

POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH PIF/PIL JAKO EFEKT ROZKODOWYWANIA PRZEZ FITOCHROMY SYGNAŁÓW ŚWIETLNYCH

POSTRANSLATIONAL MODIFICATION OF THE PIF/PIL
TRANSCRIPTION FACTORS AS A RESULT OF THE LIGHT SIGNAL
DECODING BY PHYTOCHROMES

Anna HETMANN, Stanisław KOWALCZYK

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Wzrost i rozwój roślin pozostaje pod znaczącym wpływem światła, którego jakościowe i ilościowe zmiany odbierane są przez specyficzne fotoreceptory. Zmiany warunków oświetlenia, odbierane przez różnorodne fotoreceptory, przetwarzane są na sygnały komórkowe indukujące w roślinie odpowiednie reakcje. Fotoreceptorami światła czerwonego i dalekiej czerwieni są fitochromy – dimeryczne białka zawierające kowalencyjnie związaną fitochromobilinę pełniącą funkcję chromoforu. Proces dekodowania informacji zapoczątkowuje, wzbudzona przez światło czerwone (666 nm), reakcja fotoizomeryzacji chromoforu oraz towarzyszące jej zmiany strukturalne apofitochromu. Powstająca w wyniku fotokonwersji forma Pfr jest biologicznie aktywną formą fotoreceptora. Inaktywacja fitochromu, zachodząca na świetle dalekiej czerwieni (730 nm), polega na fotokonwersji formy Pfr do nieaktywnej formy Pr. Fitochromy są syntetyzowane i w ciemności pozostają na terenie cytoplazmy w formie nieaktywnej. Forma aktywna fitochromu, powstająca w odpowiednich warunkach oświetlenia, zostaje przetransportowana do jądra, gdzie oddziałując z różnymi białkami, wpływa modyfikująco na ekspresję genów. PhyB wnika do jądra w odpowiedzi na światło czerwone, podczas gdy transport phyA może zachodzić po naświetleniu daleką czerwienią lub światłem o niskiej intensywności i zróżnicowanej barwie. W dojrzałym transporcie phyA uczestniczą dwa wiążące się z aktywną formą fitochromu białka FHY1 i FHL. Dotychczas zidentyfikowano ponad dwadzieścia białek oddziałujących z fitochromami, ale, jak wykazano w najnowszych badaniach, kluczową rolę w sygnalizacji fitochromowej odgrywają czynniki transkrypcyjne typu bHLH tworzące ewolucyjnie zachowawczą podklasę PIF (ang. *Phytochrome Interacting Factor*) lub PIL (ang. *Phytochrome Interacting Factor-like*). Niektóre białka z tej podklasy wykazują wyraźną swoistość względem określonych fitochromów, oddziałując wybiórczo tylko z phyB, inne z podobnym powinowactwem wiążą zarówno phyB, jak też phyA. Analiza fenotypowa mutantów *pif/pil* sugeruje, że czynniki transkrypcyjne PIF/PIL częściej pełnią funkcję represorową. Fosforylacja, co najmniej PIF1/PIL5, PIF3, PIF4, PIF5 i HFR1, przez aktywne formy fitochromów, kieruje fosforylowane czynniki transkrypcyjne do ubiquitynacji, a modyfikowane białka degradowane są w proteasomach

26S. Ponadto, najnowsze badania pokazują, że PIF/PIL mogą oddziaływać z DELLA – kluczowymi białkami represorowymi funkcjonującymi w sygnalizacji giberelinowej (GA). Białka DELLA, oddziałujące z niektórymi PIF/PIL, blokują motyw bHLH i uniemożliwiają wiązanie PIF/PIL do sekwencji promotorowych odpowiednich genów. Poszczególne czynniki transkrypcyjne PIF/PIL pośredniczą w regulowanym przez fitochromy kiełkowaniu nasion, deetiolacji rosnących siewek i unikaniu zacienienia. W regulacji kiełkowania nasion światło, szczególnie światło czerwone, jest ważnym zewnętrznym czynnikiem regulacyjnym, zaś działające antagonistycznie gibereliny (GA) i kwas abscysynowy (ABA) pełnią rolę kluczowych czynników wewnętrznych. Efektem badań ostatnich lat było zidentyfikowanie PIF1/PIL5 jako kluczowego negatywnego elementu pośredniczącego w zależności od fitochromów regulacji kiełkowania nasion. W ciemności PIF1/PIL5 blokuje kiełkowanie poprzez tłumienie wrażliwości nasion na gibereliny oraz regulowanie poziomu GA i ABA. Dojądrowa migracja wzbudzonych przez światło fitochromów, umożliwiająca bezpośrednie oddziaływanie fotoreceptorów z PIF1/PIL5, prowadzi do zniesienia funkcji represyjnej PIF1/PIL przez jego proteolityczną degradację. Światło odgrywa także rolę decydującego czynnika zewnętrznego, który określa program rozwojowy rosnącej siewki. W ciemności realizowany jest genetyczny program skotomorfogenezy, zaś percepcja przez fotoreceptory sygnałów świetlnych inicjuje proces deetiolacji, zapoczątkowujący program fotomorfogenezy. Informacje pochodzące od fitochromów i kryptochromów kierowane są do białek COP/DET/FUS, pełniących funkcje nadrzędnych elementów represyjnych fotomorfogenezy. W ciemności, białka te współdziałają w ubiquitylnacji czynników transkrypcyjnych HY5, HYH, LAF1 promujących fotomorfogenezę, przeciwdziałając w ten sposób przejściu od skotomorfogenezy do fotomorfogenezy. Białka PIF/PIL w ciemności są aktywne i uczestniczą w realizacji genetycznego programu skotomorfogenezy. Wzbudzone przez światło fitochromy w formie Pfr fosforylują białka PIF/PIL, kierując je w ten sposób do proteolitycznej degradacji, co w efekcie kończy program skotomorfogenezy. Białka PIF/PIL oraz HY5 pełnią również funkcję elementów integrujących szlaki sygnałowe aktywowane przez światło i szlaki aktywowane przez fitohormony. Fitochromy, odbierając zmiany w składzie widma światła słonecznego towarzyszące bliskości zielonych liści, pośredniczą także w odpowiedziach roślin określanych jako reakcje unikania zacienienia. Białka PIF4 i PIF5 pełnią funkcję elementów pozytywnych w szlakach regulujących odpowiedź unikania zacienienia, uczestnicząc w regulacji ATHB2, ATHB4 i PIL1, pełniących funkcję pozytywnych regulatorów unikania zacienienia, oraz HFR1, czynnika transkrypcyjnego odgrywającego rolę czynnika negatywnego. W odpowiedziach roślin na malejącą wartość współczynnika czerwien/daleka czerwien zasadniczą rolę odgrywa phyB. W warunkach światła słonecznego phyB występuje w przewadze w migrującej do jądra formie Pfr, wiążącej i fosforylującej PIF4 i PIF5. W warunkach światła wzbogaconego w daleką czerwień phyB ulega fotokonwersji do pozostającej w cytoplazmie formy nieaktywnej Pr, co w efekcie sprzyja wzrostowi w jądrze poziomu białek PIF4 i PIF5.

Słowa kluczowe: fitochrom, białka oddziałujące z fitochromami, sygnalizacja świetlna.

Summary: Growth and development of plant occur under great influence of light, that quality and quantity changes are received by the specific photoreceptors. Various photoreceptors perceive the changing light condition and transform them into a molecular signal that results in the appropriate response. The photoreceptors of red/far-red light are phytochromes – the dimeric proteins covalently linked with phytochromobilin that acts as a chromophore. The decoding process starts with the perception of red light (666 nm), which occurs through photoisomerization of a chromophore leading to structural changes in apoprotein. This form of the phytochrome is called Pfr and is considered the biologically active form. This change is reversible, with far-red light (730 nm) illumination restoring Pr form. The phytochromes are synthesized in their inactive Pr form and are localized in the cytoplasm. Upon light excitation they are activated and translocated into the nucleus, where they interact with different proteins and modulate gene expression. PhyB enters the nucleus in response to red light, but phyA is efficiently transported into nucleus in response to far-red light and in response to very low levels of light over a broad range of colours. Nuclear accumulation of phyA is dependent on two proteins FHY1 and FHL which preferentially interact with the light activated form of phyA. Phytochromes, after translocation into the nucleus, interact with nuclear proteins. To date, more than 20 phytochrome-interacting proteins have been reported. Several recent studies have shown that multiple related bHLH (*basic helix-loop-helix*) class transcription factors play key roles in phytochrome signal transduction. All the bHLH proteins involved in light signaling belong to a single evolutionarily related subclass. These bHLH transcription factors are known as PIF

(*phytochrome interacting factor*) or PIL (*phytochrome interacting factor-like*). Some PIF/PILs preferentially interact with phyB whereas others interact with equal affinity with both phyB and phyA. Analysis of *pif/pil* mutants have led to the suggestion that they mainly act as negative rather than positive regulators. Because phytochromes can phosphorylate PIF1/PIL5, PIF3, PIF4, PIF5 and HFR1, it is suggesting that phosphorylated proteins may then be ubiquitinated by an E3 ubiquitin ligase, leading to degradation by the 26S proteasome. Recent studies demonstrated that several PIF/PIL proteins may interact with DELLA proteins – the key repressors of gibberellic acid signaling. The DELLA proteins physically interact with several members of the PIF/PIL family in such a way that the interaction inhibits the ability of the PIF/PILs to bind to, and regulate their target genes. Members of the PIF/PIL transcription factors subclass are involved in phytochrome-regulated processes such as seed germination, seedling de-etiolation, and response to shade signals. Light, specifically red light, is a crucial external factor that induces seed germination. On the other hand, the plant hormones, gibberellins (GA) and abscisic acid (ABA) are internal cues that play important but antagonistic roles in seed germination. Recent research has identified PIF1/PIL5 as a key negative regulator in phytochrome-mediated seed germination. In the dark, PIF1/PIL5 represses germination through reducing GA responsiveness and regulating GA and ABA levels. Light-activated phytochromes directly interact with PIF1/PIL5 and promote its degradation, negating PIF1/PIL5 repressive effects. To a postgerminative seedling, light is a decisive environmental factor that determines its developmental program. In the dark, a seedling undergoes scotomorphogenesis, however, under light, it adopts genetic program of photomorphogenesis. Light signals from phytochromes and cryptochromes converge on a group of conserved proteins termed COP/DET/FUS, which are central repressors of photomorphogenesis. In darkness, they work in concert to target a number of photomorphogenesis-promoting transcription factors, such as HY5, HYH and LAF1, for degradation. In the dark, PIF/PIL proteins are active and regulate gene expression to promote scotomorphogenic growth. Under light, activated phytochromes in their Pfr form, interact with PIF/PILs and result in the phosphorylation and subsequent degradation of PIF/PILs by the proteasome, resulting in photomorphogenesis. Besides, PIF/PIL and HY5 proteins are signaling integrators that link light signals to the signaling of phytohormones. Phytochromes sense changes in light quality due to shading by competing vegetation, using the ratio of red to far-red light (R/FR). PIF4 and PIF5 have recently been shown to be positive regulators of shade avoidance responses, participating in the regulation of some key players in these responses, such as ATHB2, ATHB4 and PIL1, the proteins positively regulating shade avoidance, and HFR1, a transcription factor with a negative role in shade avoidance. Responses to low R/FR ratio are primarily mediated by phyB. In daylight, phyB exists predominantly in the Pfr form, and following import into the nucleus, Pfr B binds PIF4 and PIF5 proteins, resulting in their degradation via the 26S proteasome. In vegetational shade, a reduction in R/FR ratio results in conversion of phyB to the inactive Pr form. The reduction in phyB Pfr would therefore result in increased abundance of nuclear PIF4 and PIF5 proteins.

