

LIGAZY UBIKWITYNOWO-BIAŁKOWE W SZLAKACH SYGNAŁOWYCH AUKSYN, JASMONIANÓW I GIBERELIN*

UBIQUITIN LIGASES INVOLVED IN AUXIN, JASMONATE AND GIBBERELLIN SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS

Katarzyna MARCINIAK, Tomasz TUROWSKI, Emilia WILMOWICZ,
Kamil FRANKOWSKI, Jacek KĘSY, Jan KOPCEWICZ

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin

Streszczenie: Realizacja wewnętrznego programu genetycznego, która prowadzi do powstania organizmu rośliny, wymaga skorelowania przebiegu endogennych procesów wzrostu i rozwoju z różnymi bodźcami środowiskowymi. Zasadniczą rolę w tym procesie odgrywają regulatory wzrostu i rozwoju nazywane hormonami roślinnymi lub fitohormonami. Zgodnie z definicją, hormony roślinne są cząsteczkami sygnałowymi wytwarzanymi przez roślinę w bardzo niskich stężeniach. Syntetyzowane w jednych częściach organizmu, przemieszczają się do innych części przez system wiązek przewodzących lub, jak ma to miejsce przynajmniej w przypadku auksyn, dzięki skomplikowanemu systemowi bezpośredniego transportu z komórki do komórki. Fitohormony działają na specyficzne tkanki docelowe, chociaż inaczej niż u zwierząt odpowiedzi są często efektem działania dwóch lub większej liczby hormonów. Kluczowym w poznaniu hormonalnej kontroli wzrostu i rozwoju roślin jest zrozumienie mechanizmów ich percepcji i szlaków przekazywania sygnału. Pomimo wielu lat badań, dopiero niedawno udało się zidentyfikować receptory niektórych z fitohormonów, co niewątpliwie spowodowało znaczny postęp w rozumieniu przez fizjologów funkcjonowania tych substancji u roślin. Badania ujawniły również zupełnie nowy mechanizm sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, w którym rolę receptorów pełnią ligazy ubikwitynowo-białkowe. Białka te funkcjonują jako składnik systemu ubikwitynowo-proteasomalnego (UPS), który poprzez selektywną hydrolizę białek regulatorowych uczestniczy w kontroli przekazywania sygnałów w komórkach eukariontów. Ligazy ubikwitynowo-białkowe E3 specyficznie wiążą białkowe substraty i pośredniczą w ich ubikwitylacji, a następnie degradacji w proteasomie 26S. W genomie *Arabidopsis thaliana* występuje około 1400 genów kodujących poszczególne elementy UPS, z czego około 90% genów koduje ligazy E3, obejmujące dużą rodzinę białek lub kompleksów białkowych zawierających w swej budowie charakterystyczne domeny RING-finger, U-box lub HECT. Analiza sekwencji nukleotydowych ujawniła, że składniki UPS wykazują dużą zachowawczość w obrębie różnych gatunków królestwa roślin. Spośród wszystkich ligaz ubikwitynowo-białkowych występujących u roślin najlepiej zba-

*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu grantu MNiSW nr N N303 333436 oraz stypendium marszałka województwa kujawsko-pomorskiego "Stypendia dla doktorantów 2008/2009 - ZPORR" nr SPS.IV-3040-UE/619/2009

