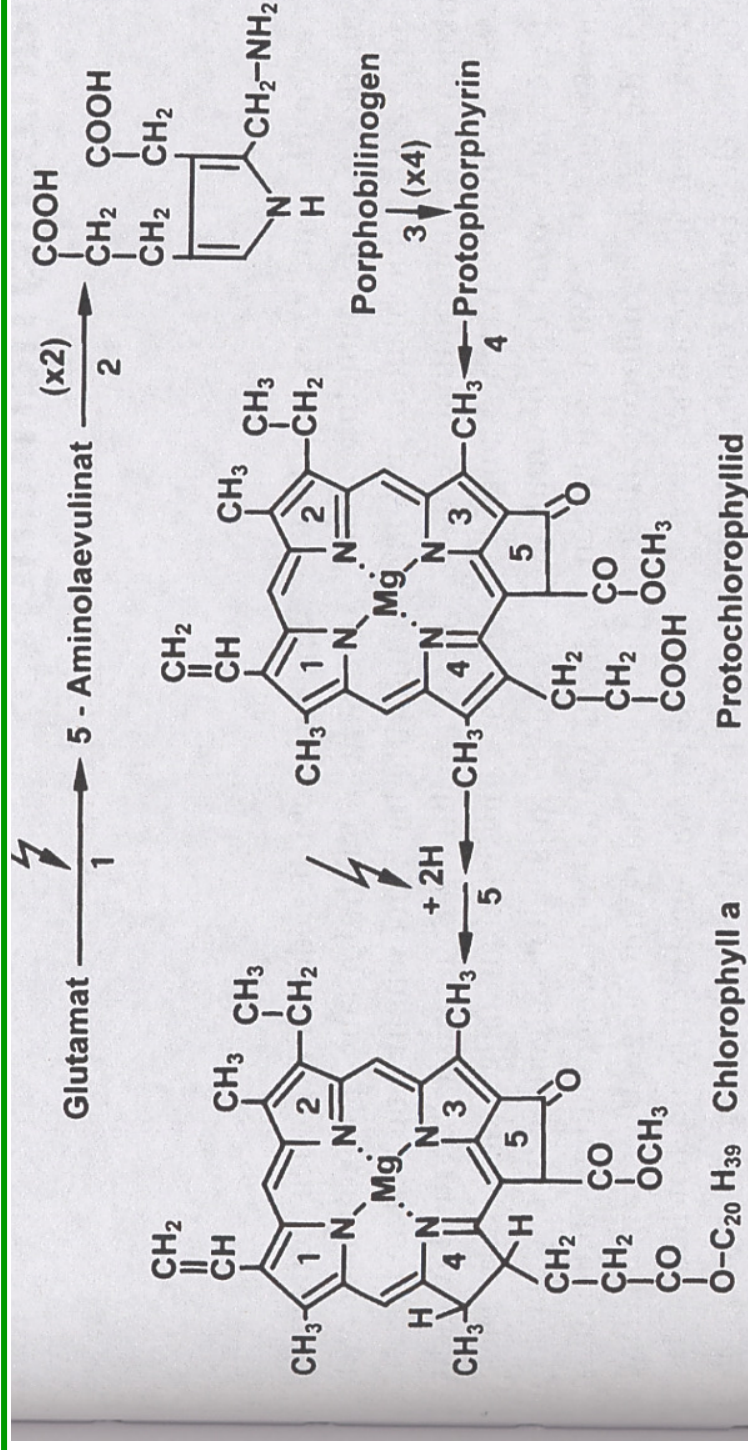
Belichtung mit Rotlicht induziert Photo- morphogenese, aber das Ergrünen erfordert Weißlicht



Keimlinge der Bohne für 6
Tage;

1. Täglich 5 Minuten
schwaches Rotlicht.
2. Vollständige Dunkelheit
3. Weißes Dauerlicht.

Protochlorophyllid



Protein-gebunden
(Protochlorophyllid
-holochrom)

Shade avoidance response (Schattenvermeidungsreaktion)



- Pflanzen wurden bezüglich der Lichtmenge unter gleichen Bedingungen angezogen
- Das R/FR Verhältnis wurde variiert
- Geringe Mengen von PhyB in der Pfr werden bei einem geringen R/FR gebildet.

Die Schattenvermeidungsreaktion wirkt sich auf den Ertrag aus



High R/FR

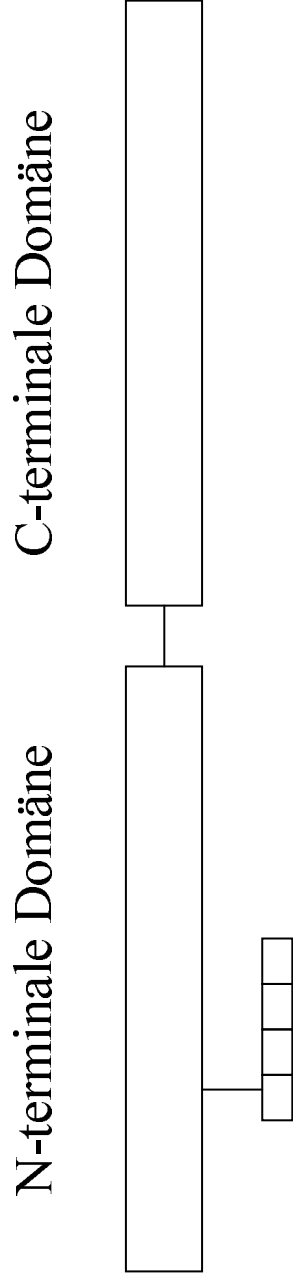
Low R/FR

- Pflanzen im Feld absorbieren Rotlicht
- Dunkelrotlicht wird reflektiert.
- Die Energie wird in die Verlängerung von Stamm und Petiolen auf Kosten der Ablagerung in Speicherorgane investiert.

Phytochrom A und Phytochrom B



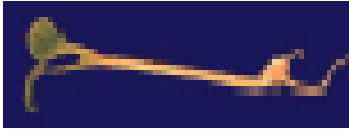
- Gleicher Aufbau des Proteins:



- Phytochrom A ist im etiolierten Gewebe 200x häufiger als Phytochrom B.
- Nach Umwandlung in die Pfr Form wird Phytochrom A sehr schnell abgebaut.

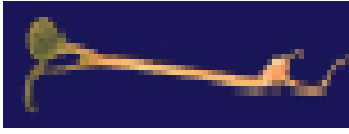
Phytochrom A und B, Experimente im Dauerlicht



Genotyp	WT	<i>phyA</i>	<i>phyB</i>
Bestrahlung mit Rot			
Bestrahlung mit Dunkelrot			
		PhyB wird durch Rotlicht zu 85% in Pfr Form überführt und hemmt das Hypokotylwachstum	PhyA wird durch Dunkelrotlicht zu 3% in die Pfr Form überführt.

Phytochrom A und B, Experimente im Dauerlicht



Genotyp	WT	<i>phyA</i>	<i>phyB</i>
Bestrahlung mit Rot			
Bestrahlung mit Dunkelrot			

PhyB wird durch Rotlicht zu 85% in Pfr Form überführt und hemmt das Hypokotylwachstum, die relativ großen Mengen von PhyA werden unter diesen Bedingungen abgebaut.

Der 3% des relativ großen PhyA Pools wechseln ständig zwischen der Pr und der Pfr Form. Theorie: vielleicht ist hier eine intermediäre Form sehr aktiv.

Wirkung von Lichtpulsen



- Very low fluence response (VLFR)
 - 0.0001 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ to 0.05 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (einziges Aufleuchten eines Glühwürmchens)
 - Keimung von Arabidopsis-Samen
 - Überführung relativ geringer Mengen (0.02%) des relativ großen *PhyA* Vorrats in die Pfr Form
 - Nicht durch Dunkelrotlicht revertierbar.
 - Unter diesen Lichtbedingungen können Samen von *phyA* Mutanten nicht mehr keimen.

Fluence: mol absorbierte Photonen pro m^2

Wirkung von Rotlichtpulsen



- Low fluence response (LFR)
 - 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ to 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
 - Keimung von Arabidopsissamen, Verhinderung der Streckung des Hypokotyls bei Arabidopsis
 - Unter diesen Lichtbedingungen können Samen von *phyB* Mutanten nicht mehr keimen.
 - Unter diesen Bedingungen wird der PhyA Vorrat schnell abgebaut.
 - Revertiert man den PhyB Vorrat mit Dunkelrotlicht, kann man verhindern, dass die biologische Antwort ausgelöst wird (Photoreversibilität).

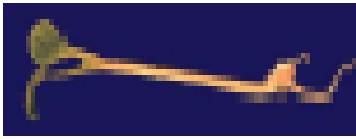
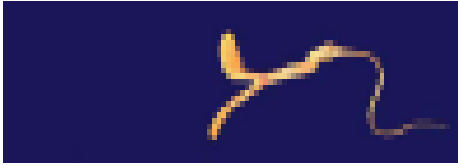
Law of reciprocity



- VLFRs und LFRs können entweder durch schwächere Lichtpulse über längere Zeiten oder durch starke Lichtpulse für kürzere Zeiten induziert werden, d.h. die Lichtmenge ist entscheidend.