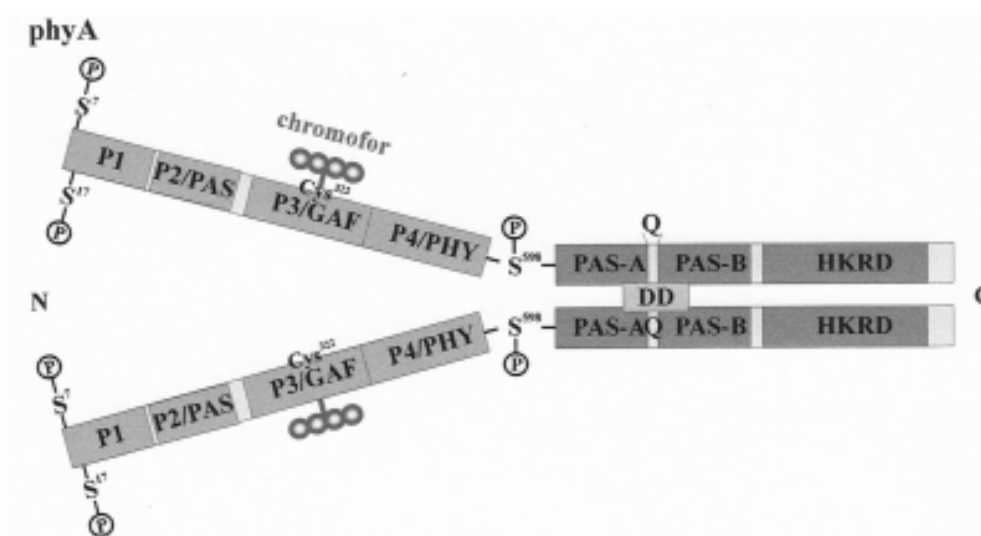
Key words: phytochrome, phytochrome-interacting proteins, light signaling.

WPROWADZENIE

Rośliny, dzięki posiadanym fotoreceptorom, w sposób ciągły odbierają informacje o jakościowych i ilościowych zmianach widma światła słonecznego i na bieżąco dostosowują do nich swój wzrost i rozwój. W odbiorze światła czerwonego i dalekiej czerwieni uczestniczy układ fitochromów – w rzodkiewniku i pomidorze kodowany przez pięć genów *PHYA-PHYE*, w ryżu i innych jednoliściennych przez trzy *PHYA-PHYC*, a w sośnie przez cztery geny *PHYP1*, *PHYP2*, *PHYN* i *PHYO* [8,73]. Fitochromy roślin wyższych są dimerycznymi chromoproteinami, zawierającymi dwie kowalencyjnie związane cząsteczki fitochromobiliny pełniące funkcję chromoforową. Poszczególne fotoreceptory, różniące się stabilnością apofitochromu oraz niektórymi szczegółami dotyczącymi percepcji oraz sposobu przetwarzania sygnałów świetlnych,

klasyfikowane są do dwóch grup określanych jako fitochromy typu I i II lub A i B. Fitochrom A (PhyA), występujący wyłącznie w formie homodimerów, ulega na świetle proteolitycznej degradacji, podczas gdy fitochromy z grupy B w podobnych warunkach są bardziej stabilne, a ponadto funkcjonują w formie homo- bądź heterodimerów. Na przykład, phyC i phyE nie występują w formie homodimerów, tylko tworzą heterodimery z phyB i phyD [18]. Fitochromy grupy B uczestniczą w klasycznych fotoodwracalnych odpowiedziach towarzyszących fotokonwersji typu $Pr \rightleftharpoons Pfr$, a w warunkach obniżonego współczynnika czerwien/daleka czerwień odgrywają kluczową rolę w regulacji odpowiedzi „unikania zacienienia”. PhyA pośredniczy w percepcji światła czerwonego o wysokim natężeniu, światła dalekiej czerwieni oraz uczestniczy w procesach zachodzących na granicy dnia i nocy. W *A. thaliana* phyA bierze udział w odpowiedziach na światło o bardzo niskim natężeniu (VLFR) (ang. *Very Low Fluence Response*) oraz światło dalekiej czerwieni o wysokim natężeniu (FR-HIR) (ang. *Far Red-High Irradiance Response*) [8,73].

W pojedynczym, około 120 kDa polipeptydzie apofitochromu wyróżnia się około 65 kDa domenę N-kończową uczestniczącą w odbiorze i przekazywaniu sygnału oraz około 55 kDa domenę C-kończową odpowiedzialną za dimeryzację, stabilność, a w przypadku phyB także za subkomórkową relokację fotoreceptora [8,73]. Domenę N-kończową tworzą cztery subdomeny określone jako P1, P2/PAS, P3/GAF i P4/PHY (ryc. 1). Subdomena P1 w phyB wydaje się nie odgrywać istotnej roli, natomiast w phyA pełni przypuszczalnie zróżnicowaną funkcję zależną od źródła pochodzenia. Jednakże, na szczególną uwagę zasługują wyniki wskazujące, iż P1 bierze udział w regulacji stabilności phyA, zwłaszcza w powstającej na świetle czerwonym formie Pfr [31,94]. Subdomeny P2/PAS i P3/GAF odpowiadają za wiązanie chromoforu (otwartej grupy tetrapiolowej) do położonej w subdomenie P3/GAF reszty cysteiny oraz uczestniczą w transdukcji sygnału. W subdomenie P3/GAF phyB ważną funkcję pełni reszta tyrozyny-276 (w phyA Tyr-242), gdyż mutacja substytucyjna polegająca na zastąpieniu tego aminokwasu przez histydynę daje konstytutywnie aktywne fotoreceptory [91]. Zmiany konformacyjne towarzyszące mutacji miałyby – wg autorów – uniezależnić dojądrowy transport zmutowanego białka od warunków oświetlenia. Subdomena P4/PHY, oddziałująca z pierścieniem D grupy chromoforowej oraz stabilizująca formę Pfr fotoreceptora, odpowiada za aktywność katalityczną liazy chromoforowej, pośredniczy w regulacji fitochromu, a ponadto bierze udział w dojądrowej relokacji phyA [8]. W części C-końcowej wyróżnia się subdomenę PRD (ang. *PAS Repeat Domain*), z dwoma motywami PAS (A i B), odpowiedzialną za dimeryzację, a w przypadku phyB zawierającą sekwencję NLS skierowaną do jądra (ang. *Nuclear Localization Signal*). PhyA nie zawiera motywu NLS i dlatego w jego transporcie z cytoplazmy do jądra biorą udział, oddziałujące z subdomenami N-kończowymi, białka FHY1 i FHL [24]. Subdomena HKRD (ang. *Histidine Kinase-Related Domain*), z uwagi na 13–17% identyczność sekwencji aminokwasowej z domeną przekaźnika typowych bakteryjnych kinaz histydynowych, uważana była początkowo za domenę odpowiedzialną za aktywność histydynowo/asparaginianowej kinazy białkowej, a później aktywność serynowo/treoninowej kinazy białkowej



RYCINA 1. Schemat budowy homodimeru fitochromu A. Sensorowo-regulatorowa domena N-końcowa obejmuje cztery subdomeny: P1, P2/PAS, P3/GAF i P4/PHY. W regulatorowej części C-końcowej wyróżnia się dwa motywy PAS, motyw regulatorowy Q, odpowiedzialny za dimeryzację motyw DD oraz domenę HKRD. Na schemacie zaznaczono położenie w phyA owsa trzech reszt serynowych ulegających fosforylacji. Opis funkcji poszczególnych subdomen w tekście (na podstawie [8,73])

FIGURE 1. Schematic illustration of phytochrome A structure. The photosensory/regulatory N-domain can be divided into four conserved subdomains: P1, P2/PAS, P3/GAF and P4/PHY. The C-terminal regulatory domain contains: two PAS repeats, regulatory motif (Q), dimerization motif (DD) and HKRD domain. Three possible phosphorylation serine residues of oat phyA are shown. Detailed descriptions of the function of different subdomains are in the text (based on [8,73])

fitochromów [36,50]. Jednakże w świetle najnowszych badań przyjmuje się, że subdomena HKRD odgrywa pewną rolę w wewnątrzkomórkowej relokalizacji phyA [61]. Fitochromy, za pośrednictwem domeny C-końcowej, oddziałują z szeregiem białek (NDPK, PKS1, kryptochromy, FyPP, PIF/PIL, ELF3, ZTL, Ado1) [17,36,41], dlatego początkowo z tą domeną wiązano funkcję przekazywania sygnałów na kolejne elementy szlaków sygnałowych. Jednakże wyniki doświadczeń sprzed kilku lat nie potwierdziły powyższych przypuszczeń, bowiem okazało się, że 450-aminokwasowy N-końcowy fragment phyB, pozbawiony nawet subdomeny P4/PHY, z powodzeniem może zastąpić kompletny fotoreceptor, pod warunkiem, że za pomocą technik biologii molekularnej dołączy się do niego sekwencję umożliwiającą tworzenie formy dimerycznej oraz zapewni się możliwość jego transportu do jądra [8,17,41,58].

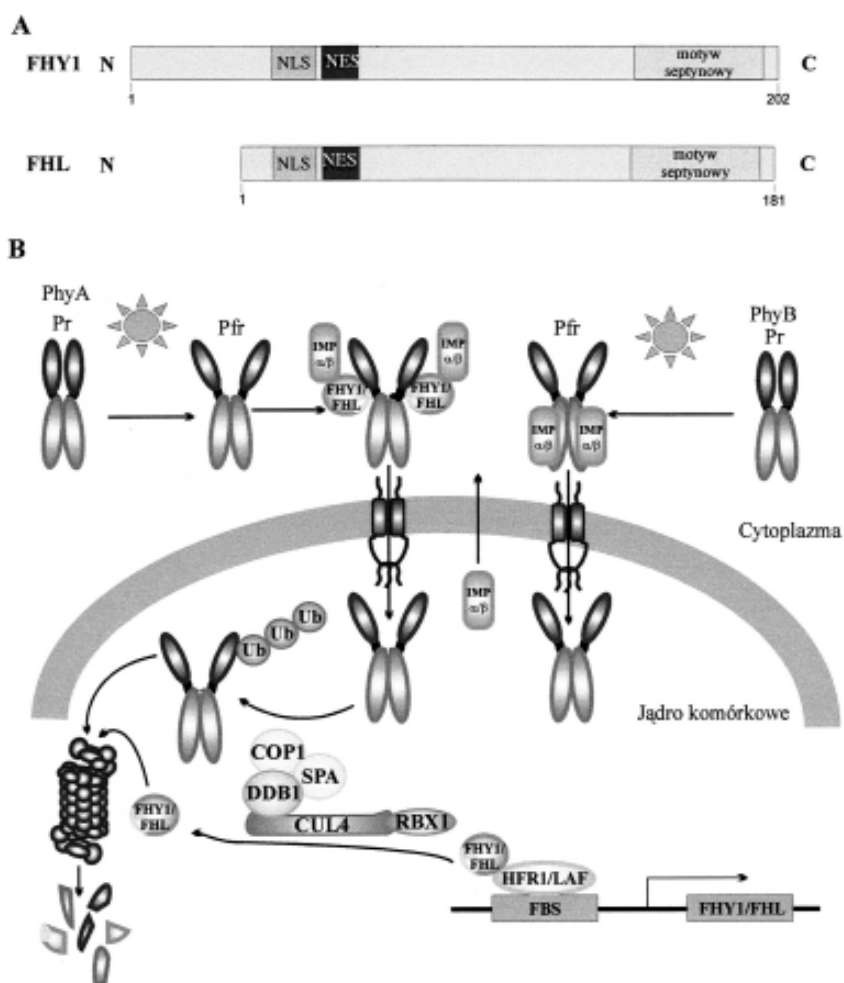
W pracach przeglądowych, opublikowanych przed kilku laty w polskich kwartalnikach naukowych, prezentowano niektóre wybrane zagadnienia dotyczące budowy oraz funkcjonowania fitochromów [36,50]. W ostatnich latach zainteresowanie badaczy skupiło się na śledzeniu oddziaływań fitochromów z czynnikami transkrypcyjnymi podrodziny PIF/PIL, które okazały się także kluczowymi elementami mechanizmów integracji szlaków sygnalizacji świetlnej z sygnalizacją hormonalną. Niniejsza praca jest próbą podsumowania wyników badań ostatniego pięciolecia uwzględniając także najnowsze wyniki dotyczące integracji szlaków sygnałowych. Podobnym

zagadnieniom poświęcono szereg prac przeglądowych opublikowanych w ostatnich trzech latach w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym [3,8,10,14,17,26,34,41,42,58,73,81].