dane zostały te należące do klasy SCF, której skrót pochodzi od nazw trzech podjednostek: SKP1, kuliny (ang. *cullin*) i białka z kasetą F – FBP (ang. *F-box protein*). Białka z kasetą F stanowią największą rodzinę białek *A. thaliana* i kodowane są przez 2,7% genomu tej rośliny. Odkrycia ostatnich lat wykazały, że roślinne białka AtTIR1 (ang. *A. thaliana Transport Inhibitor Response 1*), OsGID1 (ang. *O. sativa Gibberellin Insensitive Dwarf 1*) oraz AtCOI1 (ang. *A. thaliana CORonatine Insensitive 1*), pełniące podstawową rolę w mechanizmach działania odpowiednio auksyn, giberelin i kwasu jasmonowego, są białkami FBP (AtTIR1 i AtCOI1) lub blisko z nimi współdziałają (OsGID1), natomiast zadaniem całych kompleksów SCF jest pośredniczenie w degradacji represorów odpowiedzi na hormony. W przypadku auksyn, reakcje na hormon są zablokowane przez białka AUX/IAA tworzące heterodimery z białkami ARF, które są z kolei aktywatorami transkrypcji genów odpowiedzi na auksyny. Przy wysokim stężeniu auksyn, hormon wiąże się z białkiem TIR1, co umożliwia również związanie AUX/IAA z kompleksem SCF, a następnie ubikwitylację i degradację represorów w proteasomie 26S. W konsekwencji tego dochodzi do odblokowania czynników transkrypcyjnych ARF. W przypadku jasmonianów, odpowiedzi na hormon blokowane są przez białka JAZ, które wiążą się z czynnikami transkrypcyjnymi MYC2. Pod wpływem JA następuje aktywacja kompleksu ligazy ubikwityny SCF^{COI1}, która znakuje białka JAZ i skierowuje je do degradacji, przez co odblokowuje aktywatory transkrypcji MYC2. Oprócz auksyn i jasmonianów również gibereliny są hormonami, w percepcję których zaangażowany jest kompleks ligazy ubikwityny typu SCF. Działanie GA blokowane jest przez białka DELLA, które wiążą białka GAMyb, PIF3, PIF4 oraz prawdopodobnie inne czynniki transkrypcyjne kontrolujące ekspresję genów odpowiedzi na gibereliny. Białka DELLA są również aktywatorami ekspresji niektórych genów regulowanych przez gibereliny. Wśród nich są geny kodujące enzymy biosyntezy giberelin i niektóre składniki ich szlaków sygnałowych, włącznie z receptorem GID1. Pod wpływem giberelin receptor GID1 oddziałuje z DELLA, a następnie wytworzony kompleks GA-GID1-DELLA rozpoznawany jest przez ligazę ubikwitynowo-białkową SCF^{GID2/SLY1}, która znakuje białka represorowe do degradacji. W tym przypadku hormon nie jest wiązany bezpośrednio przez białko FBP, ale uczestniczy w tym dodatkowa cząsteczka podjednostki receptorowej kompleksu SCF. Z uwagi na ważność kompleksu ligazy ubikwitynowo-białkowej w przekazywaniu sygnału, oczywiste jest, że proces jej tworzenia i funkcjonowania jest ściśle regulowany. Uczestniczą w tym trzy białka lub kompleksy białkowe, tj. białko RUB1 (ang. *Related to Ubiquitin 1*) i CAND1 (ang. *Cullin Associated Neddylation Dissociated 1*) oraz sygnałosom COP9 (CSN). Przedstawiony w pracy mechanizm przekazywania sygnałów hormonalnych został jak dotąd opisany jedynie u roślin, jednak ze względu na powszechne występowanie ligaz ubikwitynowo-białkowych w komórkach eukariotycznych, nie jest wykluczone, że ten nowy mechanizm może występować także u innych organizmów.

Słowa kluczowe: hormony roślinne, ligazy ubikwitynowe, percepcja i transdukcja sygnału.

Summary: Plant growth and development, which determinate plant form, require the integration of a variety of environmental signals with the intrinsic genetic program. Fundamental to this process are several growth regulators called the plant hormones or phytohormones. In accordance with definition, the plant hormones are signal molecules produced within the plant and occur in extremely low concentrations. They are often synthesized in one part of the plant and are transported to another location through the plant vasculature system or, at least in the case of auxin, through a complex cell-to-cell transport system. They interact with specific target tissues to cause physiological responses and unlikely to animals responses are often the result of two or more hormones acting together. Central to comprehending hormonal control of plant growth and development is the understanding of how the hormones are perceived and the signal is transduced. Despite decades of study, only recently receptors for several of these substances have been identified, providing plant physiologists with a much clearer picture of hormonal control. Moreover, studies have revealed a quite novel model of signal transduction in which ubiquitin ligases function as hormone receptors. In eukaryotes, ubiquitin ligases operate in the ubiquitin-proteasome system (UPS) participating in the control of signal transduction events by selectively eliminating regulatory proteins. E3 ubiquitin ligases specifically bind degradation substrates and mediate their polyubiquitylation and later degradation by the 26S proteasome. In *Arabidopsis thaliana* more than 1400 genes encode components of the UPS. About 90% of these genes encode subunits of the E3 ubiquitin ligases comprise large family of protein or protein complexes containing a RING-finger, U-box domain or a HECT domain. Analysis of nucleotide sequences have revealed also that the UPS is strongly conse-