High-irradiance response (HIR)



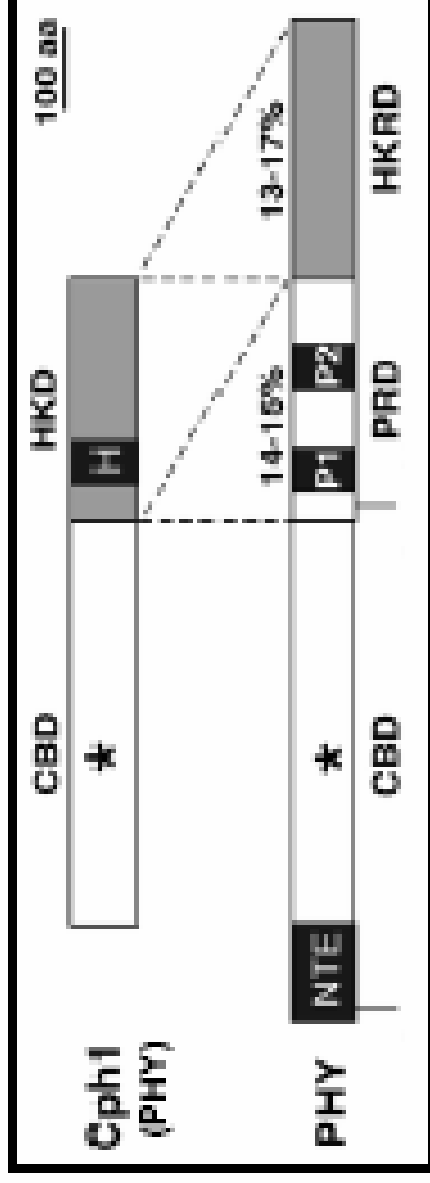
Genotyp	WT	phyA	phyB
Bestrahlung mit Rot			
Bestrahlung mit Dunkelrot			

HIR braucht Dauerlicht von relativ hoher Intensität

Die HIR ist nicht photoreversibel

Die HIR erfordert die dauerhafte Konversion von Pr zu Pfr, das Absorptionsmaximum liegt zwischen R und FR

Evolutionärer Ursprung



-Phytochrome findet man in Eu-, Archae- und Cyanobakterien auf.

→ prokaryotischen Ursprungs.

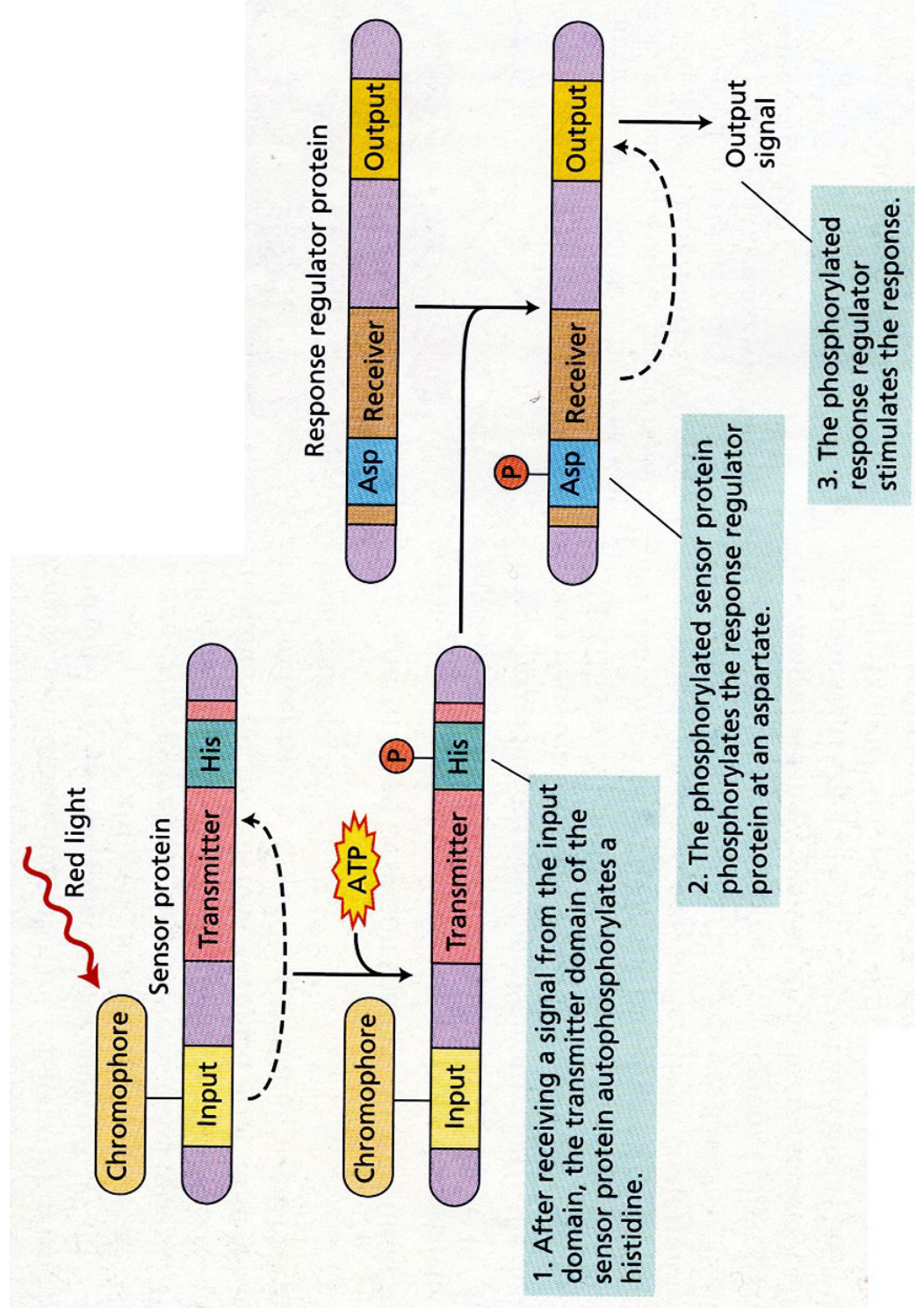
- In Prokaryoten sind Phytochrome Histidinkinasen (wie z.B. CRE1, ETR1); die Signaltransduktion läuft über einen Phosphorelay (Zwei-Komponentensystem)
- Pflanzliche Phytochrome besitzen keine Histidinekinaseaktivität mehr, dafür zusätzliche funktionelle Motive (→ Signaltransduktion?)

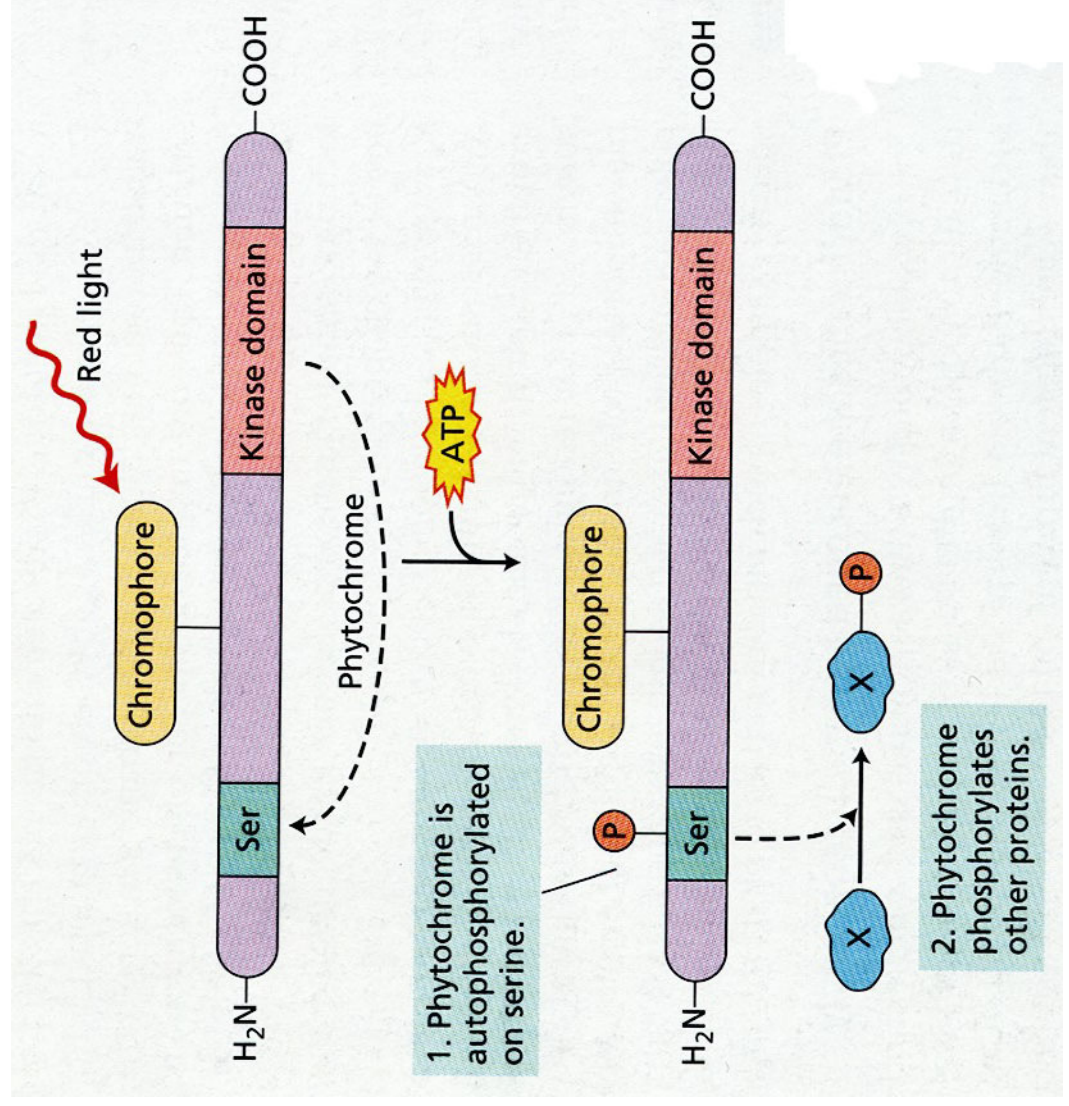
Cph1: Phytochrom von *Synechocystis* (Cyanobakterium)

CBD: Chromophor-bindende Domäne

HKD: Histidinkinase-Domäne (HKRD: His-Kinase „related“ Domäne)