CZY FITOCHROM JEST KINAZĄ BIAŁKOWĄ, KTÓREJ LOKALIZACJA SUBKOMÓRKOWA ORAZ AKTYWNOŚĆ KATALITYCZNA REGULOWANE SĄ PRZEZ ŚWIATŁO?

Przełomowym odkryciem w poszukiwaniach mechanizmów przetwarzania rozpoznanych przez układ fitochromowy sygnałów okazał się odkryty w 1996 roku, regulowany przez światło transport phyB z cytoplazmy do jądra, a niedługo później także transport phyA oraz pozostałych fitochromów typu II *A. thaliana* [15,24,44]. Wielkość cząsteczki apofitochromu uniemożliwia przenikanie fotoreceptora przez jądrowy kompleks porowy na zasadzie dyfuzji, dlatego już od początku relokację phyB wiązano z obecnością niecałkowicie określonej sekwencji kierującej do jądra. Z czasem okazało się, że w phyB występującym w formie Pr, położony w domenie PRD motyw NLS pozostaje zasłonięty przez subdomeny P3/GAF i P4/PHY i dopiero zmiany konformacyjne towarzyszące fotokonwersji fotoreceptora do formy Pfr powodują jego odsłonięcie, umożliwiając interakcję fotoreceptora z importyną α (ryc. 2B) [15,24,44]. Akumulacja w jądrze fuzyjnego białka phyB-GFP przebiega stosunkowo wolno i jest reakcją niskoenerygetyczną LFR, zachodzącą w warunkach ciągłego światła czerwonego. Po dwóch godzinach naświetlania ciągłym światłem czerwonym phyB-GFP jest niemal w całości zlokalizowane w jądrze, a po 4–6 godzinach tworzy w nukleoplazmie charakterystyczne ziarnistości [15]. PhyA *A. thaliana* nie ma motywu NLS i dlatego w jego transporcie z cytoplazmy do jądra musi uczestniczyć białko FHY1 (ang. *Far-red elongated Hypocotyl 1*) lub jego homolog FHL (ang. *FHY1 Like*) [30,37,70]. FHY1 i FHL są małymi 20–23 kDa białkami z motywami NLS i NES (ang. *Nuclear Export Signal*) w części N-końcowej oraz motywem septynowym pośredniczącym w dimeryzacji i wiązaniu phyA położonym w części C-końcowej (ryc. 2A). Motyw septynowy poznano wcześniej w septynach ssaków – białkach tworzących rusztowania dla wielu białek funkcjonujących m.in. w cytokinezie [30,44]. W doświadczeniach wykorzystujących technikę drożdżowego systemu dwuhybrydowego oraz technikę *pull-down* wykazano, że FHY1/FHL preferencyjnie wiąże phyA w formie Pfr poprzez motywy położone w domenie N-końcowej, z wyłączeniem subdomeny P4/PHY [30,70,77,86,99]. Transport do jądra phyA może być odpowiedzią na krótki impuls światła białego, czerwonego i niebieskiego lub ciągłego światła dalekiej czerwieni HIR (ang. *High Irradiance Response*). Białko fuzyjne phyA-GFP pojawia się na terenie jądra już po 15 minutach naświetlania, a specyficzne ziarnistości tworzą się po 1,5–2 godzinach [15,44].

Wyniki najnowszych doświadczeń pokazują, że rola FHY1/FHL nie ogranicza się tylko do wprowadzania phyA do jądra, gdyż okazało się, że FHY1 wiąże czynnik transkrypcyjny LAF1 (ang. *Long After Far-red1*), a FHL czynnik HFR1 (ang. *Long Hypocotyl in Far-Red1*) [99]. Na razie nie wiadomo, czy FHY1/FHL pełnią tylko



RYCINA 2. Model przedstawiający zależny od światła transport fitochromów z cytoplazmy do jądra. (A) Schemat budowy białek FHY1 i FHL. Obydwa białka zawierają motywy NLS i NES oraz oddziałujący z phyA motyw septynowy; (B) Dojądrowy transport phyB i phyA. Wzbudzenie światłem czerwonym phyB prowadzi do wyeksponowania położonego w domenie PRD motywu NLS kierującego fotoreceptor do jądra. W transporcie wzbudzonego przez światło phyA uczestniczy białko FHY1 lub FHL zawierające rozpoznawany przez importynę α motyw NLS. Fotokonwersja $Pr \rightleftharpoons Pfr$ phyA odsłania położone w części N-końcowej miejsce wiążące FHY1/FHL. Utworzony kompleks importyna α /FHY1/FHL/phyA(Pfr) transportowany jest do jądra przez jądrowy kompleks porowy. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [15,24,44,99])

FIGURE 2. Model for the light-regulated nucleo-cytoplasmic relocation of phytochromes. (A) Schematic illustration of FHY1 and FHL proteins. The both proteins contain functional NLS, which can be recognized by a cytosolic importin α ; (B) Upon red light excitation, the NLS present in the PRD of phyB becomes exposed, leading to nuclear import of the photoreceptor. Light-induced PhyA interacts with two phytochrome-interacting proteins, FHY1 or FHL. FHY1/FHL proteins contain functional NLS, which can be recognized by an importin α . $Pr \rightleftharpoons Pfr$ transition of phyA, occurred in response to light irradiation, unmasks the FHY1/FHL binding site on phyA. The importin α -FHY1/FHL-phyA(Pfr) complex is transported through the nuclear pores to the nuclei. Detailed descriptions are in the text (based on [15,24,44,99])

funkcję pomostową pomiędzy phyA a czynnikami transkrypcyjnymi, czy też samodzielnie funkcjonują w regulacji ekspresji genów. Co więcej, okazało się, że białko FHY1 może być fosforylowane przez phyA w formie Pfr, co może sugerować, że ufosforylowane FHY1 ulega ubikwitynylacji i jest proteolitycznie degradowane [86]. Doświadczenia prowadzone na podwójnych mutantach *fhy1/fhl* nie tylko potwierdziły całkowitą zależność dojądrowego transportu phyA od obecności FHY1/FHL, ale także pokazały, że fotoreceptor funkcjonuje również w cytoplazmie, wpływając na modyfikowane przez światło niebieskie i czerwone reakcje grawi- i fototropowe [75].

Regulowany przez światło transport fitochromów z cytoplazmy do jądra skierował uwagę badaczy nie tylko na poszukiwanie jądrowych białek oddziałujących z fotoreceptorami, ale także na poznanie charakteru oddziaływań pomiędzy fitochromami a badanymi białkami. W podejmowanych doświadczeniach postawiono także pytanie o sugerowaną od jakiegoś czasu aktywność kinazową fitochromów [36,47,50]. Otóż, w badaniach sprzed dwunastu lat prowadzonych na rekombinowanym phyA owsa i zielonego glonu *Mesotaenium caldariorum* wykazano, iż białko fotoreceptora ulega regulowanej przez światło autofosforylacji i może fosforylować histon H1 oraz białko z *Synechocystis* sp. Ponieważ struktura pierwszorzędowa fitochromów roślin wyższych jest podobna do struktury fotoreceptorów Cph1 i RcaE cyjanobakterii funkcjonujących jako typowe kinazy histydynowo/asparaginianowe [36,50], dlatego koncepcja traktująca fitochromy jako regulowane przez światło kinazy białkowe wydawała się bardzo interesująca. Aktywność kinazową fitochromów wydają się również potwierdzać wyniki doświadczeń sprzed kilku lat, w których sugerowano, iż oczyszczone rekombinowane białko phyA może fosforylować reszty seryny/treoniny w białkach: PKS1, NDPK2, kryptochrom 1, AUX/IAA [17,36,41,47], a ostatnio w doświadczeniach poświęconych badaniu oddziaływań phyA z białkiem FHY1 uczestniczącym w dojądrowym transporcie fotoreceptora [86]. Jednakże, koncepcja wiążąca funkcjonowanie fitochromów z regulowaną przez światło aktywnością kinazową nabrała nowego znaczenia w kontekście prowadzonych obecnie na większą skalę badań dotyczących interakcji pomiędzy fitochromami a czynnikami transkrypcyjnymi PIF/PIL (ang. *Phytochrome Interacting Factor/ PIF3-Like factor*). Okazało się, że co najmniej niektóre białka PIF/PIL są fosforylowane przez oddziałujące z nimi fitochromy, stając się w ten sposób substratami dla niezidentyfikowanych jeszcze ligaz ubikwitynowych, kierujących je do proteolitycznej degradacji w proteasomach. W ten sposób fitochromy miałyby regulować poziom, co najmniej PIF1/PIL5, PIF3, PIF4 i PIF5 [7,56,83,84,85], a także czynnika transkrypcyjnego HFR1 [22].

W tym miejscu warto jednakże przypomnieć, iż subdomena HKRD, z motywami podobnymi do histydynowo/asparaginianowych kinaz białkowych, nie uczestniczy w transdukcji sygnału. Ponadto, wyniki doświadczeń poświęconych badaniu roli poszczególnych subdomen sugerują, że ewentualna aktywność kinazowa fitochromów powinna być zlokalizowana w domenie N-końcowej, gdyż ta część fotoreceptora w formie dimeru, po przetransportowaniu do jądra, może zastąpić kompletne białko fitochromowe [8,73]. Brak w tej części motywów charakterystycznych dla kinaz białkowych może wskazywać, iż fitochromy stanowią nową, niekonwencjonalną rodzinę kinaz białkowych.

Próby eksperymentalnej weryfikacji koncepcji wiążącej funkcjonowanie fitochromów jako regulowanych przez światło kinaz białkowych były dotychczas podejmowane w zasadzie tylko w odniesieniu do phyA owsa. W domenie N-końcowej zidentyfikowano dwa miejsca autofosforylacji phyA (Ser-7 i Ser-17), natomiast w regionie zawiasowym fosforylowaniu może ulegać Ser-598 (ryc. 1.) [31,47]. Reszty Ser-7 i Ser-598 fosforylowane są *in vivo*, a fosforylowanie Ser-17 i Ser-598 obserwowano *in vitro*. Reszta Ser-7 ulega fosforylacji w obu formach phyA, podczas gdy Ser-598 jest akceptorem reszty fosforanowej tylko w formie Pfr [31,47]. Dotychczas zidentyfikowano dwie kinazy białkowe mogące fosforylować phyA. PKA (ang. *Protein Kinase A*) fosforyluje resztę Ser-17 phyA w formie Pr oraz Ser-598 w formie Pfr. Seryna w pozycji 7 jest fosforylowana przez kinazę CM1K [47]. Z kolei w defosforylacji białka fitochromowego mogą uczestniczyć co najmniej trzy fosfatazy białkowe: zlokalizowana w cytoplazmie i jądrze PAPP5 *A. thaliana* [76], specyficzna względem phyA w formie Pfr PAPP2C [71], a także AtPP7 [29].

