

BRASINOSTEROIDY – STRUKTURA CHEMICZNA, GENETYCZNE PODSTAWY BIOSYNTETY I TRANSDUKCJI SYGNAŁU ORAZ FUNKCJE FIZJOLOGICZNE*

BRASSINOSTEROIDS – CHEMICAL STRUCTURE, GENETIC BASIS
OF BIOSYNTHESIS AND SIGNAL TRANSDUCTION,
PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS

Damian GRUSZKA, Mirosław MAŁUSZYŃSKI

Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski

Streszczenie: Brasinosteroidy (BR) są substancjami wykazującymi wysoką aktywność w stymulowaniu wzrostu i rozwoju roślin. Występują w wyjątkowo niskich koncentracjach w komórkach wszystkich tkanek wielu gatunków roślin, reprezentujących różne grupy ewolucyjne, na każdym etapie rozwoju osobniczego. Najbogatszym źródłem brasinosteroidów są ziarna pyłku i niedojrzałe nasiona, podczas gdy w pędach i liściach notuje się niższe ich koncentracje. Pierwszym zidentyfikowanym przedstawicielem tych hormonów był związek o charakterze laktonu steroidowego – brasinolid (BL), wyizolowany w 1979 roku z ziaren pyłku *Brassica napus*. Odnotowano przypadki glikozytacji, sulfonacji i acetytacji brasinosteroidów służące ich transportowi, magazynowaniu i inaktywacji. Brasinosteroidy są polihydroksylowanymi pochodnymi steroli, których prawidłowy metabolizm zapewnia odpowiedni przebieg embriogenezy, ksylogenezy oraz rozwój merystemów pędu i korzenia. Proces biosyntezy związków sterolowych, których prekursorem jest mewalonian, został najlepiej poznany u *Arabidopsis thaliana*. Podzielony on jest na trzy fazy. W wyniku szeregu reakcji chemicznych, wchodzących w obręb fazy A szlaku biosyntezy, powstaje produkt pośredni, który może stanowić substrat enzymów rozpoczynających dwa alternatywne szlaki syntezy. Pierwszy z nich, stanowiący fazę B, prowadzi do powstania sitosterolu i stigmasterolu, które są istotnymi składnikami błon komórkowych, regulującymi ich właściwości fizykochemiczne. Drugi szlak procesu syntezy związków sterolowych, nazywany fazą C, jest szeregiem reakcji prowadzących do syntezy brasinosteroidów. Pod względem genetycznym lepiej scharakteryzowane są późne etapy szlaku syntezy związków sterolowych, prowadzące do powstania brasinosteroidów. Zidentyfikowano szereg genów kodujących enzymy katalizujące poszczególne reakcje późnego etapu syntezy wraz z opisem fenotypu odpowiadających im mutantów. Relatywnie słabiej poznany jest wczesny etap syntezy steroli – zidentyfikowano jedynie niektóre z genów odpowiedzialnych za te reakcje. Mutanty z defektami w tym procesie są letalne, gdyż charakteryzują się nieprawidłowym przebiegiem embriogenezy. Analizy biochemiczne i genetyczne pozwoliły na stworzenie modelu szlaku transdukcji sygnału BR u *A. thaliana*. Brasinosteroidy ulegają wychwyceniu na powierzchni

*Artykuł stanowi skróconą wersję przeglądu literatury stanowiącego część rozprawy doktorskiej finansowanej ze środków grantu MNiSW nr N301 091 32/3403.

plazmalemy przez transbłonowy peptyd BRI1 (ang. *Brassinosteroid-Insensitive1*), mający cechy kinazy serynowo-treoninowej, należącej do rodziny białek zawierających domeny bogate w leucynę – LRR (ang. *Leucine-Rich Repeat*). Zidentyfikowano szereg genów kodujących enzymy katalizujące różne typy reakcji chemicznych, z których część funkcjonuje jako negatywne regulatory szlaku transdukcji sygnału. Wiązanie cząsteczek BR przez transbłonowy receptor powoduje dezaktywację inhibitorów sygnalizacji oraz akumulację i indukcję czynników transkrypcyjnych prowadzącą do ekspresji genów warunkujących molekularną odpowiedź na obecność tych hormonów. Metabolizm brasinosteroidów jest utrzymywany w stanie dynamicznej homeostazy dzięki funkcjonowaniu mechanizmu negatywnego sprzężenia zwrotnego między procesami syntezy i sygnalizacji. Brasinosteroidy regulują szeroki zakres procesów fizjologicznych, takich jak: embriogeneza i kiełkowanie nasion, podziały i wydłużanie komórek, rozwój pylników, kiełkowanie mikrospor oraz wzrost łagiewki pyłkowej, różnicowanie elementów trachealnych, polaryzację błon komórkowych oraz starzenie się i obumieranie liści. Ponadto kontrolują pompowanie protonów do apoplastu i w obręb wakuoli, poprzez stymulowanie działania transbłonowych H⁺ATPaz. Brasinosteroidy zwiększają intensywność procesu fotosyntezy, przez zwiększenie poziomu asymilacji CO₂ i wzrost aktywności enzymu Rubisco. Hormony te modulują także odpowiedź metaboliczną roślin na szeroki zakres stresów środowiskowych. Stwierdzono również regulowanie przez brasinosteroidy aktywności akwaporyn, odpowiedzialnych za transbłonowy transport wody. Odnotowano ponadto pozytywny wpływ BR na proces somatycznej embriogenezy oraz na embriogenezę z mikrospor wśród gatunków z rodzaju *Brassica*. Hormony te stymulują ekspresję genów alfa- i beta-tubuliny oraz reorientację mikrotubul korowych, która odgrywa kluczową rolę w organizacji przestrzennej mikrofibryl celulozowych wpływającej na właściwości strukturalne ściany komórkowej. Stwierdzono pozytywny wpływ BR na tworzenie brodawek korzeniowych u *Pisum sativum*. Brasinosteroidy w wysokim stężeniu hamują wzrost wydłużeniowy korzeni i formowanie korzeni bocznych. Wiele z tych procesów jest regulowanych na zasadzie interakcji synergistycznych z auksynami. Osobnym zagadnieniem jest regulacja procesów fotomorfogenezy i skotomorfogenezy, które wymagają interakcji na poziomie molekularnym szlaków transdukcji sygnałów pochodzących z fotoreceptorów z procesami transdukcji sygnału i syntezy brasinosteroidów. Zmiany na poziomie molekularnym prowadzące do defektów w metabolizmie tych hormonów, powodują zaburzenia morfologii i architektury roślin. Jedną z takich cech jest karłowatość roślin zbożowych, mająca znaczenie ekonomiczne ze względu na możliwość zwiększenia dawek nawozowych i w konsekwencji wyższą plonów dzięki odporności form karłowatych na wyleganie. Przedstawiana praca stanowi omówienie genetycznych i molekularnych uwarunkowań metabolizmu brasinosteroidów wraz z ich efektem fizjologicznym na szeroki zakres procesów morfogenetycznych.

Słowa kluczowe: brasinosteroidy, synteza, sygnalizacja, metabolizm, efekt fizjologiczny.

Summary: Brassinosteroids (BR) are hormones displaying high activity in stimulation of plant growth and development. They are present at low concentrations in pollen grains, anthers, seeds, leaves, stems, roots and vegetative tissues undergoing early developmental stages in a broad range of species representing various evolutionary groups. The richest sources of brassinosteroids are pollen grains and immature seeds, whereas leaves and stems contain much lower concentration of these hormones. The first identified representative of this class of hormones was a compound characterized as a steroidal lactone – brassinolide, extracted in 1979 from pollen grains of *Brassica napus*. Glucosylation, sulphonization and acetylation of brassinosteroids was noted and these chemical modifications enable their transportation, storing and inactivation. Brassinosteroids are polyhydroxylated derivatives of sterols. Intact metabolism of sterols is crucial for proper embryogenesis, xylogenesis and development of shoot and root apical meristems. Biosynthesis of sterols, which precursor is mevalonian, was elucidated to the greatest extent in *Arabidopsis thaliana* and divided into three stages: as a result of a series of reactions constituting phase A of this pathway an intermediate is produced, which may serve as a substrate of two further alternative synthesis routes: the first one, known as phase B, leads to production of sitosterol and stigmasterol being an important components of phospholipid membranes, influencing their properties. The last stage of sterol biosynthesis pathway, defined as phase C, comprises series of reactions leading to production of brassinosteroids. As far as genetic regulation of sterol biosynthesis is concerned, late stages of this process leading to brassinosteroid production are much better elucidated by identification of genes encoding enzymes catalyzing reactions constituting phase C, together with characterization of mutant phenotypes, displaying defects in this process. Early stages of sterol biosynthesis pathway are relatively much less

understood – only some of the genes responsible for these reactions were identified and phenotypes of mutants with abnormalities in this process include impaired embryogenesis. Biochemical and genetic analysis clarified the brassinosteroid signal transduction pathway in *A. thaliana*, which commences with perception of this hormone on the surface of plasma membrane leading to alteration in genes' expression. Brassinosteroids are perceived by transmembrane polypeptide BRI1 (*Brassinosteroid-Insensitive 1*) functioning as a serine-threonine kinase, belonging to a vast family of proteins, containing LRR (*Leucine-Rich Repeat*) domains. As a result of research, several genes were identified, encoding enzymes catalyzing different types of chemical reactions, some of them function as negative regulators of BR signal transduction. Perception of brassinosteroids triggers deactivation of signaling inhibitors and, on the other hand, accumulation and induction of transcription factors, which lead to expression of genes constituting molecular response to perception of this hormone. Brassinosteroid metabolism is maintained in the state of dynamic homeostasis on the basis of feedback mechanism between their synthesis and signaling. Brassinosteroids regulate broad range of physiological processes, including: seed development and germination, cell division and elongation, anther development, microspore germination and pollen-tube growth, differentiation of tracheary elements, proton pumping and membranes polarization, leaf senescence, induction of photosynthesis caused by increase in carbon dioxide assimilation and Rubisco activity. Brassinosteroids modulate plant metabolic response to a broad range of environmental stresses. Positive effect of brassinosteroids on aquaporin activity, responsible for transmembrane water transportation was also reported, as well as stimulation of somatic and microspore embryogenesis described in species from genus *Brassica*. Brassinosteroids stimulate expression of genes encoding alpha- and beta-tubulin proteins and re-orientation of cortical microtubules, which is essential for proper deposition of cellulose microfibrils, influencing structural properties of a cell wall. Brassinosteroids induce nodulation in *Pisum sativum*. These hormones when present at high concentration inhibit root growth and lateral root formation. Some of these physiological processes are regulated on the basis of synergistic interactions with auxins. BR regulate photo- and skotomorphogenesis through molecular interactions of brassinosteroid synthesis and signal transduction with photoreceptor-initiated transduction pathway. Alterations in metabolism of brassinosteroids cause abnormalities in morphology and architecture of plants. One of these traits is dwarfism of cereals, which gained an economical importance taking into account that it enables an increase in fertilizers dosage and as a consequence greater yield because of elevated lodging resistance of short stature plants. This paper presents a comprehensive review on the genetic and molecular basis of brassinosteroid metabolism and physiological effects of these hormones on a broad range of morphogenetic processes.

Key words: brassinosteroids, synthesis, signaling, metabolism, physiological effects.

STRUKTURA CHEMICZNA BRASINOSTEROIDÓW

Brasinosteroidy (BR) są sterolowymi substancjami hormonalnymi, wykazującymi wysoką aktywność w stymulowaniu wzrostu i rozwoju roślin [3, 15]. Występują w wyjątkowo niskich koncentracjach w komórkach wszystkich tkanek wielu gatunków roślin, reprezentujących różne grupy ewolucyjne, na każdym etapie rozwoju osobniczego. Ich obecność stwierdzono u przedstawicieli zielenic (*Hydrodictyon reticulatum*), mszaków (*Marchantia polymorpha*), paprotników (*Equisetum arvense*), jak również u trzech rodzin należących do nagozalążkowych, a wśród roślin okrytozalążkowych obecność BR wykryto w obrębie szesnastu rodzin roślin dwuliściennych i pięciu rodzin jednoliściennych. Pierwszym zidentyfikowanym przedstawicielem BR był związek o charakterze laktonu steroidowego – brasinolid (BL – (22*R*,23*R*,24*S*)-2*α*,3*α*,22,23-tetrahydroksy-24metylo-B-homo-7oksa-5*α*-cholestan-6on), który został wyizolowany w 1979 roku z ziaren pyłku *Brassica napus*. Brasinolid jest formą brasinosteroidów o najwyższej aktywności biologicznej. Od momentu identyfikacji

brasinolidu potwierdzono naturalne występowanie ponad pięćdziesięciu przedstawicieli tej grupy związków [3]. Substancje te występują u roślin w szerokim zakresie koncentracji w zależności od gatunku, tkanki, czy też stadium rozwojowego rośliny. Najbogatszym źródłem brasinosteroidów są ziarna pyłku i niedojrzałe nasiona, w których związki te występują w zakresie stężeń od 1 do 100 ng/g świeżej masy, podczas gdy w pędach i liściach notuje się niższe ich koncentracje, bo od 0,01 do 0,1 ng/g świeżej masy. W tkankach i organach roślinnych we wczesnych stadiach rozwoju występują wyższe stężenia brasinosteroidów, co wywołuje większy efekt działania tych hormonów.