PRD: PAS „related“ Domäne





Lokalisation

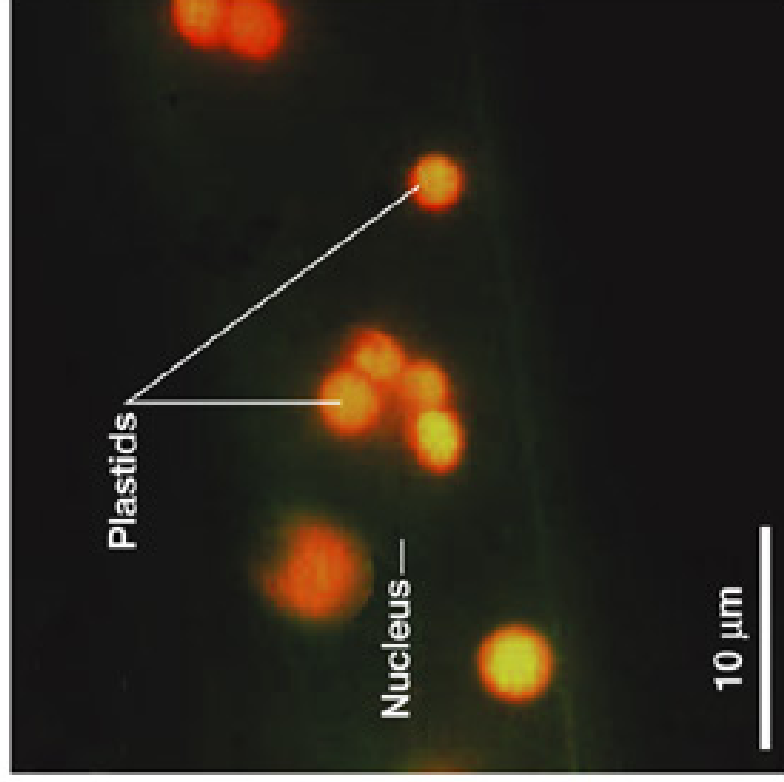


- Analyse:
 - Fusion des Proteins mit „Green Fluorescent Protein“ (GFP)
 - GFP: Protein aus der Qualle, das fluoresziert.
 - Expression des Fusionsproteins PhyA-GFP oder PhyB-GFP in Keimlingen
 - Sensitive Nachweismethode
 - *In situ* Analyse

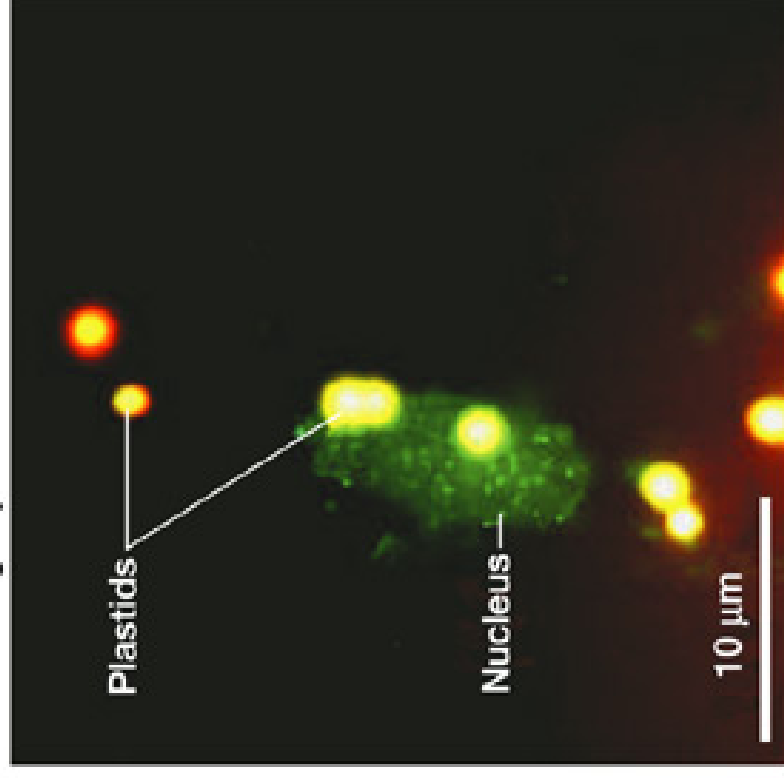
Translokation der Pfr Form in den Kern



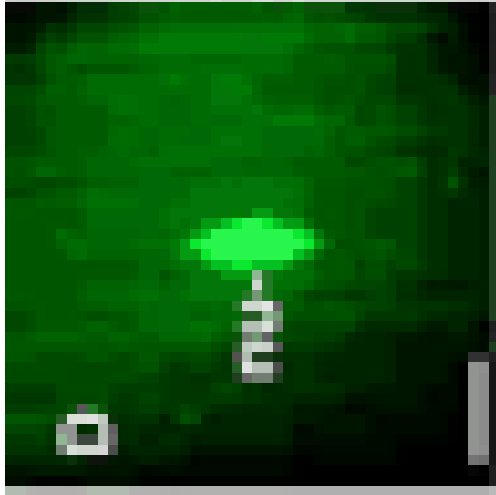
In darkness



After red light pulse

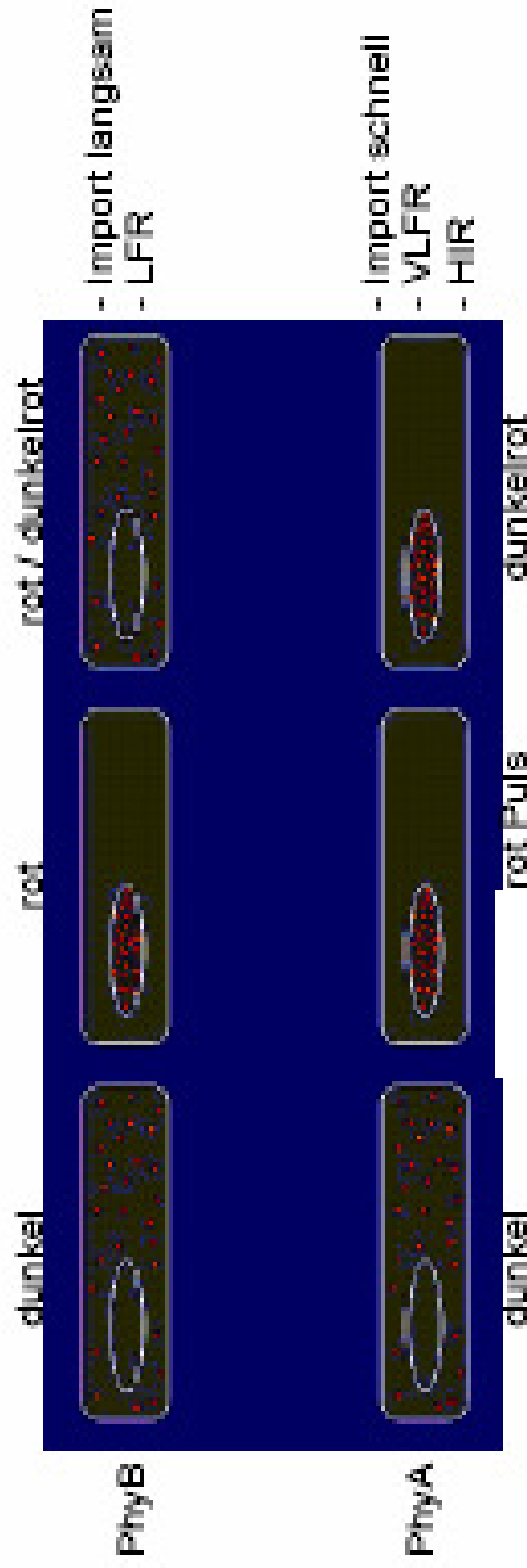


Kernlokalisierung von Pfr



Phytochrom A

Regulation der Lokalisation



- Phytochrome: Wandern nach Bestrahlung vom Cytoplasma in den Zellkern.
- Die Kinetik u. Lichtempfindlichkeit des Kernimports reflektiert die physiologische Funktion der einzelnen Phytochrome.
- Im Kern befinden sich die Phytochrome in auffälligen Strukturen.