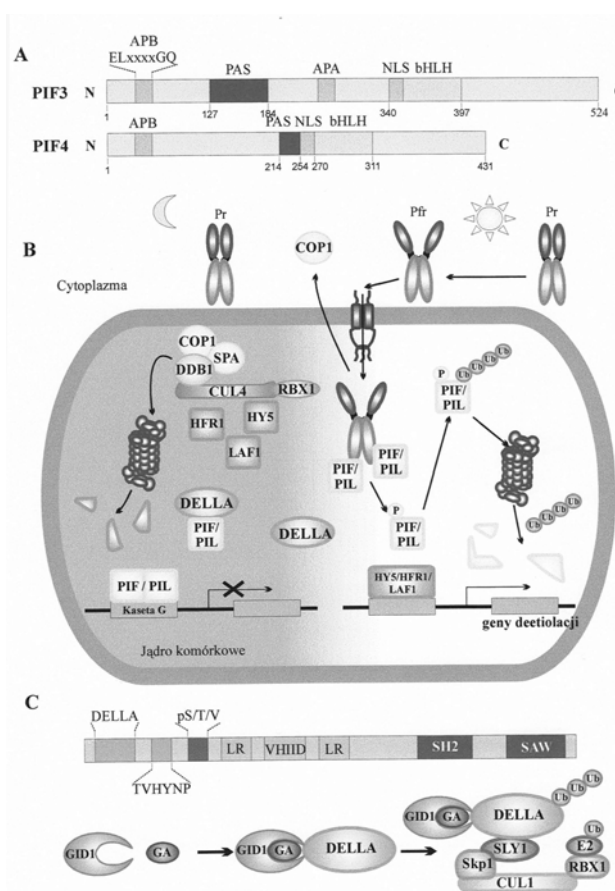
Jak już wcześniej wspomniano, fosforylacja reszt serynowych/treoninowych położonych w regionie N-końcowym, ale także delecja fragmentu bogatego w reszty seryny, przyspiesza tempo degradacji fitochromu [94]. Udział autofosforylacji w regulacji stabilności fotoreceptora potwierdzono także w doświadczeniach, w których defosforylacja phyA w formie Pfr przez PAPP5 wyraźnie wpływa stabilizująco na apofitochrom [76]. Delecja fragmentu phyA odpowiadającego aminokwasom w pozycjach od 6 do 12 prowadzi do destabilizacji obu form phyA, Pr i Pfr [94]. Inaczej jest w przypadku Ser-598, której fosforylacja nie ma wpływu na stabilność fitochromu, natomiast zmienia powinowactwo fotoreceptora do niektórych białek (NDPK2, PIF3) [47]. Znaczenie autofosforylacji potwierdzono także w doświadczeniach dotyczących oddziaływań ufosforylowanego phyA z kompleksem ligazy ubikwitynowej COP1/SPA1 pośredniczącym w ubikwitynylacji fotoreceptora, a także z FHY1 i czynnikiem transkrypcyjnym FHY3 [47,77].

PRZETWARZANIE INFORMACJI DEKODOWANEJ PRZEZ FITOCHROMY NA ZMIANY POZIOMU CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

Odkrycie regulowanego przez światło transportu fitochromów z cytoplazmy do jądra skierowało uwagę badaczy na poszukiwanie oddziałujących z fotoreceptorami białek jądrowych, które w szlakach sygnałowych powinny zajmować miejsce poniżej fitochromów. Wykorzystując technikę drożdżowego systemu dwuhybrydowego, w 1998 roku po raz pierwszy zidentyfikowano białko jądrowe PIF3 (ang. *Phytochrome Interacting Factor3*) oddziałujące z C-końcowym odcinkiem phyA i phyB [14,35,58]. Cztery lata później u mutantu *slr2* (ang. *short under red light*) poznano gen *SLR2/PIF4* kodujący białko homologiczne z PIF3 oddziałujące z phyB w formie Pfr [14,35,58]. Dzięki badaniom podejmowanym w następnych latach ustalono, iż PIF3 i PIF4, razem z trzynastoma innymi białkami zawierającymi motyw bHLH (ang.

basic Helix-Loop-Helix), tworzą w *A. thaliana* podrodzinę czynników transkrypcyjnych określanych akronimami PIF/PIL (PIL z ang. *PIF3-Like factor*). Około 30-aminokwasowy zasadowy fragment b, poprzedzający motyw HLH, uczestniczy w wiązaniu PIF/PIL z kasetą E (5'-CANNTG-3'), która często ma postać kasety G (5'-CACGTG-3') wiążącej np. białka PIF1, PIF3 czy PIF4 [23,58]. Dwanaście białek PIF/PIL w części N-końcowej ma zachowawczą sekwencję ELxxxxGQ określaną jako motyw APB (ang. *Active Phytochrome-Binding*), który jest konieczny i wystarczający do wiązania PIF/PIL z phyB w formie Pfr (ryc. 3A) [58]. Białka PIF1/PIL5 i PIF3, oprócz APB mają dodatkowy motyw APA (ang. *Active PhyA-binding motif*) pośredniczący w wiązaniu phyA w formie Pfr. Przypuszczalnie, nie bez znaczenia jest również fakt, iż poszczególne białka PIF/PIL wykazują zróżnicowane powinowactwo względem białek fitochromowych. PhyB najsilniej wiąże PIF1/PIL5, PIF3, PIF6/PIL2 i znacznie słabiej pozostałe białka, natomiast phyA silnie wiąże tylko PIF1/PIL5, słabiej PIF3 i bardzo słabo pozostałe białka [14].

Wiedza na temat roli poszczególnych PIF/PIL jest jeszcze bardzo fragmentaryczna, tym nie mniej funkcja siedmiu białek (PIF1/PIL5, PIF3, PIF4, PIF5/PIL6, PIF6/PIL2, PIF7, PIL1) oddziałujących z fitochromami oraz jednego (HFR1), z trzech białek z tej samej podrodziny pozbawionych motywu APB, została już częściowo poznana [10,14,23,34,42,58]. Wyniki pierwszych doświadczeń sprzed dziesięciu lat sugerowały, że PIF3 jest aktywatorem ekspresji genów *CCA1* i *LHY* kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB, jednakże funkcję PIF4 wiązano już z represją genów, znoszoną na skutek wiązania białka z phyB w formie Pfr [36]. Także wyniki prezentowane w ostatnich latach, zwłaszcza po tym, jak się okazało, że większość PIF/PIL, w wyniku swoistego oddziaływania z fitochromami, jest fosforylowana i ulega proteolitycznej degradacji, interpretowane są na korzyść koncepcji wiążącej rolę PIF/PIL z funkcją represyjną [53,87,90]. Przekonujących argumentów wspierających powyższą koncepcję dostarczyły doświadczenia prowadzone na mutantach *pif1*, *pif3*, *pif4* i *pif5*, a zwłaszcza na mutantach podwójnych, potrójnych i poczwórnych. Otóż, fenotypy wielokrotnych mutantów *pif/pil* są w różnym stopniu podobne do mutantów *cop/det/fus*, wykazujących w ciemności cechy roślin rosnących na świetle. Również wzór ekspresji genów wielokrotnych mutantów jest bardzo podobny do tego, jaki charakteryzuje roślinę linii dzikiej rosnącej na świetle czerwonym [53,87,90]. Uzyskane wyniki skłaniają do przypuszczeń, iż fitochrom migrujący na świetle czerwonym do jądra i fosforylujący czynniki transkrypcyjne PIF/PIL, inicjuje ich proteolityczną degradację, a w efekcie aktywuje ekspresję blokowanych przez nie genów [7,56,84,85]. Jednakże, obserwowany ciąg zdarzeń nie obejmuje wszystkich PIF/PIL, a dodatkowo szereg nowych doniesień sugeruje, iż sposób funkcjonowania PIF/PIL może daleko wykraczać poza ramy proponowanego schematu [6,58]. Okazało się bowiem, że PIF7 oddziałuje z phyB w formie Pfr, lecz nie jest fosforylowane i pozostaje stabilne na świetle czerwonym [52]. PIF4, oddziałujące z phyB, odgrywa także ważną rolę w szlaku sygnałowym aktywowanym przez wyższą temperaturę (28°C) [48]. W innych doświadczeniach wykazano, iż w regulacji stanu spoczynkowego nasion funkcjonują produkty dwóch różnych transkryptów PIF6 powstających w wyniku alternatywnego składowania [68]. Propono-



RYCINA 3. Model przedstawiający mechanizm integracji fitochromowych i giberelinowych szlaków sygnałowych. (A) Położenie charakterystycznych domen w białkach PIF3 i PIF4; (B) Zależna od fitochromu degradacja białek PIF/PIL. W ciemności, białka PIF/PIL zlokalizowane są w jądrze, natomiast fitochromy w cytozolu. W warunkach obniżonego stężenia lub braku GA, białka DELLA oddziałują z PIF/PIL przeciwdziałając ich wiązaniu przez DNA. Białko COP1, współtworzące kompleks ligazy ubikwitynowej E3, pośredniczy w ubikwitynozależnej degradacji HY5, HYH, HFR1 i LAF1. Wzbudzone na świetle fitochromy wnikają do jądra, gdzie oddziałują z białkami PIF/PIL. Fosforylowane PIF/PIL ulegają ubikwitynyacji przez nieznaną ligazę E3 i są degradowane w proteasomach. Światło hamuje aktywność ligazy COP1/CUL4 oraz wymusza eksport COP1 do cytozolu; (C) Schemat budowy białka DELLA oraz mechanizm jego ubikwitynyacji przez ligazę SCF^{SLY1}. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [1,14,19,23,25,33,34,41,55,79,81])

FIGURE 3. Model representing the integration of both phytochrome and GA signaling. (A) Domain structure of PIF3 and PIF4 proteins; (B) Phytochrome-mediated degradation of PIF/PILs. In the dark, PIF/PIL proteins are constitutively localized to the nucleus, whereas phytochromes are localized to the cytosol. In the absence of GA, DELLA proteins directly interact with PIF/PILs and repress their DNA-binding ability. COP1 forms the E3 ubiquitin ligase complex, which mediates HY5, HFR1, LAF1 degradation. In the light, activated phytochromes translocate into the nucleus and bind to PIF/PILs. PIF/PILs are phosphorylated in a phytochrome-dependent manner and ubiquitinated by an unknown E3 ligase before proteasomal degradation. Light disrupts COP1/CUL4 ligase activity and triggers COP1 migration from the nucleus; (C) Schematic representation of DELLA-SCF^{SLY1} interaction. Detailed descriptions are in the text (based on [1,14,19,23,25,33,34,41,55,79,81])

wanego pierwotnie ciągu zdarzeń nie potwierdzają także wyniki szczegółowych analiz, w których technikami biologii molekularnej zidentyfikowano 166 genów *A. thaliana* z sekwencjami promotorowymi wiążącymi PIF1/PIL5 [64]. Okazało się, że wiązaniu tego czynnika transkrypcyjnego towarzyszy aktywacja 105 genów, a ekspresja 61 genów jest hamowana. Trzydzieści cztery geny bezpośrednio regulowane przez PIF1/PIL5 kodują czynniki transkrypcyjne, część białek zaangażowana jest w reakcje modyfikacji ściany komórkowej, a pozostałe geny kodują białka funkcjonujące w regulacji metabolizmu wszystkich klasycznych fitohormonów [64]. W konkluzji, można zatem stwierdzić, iż wyniki dotychczasowych, nielicznych jeszcze badań, wyraźnie sugerują, iż sposób funkcjonowania poszczególnych PIF/PIL jest zróżnicowany i nie opiera się na jednym ogólnym schemacie.

Powyższy wniosek potwierdzają także wyniki sprzed dwóch lat dowodzące, iż zależna od fitochromów proteolityczna degradacja PIF/PIL nie jest jedynym sposobem regulacji poziomu tych białek w jądrze komórkowym. Spostrzeżenie to oparte jest na wynikach doświadczeń, w których wykazano, iż PIF3, PIF4 i PIF5 mogą oddziaływać z białkami DELLA funkcjonującymi w szlakach sygnałowych aktywowanych przez gibereliny (GA) [19,25]. Rodzina białek DELLA, licząca w *A. thaliana* pięć białek jądrowych GAI, RGA, RGL1, RGL2 i RGL3, pełni funkcję represyjną wobec genów aktywowanych przez GA [1,33,79]. Wiązanie GA przez białko receptorowe (w *A. thaliana* GID1a, GID1b i GID1c), ulegające zmianom konformacyjnym w części przykrywającej kieszeń wiążącą GA, umożliwia oddziaływanie receptora z jednym z białek DELLA (ryc. 3C). W wiązaniu tym pośredniczą położone w części N-końcowej charakterystyczne motywy DELLA i TVHYNP (ryc. 3C), a utworzony w ten sposób heterodimer oddziałuje z białkiem SLEEPY1 (SLY1) z kasetą F współtworzącym kompleks ligazy ubikwitynowej SCF^{SLY1} znakującej DELLA do proteolitycznej degradacji [1,33,79]. Leżące w części środkowej polipeptydu DELLA dwa motywy bogate w leucynę (LR) oraz motyw VHIIID uczestniczą w powstawaniu form dimerycznych, natomiast rola motywu bogatego w resztę seryny i treoniny oraz położonych w części C-końcowej polipeptydu motywów SH2 i SAW, na razie pozostaje niewyjaśniona.