Brasinosteroidy są grupą związków chemicznych, których struktura zawiera wielopierścieniowy szkielet węglowy 5α -cholestanu, a zróżnicowanie ich budowy wynika z rodzaju i pozycji grup funkcyjnych w obrębie pierścieni cyklicznych A i B oraz łańcucha bocznego. W odniesieniu do struktury pierścienia A, źródłem zróżnicowania budowy chemicznej jest występowanie dwóch sąsiednich grup hydroksylowych w pozycjach C-2 α i C-3 α . Ze względu na strukturę pierścienia B brasinosteroidy dzieli się na: 7-oksalakton, 6-keton (6-okso), 6-deokso oraz 6 α -hydroksykastasteron. Generalnie, 7-oksalakton wykazuje większą aktywność biologiczną niż formy 6-keton i 6-deokso, przy czym 6 α -hydroksykastasteron wykazuje śladową aktywność w testach fizjologicznych, ponieważ jest związkiem nietrwałym, izolowanym głównie przez związanie z centrum aktywnym enzymu oksydazy C-6 [3, 6]. Ze względu na wzór substytucji alkilowych w łańcuchu bocznym, BR klasyfikowane są na trzy grupy: C₂₇, C₂₈ i C₂₉. Brasinosteroidy reprezentujące poszczególne grupy są pochodnymi steroli, charakteryzujących się tym samym typem łańcucha bocznego. Brasinosteroidy typu C₂₇ bez podstawnika alkilowego w pozycji C-24 są pochodnymi cholesterolu. Związki typu C₂₈ mające grupy α -metylowe, β -metylowe lub metylenowe w pozycji C-24 są pochodnymi, odpowiednio: kampesterolu, dihydrobrasikasterolu lub 24-metylenocholesterolu. Formy C₂₉ mające grupy α -etylowe lub etylidenowe w tej pozycji są pochodnymi odpowiednio, sitosterolu lub izofukosterolu. Formy należące do tej grupy, mające podstawnik metylenowy w pozycji C-24 i dodatkową grupę metylową w pozycji C-25 są pochodnymi 24-metyleno-25-metylocholesterolu. Jednoczesna obecność nasyconej grupy alkilowej, metylowej lub etylowej, w pozycji C-24 oraz grupy metylowej w pozycji C-25 zwiększa aktywność biologiczną brasinosteroidów [3].

MODYFIKACJE CHEMICZNE STRUKTURY BRASINOSTEROIDÓW

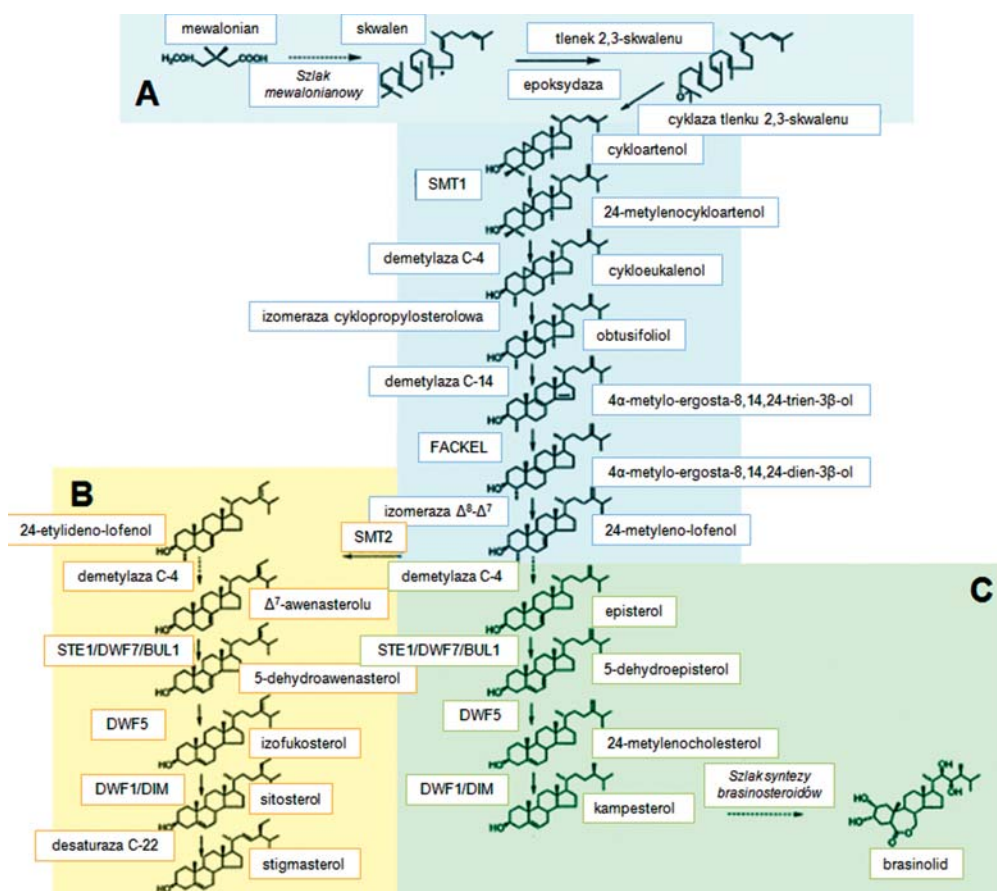
Oprócz nieskoniugowanych form brasinosteroidów, zidentyfikowano także formy o zmodyfikowanej strukturze, będącej wynikiem przyłączania innych cząsteczek i grup chemicznych. Odnotowano glukozylację, sulfonację i acetylację brasinosteroidów. Zmodyfikowane przez koniugację cząsteczki BR, ale także innych regulatorów wzrostu roślin uważa się za formy służące ich transportowi, magazyno-

waniu i inaktywacji. Również egzogennie podawane brasinosteroidy ulegają podobnym, szybkim przekształceniom metabolicznym [15].

Glukozyłacja brasinosteroidów w pozycji C-23 jest mechanizmem ich inaktywacji, przy czym formami podlegającymi temu procesowi są kastasteron i brasinolid, a więc brasinosteroidy o najwyższej aktywności biologicznej [50]. Sulfonację atomu C-22 stwierdzono u *Brassica napus*. Substratem tej reakcji był 24-epikastasteron, a nie brasinolid ani żaden jego analog i proces ten prowadził do zniesienia aktywności biologicznej substratu. Nie zidentyfikowano sulfotransferaz, których substratem jest brasinolid lub kastasteron. Acetyłacja w pozycji 3 β -OH została stwierdzona u *Lilium longiflorum*, a substratem tej reakcji był teasteron. Przypuszcza się, że niski poziom teasteronu w tkankach roślinnych jest utrzymywany dzięki jego szybkiej koniugacji, a mechanizm ten reguluje poziom syntezy brasinosteroidów. Brasinosteroidy podlegają również procesowi β -epimeryzacji [15]. Reakcja ta przebiega w pozycjach 2 α -OH i 3 α -OH, służąc procesowi dezaktywacji. Ten typ epimeryzacji był obserwowany w przypadku kastasteronu i brasinolidu oraz ich 24-epimerów u *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* i *Oryza sativa*. Obecność 3-epi-6-deoksokastasteronu i 3-epi-6-deokso-28-norkastasteronu u *Arabidopsis thaliana* i *Catharanthus roseus* wskazuje, że β -epimeryzacja jest procesem regulującym poziom biosyntezy brasinosteroidów we wszystkich jej etapach. Kolejnym typem modyfikacji chemicznej brasinosteroidów jest hydroksylacja w pozycji C-26, która jest etapem wstępnym ich katabolizmu. Proces ten reguluje poziom aktywnych biologicznie brasinosteroidów: brasinolidu i kastasteronu, przy czym jest on indukowany wpływem światła [42].

BIOSYNTETA ZWIĄZKÓW STEROLOWYCH

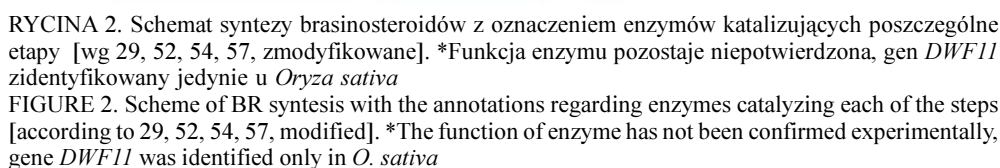
Brasinosteroidy są polihydroksylowanymi pochodnymi steroli będących częścią szerokiej rodziny izoprenoidów. Proces biosyntezy roślinnych związków sterolowych został najlepiej poznany u *A. thaliana* i podzielony na trzy etapy (ryc. 1) [37]. Prekursorem tych substancji jest mewalonian, który ulega przekształceniu do skwalenu, a ten pod wpływem epoksydazy ulega konwersji do tlenku 2,3-skwalenu. Ten ostatni, będąc substratem dla cyklazy, ulega przekształceniu do cykloartenolu [53]. Cykloartenol ulega metylacji pod wpływem metylotransferazy, kodowanej przez gen SMT1 (STEROL METHYLTRANSFERASE1) z wytworzeniem 24-metyleno-cykloartenolu. Związek ten pod wpływem demetylasy C-4 ulega konwersji do cykloeukalenolu, który zostaje przekształcony przez izomerazę w obtusifoliol. W kolejnym etapie obtusifoliol podlega reakcji katalizowanej przez demetylase C-14 z wytworzeniem 4 α -metylo-ergosta-8,14,24-trien-3 β -olu, który pod wpływem reduktazy C-14, kodowanej przez gen *FACKEL/HYDRA2*, jest przekształcany w kolejnym etapie w 4 α -metylo-ergosta-8,14,24-dien-3 β -ol. Ten ostatni związek pod wpływem izomerazy Δ^8 - Δ^7 , kodowanej przez gen *HYDRA1*, zostaje przekształcony do 24-metyleno-lofenolu. Ta reakcja jest ostatnią w pierwszej fazie syntezy związków sterolowych [37, 53]. 24-metyleno-lofenol jest potencjalnym substratem dla dwóch



RYCINA 1. Wczesne etapy syntezy związków sterolowych oraz brasinosteroidów: na niebiesko zaznaczono etap A, na żółto – etap B, na zielono – etap C, którego produktem końcowym jest brasinolid, najbardziej aktywna fizjologicznie forma brasinosteroidów; objaśnienia skrótów w tekście (wg 53, zmodyfikowane)

FIGURE 1. Early stages of sterols and brassinosteroids biosynthesis: stage A is depicted in blue, stage B is show on yellow background, and stage C is depicted in green; the final product of stage C is brassinolide, the most biologically active form of BR; all abbreviations are explained in the text (according to 53, modified)

enzymów: metylotransferazy i demetylasy C-4. Pierwszy z tych enzymów, kodowany przez gen *SMT2* (*STEROL METHYLTRANSFERASE2*), rozpoczyna ciąg reakcji określanych jako etap B w syntezie steroli i katalizuje konwersję do 24-etylideno-lofenolu. Produkt ten w kolejnej reakcji przekształcany jest przez demetylasy C-4 do Δ^7 -awenasterolu, stanowiącego substrat dla desaturazy C-5 Δ^7 -sterolu, kodowanej przez gen *STE1/DWF7/BUL1* (*STEROL DESATURASE1/DWARF7/BUL1*). W wyniku tej reakcji Δ^7 -awenasterol ulega przekształceniu w 5-dehydroawenasterol. Ten ostatni pod wpływem reduktazy Δ^7 -sterolu, kodowanej przez gen *DWF5* (*DWARF5*) ulega konwersji do izofukosterolu, a ten będąc substratem reduktazy $\Delta^{24(25)}$ -sterolu, kodowanej przez gen *DWF1/DIM* (*DWARF1/DIMINUTO*) zostaje przekształcony w sitosterol. Związek ten jest substratem reakcji katalizowanej



Episterol, produkt reakcji katalizowanej w poprzednim etapie przez demetylazę C-4, przekształcany jest przez desaturazę C-5 Δ^7 -sterolu, kodowaną przez gen *STE1/DWF7/BUL1* do 5-dehydroepisterolu. W kolejnej reakcji ten ostatni związek jest substratem reduktazy Δ^7 -sterolu kodowanej przez gen *DWF5*, która przekształca go w 24-metylenocholesterol [53]. Ten produkt przejściowy w reakcji katalizowanej przez reduktazę $\Delta^{24(25)}$ -sterolu, kodowaną przez gen *DWF1/DIM* ulega przekształceniu w kampesterol, który w następnym etapie jest substratem 5α -reduktazy, kodowanej przez gen *DET2 (DE-ETIOLATED2)*, która przekształca go w kampestanol. Ten ostatni związek może być substratem dwóch równoległych dróg syntezy.