Translokation in den Kern

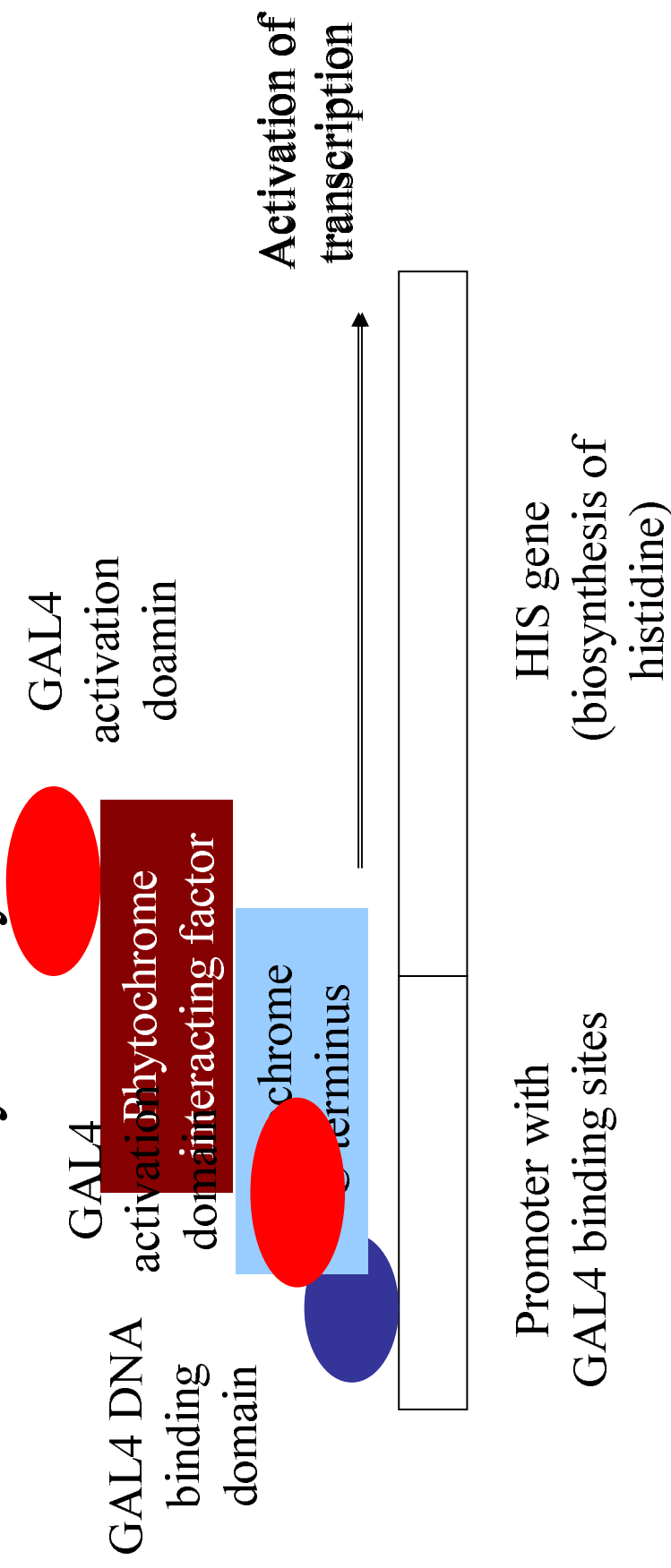


-
- PhyA-GFP: VLFR, FR-HIR
 - PhyB-GFP: LFR

Suche nach interagierenden Proteinen



- Yeast Two Hybrid System



Isolierung eines Transkriptionsfaktors



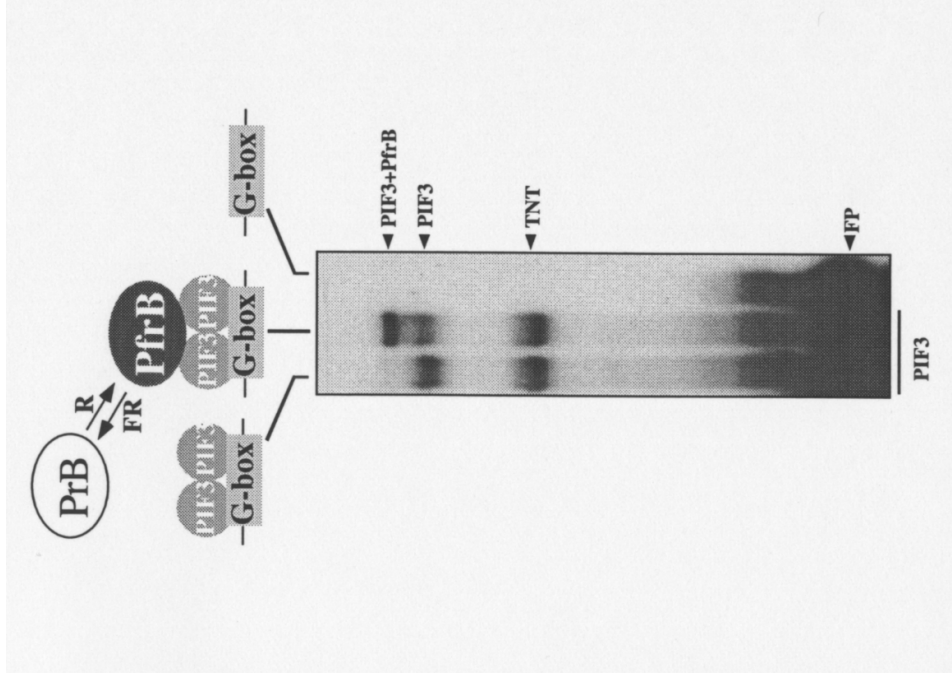
- PIF3:
 - Phytochrome interacting factor 3
 - Homologie zu anderen Transkriptionsfaktoren
 - Bindestelle: CACGTG (G-Box)

Herstellung isolierter Proteine



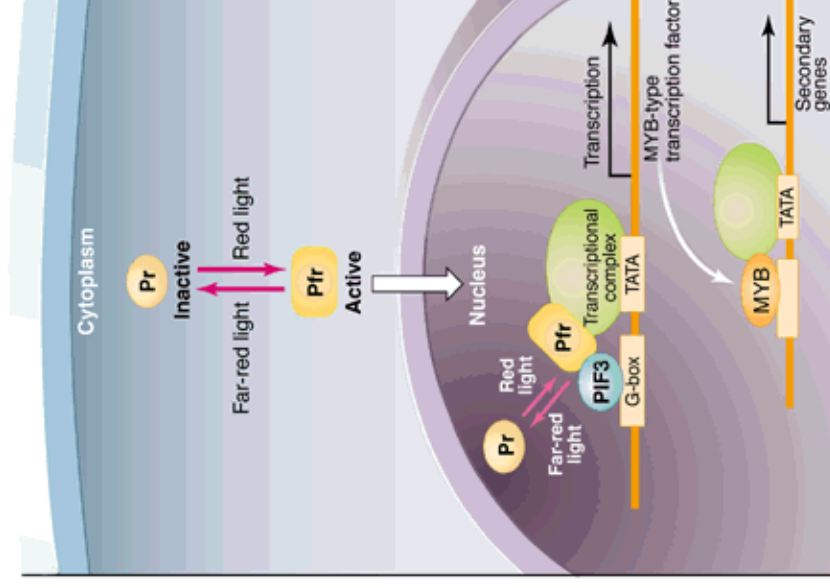
- Zugabe von T7 Polymerase und NTPs: Transkription der mRNA
- Isolierung der mRNA
- Zugabe von Ribosomen (Reticulocyten Extrakt) und Aminosäuren
- Translation des Proteins
- Im Falle von Phytochrom: Assemblierung mit Phytochromobilin zum Holoprotein

Phytochrom B interagiert mit dem Transkriptionsfaktor PIF



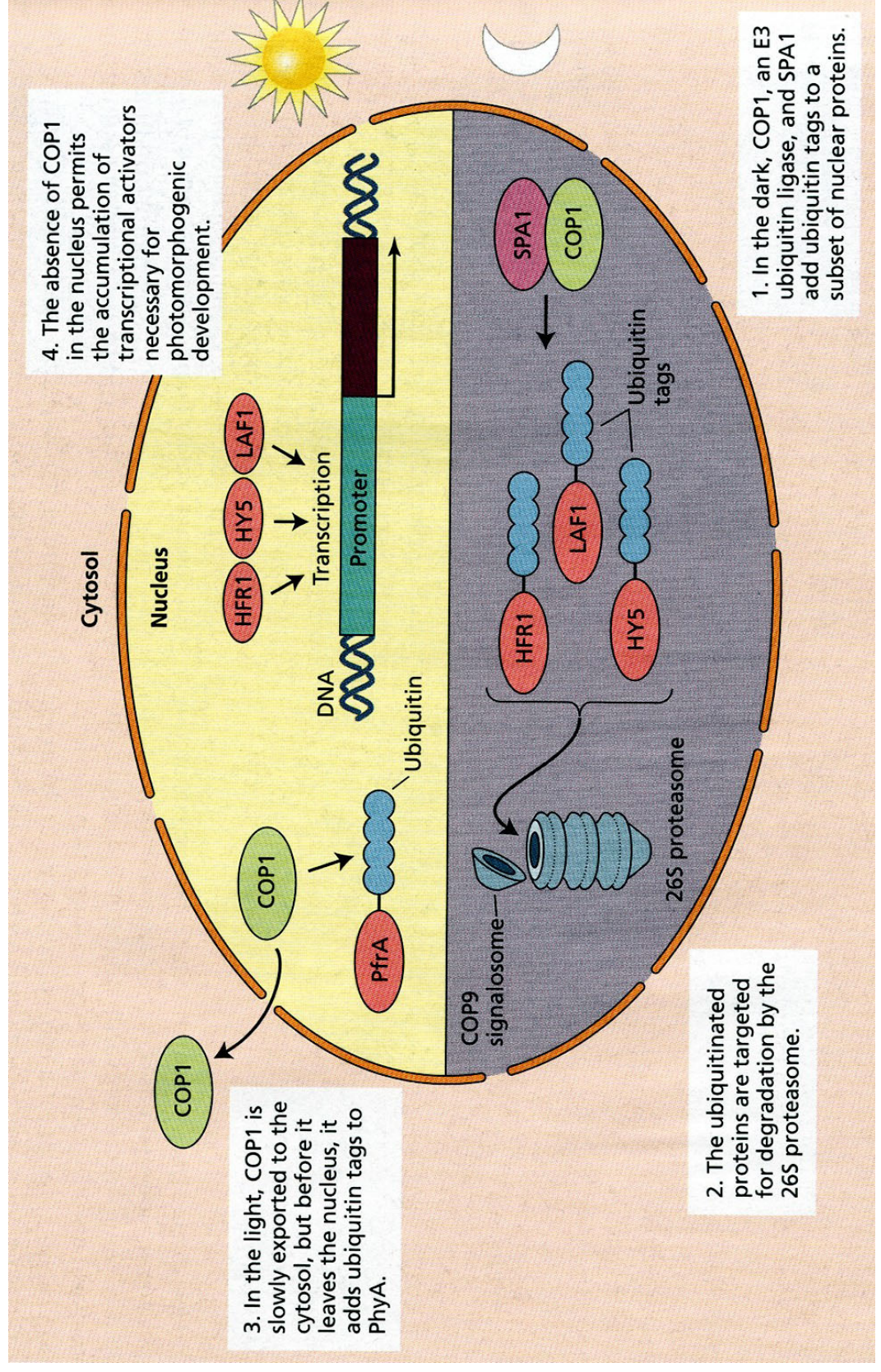
- EMSA: (Electrophoretic mobility shift assay)
- Radioaktive Markierung eines DNA-Fragmentes mit G-Box
- Zugabe von PIF3: Bildung eines DNA/Protein-Komplexes
- DNA/Proteinkomplex hat eine geringere Mobilität auf einem Gel als die freie DNA
- PhyB erkennt diesen Komplex, wenn es in der Pfr-Form vorliegt.