Sposób funkcjonowania białek DELLA jest jeszcze bardzo słabo poznany. Przyjmuje się, że są one elementami negatywnymi szlaków GA, aczkolwiek mechanizmy represji są nieznane, gdyż DELLA nie mają znanych motywów umożliwiających bezpośrednie oddziaływanie z DNA. Dotychczas na ogół przyjmowano, że DELLA powinny oddziaływać z białkami, które mogą być wiązane przez odpowiednie sekwencje promotorowe. Z drugiej jednak strony, wyniki pojedynczej pracy sprzed dwóch lat sugerują, że RGA, jedno z pięciu białek DELLA *A. thaliana*, może bezpośrednio oddziaływać z promotorami ośmiu, z czternastu zidentyfikowanych w 8-dniowych siewkach tzw. wczesnych genów giberelinowych [100]. Zaskakujący jest również fakt, iż RGA aktywuje ekspresję wszystkich czternastu genów, jednakże najsilniej dwa geny związane z biosyntezą GA oraz geny *GID1a* i *GID1b* kodujące receptory GA. Pozostałe geny kodujące czynniki transkrypcyjne są aktywowane nieco słabiej. W tym miejscu należy jednakże podkreślić,

iż wykorzystywane przez autorów techniki badawcze nie pozwalają całkowicie wykluczyć współudziału innych białek w aktywacji analizowanych genów [100].

Dotychczasowe wyniki badań pokazują, iż białka PIF/PIL są jedynymi zidentyfikowanymi czynnikami transkrypcyjnymi oddziałującymi z DELLA. Jednakże, w oddziaływaniu DELLA z trzema badanymi białkami PIF/PIL zaskakiwać może sposób wiązania, gdyż w tworzących się heterodimerach motyw bHLH zostaje zablokowany przez DELLA, tak że wiązanie PIF/PIL z DNA staje się niemożliwe [19,25]. Biorąc pod uwagę fakt, iż czynniki transkrypcyjne PIF/PIL są kluczowymi elementami szlaków sygnałowych aktywowanych przez fitochromy, a DELLA zajmują podobną pozycję w szlakach giberelinowych, możliwość tworzenia w jądrze nieaktywnych heterodimerycznych kompleksów wydaje się być jednym z kluczowych mechanizmów pozwalającym na funkcjonalną integrację obu szlaków sygnałowych. Niektóre przykłady takiej integracji zostaną przedstawione w następnym rozdziale.

Oddziaływanie PIF/PIL z fitochromami oraz białkami DELLA nie wyczerpuje wszystkich możliwości regulowania ich aktywności transkrypcyjnych. Wyniki ostatnich badań potwierdziły obserwowaną już wcześniej możliwość tworzenia przez PIF/PIL form dimerycznych z innymi białkami [36]. Okazało się, że z PIF3, PIF4 i PIF5 wiąże się oraz blokuje motyw bHLH, podobnie jak DELLA, białko HFR1 z podrodziny PIF/PIL, z nietypowym motywem zasadowym oraz pozbawione motywu APB [38].

Poziom co najmniej niektórych białek PIF/PIL pozostaje pod bezpośrednią kontrolą oscylatora komórkowego [62,63]. Okazuje się, że poziom transkryptów *PIF4*, *PIF5/PIL6* i *PIF7* rośnie pod koniec dnia, natomiast poziom kodowanych białek wzrasta pod koniec nocy [45,62,63]. Ponadto, co najmniej niektóre PIF/PIL oddziałują z białkiem TOC1, funkcjonującym jako pozytywny element oscylatora, mimo że same nie są elementami oscylatora [35]. Można zatem założyć, że co najmniej niektóre PIF/PIL są elementami mechanizmu integrującego szlaki fitochromowe z transkrypcyjno/translacyjnym mechanizmem oscylatora.

Roli białek PIF/PIL nie można rozpatrywać w oderwaniu od kompleksu ligazy ubikwitynowej COP1/SPA uważanego za kluczowy element szlaków sygnałowych regulujących ekspresję genów kontrolowanych przez światło [36,55]. Początki badań związanych z ligazą COP1 należy wiązać z wyselekcjonowaniem przed piętnastu laty rodziny mutantów *cop/det/fus A. thaliana* wykazujących w ciemności fenotypy roślin rosnących na świetle [36]. Plejotropowy charakter zmian *cop/det/fus* sugerował, że regulowany przez światło program fotomorfogenezy został u tych mutantów poważnie naruszony, a białka kodowane przez zmutowane geny powinny w fotomorfogenezie odgrywać kluczowe role. Badania prowadzone w następnych latach pokazały, że COP1 uczestniczy w zachodzącej tylko w ciemności proteolitycznej degradacji czynników transkrypcyjnych HY5 (ang. *Hypercotyl 5*) i HYH [3,17,34,36,41]. Z czasem okazało się, że COP1 funkcjonuje w ubikwitynylacji czynników transkrypcyjnych LAF1 (ang. *Long After Far-red light 1*) z rodziny MYB-R2R3, białka HFR1, w samoubikwitynylacji, a także w ubikwitynylacji phyA [3,17,34,39,40,77,98]. Jeszcze niedawno COP1 uważane było za monomeryczną ligazę ubikwitynową E3, w ciemności zlokalizowaną w jądrze, natomiast na świetle w cytoplazmie, jednakże wyniki z ostatnich lat pokazały, że COP1 współtworzy

kompleks ligazy zbudowanej na kulinie 4 – jednym z 5 białek *A. thaliana* tworzących rusztowanie dla różnych typów tzw. kulinowych ligaz ubikwitynowych [49]. W skład kompleksu COP1/kulina4 wchodzi jeszcze białko DDB1, białko RBX1 wiążące enzym koniugujący E2 oraz co najmniej jedno z czterech białek SPA (ryc. 3B) [16].

Ubikwitynylacja i proteolityczna degradacja czynników transkrypcyjnych HY5, HYH, LAF1, HFR1 w ciemności oraz ich jądrowa akumulacja na świetle okazuje się mieć zasadnicze znaczenie w procesie fotomorfogenezy [3,8,41,98]. Istota tego mechanizmu polega na szybkim hamowaniu na świetle aktywności COP1 przez fitochromy i kryptochromy oraz stosunkowo wolnym w tych warunkach transporcie COP1 z jądra do cytoplazmy [92]. Jądrowa lokalizacja COP1 w ciemności zależy w jakiś sposób od białka CSN1 – jednego z ośmiu białek budujących kompleks COP9/CSN zaangażowany w regulację ligaz kulinowych [49,96]. Tak więc ligaza COP1, uważana w genetycznym programie fotomorfogenezy za nadrzędny element represyjny, jest w sumie regulowana przed układ fitochromów, ale również sama uczestniczy w ubikwitynylacji phyA, a ponadto stabilizuje rosnący w ciemności poziom PIF3, a przypuszczalnie także innych białek PIF/PIL [9].

ROLA PIF/PIL W REGULACJI KIELKOWANIA NASION FOTOBlastycznych, DEETIOLACJI SIEWEK ORAZ W UNIKANIU ZACIENIENIA

Odkrycie regulowanej przez fitochromy podrodziny czynników transkrypcyjnych PIF/PIL, bezpośrednio lub pośrednio uczestniczących w regulacji ekspresji genów, przyczyniło się do częściowego rozszyfrowania istoty mechanizmów regulacji kilku ważnych procesów zależnych od światła. Mając na uwadze aktualny poziom zaawansowania tych badań, procesami wartymi krótkiego omówienia są niewątpliwie: kielkowanie nasion fotoblastycznych, deetiolacja rosnących siewek oraz zmiany towarzyszące tzw. unikaniu zacielenia.

Kielkowanie nasion jest procesem regulowanym przez szereg czynników, spośród których najważniejszymi są: wilgotność, temperatura, dostęp tlenu, a w przypadku roślin fotoblastycznych wytwarzających zwykle bardzo małe nasiona (sałata, rzodkiewnik, pomidor, tytoń) także światło. W klasycznych doświadczeniach, sprzed prawie 60 lat, wykazano, iż nasiona sałaty namoczone w ciemności kiełkują dopiero po naświetleniu światłem czerwonym, a efekt czerwieni znoszony jest impulsem światła dalekiej czerwieni. Mechanizm przetwarzania informacji świetlnej na zmiany w ekspresji genów, będące *de facto* realizacją programu genetycznego procesu kielkowania, zaczyna być właściwie rozumiany dopiero w kontekście badań związanych z białkiem PIF1/PIL5. Białko to odgrywa rolę elementu pośredniczącego pomiędzy sygnałami świetlnymi odbieranymi przez fitochromy a zmianami poziomu giberelin i kwasu abscysynowego – fitohormonów regulujących kielkowanie nasion [69,81]. Poziom aktywnych giberelin (GA1, GA4) regulowany jest m.in. przez zmiany ekspresji genów kodujących enzymy szlaku syntezy GA, głównie dioksygenaz

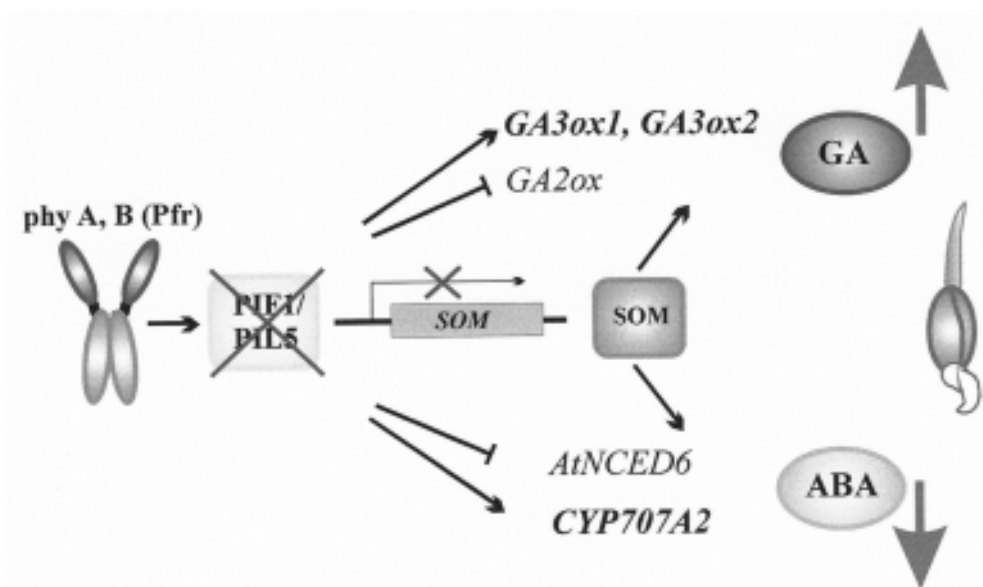
zależnych od α -ketoglutaranu (2ODD), takich jak: GA20ox czy GA3ox, z jednej strony, a genów kodujących enzymy inaktywujące GA, takie jak: 2-oksydazy GA (GA2ox) czy metylotransferazy (GAMT1, GAMT2), z drugiej strony [81,97]. Podobnie regulowany jest także poziom ABA. Enzymami szlaku biosyntezy ABA są dioksygenazy NCED, a 8'-hydroksylazy, takie jak CYP707A, uczestniczą w inaktywacji fitohormonu [81].

Wyniki pierwszych doświadczeń sprzed kilku lat pokazały, że w indukowanym przez światło kiełkowaniu nasion PIF1/PIL5 pełni funkcję elementu negatywnego. Okazało się bowiem, że nasiona mutanta *pif1/pil5*, a szczególnie podwójnego mutanta *pif1/pil5/phyA* bądź *pif1/pil5/phyB* kiełkują w ciemności, a także w warunkach naświetlania daleką czerwienią [65]. Późniejsze szczegółowe analizy zmian towarzyszących mutacjom bądź nadekspresji *PIF1/PIL5* potwierdziły udział tego białka, zarówno bezpośredni jak i pośredni, w regulacji genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy oraz szlaku inaktywacji GA [65,67]. W ciemności PIF1/PIL5 blokuje ekspresję genów związanych z biosyntezą GA (*GA3ox1*, *GA3ox2*), natomiast aktywuje ekspresję genów odpowiedzialnych za katabolizm GA (*GA2ox*) [28,67]. Proteolityczna degradacja PIF1/PIL5 w warunkach stymulacji nasion światłem czerwonym (*phyB*) lub ciągłym światłem dalekiej czerwieni (*phyA*) znosi blokadę genów związanych z biosyntezą GA oraz kończy aktywację genów odpowiedzialnych za katabolizm GA (ryc. 4) [65,67]. Regulacja ekspresji genów odbywa się przez bezpośrednie wiązanie PIF1/PIL5 do określonych miejsc promotorowych, a także przez kaskadę czynników transkrypcyjnych, aktywowanych bądź blokowanych przez PIF1/PIL5 [28,64,78,80].