Pierwsza z nich to tzw. szlak późnej oksydacji C-6, w którym atomy węgla w pierścieniu A oraz w sąsiadujących pozycjach C-22 i C-23 w łańcuchu bocznym cząsteczki brasinosteroidu są hydroksylowane, zanim nastąpi oksydacja atomu węgla C-6. W przebiegu tzw. szlaku wczesnej oksydacji C-6, utlenianie atomu węgla w tej pozycji następuje, zanim sąsiednie grupy hydroksylowe w pozycjach C-22 i C-23 zostaną włączone do łańcucha bocznego [54]. Analiza syntezy brasinosteroidów u różnych gatunków roślin wykazała, że proces ten odbywa się głównie drogą wczesnej oksydacji C-6 [49]. W reakcji stanowiącej pierwszy etap szlaku późnej oksydacji C-6, kampestanol ulega przekształceniu przez hydroksylazę C-22 α , kodowaną przez gen *DWF4* (*DWARF4*) do 6-deoksokastasteronu [15], który w kolejnej reakcji jest substratem hydroksylazy C-23, kodowanej przez gen *CPD* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM*), przekształcającej ten związek w 6-deoksoteasteron [4]. Ten ostatni związek jest konwertowany przez oksydazę C-3, kodowaną przez gen *CYP90D* (*CYTOCHROME P450 90D*) w 3-dehydro-6-deoksoteasteron [29]. Etap przekształcenia 3-dehydro-6-deoksoteasteronu do kolejnego produktu przejściowego, 6-deoksotyfasterolu u *A. thaliana* został scharakteryzowany jedynie na poziomie biochemicznym, bez identyfikacji genu odpowiedzialnego za ten proces. Wprawdzie badania molekularne doprowadziły do identyfikacji genu *DWF11* (*DWARF11*), pochodzącego z genomu *O. sativa*, kodującego enzym CYP724B1, należący do rodziny białek cytochromowych P450, którego postulowaną rolą jest synteza 6-deoksotyfasterolu i tyfasterolu, odpowiednio w procesie późnej i wczesnej oksydacji C-6, jednak analizy bioinformatyczne nie doprowadziły do identyfikacji potencjalnego homologa tego genu u innych gatunków roślin [57]. 6-deoksotyfasterol jest substratem hydroksylazy C-2 α , kodowanej przez gen *ROT3* (*ROTUNDIFOLIA3*), ulegając konwersji do 6-deoksokastasteronu, który jest substratem oksydaz C-6. Enzymy te są kodowane przez dwa paralogiczne geny *BR6ox1* (*BR-6-oxidase1*) i *BR6ox2* (*BR-6-oxidase2*) i przekształcają 6-deoksokastasteron do kastasteronu [29, 52]. Wykazano, że oksydazy te dodatkowo katalizują reakcje przekształcania 6-deoksotyfasterolu do tyfasterolu, 6-deokso-3-dehydroteasteronu do 3-dehydroteasteronu oraz 6-deoksoteasteronu do teasteronu, powodując, że szlaki późnej i wczesnej oksydacji C-6 ulegają połączeniu nie tylko na ostatnim etapie – syntezie kastasteronu, ale także na poziomie poprzednich reakcji [54], co sprawia, że schemat procesu biosyntezy BR z formy dwóch równoległych szlaków oksydacji przyjmuje postać sieci. Oba enzymy katalizują reakcję przekształcenia 6-deoksokastasteronu do kastasteronu, jednak reakcja przekształcania kastasteronu do brasinolidu, określana jako 7-oksalaktonizacja, katalizowana jest wyłącznie przez oksydazę BR6ox2/CYP85A2 [30].

Zaproponowano nowy model syntezy brasinosteroidów, w którym enzymy kodowane przez geny *ROT3* i *CYP90D* pełnią, na zasadzie uzupełniających się aktywności, funkcję hydroksylaz C-23, które biorą udział w alternatywnym, skróconym szlaku syntezy prowadzącym od 22-okso-brasinosteroidów, takich jak: 22-hydroksykampesterol oraz 3-epi-6-deoksokastasteron, bezpośrednio do 3-dehydro-6-deoksoteasteronu i 6-deoksotyfasterolu, z pominięciem kampestanolu, 6-deoksokastasteronu i 6-deoksoteasteronu [49]. Obecność 22-okso-brasinosteroidów wykryto

w ekstraktach pochodzących z *A. thaliana*, co wskazuje na obecność alternatywnego szlaku w procesie syntezy BR [6].

W przebiegu szlaku wczesnej oksydacji C-6 kampestanol ulega konwersji do 6-oksokampestanolu, przy czym enzym katalizujący ten etap nie został zidentyfikowany u żadnego gatunku roślin [54]. Poszczególne etapy szlaku wczesnej oksydacji C-6 są katalizowane przez enzymy, regulujące analogiczne kroki w procesie późnej oksydacji [52]. Enzym DWF4 przekształca 6-oksokampestanol w kastasteron, będący w kolejnym etapie substratem hydroksylazy CPD katalizującej reakcję, której produktem jest teasteron [54]. Ten związek jest przekształcany przez enzym CYP90D w 3-dehydroteasteron, który ulega konwersji do tyfasterolu, przekształcanego następnie w kastasteron przez hydroksylazę C-2 α , kodowaną przez gen *ROT3* [29]. Kastasteron podczas reakcji 7-oksalaktonizacji, katalizowanej przez oksydazę BR6ox2 (CYP85A2), ulega konwersji w brasinolid, będący terminalnym produktem syntezy brasinosteroidów [54]. U *A. thaliana* obie drogi syntezy BR są funkcjonalne, przy czym wykazano, że szlak późnej oksydacji C-6 odgrywa główną rolę podczas fotomorfogenezy, zaś równolegle przebiegająca wczesna oksydacja C-6 dominuje podczas skotomorfogenezy, która jest procesem rozwojowym zachodzącym podczas wzrostu roślin w ciemności, objawiającym się w przypadku roślin dwuliściennych wydłużonym hypokotylem, silnie zakrzywionym hakiem apikalnym osłaniającym zwinięte liście, zatrzymanym rozwojem chloroplastów, przy jednoczesnym hamowaniu ekspresji genów indukowanych światłem [45]. Wszystkie zidentyfikowane do tej pory enzymy, biorące udział w dalszej części szlaku syntezy brasinosteroidów, należą do rodziny białek P450, wiążących cytochromową grupę prostetyczną i wykazujących aktywność monooksygenaz, katalizując reakcje oksydacji, hydroksylacji, izomeryzacji i dehydratacji. Enzymy te zlokalizowane są w błonie retikulum endoplazmatycznego, co może ułatwiać tworzenie kompleksów wieloenzymatycznych i ukierunkowanie przepływu produktów pośrednich podczas biosyntezy [24]. Analizy przeprowadzone u gatunków: *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Lycopersicon esculentum*, *Oryza sativa* i *Triticum aestivum* wykazały, że BR nie podlegają długodystansowemu transportowi między organami, a miejsca syntezy są zbieżne z miejscami aktywności biologicznej [56]. Wykaz genów oraz kodowanych przez nie enzymów biorących udział w biosyntezie steroli i brasinosteroidów zamieszczono w tabeli 1. W tabeli 2 zamieszczono listę enzymów katalizujących niektóre etapy syntezy związków sterolowych, przy czym enzymy te kodowane są przez niezidentyfikowane geny.

CHARAKTERYSTYKA MUTANTÓW Z ZABURZENIAMI W SYNTEZIE STEROLI I BRASINOSTEROIDÓW

Mutanty *A. thaliana* charakteryzujące się defektami w funkcjonowaniu enzymów katalizujących reakcje stanowiące elementy fazy A szlaku biosyntezy związków sterolowych, w odróżnieniu od mutantów brasinosteroidowych, wykazują letalność

TABELA 1. Geny zaangażowane w syntezę związków sterolowych i brasinosteroidów wraz z opisem funkcji kodowanych polipeptydów

TABLE 1. Genes regulating synthesis of sterols and brassinosteroids with the characterization of functions of encoded polypeptides

Gen	Enzym	Funkcja enzymu	Proces	Lit.
Synteza związków sterolowych i brasinosteroidów				
<i>SMT1 (STEROL METHYLTRANSFERASE1)</i>	metylotransferaza	metylacja cykloartenolu	synteza związków sterolowych (faza A)	[37, 53]
<i>FAKEL/HYDRA2</i>	reduktaza C-14	redukcja 4 α -metylo-ergosta-8,14,24-trien-3 β -olu		[37, 53]
<i>HYDRA1</i>	izomeraza Δ^8 - Δ^7	izomeryzacja 4 α -metylo-ergosta-8,14,24-dien-3 β -olu		[37, 53]
<i>SMT2 (STEROL METHYLTRANSFERASE2)</i>	metylotransferaza	synteza 24-etylideno-lofenolu	synteza związków sterolowych (faza B)	[53]
<i>STE1/DWF7/BUL1 (STEROL DESATURASE1/DWARF7/BUL1)</i>	desaturaza C-5 Δ^7 -sterolu	konwersja Δ^7 -awenasterolu do 5-dehydroawenasterolu		[53]
<i>DWF5 (DWARF5)</i>	reduktaza Δ^7 -sterolu	konwersja 5-dehydroawenasterolu do izofukosterolu		[37, 53]
<i>DWF1/DIM (DWARF1/DIMINUTO)</i>	reduktaza $\Delta^{24(25)}$ -sterolu	synteza sitosterolu	synteza związków sterolowych (faza C – synteza brasinosteroidów)	[37, 53]
<i>STE1/DWF7/BUL1</i>	desaturaza C-5 Δ^7 -sterolu	konwersja episterolu do 5-dehydroepisterolu		[15]
<i>DWF5(DWARF5)</i>	reduktaza Δ^7 -sterolu	synteza 24-metylenocholesterolu		[53]
<i>DWF1/DIM (DWARF1/DIMINUTO)</i>	reduktaza $\Delta^{24(25)}$ -sterolu	synteza kampesterolu		[15]
<i>DET2 (DE-ETIOLATED2)</i>	5 α -reduktaza	synteza kampestanolu		[15]
<i>DWF4 (DWARF4)</i>	hydroksylaza C-22 α	synteza 6-deoksokasteronu w szlaku późnej oksydacji C-6 i kasteronu w szlaku wczesnej oksydacji C-6		[15]
<i>CPD (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM)</i>	hydroksylaza C-23	synteza 6-deoksoteasteronu w szlaku późnej oksydacji C-6 i teasteronu w szlaku wczesnej oksydacji C-6		[4]
<i>CYP90D (CYTOCHROME P450 90D)</i>	oksydaza C-3	synteza 3-dehydro-6-deoksoteasteronu w szlaku późnej oksydacji C-6 i 3-dehydroteasteronu w szlaku wczesnej oksydacji C-6		[29]
<i>ROT3 (ROTUNDIFOLA3)</i>	hydroksylaza C-2 α	synteza 6-deoksokasteronu w szlaku późnej oksydacji C-6 i kasteronu w szlaku wczesnej oksydacji C-6		[29, 52]
<i>BR6ox1 (BR-6-oxidase1)</i> <i>BR6ox2 (BR-6-oxidase2)</i>	oksydazy C-6	konwersja: 6-deoksotyfasterolu do tyfasterolu, 6-deokso-3-dehydroteasteronu do 3-dehydroteasteronu, 6-deoksoteasteronu do teasteronu, 6-deoksokasteronu do kasteronu		[30,45]
<i>BR6ox2 (BR-6-oxidase2)</i>	oksydaza C-6	reakcja 7-oksaktonizacji prowadząca do syntezy brasinolidu		[54]

TABELA 2. Wykaz enzymów, które kodowane są przez niezidentyfikowane geny i katalizują niektóre etapy syntezy związków sterolowych

TABLE 2. Enzymes encoded by unidentified genes and catalyzing several reactions during synthesis of sterols