Wirkung von Phytochrom auf die Genexpression

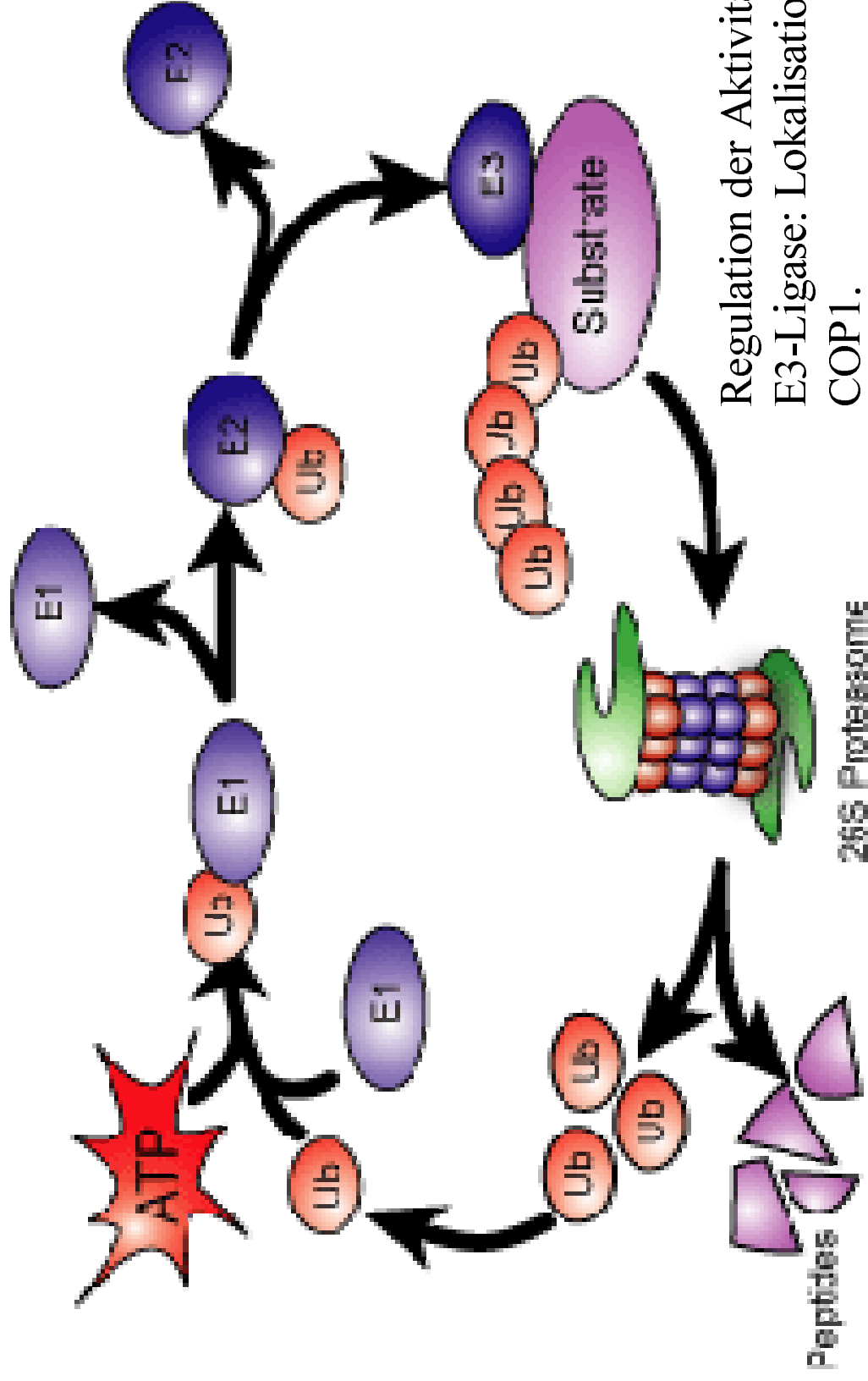


Nagatani, A. Science 288, 821-822 (2000)

Copyright (2000) American Association for the Advancement of Science



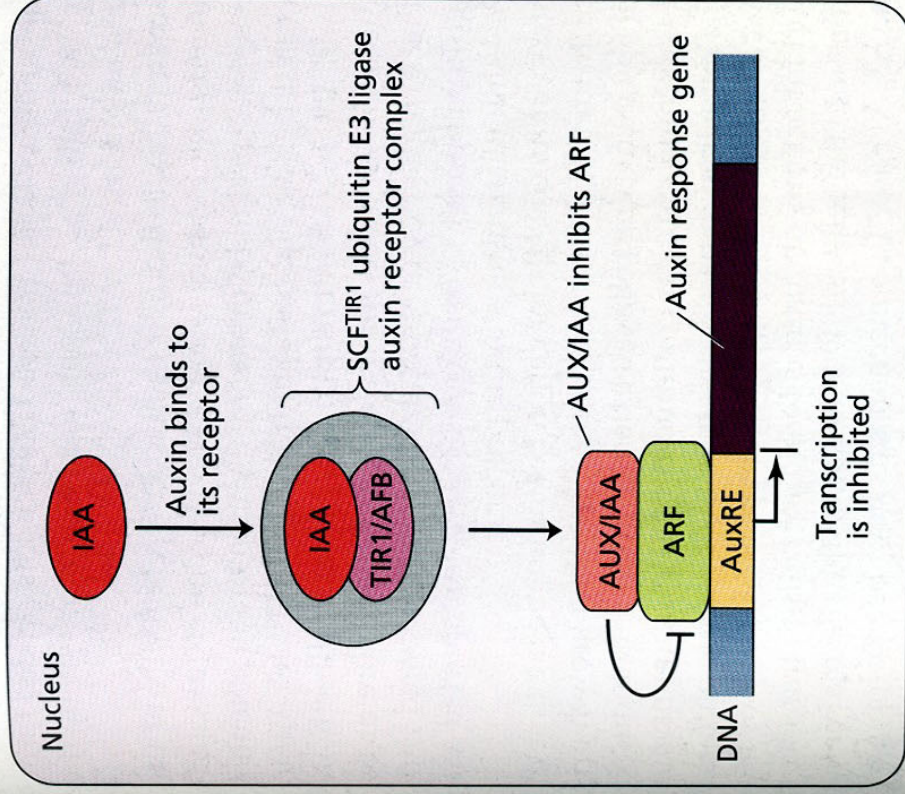
Proteinabbau



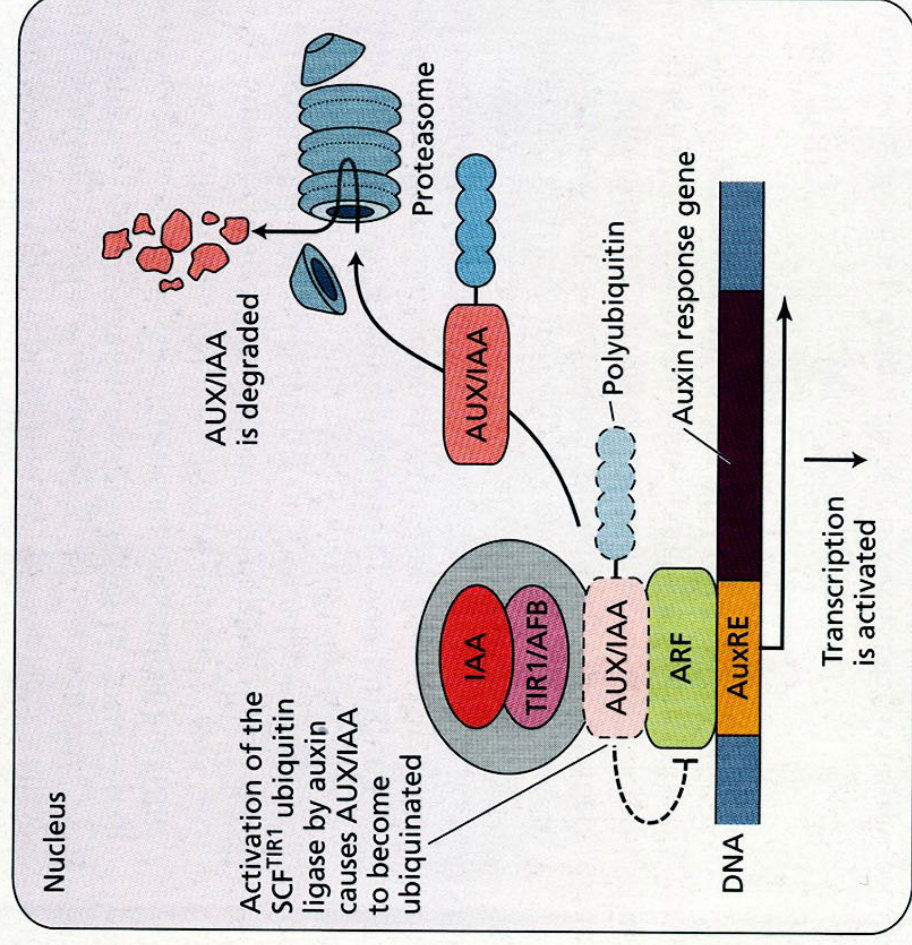
Proteinabbau bei der Auxin-vermittelten Signaltransduktion