Regulacja ekspresji genów związanych z metabolizmem GA i ABA stanowi przypuszczalnie jeden z kilku możliwych sposobów wpływania PIF1/PIL5 na poziom badanych fitohormonów. W ostatnim czasie wyselekcjonowano mutanta *somnus A. thaliana*, którego nasiona kiełkują w ciemności niezależnie od sygnału fitochromowego [46]. Okazało się, że białko SOMNUS (SOM) zawierające trzy motywy palca cynkowego typu CCCH przypuszczalnie uczestniczy, podobnie jak inne białka wiążące RNA tego typu, w regulacji dojrzewania pre-mRNA bądź w stabilizowaniu gotowych transkryptów [46]. Ponieważ ekspresja SOM jest aktywowana przez wiążące się z jego promotorem PIF1/PIL5, dlatego zależna od światła degradacja PIF1/PIL5 może wpływać na metabolizm GA i ABA przez zmianę poziomu odpowiednich transkryptów (ryc. 4).

Wyniki nielicznych jeszcze doświadczeń pokazują, że mutacje w niektórych genach *DELLA* sprzyjają kiełkowaniu, podczas gdy mutacje w *SLY1* czy *GID1* hamują kiełkowanie nasion [11,12]. W kontekście badań związanych z sygnalizacją GA interesujące są też obserwacje sugerujące, że PIF1/PIL5 aktywuje ekspresję genów *GID1A*, *GID1C* i *RGA* oraz hamuje ekspresję *RGL1* [64,66]. Jednakże na razie nie wiadomo, czy PIF1/PIL5 oddziałuje, podobnie jak PIF3, PIF4 i PIF5, z białkami *DELLA*.

Siewki nasion kiełkujących w glebie rosną w kierunku powierzchni, tak by w możliwie krótkim czasie rozpocząć odżywianie autotroficzne. Uruchomiony w tym celu program genetyczny **skotomorfogenezy** ma nie tylko zapewnić heterotroficznej siewce szybkie dotarcie do światła, ale co równie ważne, musi zapobiec mechanicz-



RYCINA 4. Model przedstawiający udział fitochromów w kiełkowaniu nasion fotoblastycznych. Białko PIF1/PIL5 hamuje kiełkowanie nasion poprzez represję genów biosyntezy i aktywację genów związanych z katabolizmem GA, i równoległą aktywację genów związanych z anabolizmem i inhibicją genów kodujących enzymy degradujące ABA. Zapoczątkowana przez światło degradacja PIF1/PIL5 sprzyja wzrostowi poziomu GA i obniża poziom ABA. PIF1/PIL5 aktywuje także *SOM* kodujący białko zaangażowane w regulację GA/ABA. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [64,65,67,69,81])

FIGURE 4. Model representing the phytochrome-mediated promotion of seed germination. PIF1/PIL5 inhibits seed germination by repressing of GA biosynthetic, and activating of GA catabolic genes. For ABA, PIF1/PIL5 increases the level of ABA by activating ABA anabolic, and repressing ABA catabolic genes. Under inductive light condition, phytochromes activate the degradation of PIF1/PIL5, thus increasing the biosynthesis of GA and inhibiting ABA biosynthesis. PIF1/PIL5 also activates the expression of *SOM* by directly binding its promoter. Detailed descriptions are in the text (based on [64,65,67,69,81])

nym uszkodzeniom siewki, zwłaszcza uszkodzeniu merystemu wierzchołkowego. Fenotypowo, skotomorfogeneza charakteryzuje się szybkim wzrostem hypokotyła z haczykowato zagiętym odcinkiem szczytowym i ściśle upakowanymi wokół merystemu wierzchołkowego liścieniami. Percepcja sygnałów świetlnych przez siewkę pozbawioną jeszcze chlorofilu i wykształconych chloroplastów inicjuje proces deetiolacji zapoczątkowujący **fotomorfogenezę**. Proces deetiolacji charakteryzuje spowolniony wzrost hypokotyła, zanikanie haczykowatego wygięcia odcinka szczytowego, rozwijanie liścieni, różnicowanie chloroplastów i synteza chlorofilu [32]. Technikami mikromacierzy DNA wykazano, że przy przejściu od skotomorfogenezy do fotomorfogenezy zmianom ulega ekspresja około 30% genów *A. thaliana* [41,72,93]. Próby ustalenia, w jakiej części zmiany te regulowane są przez układ fitochromów, dają, w zależności od warunków naświetlania, bardzo rozbieżne wyniki, pokazujące, iż mniejszym lub większym zmianom podlega ekspresja od 25 do 80% genów [41,72,93]. Na przykład, godzinne naświetlanie etiolowanych roślin światłem czerwonym zmienia ekspresję 1459 z 22 000 analizowanych genów, z czego ekspresja 206 genów rośnie lub maleje co najmniej dwukrotnie [72]. Ponadto wykazano, że genami wczesnych odpowiedzi na fitochromy, w 60%

regulowanymi przez fitochrom A, są geny kodujące czynniki transkrypcyjne (27% genów ulega aktywacji, a 39% represji) oraz geny, których produkty są powiązane z funkcjonowaniem auksyn [72].

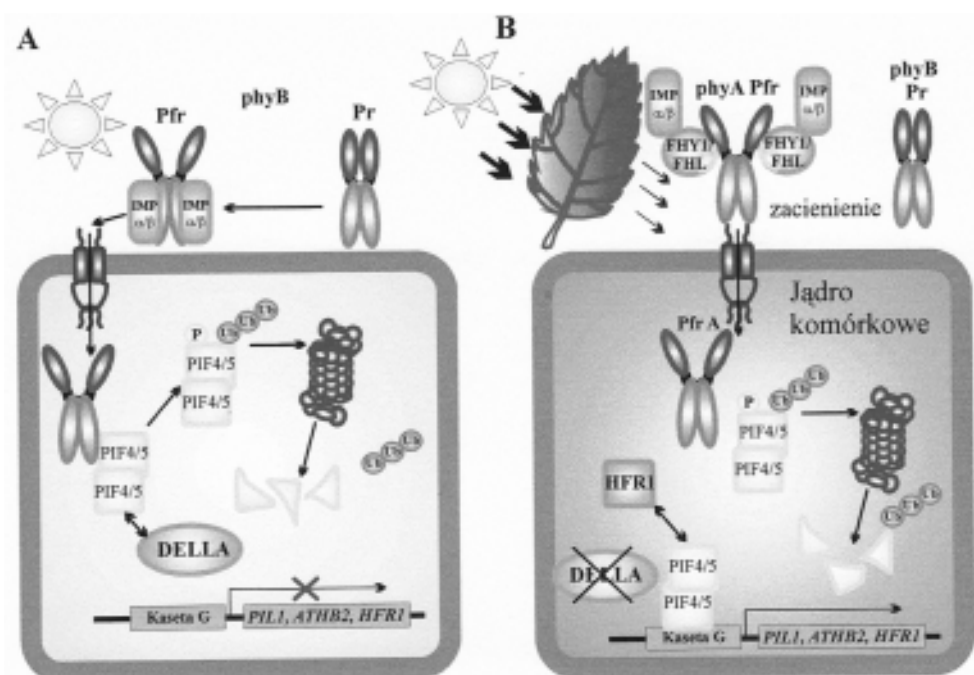
Wyniki badań z ostatnich lat pokazały, iż kluczową pozycję w genetycznym programie skotomorfogenezy zajmują białka PIF/PIL zapewniające w ciemności pozostawanie siewki w stanie etiolacji [43]. Doświadczenia prowadzone na mutantach *pif1*, *pif3*, *pif4* i *pif5*, a zwłaszcza na poczwórnych mutantach, ujawniły, iż produkty tych genów funkcjonują jako represory fotomorfogenezy, gdyż fenotypowo mutanty upodabniają się do roślin linii dzikich rosnących na świetle [43,53,54,87,90]. W siewkach poczwórnych mutantów *pif1/pif3/pif4/pif5*, po dwudniowym okresie ciemności, znaczącym zmianom ulega ekspresja 1028 genów, z tego aż 820 genów (80%) jest identyczna z genami, których ekspresja uległa zmianie w siewkach linii dzikich naświetlanych przez dwa dni światłem czerwonym [54]. Interesujący jest również fakt, iż 60% spośród 820 genów ulega aktywacji, a ekspresja 38% zostaje zahamowana. Wyniki powyższych analiz pozwalają zatem sądzić, iż białka PIF/PIL konstytutywnie hamują bądź aktywują określone geny, podczas gdy światło poprzez układ fitochromów odwraca kierunek zmian. Produkty genów pierwotnie regulowanych przez PIF/PIL aktywują lub blokują kolejne geny, tworząc w ten sposób kaskadę transkrypcyjną realizującą program fotomorfogenezy [54]. Proponowany mechanizm wydają się również potwierdzać niektóre wyniki najnowszych doświadczeń, w których wykazano, iż poszczególne PIF/PIL pełnią w szlakach sygnałowych funkcje pozytywnych elementów, np. PIF1 w biosyntezie chlorofilu [60], PIF3 w rozwoju chloroplastów i biosyntezie antocyjanów [59,88], a PIF4 w różnicowaniu szparek [13].

Doświadczenia badające udział GA w fotomorfogenezie pokazały, że obniżenie metodami chemicznymi bądź genetycznymi poziomu GA prowadzi w ciemności do derepresji fotomorfogenezy [5]. Ponadto, analizy GA wykazały, że w hypokotylu, w przeciwieństwie do kiełkujących nasion, światło ogranicza akumulację GA4, działając w ten sposób w kierunku wzrostu poziomu białek DELLA. Tak więc, większy w ciemności poziom GA, obniżający poziom DELLA, sprzyja aktywacji przez PIF3 i PIF4 genów związanych z szybkim wzrostem hypokotyła [1,2,4].

Drugim układem zajmującym kluczowe miejsce, zarówno w programie genetycznym skotomorfogenezy jak również przy przechodzeniu do fotomorfogenezy, jest kompleks ligazy COP1/SPA ubikwitynylujący w ciemności czynniki transkrypcyjne HY5, HYH, HFR1, LAF1 [3,17,34,40,77]. Po przeniesieniu rośliny na światło, najpierw ulega zahamowaniu aktywność ligazowa COP1/SPA, zaś po dłuższym czasie następuje usunięcie COP1 z jądra do cytoplazmy, co w efekcie zapobiega dalszemu degradowaniu pozytywnych elementów fotomorfogenezy (ryc. 3B) [92]. Technikami immunoprecypitacji chromatyny (*CHIP-chip*) wykazano, że stabilne na świetle HY5 wiąże się do 3894 genów, z tego w dużej części genów kodujących czynniki transkrypcyjne oraz genów wczesnych odpowiedzi na światło [51]. Zatem, można zaryzykować stwierdzenie, iż w kaskadzie czynników transkrypcyjnych tworzących układ typu piramidalnego, HY5 zajmuje miejsce szczytowe, pozwalające wpływać na ekspresję licznej grupy genów związanych z procesem fotomorfogenezy.