Enzym	Funkcja enzymu	Proces	Literatura
Epoksydaza	synteza tlenku 2,3-skwalenu	synteza związków sterolowych (faza A)	[53]
Cyklaza	synteza cykloartenolu		[53]
Demetylaza C-4	synteza cykloeukalenolu		[37, 53]
Izomeraza	synteza obtusifoliolu		[37, 53]
Demetylaza C-14	synteza 4 α -metylo-ergosta-8,14,24-trien-3 β -olu		[37, 53]
Demetylaza C-4	synteza Δ^7 -awenasterolu	synteza związków sterolowych (faza B)	[53]
Desaturaza C-22	synteza stigmasterolu		[37, 53]

na etapie rozwoju zarodka bądź we wczesnych stadiach rozwoju siewki [15]. Przyczyną są mutacje w genach *SMT1*, *FACKEL/HYDRA2*, *HYDRA1* i *SMT2* [37, 53]. Mutanty charakteryzujące się zaburzeniami w przebiegu reakcji prowadzących do syntezy brasinosteroidów, a stanowiących elementy fazy C, zostały zidentyfikowane u *A. thaliana* na podstawie przeprowadzonych testów etiolacji oraz znaczącej redukcji wzrostu roślin. Między innymi, zidentyfikowano mutacje w genie *STE1/DWF7/BUL1* (kodującym desaturazę C-5 Δ^7 -sterolu), prowadzące do karłowego fenotypu roślin, których wysokość stanowi ok. 14% formy wyjściowej. Fenotypy podobne do opisanych powyżej obserwowano również u mutantów charakteryzujących się zmianami w sekwencji genu *DWF5*, kodującego reduktazę Δ^7 -sterolu. Mutanty te cechują ponadto zaburzenia w embriogenezie i kiełkowaniu nasion. Mutacje zidentyfikowane u *A. thaliana*, zlokalizowane w genie *DWF1/DIM*, kodującym reduktazę $\Delta^{24(25)}$ -sterolu, również wywołują karłowy fenotyp, a rośliny cechuje obniżona płodność, zmiana morfologii liści, wydłużony cykl życiowy oraz zaburzenia etiolacji. Karłowy fenotyp związany jest z redukcją wydłużania komórek, spowodowaną obniżonym poziomem ekspresji genów tubulin i enzymów modyfikujących strukturę ścian komórkowych [53]. Karłowego mutantu *lkb* niosącego mutację w homologicznym genie zidentyfikowano u *P. sativum*. Wykazuje on zmianę profilu steroli wchodzących w skład plazmalemy, z dominującym udziałem izofukosterolu zamiast stigmasterolu [15]. Mutacje w genie *DET2* *A. thaliana*, kodującym 5 α -reduktazę, której koniecznym kofaktorem jest NADPH, powodują występowanie de-etiolacji, podczas rozwoju roślin w ciemności, charakterystycznej dla mutantów brasinosteroidowych. De-etiolacja powiązana jest z redukcją wzrostu hypokotyli i liścieni, inicjacją rozwoju liści oraz akumulacją antocyjanów przy jednoczesnym braku rozwoju chloroplastów. U osobników niosących te mutacje, podczas rozwoju w normalnych warunkach, tak jak w przypadku poprzednio omówionych mutantów, obserwuje się zredukowany wzrost, ciemnozielone zabarwienie liści, wydłużony cykl rozwojowy, obniżoną dominację apikalną oraz redukcję płodności. U mutantu *lk* *P. sativum* scharakteryzowano nonsensowną mutację w homologicznym genie *PsDET2*,

która powoduje karłowaty fenotyp, ciemnozielone zabarwienie liści oraz zwiększoną średnicę pędu. Mutacja ta prowadzi do skrócenia kodowanego polipeptydu o domenę wiążącą cząsteczkę brasinosteroidu oraz o domenę wchodzącą w interakcje z NADPH [46]. Mutacje w genie *DWF4*, kodującym hydroksylazę C-22 α , powodują występowanie u *A. thaliana* fenotypów typowych dla innych mutantów brasinosteroidowych, których przyczyną jest defekt w procesie elongacji komórek.

Mutacje w genie *CPD* *A. thaliana*, kodującym hydroksylazę C-23, zostały uzyskane w drodze mutagenезы insercyjnej [15]. Mutant *cpd* charakteryzuje się de-etiolacją podczas wzrostu w ciemności, wiążącą się z indukcją ekspresji genów, kodujących polipeptydy uczestniczące w procesie fotosyntezy: karboksylazę rybulozo-1,5-bisfosforanową (RBCS) i białka wiążące chlorofil (CAB). Mutanta cechuje znaczna redukcja wydłużania komórek i wzrostu rośliny, zaburzenia w dyferencjacji elementów waskularnych i morfogenezie liści oraz sterylność. W przypadku genu *CYP90D*, kodującego oksydazę C-3, wywołanie mutacji typu *knockout* przez insercję elementu T-DNA nie spowodowało znaczących efektów fenotypowych. Podobnie wytworzenie roślin transgeniczných, u których ekspresji ulegał antysensowny konstrukt *CYP90D*, nie doprowadziło do zmian w morfologii roślin. Efekt fenotypowy obserwowany był dopiero po jednoczesnym wywołaniu mutacji w genach *CYP90D* i *ROT3*, co sugeruje, że geny te pełnią uzupełniające się funkcje w procesie syntezy BR [29].

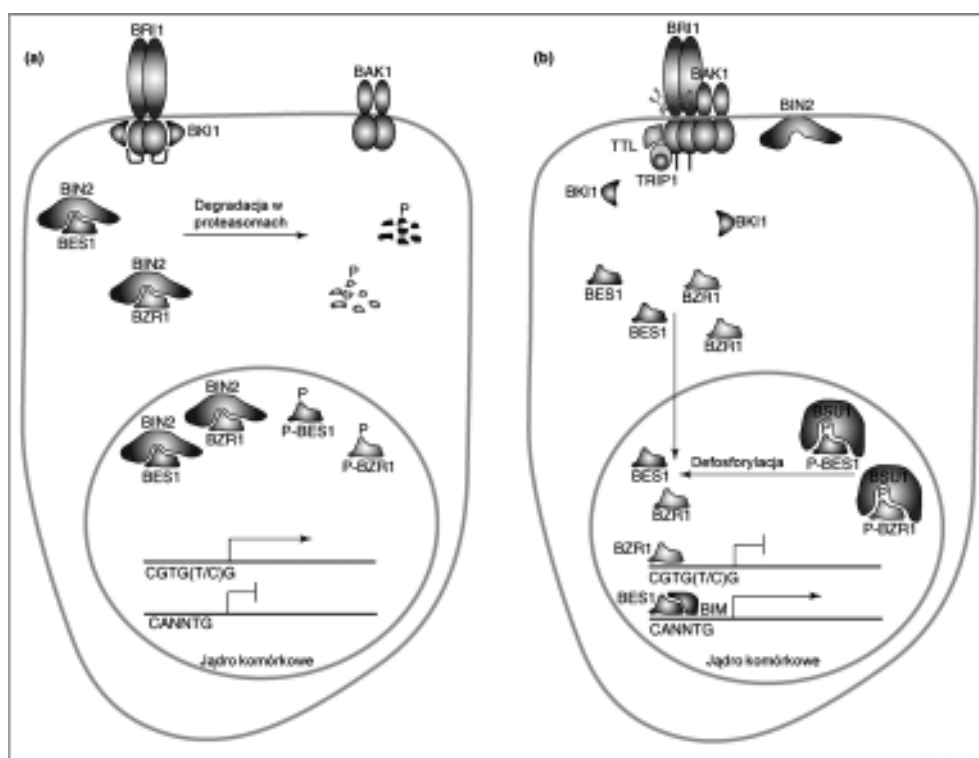
Jak już wspomniano, gen *DWF11* kodujący enzym CYP724B1, którego sugerowaną funkcją jest synteza 6-deoksotyfasterolu i tyfasterolu, odpowiednio w procesie późnej i wczesnej oksydacji C-6, został zidentyfikowany jedynie u *O. sativa*. Funkcję CYP724B1 określono na podstawie analizy przekształcania produktów pośrednich syntezy BR przez ten enzym. Formy z mutacją w tym genie wykazują zwarty, wzniesiony pokrój, skróconą długość międzywęzli oraz wytwarzanych ziarniaków. Dodatkowo, podczas rozwoju w ciemności, mutanty cechują się zaburzoną skotomorfogenezą. Mutacje o charakterze delecji (*rot3-1*), substytucji wysoce konserwowanej glicyny (*rot3-2*) lub też insercji elementu T-DNA w obrębie promotora (*rot3-3*) w genie *ROT3* *A. thaliana*, kodującym hydroksylazę C-2 α , wywołują defekt w wydłużeniowym wzroście komórek, szczególnie widoczny podczas rozwoju liści. Cechą szczególną tych mutantów jest normalna skotomorfogeneza, podczas gdy inne mutanty BR w tych warunkach wykazywały de-etiolację [52].

W wyniku analizy aktywności enzymów mikrosomalnych wykazano obecność dodatkowego enzymu należącego do białek cytochromowych P450, katalizującego konwersję tyfasterolu do kastasteronu i 6-deoksotyfasterolu do 6-deoksokastasteronu, odpowiednio podczas wczesnej i późnej oksydacji C-6. Są to etapy katalizowane również przez hydroksylazę ROT3. Wyniki te wskazują na wzajemne uzupełnianie się funkcji tych enzymów, tłumaczące nietypowy fenotyp mutantów *rot3* [29]. Mutacja typu *knockout* wywołana w sekwencji genu *BR6ox1* *A. thaliana* przez insercję elementu T-DNA, nie powoduje znaczących efektów fenotypowych. Podobnie, ten sam typ mutacji w paralogicznym genie *BR6ox2* również nie skutkuje zmianą w architekturze roślin [30, 54]. Wyniki te potwierdzają uzupełnianie się obu genów w procesie syntezy BR na etapie oksydacji C-6 [8, 54]. Mutacje w obu genach powodują karłowaty fenotyp roślin

br6ox1br6ox2 [32, 48]. Podobnie w genomie *L. esculentum* zidentyfikowano dwa geny *LeBR6ox1* i *LeBR6ox3*, kodujące enzymy katalizujące analogiczne reakcje, jak odpowiednio *BR6ox1* i *BR6ox2* u *A. thaliana* [23, 48]. Mutacje typu *knockout* w genie *LeBR6ox1*, uzyskane przez insercję transpozonu [54] wywołują karłowy fenotyp roślin, dodatkowo cechujących się zaburzeniami w skotomorfogenezie. Występowanie takiego fenotypu mutantu u *L. esculentum* spowodowane jest tym, że gen *LeBR6ox3* ulega ekspresji wyłącznie w owocach tego gatunku [48], co powoduje brak wzajemnego uzupełnienia się funkcji tych genów w tkankach wegetatywnych, gdzie aktywną fizjologicznie formą brasinosteroidów jest wyłącznie kastasteron, syntetyzowany w reakcji katalizowanej przez oksydazę C-6, kodowaną przez gen *LeBR6ox1* [41]. W odróżnieniu od *A. thaliana* i *L. esculentum* w genomie *P. sativum* dwa zidentyfikowane geny *PsBR6ox1* i *PsBR6ox6*, kodują enzymy o funkcji oksydaz C-6 syntetyzujących kastasteron, przy czym żaden z tych enzymów nie ma aktywności syntetazy brasinolidu [23].

SZLAK TRANSDUKCJI SYGNAŁU BRASINOSTEROIDÓW

Analizy biochemiczne i genetyczne pozwoliły na stworzenie modelu szlaku transdukcji sygnału BR u *A. thaliana* prowadzącego do zmian ekspresji genów (ryc. 3) [19]. Brasinosteroidy ulegają wychwyceniu na powierzchni plazmalemy przez transbłonowy receptor BRI1 (ang. *Brassinosteroid-Insensitive1*), mający cechy kinazy serynowo-treoninowej, należącej do rodziny białek zawierających domeny bogate w leucynę – LRR (ang. *Leucine-Rich Repeat*). Region zawierający domeny LRR odpowiedzialny jest za interakcje z peptydami [35]. W funkcjonowaniu receptora po stronie apoplastu, szczególnie w enzymatycznej obróbce dodatkowych elementów uczestniczących we wczesnych etapach sygnalizacji, może również brać udział karboksypeptydaza serynowa – BRS1 (ang. *BRI1-Supressor1*) [67]. Po bezpośrednim związaniu cząsteczki BR przez receptor BRI1, indukowana jest aktywność kinazowa tego białka, w wyniku czego następuje autofosforylacja BRI1, powodująca asocjację i fosforylację drugiego elementu transbłonowego receptora, jakim jest polipeptyd BAK1/SERK3 (ang. *BRI1-Associated receptor Kinase1/ Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase3*) [61]. Fosforylacja reszt treoninowych obu peptydów nie tylko wzajemnie je aktywuje [12], ale również eksponuje miejsca interakcji z innymi elementami szlaku sygnalizacji, co umożliwia formowanie kompleksu receptora i inicjuje transdukcję sygnału [34]. Transbłonowy heterodimer BRI1-BAK1/SERK3 pełniący funkcję receptora BR ma budowę asymetryczną, ponieważ polipeptyd BAK1/SERK3 ma mniejszą długość niż BRI1, co spowodowane jest tym, że BAK1/SERK3 zawiera pięć powtórzeń LRR, podczas gdy polipeptyd BRI1 ma 25 segmentów LRR. Dodatkowo BAK1/SERK3, w odróżnieniu od BRI1, nie ma pary cystein odpowiedzialnych za tworzenie homo- i heterodimerów oraz domeny 70-aminokwasowej odpowiedzialnej za wiązanie cząsteczek hormonu, dlatego BRI1 jest jedynym komponentem kompleksu receptora, odpowiedzialnym za wiązanie BR [27, 31]. Wykazano, że heterodimeryzacja peptydów BRI1 i BAK1/SERK3 prowadzi do endocytozy fragmentów plazmalemy zawierających te



RYCINA 3. Model szlaku transdukcji sygnału brasinosteroidów. Pod nieobecność BR (a), następuje hamowanie kaskady sygnalizacyjnej w wyniku działania kinazy BIN2 oraz białek BKI1, wiążących receptor BRI1. Stymulacja BR (b) prowadzi do oddysocjowania peptydów BKI1, wzajemnej fosforylacyjnej aktywacji receptorów BRI1 i BAK1/SERK3, uformowania kompleksu receptora, co prowadzi do inaktywacji kinazy BIN2. Fosfataza BSU1 katalizuje defosforylację czynników transkrypcyjnych BES1/BZR2 i BZR1, które ulegają akumulacji w jądrze komórkowym regulując ekspresję genów [wg 35, zmodyfikowane]

FIGURE 3. Model of BR signaling. During the absence of hormone (a) signal transduction is blocked due to activity of BIN2 kinases and proteins BKI1, binding BRI1 receptor. BRs induce (b) dissociation of BKI1 proteins, transphosphorylation and mutual activation of BRI1 and BAK1/SERK3 forming a receptor complex, leading to inactivation of BIN2 kinases. BSU1 phosphatases dephosphorylate BES1/BZR2 and BZR1 transcription factors, which are accumulated in the nucleus and regulate genes expression [according to 35, modified].

polipeptydy, co może stanowić mechanizm ułatwiający interakcję ko-receptora BRI1-BAK1/SERK3 z białkami cytoplazmatycznymi, stanowiącymi składniki szlaku transdukcji sygnału [18, 27, 35].