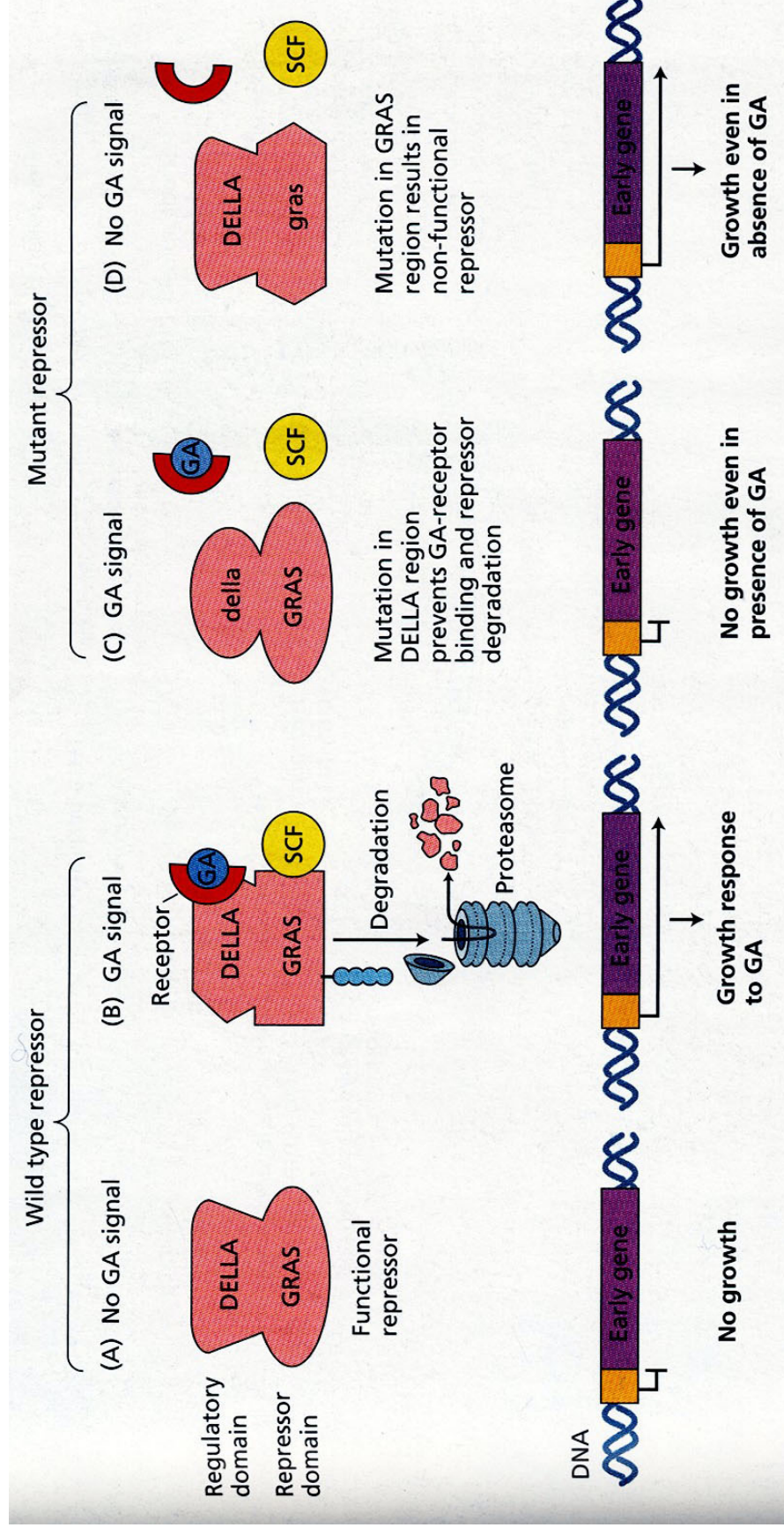
(A) Repression



(B) Activation



Proteinabbau bei der Gibberellinsäure-induzierten Signaltransduktion

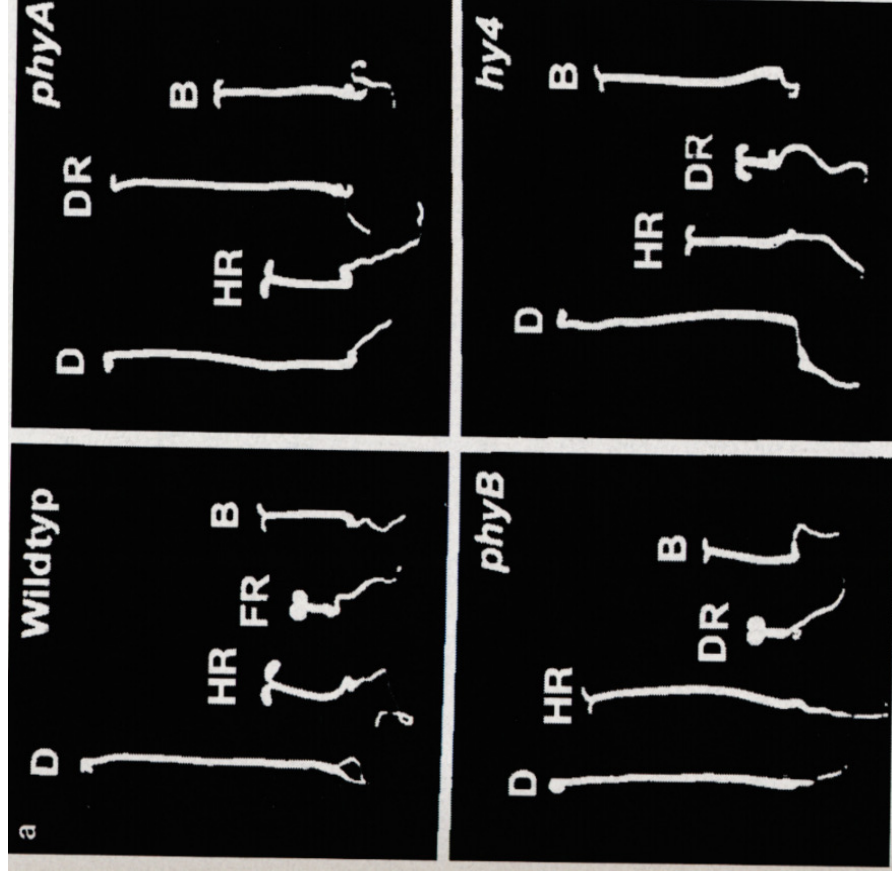


Vordiplom



- Welche Vorgänge sind an der Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (ER, Mitochondrien, Chloroplasten) beteiligt?
- Der Keimling entwickelt sich im Dunkeln anders als im Licht, nennen Sie 5 Unterschiede
- Was ist ein Etioplast?
- Wie können Sie den Photorezeptor Phytochrom in einem Extrakt nachweisen?
- Skizzieren Sie die Absorptionsspektren von Pr und Pfr
- Wie aktiviert die Pfr Form die Genexpression?

Auch Blaublicht induziert die Photormorphogenese



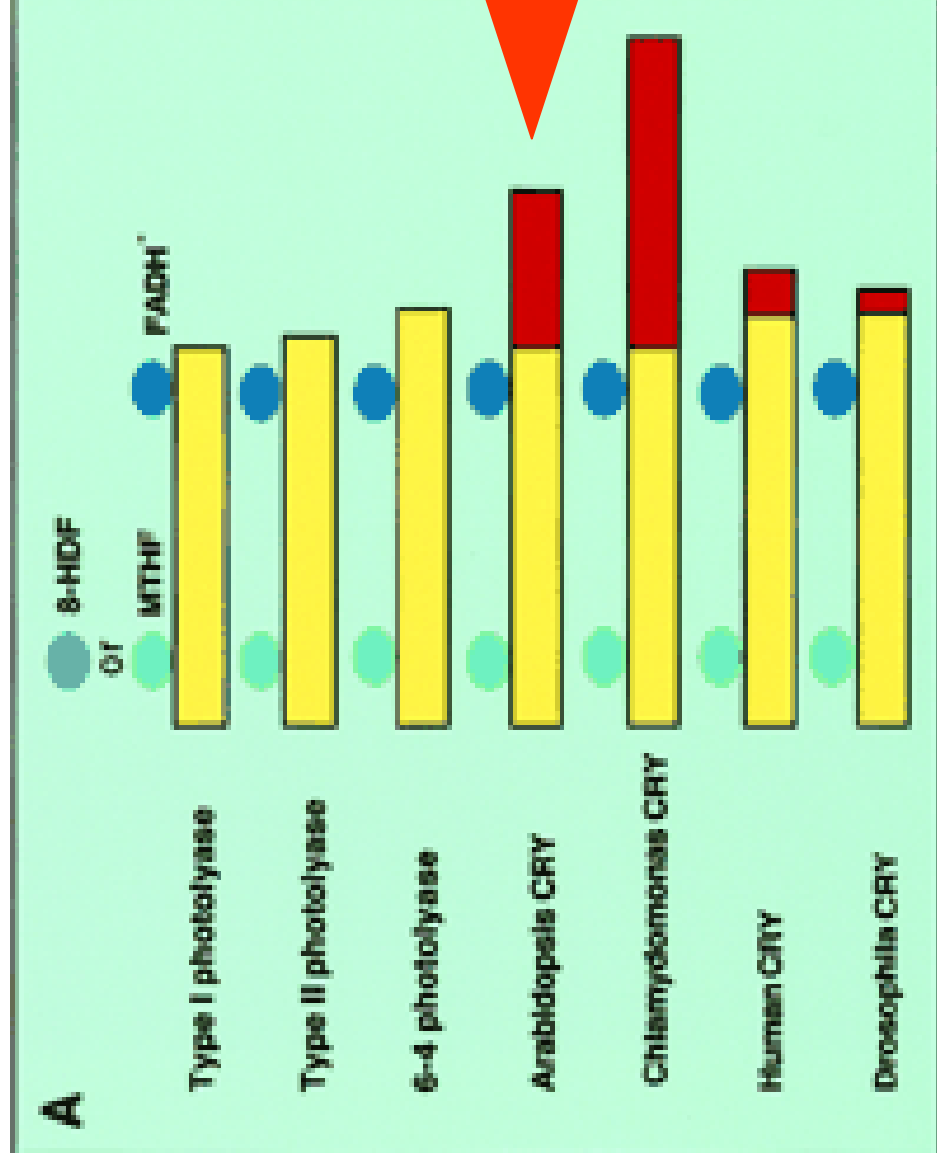
- auch Blaublicht führt zur Inhibition des Hypokotylwachstums.
- *hy4* Mutante, ausgelöst durch T-DNA Insertion