Światło słoneczne padające bezpośrednio na roślinę różni się od światła przefiltrowanego przez liście bądź odbitego od zielonych liści. Barwniki chloroplastowe pochłaniają światło niebieskie i czerwone, natomiast odbijają daleką czerwień, co w efekcie prowadzi do obniżenia intensywności światła, ale co równie ważne, zmienia skład widma, zwłaszcza w zakresie czerwieni (660–670 nm) i dalekiej czerwieni (725–735 nm). Wartość współczynnika czerwień/daleka czerwień dla światła słonecznego wynosi około 1,2, natomiast w przypadku światła przefiltrowanego przez pojedynczy liść, maleje do około 0,2, a dla światła, które przeszło przez dwa liście, wartość ta nie przekracza 0,1. Intensywność światła przefiltrowanego przez pojedynczy liść jest mniejsza prawie dziesięciokrotnie, a po przejściu przez dwa liście obniża się prawie 30-krotnie [27,95]. Zmiany w składzie widma światła słonecznego, niosące informację o bliskości „zielonego sąsiada”, inicjują szereg odpowiedzi określanych terminem **unikanie zacienienia** bądź **syndromem unikania zacienienia**. Powszechnie wiadomo, że roślina rosnąca w cieniu innych roślin charakteryzuje się przyspieszonym wzrostem w stronę światła, wyraźniejszą dominacją wierzchołkową, ma wydłużone ogonki liściowe, mniejsze liście i obniżony poziom chlorofilu w liściach oraz szybciej zakwita. Wyniki badań genetycznych pokazały, iż światło o małych wartościach współczynnika czerwień/daleka czerwień aktywuje ekspresję *HFR1* i aż 35-krotnie ekspresję *PIL1*, a ponadto genów *ATHB2/HAT4* i *ATHB4* – genów kodujących czynniki transkrypcyjne z homeodomeną zamka leucynowego [20,74,-82,89]. Udział *ATHB2* i *ATHB4* w unikaniu zacienienia potwierdzono również w doświadczeniach wykorzystujących mutanty, a także stosując techniki antysensu bądź nadekspresji *ATHB2*. W pierwszym wypadku rośliny mają skrócony hypokotyl i przypominają rośliny linii dzikich rosnące na świetle, podczas gdy fenotyp roślin z nadekspresją *ATHB2* jest podobny do roślin rosnących w zacienieniu [27].

Mechanizm przetwarzania informacji świetlnych na genetyczną regulację procesów unikania zacienienia zaczyna być już częściowo rozumiany dzięki poznaniu interakcji fitochromów z białkami PIF/PIL. W warunkach światła bezpośrednio padającego na roślinę, a więc wówczas, gdy stosunek światła czerwonego do dalekiej czerwieni jest stosunkowo wysoki, phyB występuje w przewodzie w formie Pfr i jako taki kierowany jest do jądra, gdzie oddziałuje z PIF/PIL (ryc. 5A). Proteolityczna degradacja PIF4 i PIF5 hamuje ekspresję *PIL1*, *ATHB2*, *ATHB4* i *HFR1* [56,89]. Jednakże zmiany te występują częściowo także u mutantu *phyB*, dlatego należy sądzić, iż w unikaniu zacienienia funkcjonują także inne fitochromy [27]. Zmiana współczynnika czerwień/daleka czerwień w kierunku obniżenia jego wartości, zmienia stosunek form Pr/Pfr phyB, a w konsekwencji obniża poziom phyB w jądrze, sprzyjając w ten sposób wzrostowi poziomu czynników transkrypcyjnych PIF4 i PIF5 aktywujących geny związane z unikaniem zacienienia (ryc. 5B). Odpowiedzi wzrostowe ogonków liściowych oraz wzrost hypokotyła regulowane są także przez białka DELLA. W warunkach przedłużającej się dalekiej czerwieni następuje degradacja RGA, a obniżenie poziomu DELLA sprzyja wzrostowi poziomu wolnych PIF/PIL [19,21]. W warunkach przedłużającego się zacienienia zaczyna funkcjonować mechanizm ograniczający nadmierną reakcję unikania zacienienia. Pewną rolę przypisuje się tutaj phyA, który w warunkach wydłużonego działania dalekiej



RYCINA 5. Udział fitochromów w odpowiedziach unikania zacienienia. (A) W warunkach światła dziennego, phyB, występujący w przewodzie w formie Pfr, wnika do jądra, gdzie oddziałuje z białkami PIF4 i PIF5 kierując je do degradacji. Białka PIF/PIL są także inaktywowane na skutek oddziaływania z DELLA; (B) Światło przefiltrowane lub odbite od zielonych liści, wymusza, na skutek zubożenia w czerwień, fotokonwersję phyB do nieaktywnej formy Pr. W równoważeniu odpowiedzi na zacienienie uczestniczy PhyA oraz białko HFR1. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [3,21,27,56,82,95])

FIGURE 5. Proposed model for the shade avoidance signaling. (A) In daylight, phyB exists predominantly in the Pfr form, and following import into the nucleus, it binds PIF4 and PIF5, resulting in their degradation. Also, the binding of DELLA by PIFs simultaneously results in PIF inactivation; (B) In vegetational shade, light filtered or reflected by the neighboring vegetation is enriched in far red light. A reduction in red/far red ratio results in conversion of phyB to the inactive Pr form. Antagonism of shade avoidance is provided by phyA operating in the high irradiance response, as well as by HFR1 protein. Detailed descriptions are in the text (based on [3,21,27,56,82,95])

czerwieni wnika do jądra, wpływając na obniżenie poziomu PIF/PIL, a w efekcie hamuje ekspresję genów związanych z unikaniem zacienienia (ryc. 5B) [27]. W podobny sposób może także działać HFR1, białko intensywnie syntetyzowane w warunkach zacienienia, tworzące z PIF/PIL nieaktywne kompleksy, podobne do heterodimerów PIF/PIL-DELLA [38,57,82].

W kontekście prezentowanych obecnie badań, godnymi podkreślenia wydają się być wyniki wskazujące, iż nie tylko czynniki transkrypcyjne PIF/PIL, ale również HY5 i HYH, oprócz funkcji regulacyjnej w ekspresji genów, pełnią również rolę elementów integrujących sygnalizację świetlną z sygnalizacją hormonalną. Białka PIF/PIL, tworzące dimery z DELLA, przeciwdziałają wiązaniu tych białek represorowych z receptorami GA, ale również same PIF/PIL tracą możliwość oddziaływania z DNA. Podobnie, szereg publikowanych w ostatnim czasie wyników dowodzi, iż

czynnik transkrypcyjny HY5 pełni funkcję elementu integrującego sygnalizację świetlną z sygnalizacją cytokininową, chociaż mechanizm budowania sieci sygnałowej na poziomie molekularnym pomiędzy badanymi szlakami pozostaje jeszcze nieznany.

LITERATURA

- [1] ACHARD P, GENSHIK P. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* 2009; **60**: 1085–1092.
- [2] ACHARD P, LIAO L, JIANG C, DESNOS T, BARTLETT J, FU X, HARBERD NP. DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* 2007; **143**: 1163–1172.
- [3] ALABADÍ D, BLÁZQUEZ MA. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 409–417.
- [4] ALABADÍ D, GALLEGU-BARTOLOMÉ J, ORLANDO L, GARCÍA-CÁRCEL L, RUBIO V, MARTÍNEZ C, FRIGERIO M, IGLESIAS-PEDRAZ JM, ESPINOSA A, DENG XW, BLÁZQUEZ MA. Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent *Arabidopsis* seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* 2008; **53**: 324–335.
- [5] ALABADÍ D, GIL J, BLÁZQUEZ MA, GARCÍA-MARTÍNEZ JL. Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* 2004; **134**: 1050–1057.
- [6] AL-SADY B, KIKIS EA, MONTE E, QUAIL PH. Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 2232–2237.
- [7] AL-SADY B, NI W, KIRCHER S, SCHÄFER E, QUAIL PH. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 2006; **23**: 439–446.
- [8] BAE G, CHOI G. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 281–311.
- [9] BAUER D, VICZIÁN A, KIRCHER S, NOBIS T, NITSCHKE R, KUNKEL T, PANIGRAHI KCS, ÁDÁM E, FEJES E, SCHÄFER E, NAGY F. Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **16**: 1433–1445.
- [10] BOU-TORRENT J, ROIG-VILLANOVA I, MARTÍNEZ-GARCÍA JF. Light signaling: back to space. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 108–114.
- [11] CAO D, CHENG H, WU W, SOO HM, PENG J. Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; **142**: 509–525.
- [12] CAO D, HUSSAIN A, CHENG H, PENG J. Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in *Arabidopsis*. *Planta* 2005; **223**: 105–113.
- [13] CASSON AS, FRANKLIN KA, GRAY JE, GRIERSON CS, WHITELAM GC, HETHERINGTON AM. Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity. *Curr Biol* 2009; **19**: 229–234.
- [14] CASTILLON A, SHEN H, HUQ E. Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* 2007; **12**: 514–521.
- [15] CHEN M. Phytochrome nuclear body: an emerging model to study interphase nuclear dynamics and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2008; **11**: 503–508.
- [16] CHEN H, HUANG X, GUSMAROLI G, TERZAGHI W, LAU OS, YANAGAWA Y, ZHANG Y, LI J, LEE J-H, ZHU D, DENG XW. *Arabidopsis* CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *Plant Cell* 2010; **22**: 108–123.
- [17] CHORY J. Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities. *Plant J* 2010; **61**: 982–991.
- [18] CLACK T, SHOKRYA, MOFFET M, LIU P, FAUL M, SHARROCK RA. Obligate heterodimerization of *Arabidopsis* phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* 2009; **21**: 786–799.
- [19] DE LUCAS M, DAVIÈRE J-M, RODRÍGUEZ-FALCÓN M, PONTIN M, IGLESIAS-PEDRAZ JM, LORRAIN S, FANKHAUSER C, BLÁZQUEZ MA, TITARENKO E, PRAT S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 2008; **451**: 480–484.

- [20] DEVLIN PF, YANOVSKY MJ, KAY SA. A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1617–1629.
- [21] DJAKOVIC-PETROVIC T, DE WIT M, VOESENEK LACJ, PIERIK R. DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J* 2007; **51**: 117–126.
- [22] DUEK PD, ELMER MV, VAN OOSTEN VR, FANKHAUSER C. The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr Biol* 2004; **14**: 2296–2301.
- [23] DUEK PD, FANKHAUSER C. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 51–54.
- [24] FANKHAUSER C, CHEN M. Transposing phytochrome into the nucleus. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 596–601.
- [25] FENG S, MARTINEZ C, GUSMAROLI G, WANG Y, ZHOU J, WANG F, CHEN L, YU L, IGLESIAS-PEDRAZ JM, KIRCHER S, SCHÄFER E, FU X, FAN L-M, DENG XW. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 2008; **451**: 475–479.
- [26] FRANKLIN KA, QUAIL PH. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* 2010; **61**: 11–24.
- [27] FRANKLIN KA. Shade avoidance. *New Phytol* 2008; **179**: 930–944.
- [28] GABRIELE S, RIZZA A, MARTONE J, CIRCELLI P, COSTANTINO P, VITTORIOSO P. The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1*. *Plant J* 2010; **61**: 312–323.
- [29] GENOUD T, SANTA CRUZ MT, KULISIC T, SPARLA F, FANKHAUSER C, MÉTRAUX J-P. The protein phosphatase 7 regulates phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2008; **3**: 1–10.
- [30] GENOUD T, SCHWEIZER F, TSCHESCHLER A, DEBRIEUX D, CASAL JJ, SCHÄFER E, HILTBRUNNER A, FANKHAUSER C. FHY1 mediates nuclear import of the light-activated phytochrome A photoreceptor. *PLoS Genetics* 2008; **4**: 1–12.
- [31] HAN Y-J, KIM H-S, KIM Y-M, SHIN A-Y, LEE S-S, BHOO SH, SONG P-S, KIM J-I. Functional characterization of phytochrome autophosphorylation in plant light signaling. *Plant Cell Physiol* 2010; **51**: 596–609.
- [32] HAN Y-J, SONG P-S, KIM J-I. Phytochrome-mediated photomorphogenesis in plants. *J Plant Biol* 2007; **50**: 230–240.
- [33] HARBERD NP, BELFIELD E, YASUMURA Y. The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an „inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 2009; **21**: 1328–1339.
- [34] HENRIQUES R, JANG I-C, CHUA N-H. Regulated proteolysis in light-related signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 2009; **12**: 49–56.
- [35] HETMANN A, KOWALCZYK S. Roślinne receptory światła niebieskiego i UV-A pośredniczące w reakcjach fototropicznych, fotomorfogenezie i nastawianiu zegara biologicznego. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 441–463.
- [36] HETMANN A, KOWALCZYK S. Szlaki sygnałowe aktywowane przez fitochromy, roślinne receptory światła czerwonego i dalekiej czerwieni. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 155–176.
- [37] HILTBRUNNER A, TSCHESCHLER A, VICZIÁN A, KUNKEL T, KIRCHER S, SCHÄFER E. FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* 2006; **47**: 1023–1034.
- [38] HÖRNITSCHKE P, LORRAIN S, ZOETE V, MICHELIN O, FANKHAUSER C. Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *EMBO J* 2009; **28**: 3893–3902.
- [39] HUQ E. Degradation of negative regulators: a common theme in hormone and light signaling networks? *Trend Plant Sci* 2006; **11**: 4–7.
- [40] JANG I-C, YANG J-Y, SEO HS, CHUA N-H. HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Gen Dev* 2005; **19**: 593–602.
- [41] JIAO Y, LAU OS, DENG XW. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Gen* 2007; **8**: 217–230.
- [42] JOSSE E-M, FOREMAN J, HALLIDAY KJ. Paths through the phytochrome network. *Plant Cell Envir* 2008; **31**: 667–678.
- [43] JOSSE E-M, HALLIDAY KJ. Skotomorphogenesis: the dark side of light signalling. *Curr Biol* 2008; **18**: R1144–1146.