Kolejnym polipeptydem regulującym proces sygnalizacji brasinosteroidów jest BKI1 (ang. *BRI1 Kinase Inhibitor1*), będący negatywnym regulatorem tego procesu, ponieważ specyficznie wiąże się z domenami kinazowymi receptorów BRI1, uniemożliwiając ich interakcje z białkami BAK1/SERK3 i innymi składnikami receptora, blokując transdukcję sygnału na poziomie plazmalemy (ryc. 3a) [27]. Wiązanie cząsteczek BR przez BRI1 powoduje oddysocjowanie polipeptydów BKI1

i inicjację formowania kompleksu receptora (ryc. 3b) [35, 60]. Zidentyfikowano ponadto dwa polipeptydy: TTL (ang. *Transthyretin-Like protein*) i TRIP1 (ang. *TGF β Receptor-Interacting Protein1*), będące substratami kinazy BRI1 (ryc. 3b) [13, 43]. Analizy wykazały, że czynnik TTL jest negatywnym regulatorem transdukcji sygnału brasinosteroidów [43, 60], jednak dokładna rola obu czynników w regulacji sygnalizacji BR pozostaje nieznana [19, 35].

Cytoplazmatyczna, serynowo-treoninowa kinaza – BIN2 (ang. *Brassinosteroid-Insensitive2*) jest kolejnym negatywnym regulatorem szlaku transdukcji sygnału BR, który fosforyluje, a tym samym hamuje działanie czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów odpowiedzi na BR. Aktywność BIN2 podlega hamowaniu po związaniu cząsteczek BR na powierzchni plazmalemy przez receptor BRI1-BAK1/SERK3 [35]. Działanie kinazy BIN2 polega na inaktywacji czynników transkrypcyjnych BZR1 (ang. *Brassinazole-Resistant1*) i BES1/BZR2 (ang. *BRI1-EMS-Suppressor1/Brassinazole Resistant2*), wiążących się z promotorami genów regulowanych przez brasinosteroidy. BES1/BZR2 wiąże się z sześci nukleotydowymi domenami w obrębie promotorów, działając jako aktywator transkrypcji, a oddziałuje ponadto z grupą trzech białek BIM (ang. *BES1-Interacting Myc-like*), należących do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających domenę bHLH (ang. *basic Helix-Loop-Helix*), a interakcje te są niezbędne dla regulacji ekspresji genów (ryc. 3b) [20, 34, 36, 65]. Modyfikacja chemiczna peptydów BZR1 i BES1/BZR2 przez kinazę BIN2 powoduje ich degradację w proteasomach, przy udziale czynnika E3, będącego ligazą ubikwityny (ryc. 3a) [20, 65]. Związanie brasinosteroidów przez transbłonowy receptor powoduje akumulację defosforylowanych i jednoczesny zanik fosforylowanych form czynników transkrypcyjnych BZR1 i BES1/BZR2. Enzymem defosforylującym czynnik transkrypcyjny BES1/BZR2 jest prawdopodobnie fosfataza BSU1 (ang. *Bri1 Suppressor1*) zlokalizowana w jądrze komórkowym [27].

Lokalizacja i aktywność czynników transkrypcyjnych BES1/BZR2 i BZR1 jest precyzyjnie regulowana przez ich poziom fosforylacji, który jest determinowany przez antagonistyczne działania kinazy BIN2 i fosfatazy BSU1 [19, 51]. Fosforylacja BZR1 i BES1/BZR2 obniża ich zdolność wiązania się z promotorami genów i stanowi pierwszy etap degradacji tych czynników transkrypcyjnych [58]. Stwierdzono ponadto, że polipeptydy należące do grupy 14-3-3, mające zdolność wiązania fosforylowanych białek, stanowią kolejny element regulacji przekazywania sygnału BR, ponieważ biorą udział w zatrzymaniu ufosforylowanych form BES1/BZR2 i BZR1 na terenie cytoplazmy [17, 19]. Związanie cząsteczek BR przez receptor BRI1-BAK1/SERK3 powoduje defosforylację czynników BES1/BZR2 i BZR1 [58], co prowadzi do oddysocjowania białek 14-3-3 i przemieszczania czynników transkrypcyjnych do jądra komórkowego [2]. Pod nieobecność BR ko-receptory BRI1 i BAK1/SERK3 nie są aktywowane, a polipeptyd BRI1 jest związany z białkami BKI1, hamującymi interakcje z innymi elementami kompleksu receptora [60]. Kinaza BIN2 jest konstytutywnie aktywna i fosforyluje czynniki transkrypcyjne BES1/BZR2 i BZR1, co uniemożliwia ich wiązanie z promotorami genów i blokuje transdukcję sygnału BR w cytoplazmie [35]. W odpowiedzi na brasinosteroidy, ko-receptory BRI1 i

BAK1/SERK3 ulegają wzajemnej aktywacji przez fosforylację, co prowadzi do oddysocjowania peptydów BKI1, formowania kompleksu receptora i jednoczesnego hamowania działania kinazy BIN2 [18, 58]. W rezultacie, czynniki BES1/BZR2 i BZR1 ulegają defosforylacji pod wpływem fosfatazy BSU1 i akumulacji w obrębie jądra komórkowego, gdzie regulują ekspresję genów przy udziale czynników BIM [34, 35, 65]. Wykaz genów biorących udział w szlaku transdukcji sygnału brasinosteroidów oraz kodowanych przez nie enzymów zamieszczono w tabeli 3.

CHARAKTERYSTYKA MUTACJI ZIDENTYFIKOWANYCH W GENACH BIORĄCYCH UDZIAŁ W TRANSDUKCJI SYGNAŁU BRASINOSTEROIDÓW

W genie kodującym ko-receptor BRI1 *A. thaliana* do tej pory scharakteryzowano piętnaście mutacji zlokalizowanych w rejonach genu kodujących różne domeny receptora. Mutacja *bril-5* dotyczy jednej z cystein w N-terminalnej części peptydu, a cztery ze scharakteryzowanych mutacji: *bril-6*, *bril-7*, *bril-113* i *bril-116* zlokalizowane są we fragmencie genu kodującego 70-aminokwasową domenę rozdzielającą powtórzenia LRR. Dwie mutacje *bril-9* i *bril-102* dotyczą domeny LRR poprzedzającej rejon transbłonowy, a pozostałe mutacje *bril-1*, *bril-8*, *bril-101*, *bril-104*, *bril-107*, *bril-108*, *bril-115* i *bril-117* zlokalizowane są we fragmencie genu kodującego domenę kinazową. Fenotypy tych mutantów, podobnie jak i tych cechujących się zaburzeniami w procesie syntezy brasinosteroidów, charakteryzują się różnym poziomem karłowatości zależnym od mutacji: skróconymi, ciemnozielonymi i zgrubiałymi liśćmi; zredukowaną dominacją apikalną; de-etiolacją podczas wzrostu w ciemności oraz wydłużonym cyklem rozwojowym i sterylnością. Cechą szczególną mutantów *bril* odróżniającą je od mutantów mających defekt w procesie syntezy BR jest niewrażliwość na działanie brasinosteroidów oraz ich akumulacja, szczególnie form 6-okso, co wiąże się z rolą receptorów BR w mechanizmie regulacji ich syntezy polegającą na negatywnym sprzężeniu zwrotnym.

Mutacje typu *knockout* wywołane w genie kodującym drugi z elementów receptora BR – *BAK1/SERK3* powodują jedynie półkarłowy fenotyp roślin, co wynika z uzupełniania się funkcji białek kodowanych przez poszczególne geny należące do rodziny SERK, z których część pełni funkcje w procesie sygnalizacji BR. U mutantu *elg* (ang. *elongated*) zidentyfikowano substytucję w obrębie czwartego egzonu tego genu, w sekwencji kodującej trzecie z pięciu powtórzeń LRR. Mutacja ta wywołuje nadwrażliwość na brasinosteroidy, co skutkuje wydłużonym hypokotylem i pędami oraz przyspieszonym kwitnieniem. Przypuszczalną rolą tej mutacji jest zwiększenie powinowactwa ko-receptorów do cząsteczek BR lub podwyższenie zdolności tych polipeptydów do inicjowania procesu sygnalizacji również przy obniżonym endogennym poziomie tych hormonów [63].

Zidentyfikowane mutacje w genie *BIN2*, powodujące konstytutywną aktywność kodowanego polipeptydu, prowadzą do zaburzeń w procesie transdukcji sygnału BR.

TABELA 3. Geny zaangażowane w szlak transdukcji sygnału brasinosteroidów wraz z opisem funkcji kodowanych polipeptydów
 TABLE 3. Genes regulating signal transduction pathway of brassinosteroids with the characterization of functions of encoded polypeptides

Gen	Enzym	Funkcje enzymu	Proces	Literatura
Szlak transdukcji sygnału brasinosteroidów				
<i>BR11 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1)</i>	kinaza serynowo-treoninowa*	translacyjny receptor brasinosteroidów	percepcja brasinosteroidów i inicjacja szlaku transdukcji sygnału przez fosforylację	[31, 35]
<i>BRS1 (BR11-Suppressor1)</i>	karboksypeptydaza serynowa	funkcja nie potwierdzona	percepcja brasinosteroidów	[67]
<i>BAK1/SERK3 (BR11-Associated receptor Kinase1/Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase3)</i>	kinaza serynowo-treoninowa*	funkcjonuje jako drugi komponent translacyjnego receptora BR BR11-BAK1	inicjacja szlaku transdukcji sygnału przez fosforylację	[12, 34, 61]
<i>BK11 (BR11 Kinase Inhibitor1)</i>	funkcja enzymatyczna niezidentyfikowana	negatywny regulator sygnalizacji BR, blokuje transdukcję sygnału na poziomie plazmalemy	specyficznie wiąże się z domenami kinazowymi peptydów BR11, uniemożliwiając ich interakcje z białkami BAK1/SERK3 i innymi elementami receptora	[27]
<i>TTL (Transhyretin-Like protein)</i>		negatywny regulator transdukcji sygnału brasinosteroidów; substrat kinazy BR11	specyfika działania nie została wyjaśniona	[13, 19, 35, 43, 60]
<i>TRIP1 (TGFBβ-Receptor-Interacting Protein 1)</i>		substrat kinazy BR11	specyfika działania nie została wyjaśniona	[13, 19, 52, 64]
<i>BN2 (Brassinosteroid-Insensitive2)</i>	cytoplazmatyczna kinaza serynowo-treoninowa	negatywny regulator szlaku transdukcji sygnału BR; inaktywacja czynników transkrypcji. BZR1 i BES1/BZR2, wiążących się z promotorami genów regulowanych przez brasinosteroidy; fosforylacja peptydów BZR1 i BES1/BZR2 przez kinazę BIN2 powoduje degradację tych czynników w transkrypcyjnych w proteasomach, przy udziale czynnika E3	fosforyluje, a tym samym hamuje działanie enzymów katalizujących dalsze etapy sygnalizacji BR, jej aktywność ulega zabłokowaniu po związaniu cząsteczek BR przez receptor BR11-BAK1/SERK3	[28, 34, 35, 36]
<i>BSU1 (Br11 Suppressor1)</i>	fosfataza	enzym defosforylujący czynnik BES1/BZR2, zlokalizowany w jądrze komórkowym	antagonistyczne działanie kinazy BIN2 i fosfatazy BSU1, regulujące poziom fosforylacji czynników transkrypcyjnych BES1/BZR2 i BZR1	[19, 27, 51]
<i>BES1/BZR2 (BR11-EMS-Suppressor1/Brassinazole Resistant2)</i>	czynnik transkrypcyjny	BES1/BZR2 wiąże się z 6-nukleotydowym domem promotorów, działając jako aktywator transkrypcji, oddziałuje ponadto z grupą trzech białek BIM należących do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających domenę bHLH – interakcje niezbędne do regulacji ekspresji genów	regulacja transkrypcji genów indukowanych odpowiedzią na brasinosteroidy	[20, 34, 36, 65]
<i>BZR1 (Brassinazole-Resistant1)</i>	czynnik transkrypcyjny	BZR1 wiąże się z promotorami genów odpowiedzi na BR, jako regulator transkrypcji	regulacja transkrypcji genów indukowanych odpowiedzią na brasinosteroidy	[20, 34, 36, 65]