Cryptochrom



- Lange gesuchter Photorezeptor (400-500 nm)

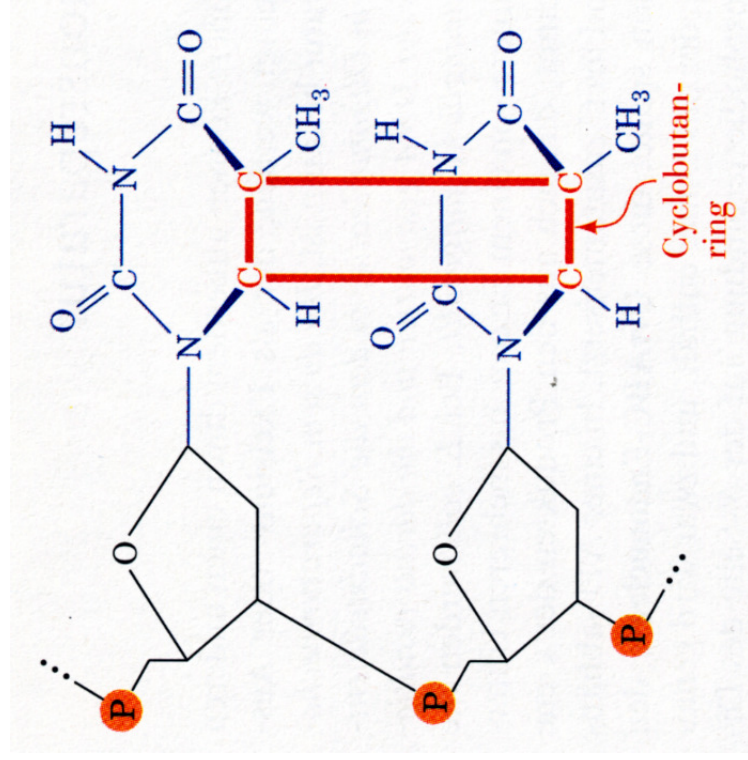
Photolyasen:
DNA-
Reparaturenzyme



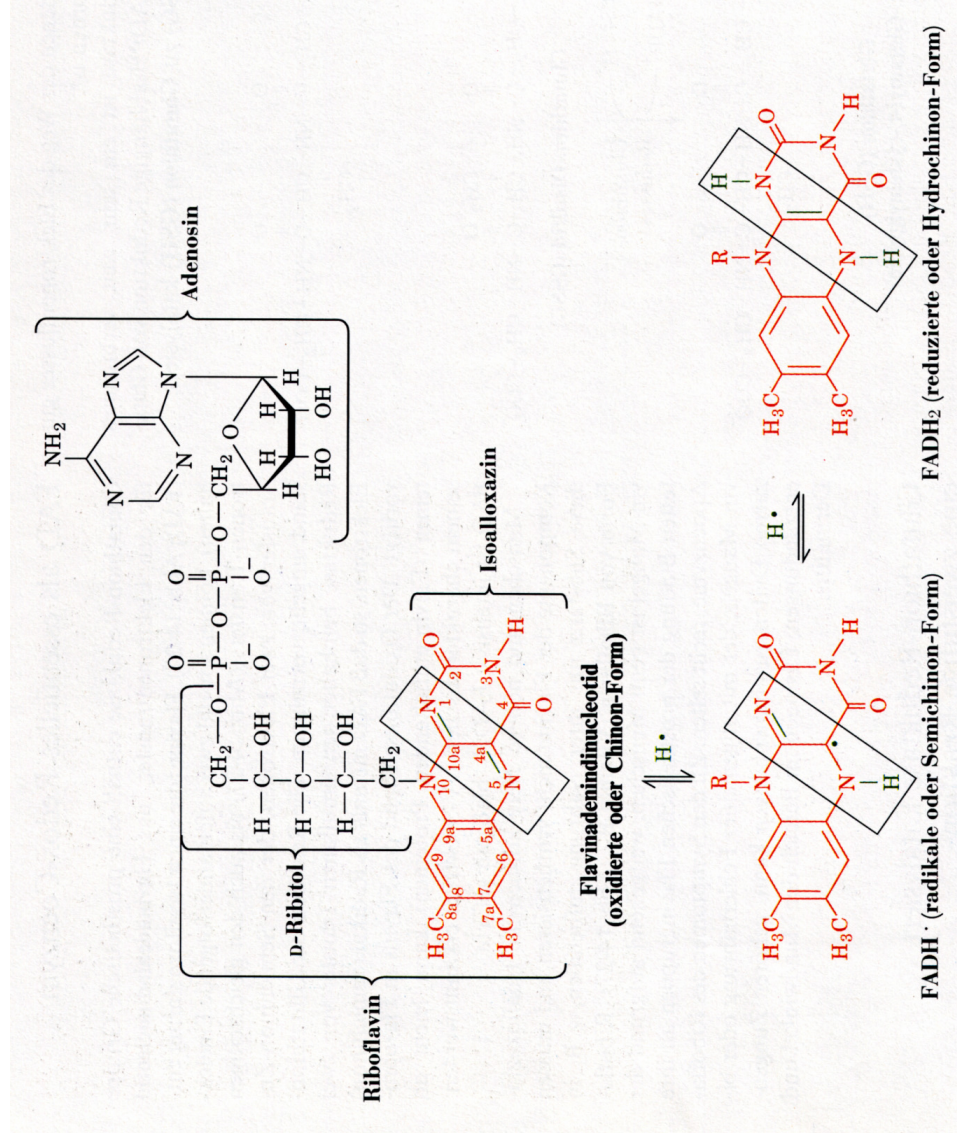
Photolyasen



- UV-Bestrahlung induziert Pyrimidin-Dimere
- Photolyasen binden im Dunkeln an DNA
- Licht-aktivierte Photolyasen spalten den Cyclobutanring
- 2 Licht absorbierende nicht kovalent gebundene Chromophore
 - FADH⁻
 - Methylentetrahydrofolat (MTHF)