- [44] KEVEI E, SCHÄFER E, NAGY F. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *J Exp Bot* 2007; **58**: 3113–3124.
- [45] KIDOKORO S, MARUYAMA K, NAKASHIMA K, IMURA Y, NARUSAKA Y, SHINWARI ZK, OSAKABE Y, FUJITA Y, MIZOI J, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SCHINOZAKI K. The phytochrome interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2009; **151**: 2046–2057.
- [46] KIM DH, YAMAGUCHI S, LIM S, OH E, PARK J, HANADAA, KAMIYA Y, CHOI G. SOMNUS a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis* negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *Plant Cell* 2008; **20**: 1260–1277.
- [47] KIM J-I, PARK J-E, ZARATE X, SONG P-S. Phytochrome phosphorylation in plant light signaling. *Photochem Photobiol Sci* 2005; **4**: 681–687.
- [48] KOINI MA, ALVEY L, ALLEN T, TILLEY CA, HARBERD NP, WHITELAM GC, FRANKLIN KA. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr Biol* 2009; **19**: 408–413.
- [49] KOWALCZYK S, HADOWSKA E, PIEKARSKA A. Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach kluczowymi elementami hormonalnych szlaków sygnałowych. *Post Biochem* 2005; **51**: 171–187.
- [50] KOWALCZYK S, HETMANN A. Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Post Biochem* 2003; **49**: 298–318.
- [51] LEE J, HE K, STOLC V, LEE H, FIGUEROA P, GAO Y, TONGPRASIT W, ZHAO H, LEE I, DENG XW. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* 2007; **19**: 731–749.
- [52] LEIVAR P, MONTE E, AL-SADY B, CARLE C, STORERA, ALONSO JM, ECKER JR, QUAIL PH. The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* 2008; **20**: 337–352.
- [53] LEIVAR P, MONTE E, OKA Y, LIU T, CARLE C, CASTILLON A, HUQ E, QUAIL PH. Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* 2008; **18**: 1815–1823.
- [54] LEIVAR P, TEPPERMAN JM, MONTE E, CALDERON RH, LIU TL, QUAIL PH. Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 2009; **21**: 3535–3553.
- [55] LIN R, WANG H. Targeting proteins for degradation by *Arabidopsis* COP1: teamwork is what matters. *J Integr Plant Biol* 2007; **49**: 35–42.
- [56] LORRAIN S, ALLEN T, DUEK PD, WHITELAM GC, FANKHAUSER C. Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J* 2008; **53**: 312–323.
- [57] LORRAIN S, TREVISAN M, PRADERVAND S, FANKHAUSER C. Phytochrome interacting factors 4 and 5 redundantly limit seedling de-etiolation in continuous far-red light. *Plant J* 2009; **60**: 449–461.
- [58] MONTE E, AL-SADY B, LEIVAR P, QUAIL PH. Out of the dark: how the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling. *J Exp Bot* 2007; **58**: 3125–3133.
- [59] MONTE E, TEPPERMAN JM, AL-SADY B, KACZOROWSKI KA, ALONSO JM, ECKER JR, LI X, ZHANG Y, QUAIL PH. The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 16091–16098.
- [60] MOON J, ZHU L, SHEN H, HUQ E. PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 9433–9438.
- [61] MÜLLER R, FERNÁNDEZ AP, HILTBRUNNER A, SCHÄFER E, KRETSCH T. The histidine kinase-related domain of *Arabidopsis* phytochrome A controls the spectral sensitivity and the subcellular distribution of the photoreceptor. *Plant Physiol* 2009; **150**: 1297–1309.
- [62] NIWA Y, YAMASHINO T, MIZUNO T. The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2009; **50**: 838–854.
- [63] NOZUE K, COVINGTON MF, DUEK PD, LORRAIN S, FANKHAUSER C, HARMER SL, MALOOF JN. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 2007; **448**: 358–361.
- [64] OH E, KANG H, YAMAGUCHI S, PARK J, LEE D, KAMIYA Y, CHOI G. Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009; **21**: 403–419.

- [65] OH E, KIM J, PARK E, KIM J-I, KANG C, CHOI G. PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2004; **16**: 3045–3058.
- [66] OH E, YAMAGUCHI S, HU J, YUSUKE J, JUNG B, PAIK I, LEE H-S, SUN T-P, KAMIYA Y, CHOI G. PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GAI* and *RGA* promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 2007; **19**: 1192–1208.
- [67] OH E, YAMAGUCHI S, KAMIYA Y, BAE G, CHUNG W-I, CHOI G. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant J* 2006; **47**: 124–139.
- [68] PENFIELD S, JOSSE E-M, HALLIDAY KJ. A role for an alternative splice variant of PIF6 in the control of *Arabidopsis* primary seed dormancy. *Plant Mol Biol* 2010; **73**: 89–95.
- [69] PENFIELD S, KING J. Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination. *Proc R Soc B* 2009; **276**: 3561–3569.
- [70] PFEIFFER A, KUNKEL T, HILTBRUNNER A, NEUHAUS G, WOLF I, SPETH V, ADAM E, NAGY F, SCHÄFER E. A cell-free system for light-dependent nuclear import of phytochrome. *Plant J* 2009; **57**: 680–689.
- [71] PHEE B-K, KIM J-I, SHIN DH, YOO J, PARK K-J, HAN Y-J, KWON Y-K, CHO M-H, JEON J-S, BHOO SH, HAHN T-R. A novel protein phosphatase indirectly regulates phytochrome-interacting factor 3 via phytochrome. *Biochem J* 2008; **415**: 247–255.
- [72] QUAIL PH. Phytochrome-regulated gene expression. *J Integr Plant Biol* 2007; **49**: 11–20.
- [73] ROCKWELL NC, SU Y-S, LAGARIAS JC. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 2006; **57**: 837–858.
- [74] ROIG-VILLANOVA I, BOU J, SORIN C, DEVLIN PF, MARTÍNEZ-GARCÍA JF. Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; **141**: 85–96.
- [75] RÖSLER J, KLEIN I, ZEIDLER M. *Arabidopsis fhl/fhy1* double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10737–10742.
- [76] RYU JS, KIM JI, KUNKEL T, KIM BC, CHO DS, HONG SH, KIM S-H, FERNÁNDEZ AP, KIM Y, ALONSO JM, ECKER JR, NAGY F, LIM PO, SONG P-S, SCHÄFER E, NAM HG. Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell* 2005; **120**: 395–406.
- [77] SAIJO Y, ZHU D, LI J, RUBIO V, ZHOU Z, SHEN Y, HOECKER U, WANG H, DENG XW. *Arabidopsis* COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling. *Mol Cell* 2008; **31**: 607–613.
- [78] SAWADA Y, AOKI M, NAKAMINAMI K, MITSUHASHI W, TATEMATSU K, KUSHIRO T, KOSHIBA T, KAMIYA Y, INOUE Y, NAMBARA E, TOYOMASU T. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol* 2008; **146**: 1386–1396.
- [79] SCHWECHHEIMER C, WILLIGE BC. Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* 2009; **12**: 57–62.
- [80] SEO M, HANADAA, KUWAHARAA, ENDO A, OKAMOTO M, YAMAUCHI Y, NORTH H, MARION-POLLA, SUN T-P, KOSHIBA T, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S, NAMBARA E. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J* 2006; **48**: 354–366.
- [81] SEO M, NAMBARA E, CHOI G, YAMAGUCHI S. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 463–472.
- [82] SESSA G, CARABELLI M, SASSI M, CIOLFI A, POSSENTI M, MITTEMPERGHER F, BECKER J, MORELLI G, RUBERTI I. A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Gen Dev* 2005; **19**: 2811–2815.
- [83] SHEN H, MOON J, HUQ E. PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005; **44**: 1023–1035.
- [84] SHEN H, ZHU L, CASTILLON A, MAJEE M, DOWNIE B, HUQ E. Light-induced phosphorylation and degradation of the negative-regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from *Arabidopsis* depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *Plant Cell* 2008; **20**: 1586–1602.

- [85] SHEN Y, KHANNA R, CARLE CM, QUAIL PH. Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol* 2007; **145**: 1043–1051.
- [86] SHEN Y, ZHOU Z, FENG S, LI J, TAN-WILSON A, QU L-J, WANG H, DENG XW. Phytochrome A mediates rapid red light-induced phosphorylation of *Arabidopsis* FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 in a low fluence response. *Plant Cell* 2009; **21**: 494–506.
- [87] SHIN J, KIM K, KANG H, ZULFUGAROV IS, BAE G, LEE C-H, LEE D, CHOI G. Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7660–7665.
- [88] SHIN J, PARK E, CHOI G. PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *Plant J* 2007; **49**: 981–994.
- [89] SORIN C, SALLA-MARTRET M, BOU-TORRENT J, ROIG-VILLANOVA I, MARTÍNEZ-GARCÍA JF. ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 2009; **59**: 266–277.
- [90] STEPHENSON PG, FANKHAUSER C, TERRY MJ. PIF3 is a repressor of chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7654–7659.
- [91] SU Y-S, LAGARIAS JC. Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant GAF domain tyrosine mutants of *Arabidopsis* phytochromes in transgenic plants. *Plant Cell* 2007; **19**: 2124–2139.
- [92] SUBRAMANIAN C, KIM B-H, LYSSENKO NN, XU X, JOHNSON CH, VON ARNIM AG. The *Arabidopsis* repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 6798–6802.
- [93] TEPPERMAN JM, HWANG Y-S, QUAIL PH. phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of *Arabidopsis* seedling de-etiolation. *Plant J* 2006; **48**: 728–742.
- [94] TRUPKIN SA, DEBRIEUX D, HILTBRUNNER A, FANKHAUSER C, CASAL JJ. The serine-rich N-terminal region of *Arabidopsis* phytochrome A required for protein stability. *Plant Mol Biol* 2007; **63**: 669–678.
- [95] VANDENBUSSCHE F, PIERIK R, MILLENAAR FF, VOESENEK LACJ, VAN DER STRAETEN D. Reaching out of the shade. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 462–468.
- [96] WANG X, LI W, PIQUERAS R, CAO K, DENG XW, WEI N. Regulation of COP1 nuclear localization by the COP9 signalosome via direct interaction with CSN1. *Plant J* 2009; **58**: 655–667.
- [97] YAMAUCHI Y, TAKEDA-KAMIYAN, HANADAA, OGAWA M, KUWAHARAA, SEO M, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S. Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol* 2007; **48**: 555–561.
- [98] YANG J, LIN R, SULLIVAN J, HOECKER U, LIU B, XU L, DENG XW, WANG H. Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; **17**: 804–821.
- [99] YANG SW, JANG I-C, HENRIQUES R, CHUA N-H. FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 and FHY1-LIKE associate with the *Arabidopsis* transcription factors LAF1 and HFR1 to transmit phytochrome A signals for inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Cell* 2009; **21**: 1341–1359.
- [100] ZENTELLA R, ZHANG Z-L, PARK M, THOMAS SG, ENDO A, MURASE K, FLEET CM, JIKUMARU Y, NAMBARAE, KAMIYA Y, SUN T-P. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 3037–3057.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 11.06. 2010 r.

Przyjęto: 10.10. 2010 r.

dr Anna Hetmann, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń,

ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

e-mail: ahetmann@umk.pl