*kinaza serynowo-treoninowa, należąca do rodziny białek zawierających domeny bogate w leucynę – LRR (*Leucine-Rich Repeat*)

Formy niosące te mutacje wykazują fenotyp charakterystyczny dla innych mutantów brasinosteroidowych i, podobnie jak w tkankach mutantów *bril*, następuje w nich znaczna akumulacja brasinosteroidów. W genach *BES1/BZR2* i *BZR1*, powstałych przez duplikację, zidentyfikowane mutacje dotyczą zamiany tego samego aminokwasu – Pro-233 w przypadku mutantu *bes1/bzr2* i Pro-234 u mutantu *bzr1*, prowadząc do zamiany proliny na leucynę. Mutacje te mają charakter dominujący, powodują zwiększoną reakcję roślin na BR i dotyczą sekwencji kodującej domenę PEST (Pro-Glu-Ser-Thr), kluczową w procesie degradacji proteolitycznej. Obie mutacje uniemożliwiają interakcję tych czynników transkrypcyjnych z elementami mechanizmu degradacji białek, a tym samym redukują negatywny wpływ kinazy BIN2 na ich akumulację, przez co wywołują nadwrażliwość na BR [2].

Funkcję białka TTL jako negatywnego regulatora procesu sygnalizacji BR określono na podstawie fenotypu roślin *Arabidopsis*, u których doszło do insercji elementu T-DNA w obrębie genu kodującego ten peptyd. Rośliny takie cechują się zwiększonym wzrostem. Jednocześnie formy wykazujące nadekspresję tego genu charakteryzują się karłowatością [43]. O funkcji genu *BKII* wnioskowano na podstawie podobieństwa sekwencji kodowanego peptydu do sekwencji białka ulegającego fosforylacji pod wpływem ko-receptora BRI1. Nadekspresja tego genu wywołuje karłowy fenotyp spowodowany zredukowaną wrażliwością na BR, podczas gdy wyciszenie jego ekspresji przez mechanizm RNAi skutkuje zwiększonym wzrostem hypokotyla, co wskazuje na rolę BKII, jako negatywnego regulatora szlaku transdukcji sygnału BR [35].

REGULOWANIE PROCESÓW FIZJOLOGICZNYCH PRZEZ BRASINOSTEROIDY

Wpływ brasinosteroidów na kiełkowanie nasion

Brasinosteroidy indukują kiełkowanie oraz są zdolne do przełamania fizjologicznej blokady zdolności do kiełkowania, jaką wykazują mutanty giberelinowe, charakteryzujące się defektem w procesie biosyntezy i sygnalizacji tych hormonów. Mutant *A. thaliana* charakteryzujący się defektem w procesie syntezy brasinosteroidów – *det2* oraz mutant charakteryzujący się zaburzeniami w procesie transdukcji sygnału – *bril* wykazują zwiększoną wrażliwość na hamujące kiełkowanie działanie kwasu abscysynowego niż forma dzika. Blokada kiełkowania u tych mutantów wskazuje, że prawidłowe funkcjonowanie transdukcji sygnału BR jest konieczne, aby przełamać indukowany kwasem abscysynowym stan spoczynku nasion i stymulować proces kiełkowania. Mutanty *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* i *Vicia faba* charakteryzujące się zaburzeniami w procesie biosyntezy BR cechują się anormalnym kształtem nasion, co wskazuje, że BR są niezbędne w procesie ich wytwarzania [16, 46, 47]. Podczas embriogenezy *P. sativum* stężenie aktywnych biologicznie BR: brasinolidu i kastasteronu osiąga maksymalny poziom, podobnie jak poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za ich syntezę, co potwierdza zaangażowanie brasinosteroidów w proces kiełkowania [47].

Wpływ brasinosteroidów na podziały komórkowe

Brasinosteroidy wykazują stymulujący efekt na proliferację komórek, a defekty w procesie ich metabolizmu prowadzą do obniżenia tempa podziałów komórkowych. Wykazano, że po traktowaniu tym hormonem zawieszin komórek mutantu *det2 A. thaliana*, wykazującego defekt w procesie syntezy BR, następowała indukcja czynnika białkowego CycD3, który jest mediatorem cyklu komórkowego, co może tłumaczyć stymulujący wpływ BR na proces cytokinezy [14]. Wykorzystując techniki mikromacierzy DNA stwierdzono, że ekspresja genów cyklin *CycD3* oraz innych genów powiązanych z procesem cytokinezy jest indukowana przez BR [38, 59]. U *Nicotiana tabacum* indeks mitotyczny wzrasta znacząco po podaniu BR, w sposób liniowo zależny od stężenia hormonu. Wykazano ponadto, że transkrypty genów kodujących histony H2A, H3 i H4, które są dobrymi wskaźnikami intensywności przebiegu podziałów komórkowych, również ulegały znaczącej akumulacji po traktowaniu BR i to w sposób liniowy zależny od stężenia hormonów [40].

Wpływ brasinosteroidów na wydłużanie komórek

Brasinosteroidy biorą udział w ukierunkowanym wydłużaniu komórek. Analizy mikroskopowe przekrojów podłużnych liści i hypokotyli mutantów *A. thaliana* charakteryzujących się defektami w metabolizmie BR wykazały, że zredukowany wzrost siewek spowodowany jest w głównej mierze redukcją wzrostu wydłużeniowego komórek, co wskazuje na kluczową rolę brasinosteroidów w tym procesie. Promujący wpływ BR na wydłużanie się komórek i wzrost organów, jest ilustrowany zmianami w poziomie ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w modyfikacje ściany komórkowej, takie jak: endotransglukozylazy ksyloglukanu (XET) i ekspansyny [38]. Wykazano również, że eksport protonów do apoplastu jest stymulowany przez BR, a inhibitor transbłonowej ATPazy hamuje indukowane przez te hormony wydłużanie komórek. Brasinosteroidy stymulują wydłużanie komórek przez zmiany ekspresji genów oraz przez efekty nie-genomowe, obejmujące regulację działania białek cytoplazmatycznych. BR regulują również aktywność enzymów modyfikujących pektyny i białka strukturalne ścian komórkowych: proteoglikany i ekstensyny. Traktowanie siewek mutantów *A. thaliana*, wykazujących zaburzenia w syntezie brasinosteroidów i anormalną orientację mikrotubul korowych, roztworem tych hormonów powoduje reorganizację mikrotubul i ich odpowiednią orientację. Ten wynik potwierdza udział BR w procesie rearanżacji mikrotubul i elongacji komórek. U ryżu zawartość tubulin uległa wydatnemu wzrostowi po traktowaniu korzeni siewek BR. Jednocześnie wykazano, że brasinosteroidy stymulują ekspresję szeregu genów kodujących podjednostki syntetazy celulozowej [38]. Stwierdzono ponadto pozytywny wpływ brasinosteroidów na ekspresję genów kodujących podjednostki V-ATPazy (ang. *Vacuolar-ATPases*), zlokalizowanych w błonie wakuoli, które odpowiedzialne są za zakwaszanie środowiska tego kompartmentu i tworzenie gradientu elektrochemicznego przez transport protonów, który przebiega dzięki hydrolizie ATP. Istotność tego mechanizmu w podtrzymywaniu wzrostu roślin obrazuje przykład mutantu *det3* (ang.

*de-etiolation*3) *A. thaliana*, który charakteryzuje się mutacją w genie kodującym podjednostkę V-ATPazy; mutant ten wykazuje karłowaty fenotyp [22].

Regulacja różnicowania elementów trachealnych przez brasinosteroidy

Jedną z lepiej udokumentowanych funkcji brasinosteroidów jest stymulacja ksylogenezy. Odnotowano znaczący wzrost stężenia BR poprzedzający różnicowanie ksylemu, co potwierdza rolę tych regulatorów wzrostu w inicjacji ostatniego etapu tego procesu. Proces ksylogenezy podzielony jest na trzy fazy. Faza pierwsza odpowiada odróżnicowaniu komórek miękiszu. W drugiej fazie odróżnicowane komórki przekształcają się w komórki prekursorowe elementów trachealnych. W trzeciej fazie następuje formowanie wtórnej ściany komórkowej i apoptoza. Preparat 'Uniconazole', będący inhibitorem syntezy BR hamuje ekspresję genów biorących udział w trzecim etapie tego procesu, a efekt ten był znoszony po zastosowaniu brasinosteroidów. Dane te wskazują, że endogenne BR mogą inicjować ostatnią fazę ksylogenezy. Zwiększenie stężenia BR zachodzi w drugiej fazie ksylogenezy i prowadzi do stymulacji ekspresji genów biorących udział w trzeciej fazie tego procesu [59]. Brasinosteroidy wpływają nie tylko na prawidłowe różnicowanie ksylemu, ale również na odpowiednie rozmieszczenie pasm elementów trachealnych w obrębie organu. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano trzy geny, które kodują polipeptydy o dużym poziomie podobieństwa do receptora BRI1. Dwa z polipeptydów kodowanych przez te geny – BRL1 (ang. *BRI1-like1*) i BRL3 (*BRI1-like3*) wiążą cząsteczki BR z dużym powinowactwem. Geny te ulegają specyficznej ekspresji w tkance waskularnej we wszystkich analizowanych organach. Mutacje powodujące utratę funkcji przez polipeptydy BRL1 i BRL3 powodują zaburzenia w formowaniu wiązek przewodzących zwiększając udział floemu, kosztem obecności ksylemu [7].

Wpływ brasinosteroidów na rozwój generatywny

Pylniki roślin zawierają sporangia, w których we wczesnym stadium rozwoju różnicują dwie linie komórkowe: pierwsza z nich daje początek ziarnom pyłku, druga natomiast daje początek czterem warstwom ściany pylników. Prawidłowy rozwój komórek ściany pylników jest konieczny dla odpowiedniego wykształcenia ziaren pyłku [39]. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano grupę genów *SERK* (ang. *Somatic Embryogenesis Receptor Kinases*), kodujących transbłonowe kinazy o zbliżonej budowie, z których jedna o potwierdzonej roli – BAK1/SERK3 jest elementem receptora brasinosteroidów. Produkt białkowy genu *SERK1* również bierze udział w wiązaniu cząsteczek BR, wchodząc w interakcje z receptorem BRI1 i wykazuje wspólny zakres działania z BAK1/SERK3 [27, 28]. Analizy genetyczne wykazały, że geny *SERK1* i *SERK2* kodują enzymy pełniące uzupełniające się funkcje, dlatego wyłącznie jednoczesne wywołanie mutacji utraty funkcji tych kinaz spowodowało zaburzenia w rozwoju pylników. Stwierdzono, że fenotyp podwójnych mutantów *serk1serk2* powodowany jest zaburzeniami w rozwoju warstwy tapetum [1]. Defekt w rozwoju tej warstwy pociąga za sobą brak rozwoju pyłku, a co za tym idzie, rozwój sterylnych luszczyn [10]. Stwierdzono również stymulujący wpływ

brasinosteroidów na kwitnienie *A. thaliana* przez redukcję poziomu transkrypcji genu *FLC* (ang. *Flowering Locus C*), będącego represorem tego procesu [9]. Podobne interakcje obserwowano również u *O. sativa* [33]. Wykazano ponadto pozytywny wpływ tych hormonów na rozwój owoców *Lycopersicon esculentum* i *Cucumis sativus* [14].