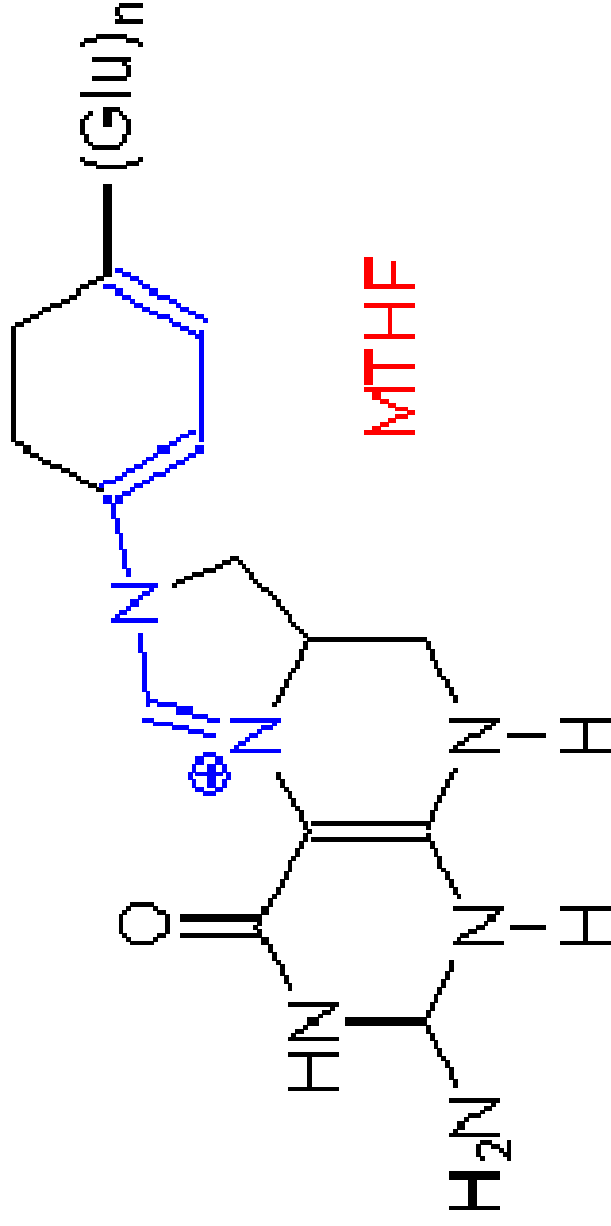
FAD/FADH⁻/FADH₂



Photolyasen



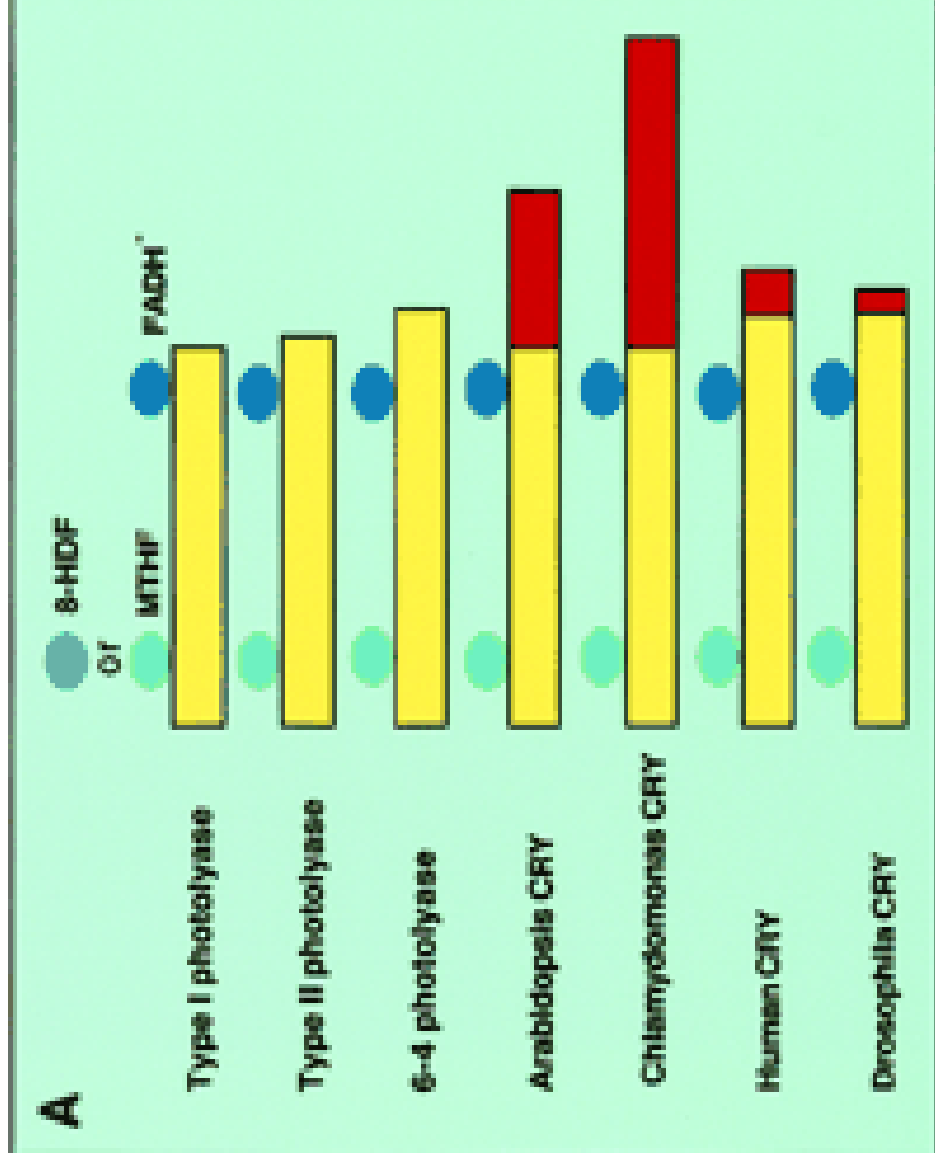
- Photolyasen reparieren DNA, indem sie ein Elektron vom Flavin auf das Pyrimidin-Dimer übertragen.
- Anregung des Elektrons durch Blaulicht
- Blaulicht wird „gesammelt“ durch MTHF



Cryptochrom



- Lange gesuchter Photorezeptor (400-500 nm)



Cryptochrome haben sich aus dem Blaulicht-absorbierenden Reparaturrenzym Photolyase entwickelt.

Chrytochrome haben keine Photolyase-Aktivität mehr.

Modellvorstellung



- Cryptochrom absorbiert Blaulicht durch MTHF
- Energie wird auf FADH übertragen
- Reduktion eines Interaktionspartners
- Veränderung der biologischen Aktivität des Interaktionspartners
- Cryptochrome sind im Kern lokalisiert.
- Cryptochrome interagieren mit COP1, einer Ubiquitin E3 Ligase, die für den lichtabhängigen Abbau von regulatorischen Proteinen verantwortlich ist.

Der pflanzliche Entwicklungszyklus

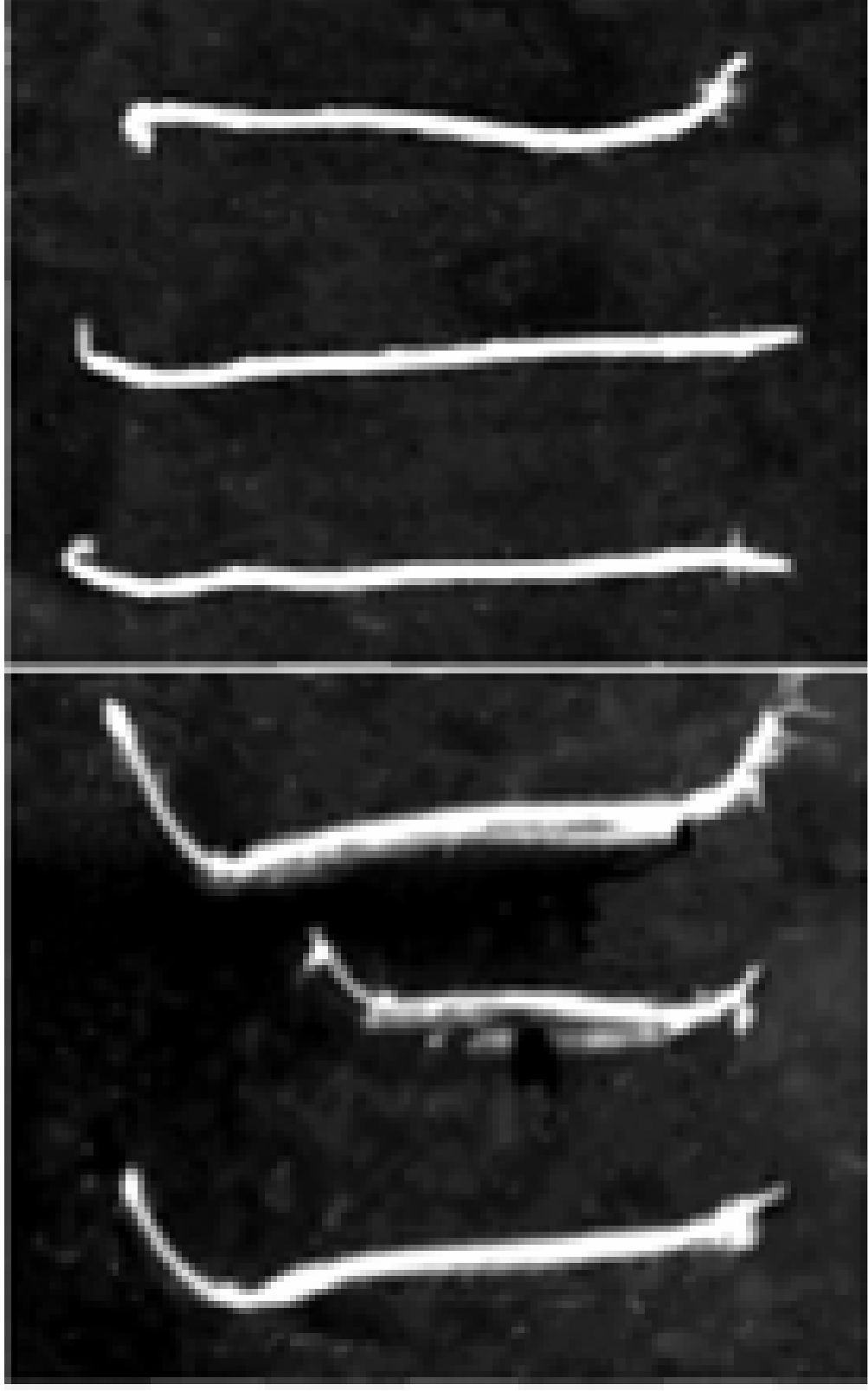


- Entwicklung der Gameten
- Doppelte Befruchtung
- Entwicklung des Embryos
- Samenreifung (Abscisinsäure)
- Keimung (Gibberellinsäure)
- Photomorphogenese (Phytochrom, Cryptochrom)
- Sprossapikalmeristem

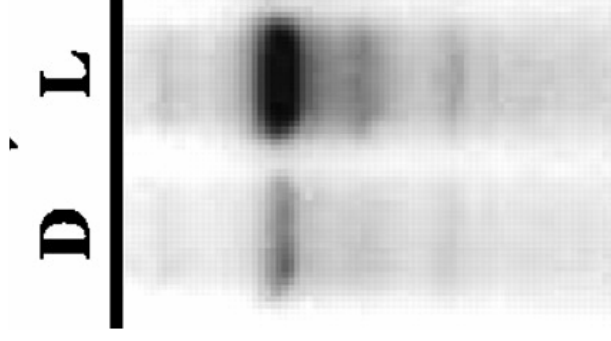
Phototropismus



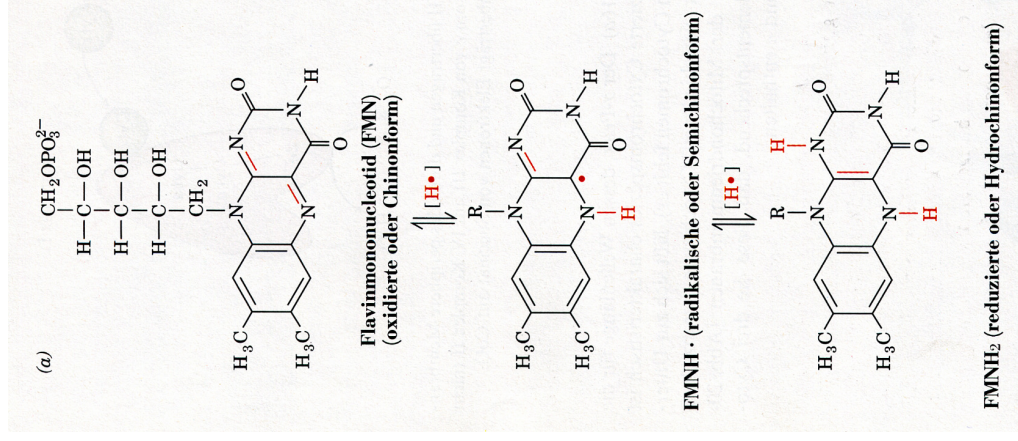
Arabidopsis „non-phototropic“ mutants



NPH1 oder Phototropin



- 116 kDa protein
- FMN als Chromophor
- Autophosphorylierung im Licht



Phosphorylierung von NPH1