Regulacja procesu fotosyntezy przez brasinosteroidy

Mutanty *A. thaliana*, charakteryzujące się zaburzeniami w biosyntezie BR cechują się zakłóconym metabolizmem węglowodanów i zredukowaną produkcją biomasy. Przedtraktowanie brasinosteroidami zmniejsza skutki stresu przechłodzenia i fotoinhibicję u siewek *C. sativus*. BR znacząco stymulują przepustowość aparatów szparkowych i transpirację. Zwiększają również aktywność enzymu Rubisco, tempo fotosyntezy oraz akumulację węglowodanów. Źródłem tych efektów może być dodatni wpływ BR na zwiększenie powierzchni liści o ok. 50%. Generalnie, BR zwiększają tempo fotosyntezy, szczególnie przez podniesienie zdolności asymilacji CO₂ w cyklu Calvina-Bensona, co przypisuje się wyższej aktywności enzymu Rubisco [66].

Procesy komórkowe regulowane przez interakcje między brasinosteroidami i auksynami

Reakcje fizjologiczne, jakie wywołują brasinosteroidy, są w wielu przypadkach zbieżne z wpływami fizjologicznymi, wywieranymi przez auksyny. Wykazano, że szlaki transdukcji sygnału dla obu regulatorów wzrostu łączą się, a hormony wywołują efekt w sposób synergistyczny. Ten typ regulacji przejawia się szczególnie w ich wpływie na wydłużanie pędów. Zbieżność obu szlaków zachodzi na poziomie czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję wspólnych genów. Interakcje brasinosteroidów i auksyn mogą przebiegać różnie w zależności od analizowanej tkanki lub gatunku rośliny. Brasinosteroidy regulują ekspresję niektórych genów odpowiedzialnych za syntezę auksyn, np. *NIT3* (*NITRILASE3*), jak również stymulują ekspresję genów *PIN* (*PIN-FORMED*) kodujących białka odpowiedzialne za polarny transport auksyn [44]. Prawidłowa dystrybucja białek PIN wymaga odpowiedniego funkcjonowania enzymu katalizującego syntezę steroli, będących prekursorami BR, co może potwierdzać rolę tych hormonów w transporcie auksyn [64]. Prawidłowe funkcjonowanie i rozmieszczenie białek PIN ma szczególne znaczenie dla reakcji grawitropicznej roślin oraz inicjacji i rozwoju korzeni bocznych [34]. Współzależność szlaków metabolicznych obu hormonów obrazuje również fakt, że mutant *bril A. thaliana*, niewrażliwy na działanie brasinosteroidów, wykazuje obniżoną wrażliwość na auksyny, co wskazuje, że dla sygnalizacji auksyn niezbędne jest prawidłowe funkcjonowanie szlaku transdukcji sygnału BR [5].

Wpływ brasinosteroidów na reakcje metaboliczne roślin na stres środowiskowy

Intensywny rozwój badań nad brasinosteroidami przez ostatnie trzydzieści lat wiąże się z tym, że są to regulatory wzrostu obecne we wszystkich taksonach

roślinnych, a ich działanie może prowadzić do zwiększania plonów roślin uprawnych [52]. Jest to możliwe dzięki oddziaływaniu BR na metabolizm roślin i drogą zwiększania ich tolerancji na szeroki zakres stresów środowiskowych, takich jak: niska i wysoka temperatura, wysokie zasolenie gleby czy atak patogenów [25]. U *Cucumis sativus* traktowanie nasion BR przed wysiewem powodowało zwiększone w stosunku do grupy kontrolnej, nietraktowanej hormonami, tempo wzrostu w warunkach obniżonej temperatury. Zawartość chlorofilu utrzymywana była w warunkach stresu na poziomie kontroli, a po zakończeniu jego działania wzrastała. Zawijanie owoców u *L. esculentum* w warunkach chłodu ulegało stymulacji po traktowaniu roślin brasinosteroidami. Natomiast w warunkach podwyższonej temperatury odnotowano stymulujący wpływ BR na kiełkowanie ziaren pyłku, zaś liczba zawiązywanych owoców w tych warunkach również ulegała zwiększeniu [55]. Stymulujący wpływ tych hormonów na tolerancję roślin na stres termiczny odnotowano także u *Solanum tuberosum* [11]. Wykazano, że poziom syntezy białek u roślin rosnących w temperaturze 43°C przebiegał na poziomie podobnym do obserwowanego w optymalnych warunkach dzięki tworzeniu kompleksów przez białka szoku cieplnego HSP (ang. *Heat Shock Proteins*). Średnia liczba HSP tworzących kompleks oraz średnia liczba tych kompleksów jest znacząco wyższa w komórkach roślin, które traktowano BR przed wystąpieniem czynnika stresowego [55]. W przypadku nasion *B. napus* i ziarniaków *O. sativa* odnotowano znaczącą redukcję negatywnego efektu zasolenia gleby na kiełkowanie, jeśli jednocześnie poddawano je traktowaniu BR [25].

Stwierdzono kompensacyjny wpływ brasinosteroidów na redukcję biomasy roślin rosnących w warunkach suszy. Wzrost produkcji biomasy związany jest z podwyższonym poziomem inwertazy w liściach, która jest odpowiedzialna za dostarczanie asymilatów do innych organów rośliny. Podniesienie tolerancji roślin na suszę odbywa się przez wpływ BR na zwiększanie ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny CBF/DREB (ang. *C-repeat Binding Factor/Dehydration Response Element B*). Czynniki te wiążą się z elementami odpowiedzi na suszę – DRE (ang. *Drought Response Elements*), zlokalizowanymi w promotorach genów, które warunkują reakcję na ten czynnik stresowy, co powoduje regulację ekspresji tych genów [25].

Brasinosteroidy są również skutecznymi fungicydami. Rośliny *S. tuberosum* traktowane BR wykazywały obniżoną częstotliwość infekcji *Phytophthora infestans*. Ten wzrost odporności roślin związany jest z podwyższonym, pod wpływem BR, poziomem syntezy kwasu abscysynowego i etylenu oraz ze zwiększoną obecnością substancji fenolowych i terpenowych. Podobne zjawisko obserwowano u *Hordeum vulgare* i *Cucumis sativus*, a wiązało się ono z podwyższoną aktywnością peroksydaz i polifenolooksydaz, które są zaangażowane w metabolizm polifenoli. Postuluje się, że ma to związek z tym, że ko-receptor brasinosteroidów polipeptyd BAK1/SERK3, należy do rodziny kinaz, która obejmuje również grupę polipeptydów związanych z odpowiedzią roślin na atak patogenów [19, 21]. Potwierdzeniem interakcji na poziomie molekularnym między szlakami transdukcji sygnału BR a szlakami odpowiedzi na czynniki stresu środowiskowego jest intrygujące odkrycie, że receptor BRI *L. esculentum* pełni równocześnie funkcję receptora dla systeminy,

będącej 18-aminokwasowym peptydem, regulującym odpowiedź na atak patogenów i zranienie, co wskazuje, że receptor ten jest miejscem konwergencji szlaku sygnalizacji BR oraz odpowiedzi na atak patogenu [62].

Interakcje między metabolizmem brasinosteroidów a procesami foto- i skotomorfogenezy roślin

Podczas wzrostu w ciemności rośliny dwuliścienne wykazują etiolowany fenotyp, obejmujący wydłużony hypokotyl, silne zakrzywienie haka apikalnego, osłaniającego zwinięte liścienie, zahamowanie rozwoju chloroplastów, przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji genów indukowanych światłem. Natomiast podczas wzrostu na świetle, wydłużanie hypokotyła jest zredukowane, następuje rozwijanie liścieni oraz rozwój liści, co pociąga za sobą rozwój chloroplastów, a geny indukowane światłem ulegają raptownej aktywacji transkrypcyjnej. Mutanty charakteryzujące się defektami w metabolizmie brasinosteroidów cechują się zaburzeniami w skotomorfogenezie, wykazując cechy roślin rosnących na świetle. Wykazano zbieżność szlaku odpowiedzi komórkowej na czynnik świetlny ze szlakiem biosyntezy brasinosteroidów [15, 26]. Peptyd Pra2 o niskiej masie cząsteczkowej, należący do rodziny białek wiążących GTP ulega ekspresji wyłącznie w strefach intensywnego wzrostu etiolowanych epikotyli *P. sativum*, a jego ekspresja jest hamowana przez światło. Strefy wysokiej ekspresji genu *Pra2* wykazują jednocześnie najwyższy poziom stymulacji w odpowiedzi na brasinosteroidy. Hamowanie ekspresji tego genu zachodzi z udziałem fitochromów A i B oraz receptorów światła niebieskiego, a poziom jego ekspresji jest skorelowany z tempem elongacji epikotyła. Zidentyfikowano gen *DDWF1* (ang. *Dark-induced DWF-like 1*), kodujący polipeptyd zawierający motywy charakterystyczne dla białek cytochromowych P450, zaangażowanych w syntezę BR. Wykazano, że ekspresja tego genu, podobnie jak *Pra2*, jest indukowana podczas wzrostu w ciemności, ulega obniżeniu pod wpływem światła i jest szczególnie wysoka w etiolowanych epikotylach *P. sativum*. W toku analiz prowadzonych *in vitro* stwierdzono, że peptydy Pra2 i DDWF1 wchodzi w interakcje zależne od GTP, zachodzące w błonie retikulum endoplazmatycznego. Produkt białkowy genu *DDWF1* pełni funkcję hydroksylazy C-2 steroidu, odpowiedzialnej za konwersję tyfasterolu do kastasteronu i 6-deoksotyfasterolu do 6-deoksokastasteronu, odpowiednio w szlaku wczesnej i późnej oksydacji C-6, zachodzącej podczas syntezy brasinosteroidów u *P. sativum*. Niewyjaśnionym pozostaje, czy peptyd Pra2 aktywuje enzym DDWF1 bezpośrednio, czy też Pra2 jest czynnikiem powodującym formowanie kompleksu enzymatycznego w błonie retikulum przez transport pęcherzykowy dodatkowych kofaktorów. Interakcje między peptydami Pra2 i DDWF1 mogą stanowić mechanizm molekularnej przejścia między procesami etiolacji i de-etiolacji. Wysoki poziom tych białek podczas wzrostu w ciemności prowadzi do podniesienia poziomu syntezy BR, co w konsekwencji skutkuje zwiększonym wydłużaniem komórek hypokotyła. Po ekspozycji na światło, szlak transdukcji z udziałem fotoreceptorów prowadzi do obniżenia ekspresji genów *Pra2* i *DDWF1*, co pociąga za sobą redukcję syntezy BR i tempa wzrostu hypokotyła [26].

PODSUMOWANIE

Poznanie szlaków metabolizmu regulatorów wzrostu, wpływających na wzrost i różnicowanie komórek oraz modulujących architekturę roślin jest istotne z dwóch powodów. Po pierwsze, ze względu na znaczenie tych danych dla badań podstawowych, a po drugie biorąc pod uwagę interakcje między metabolizmem hormonów a procesami plonowania i tolerancji roślin na różnorodne stresy środowiskowe. Wiedza w tym zakresie stanowi punkt wyjścia do modyfikacji genetycznej roślin uprawnych, m.in. w wyniku mutagenazy zmierzającej do uzyskania form o ulepszonych cechach użytkowych.

Brasinosteroidy są hormonami o charakterze polihydroksylowanych pochodnych steroli, wykazującymi wysoką aktywność w stymulowaniu wzrostu i regulowaniu szeregu aspektów morfogenezy roślin. Metabolizm brasinosteroidów jest utrzymywany w stanie dynamicznej homeostazy dzięki funkcjonowaniu negatywnego sprzężenia zwrotnego między procesami syntezy i sygnalizacji. Reakcje fizjologiczne, jakie wywołują brasinosteroidy są w wielu przypadkach zbieżne z efektami fizjologicznymi, wywieranymi przez inne hormony, a szczególnie auksyny. Szlaki transdukcji sygnału dla obu regulatorów wzrostu łączą się, a oba hormony wywołują efekt w sposób synergistyczny. Zbieżność obu szlaków ma miejsce na poziomie czynników transkrypcyjnych, regulujących ekspresję wspólnych genów docelowych.

Zmiany na poziomie molekularnym wywołujące zaburzenia zarówno w procesach syntezy, jak i transdukcji sygnału brasinosteroidów prowadzą do modyfikacji cech związanych z morfologią i architekturą roślin. Jedną z takich cech o dużym znaczeniu ekonomicznym jest karłowatość roślin zbożowych, powodująca, że rośliny o zredukowanym wzroście charakteryzują się podwyższonym plonowaniem dzięki zmniejszonemu wyleganiu przy wysokich dawkach nawozów, jak i w niekorzystnych warunkach środowiska. Z tego też powodu identyfikacja nowych genów, jak i nowych alleli genów już zidentyfikowanych, odpowiedzialnych za metabolizm brasinosteroidów wydaje się mieć istotną wartość użytkową.

LITERATURA

- [1] ALBRECHT C, KWAAITAAL M, HECHT V, BAAIJENS E, KULIKOVA O, RUSSINOVA E, de VRIES SC. The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male gametogenesis. *Plant Cell* 2005; **17**: 3337–3349.
- [2] BAIMY, ZHANG LY, GAMPALA SS, ZHU SW, SONG WY, CHONG K, WANG ZY. Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 13839–13844.
- [3] BAJGUZ A, TRETYN A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 2003; **62**: 1027–1046.
- [4] BANCOS S, SZATMARIAM, CASTLE J, KOZMA-BOGNAR L, SHIBATA K, YOKOTA T, BISHOP GJ, NAGY F, SZEKERES M. Diurnal regulation of the brassinosteroid-biosynthetic *CPD* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; **141**: 299–309.
- [5] BAO F, SHEN J, BRADY SR, MUDAY GK, ASAMI T, YANG Z. Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2004; **134**: 1624–1631.

- [6] BISHOP GJ. Refining the plant steroid hormone biosynthesis pathway. *Trends Plant Sci* 2007; **12**: 377–380.
- [7] CAÑO-DELGADO AI, YIN Y, YU C, VAFEADOS D, MORA-GARCIA S, CHENG JC, NAM KH, LI J, CHORY J. BRL1 i BRL3 are novel brassinosteroid receptor that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* 2004; **131**: 5341–5351.
- [8] CASTLE J, SZEKERES M, JENKINS G, BISHOP GJ. Unique and overlapping expression patterns of *Arabidopsis* CYP85 genes involved in brassinosteroid C-6 oxidation. *Plant Mol Biol* 2005; **57**: 129–140.
- [9] CLOUSE SD. The molecular intersection of brassinosteroid-regulated growth and flowering in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 7345–7346.
- [10] COLCOMBET J, BOISSON-DERNIER A, ROS-PALAU R, VERA CE, SCHROEDER JI. *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* 2005; **17**: 3350–3361.
- [11] CONFRARIA A, DESIKAN R, SANTOS I, NEILL S. Brassinosteroids protect plants against heat stress. *Comp Biochem Physiol* 2007; **146**: 279.
- [12] ECKARDT NA. Brassinosteroid perception and signaling: heterodimerization and phosphorylation of receptor-like kinases BRI1 and BAK1. *Plant Cell* 2005; **17**: 1638–1640.
- [13] EHSAN H, RAY WK, PHINNEY B, WANG X, HUBER SC, CLOUSE SD. Interaction of *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF-beta receptor interacting protein. *Plant J* 2005; **43**: 251–261.
- [14] FU FQ, MAO WH, SHI K, ZHOU YH, ASAMI T, YU JQ. A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. *J Exp Bot* 2008; **59**: 2299–2308.
- [15] FUJIOKA S, YOKOTA T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Ann Rev Plant Biol* 2003; **54**: 137–164.
- [16] FUKUTAN, FUKUZONO K, KAWAIDE H, ABE H, NAKAYAMA M. Physical restriction of pods causes seed size reduction of a brassinosteroid-deficient faba bean (*Vicia faba*). *Ann Bot* 2005; **97**: 65–69.
- [17] GAMPALA SS, KIM TW, HE JX, TANG W, DENG Z, BAI MY, GUAN S, LALONDE S, SUN Y, GENDRON JM, CHEN H, SHIBAGAKI N, FERL RJ, EHRHARDT D, CHONG K, BURLINGAME AL, WANG ZY. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 2007; **13**: 177–189.
- [18] GELDNER N, HYMAN DL, WANG X, SCHUMACHER K, CHORY J. Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev* 2007; **21**: 1598–1602.
- [19] GENDRON JM, WANG ZY. Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 436–441.
- [20] HE JX, GENDRON JM, SUN Y, GAMPALA SS, GENDRON N, SUN CQ, WANG ZY. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 2005; **307**: 1634–1638.
- [21] HEESE A, HANN DR, GIMENEZ-IBANEZ S, JONES AME, HE K, LI J, SCHROEDER JI, PECK SC, RATHJEN JP. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 12217–12222.
- [22] HUANG B, CHU CH, CHEN SL, JUAN HF, CHEN YM. A proteomics study of the mung bean epicotyl regulated by brassinosteroids under conditions of chilling stress. *Cell Mol Biol Lett* 2006; **11**: 264–278.
- [23] JAGER CE, SYMONS GM, NOMURA T, YAMADA Y, SMITH JJ, YAMAGUCHI S, KAMIYA Y, WELLER JL, YOKOTA T, REID JB. Characterization of two brassinosteroid C-6 oxidase genes in pea. *Plant Physiol* 2007; **143**: 1894–1904.
- [24] JORGENSEN K, RASMUSSEN AV, MORANT M, NIELSEN AH, BJARNHOLT N, ZAGROBELNY M, BAK S, MOLLER BL. Metabolite formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 280–291.
- [25] KAGALE S, DIVI UK, KROCHKO JE, KELLER WA, KRISHNA P. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 2007; **225**: 353–364.
- [26] KANG JG, YUN J, KIM DH, CHUNG KS, FUJIOKA S, KIM JI, DAE HW, YOSHIDA S, TAKATSUTO S, SONG PS, PARK CM. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell* 2001; **105**: 625–636.
- [27] KARLOVAR, de VRIES SC. Advances in understanding brassinosteroid signaling. *Science* 2006; **354**: 36–38.
- [28] KARLOVA R, BOEREN S, RUSSINOVA E, AKER J, VERVOORT J, de VRIES SC. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell* 2006; **18**: 626–638.

- [29] KIM GT, FUJIOKA S, KOZUKA T, TAX FE, TAKATSUTO S, YOSHIDA S, TSUKAYA H. CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2005; **41**: 710–721.
- [30] KIM TW, HWANG JY, KIM YS, JOO SH, CHANG SC, LEE JS, TAKATSUTO S, KIM SK. *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 2005; **17**: 2397–2412.
- [31] KINOSHITA T, CAÑO-DELGADO AI, SETO H, HIRANUMA S, FUJIOKA S, YOSHIDA S, CHORY J. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 2005; **433**: 167–171.
- [32] KWON M, FUJIOKA S, JEON JH, KIM HB, TAKATSUTO S, OSHIDA S, AN CS, CHOE S. A double mutant for the *CYP85A1* and *CYP85A2* genes of *Arabidopsis* exhibits a brassinosteroid dwarf phenotype. *J Plant Biol* 2005; **48**: 237–244.
- [33] LEE S, CHOI SC, AN G. Rice SVP-group MADS-box proteins, OsMADS22 and OsMADS55, are negative regulators of brassinosteroid responses. *Plant J* 2008; **54**: 93–105.
- [34] LI J. Brassinosteroid signaling: from receptor kinases to transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 526–531.
- [35] LI J, JIN H. Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant Sci* 2006; **12**: 37–41.
- [36] LI L, DENG XW. It runs in the family: regulation of brassinosteroid signaling by the BZR1-BES1 class of transcription factors. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 266–268.
- [37] LINDSEY K, PULLEN ML, TOPPING JF. Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signaling. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 521–525.
- [38] LISSO J, STEINHAUSER D, ALTMANN T, KOPKA J, MÜSSIG C. Identification of brassinosteroid-related genes by means of transcript co-response analyses. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 2685–2696.
- [39] MA H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgameto-genesis in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* 2005; **56**: 393–434.
- [40] MIYAZAWA Y, NAKAJIMA N, ABE T, SAKAI A, FUJIOKA S, KAWANO S, KUROIWA T, YOSHIDA S. Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression and organellar DNA contents. *J Exp Bot* 2003; **54**: 2669–2678.
- [41] MONTOKA T, NOMURA T, YOKOTA T, FARRAR K, HARRISON K, JONES JGD, KANETA T, KAMIYA Y, SZEKERES M, BISHOP GJ. Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *Plant J* 2005; **42**: 262–269.
- [42] NAKAMURA M, SATOH T, TANAKA SI, MOCHIZUKI N, YOKOTA T, NAGATANI A. Activation of the cytochrome P450 gene, *CYP72C1*, reduces the levels of active brassinosteroids *in vivo*. *J Exp Bot* 2005; **56**: 833–840.
- [43] NAM KH, LI J. The *Arabidopsis* transthyretin-like protein is a potential substrate of BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell* 2004; **16**: 2406–2417.
- [44] NEMHAUSER JL, MOCKLER TC, CHORY J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLOS Biol* 2004; **2**: 1459–1471.
- [45] NOGUCHI T, FUJIOKA S, CHOE S, TAKATSUTO S, TAX FE, YOSHIDA S, FELDMANN KA. Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2000; **124**: 201–209.
- [46] NOMURA T, JAGER CE, KITASAKA Y, TAKEUCHI K, FUKAMI M, YONEYAMA K, MATSUSHITA Y, NYUNOYA H, TAKATSUTO S, FUJIOKA S, SMITH JJ, KERCKHOFFS LHJ, REID JB, YOKOTA T. Brassinosteroid deficiency due to truncated steroid 5 α -reductase causes dwarfism in the *lk* mutant of pea. *Plant Physiol* 2004; **135**: 2220–2229.
- [47] NOMURA T, UENO M, YAMADA Y, TAKATSUTO S, TAKEUCHI Y, YOKOTA T. Roles of brassinosteroids and related mRNAs in pea seed growth and germination. *Plant Physiol* 2007; **143**: 1680–1688.
- [48] NOMURA T, KUSHIRO T, YOKOTA T, KAMIYA Y, BISHOP GJ, YAMAGUCHI S. The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P450s, *CYP85A3* in tomato and *CYP85A2* in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2005; **280**: 17873–17879.
- [49] OHNISHI T, SZATMARIAM, WATANABE B, FUJITA S, BANCOS S, KONCZ C, LAFOS M, SHIBATA K, YOKOTA T, SAKATA K, SZEKERES M, MIZUTANI M. C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 2006; **18**: 3275–3288.
- [50] POPPENBERGER B, FUJIOKA S, SOENO K, GEORGE GL, VAISTIJ FE, HIRANUMA S, SETO H, TAKATSUTO S, ADAM G, YOSHIDA S, BOWLES D. The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 15253–15258.

- [51] RYU H, KIM K, CHO H, PARK J, CHOE S, HWANG I. Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant Cell* 2007; **19**: 2749–2762.
- [52] SAKAMOTO T, MATSUOKA M. Characterization of *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM* homologs in rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Growth Reg* 2006; **25**: 245–251.
- [53] SCHALLER H. The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res* 2003; **42**: 163–175.
- [54] SHIMADA Y, FUJIOKA S, MIYAUCHI N, KUSHIRO M, TAKATSUTO S, NOMURA T, YOKOTA T, KAMIYA Y, BISHOP GJ, YOSHIDA S. Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 2001; **126**: 770–779.
- [55] SINGH I, SHONO M. Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Reg* 2005; **47**: 111–119.
- [56] SYMONS GM, ROSS JJ, JAGER CE, REID JB. Brassinosteroid transport. *J Exp Bot* 2007; **58**: 1–8.
- [57] TANABE S, ASHIKARI M, FUJIOKA S, TAKATSUTO S, YOSHIDA S, YANO M, YOSHIMURA A, KITANO H, MATSUOKA M, FUJISAWA Y, KATO H, IWASAKI Y. A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell* 2005; **17**: 776–790.
- [58] VERT G, CHORY J. Downstream nuclear events in brassinosteroid signaling. *Nature* 2006; **441**: 96–100.
- [59] VERT G, NEMHAUSER JL, GELDNER N, HONG FX, CHORY J. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2005; **21**: 177–201.
- [60] WANG X, CHORY J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* 2006; **313**: 1118–1122.
- [61] WANG X, GOSHE MB, SODERBLUM EJ, PHINNEY BS, KUCHAR JA, LI J, ASAMI T, YOSHIDA S, HUBER SC, CLOUSE SD. Identification and functional analysis of *in vivo* phosphorylation sites of the *Arabidopsis* *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1* receptor kinase. *Plant Cell* 2005; **17**: 1685–1703.
- [62] WANG ZY, HE JX. Brassinosteroid signal transduction - choices of signals and receptors. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 91–96.
- [63] WHIPPO CW, HANGARTER RP. A brassinosteroid-hypersensitive mutant of BAK1 indicates that a convergence of photomorphogenic and hormonal signaling modulates phototropism. *Plant Physiol* 2005; **139**: 448–457.
- [64] WILLEMSSEN V, FRIML J, GREBE M, Van den TOORN A, PALME K, SCHERES B. Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell* 2003; **15**: 612–625.
- [65] YIN Y, VAFEADOS D, TAO Y, YOSHIDA S, ASAMI T, CHORY J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell* 2005; **120**: 249–259.
- [66] YU JQ, HUANG LF, HU WH, ZHOU YH, MAO WH, YE SF, NOGUES S. A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*. *J Exp Bot* 2004; **55**: 1135–1143.
- [67] ZHOU A, LI J. *Arabidopsis* BRS1 is a secreted and active serine carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2005; **280**: 35554–35561.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 21.09.2009 r.

Przyjęto: 02.12. 2009 r.

Dr Damian Gruszka

Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski

40-032 Katowice, ul. Jagiellońska 28

e-mail: damian.gruszka@us.edu.pl