rved in plants kingdom. The most thoroughly studied in plants is the SCF class of E3 ubiquitin ligases. The name of this class is derived from three of its four subunits: SKP1, cullin and the F-box protein (FBP). FBP represent the largest superfamily in *Arabidopsis*, comprising 2,7% of this plant genome. The recent study revealed that plant proteins: AtTIR1 (*A. thaliana Transport Inhibitor Response 1*), OsGID1 (*O. sativa Gibberellin Insensitive Dwarf 1*) and AtCOI1 (*A. thaliana CORonatine Insensitive 1*), which play important role respectively in auxin, jasmonate and gibberellin signal transduction, are F-box proteins (AtTIR1, AtCOI1) or closely related (OsGID1), whereas the role of the SCF is to degrade repressors of hormone response. In the case of auxin, auxin-responsive genes are repressed by AUX/IAA proteins heterodimerizing with ARF transcription factors. Upon an auxin stimulus, the TIR1 binds auxin, enabling the recruitment of AUX/IAA proteins to the SCF complex for ubiquitination. Subsequently, AUX/IAA degradation by the 26S proteasome derepresses the ARF transcription factors. In the case of jasmonate, JAZ proteins negatively regulate jasmonate response by repressing MYC2 transcriptional activity. After binding of jasmonate, the SCF^{COI1} ubiquitin-ligase targets JAZ proteins for ubiquitin-mediated proteolysis, derepressing MYC2. In addition to auxin and jasmonate, gibberellin is yet another plant hormone whose perception involves an SCF ubiquitin ligase complex. DELLA proteins repress GA response by negatively regulating GAMyb, PIF3, PIF4, and presumably other transcription factors that control the expression of GA-inducible genes. DELLA proteins also promote the expression of several GA-repressible genes, some of which encode GA biosynthetic enzymes and components of the response pathway including the GID1 receptors. In the consequence of GA binding, the GID1 receptor interacts with DELLA and the new created complex (GA-GID1-DELLA) is recognized by the SCF^{GID2/SLY1} ubiquitin-ligase, which targets DELLA for ubiquitin-mediated degradation. It is seen, that GAs are not directly sensed by an F-box protein but instead by an extension molecule of the SCF substrate receptor subunit. Given the importance of SCFs to signal transduction, it is not surprising that SCF assembly and function are highly regulated. So far, tree proteins or protein complexes have been implicated in SCF regulation: RUB1 (*Related to Ubiquitin 1*), CAND1 (*Cullin Associated Neddylation Dissociated 1*) and the COP9 signalosome (CSN). The mechanism of hormonal signal transduction, presented in this paper has been described only in plants, however, due to extensive occurrence of ubiquitin ligases in eukaryotic cells, it can be supposed, that this novel hormone-signaling mechanism may also exist in other organisms.

Key words: plant hormones, ubiquitin ligases, signal perception and transduction.

1. WSTĘP

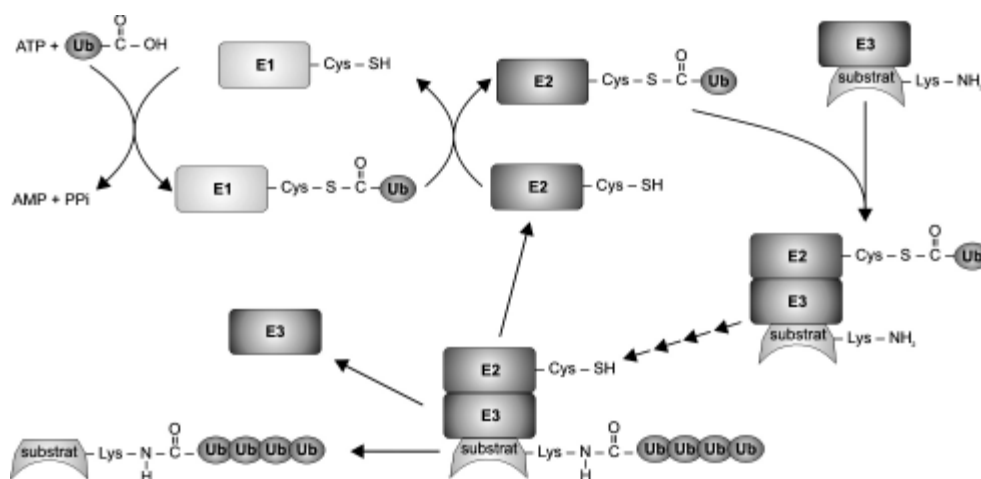
Hormony to substancje chemiczne koordynujące procesy życiowe zachodzące w różnych komórkach organizmów wielokomórkowych [2]. Zarówno u zwierząt, jak i u roślin syntetyzowane zazwyczaj w jednych częściach organizmu, przemieszczają się do innych, gdzie wpływają na przebieg procesów wzrostu i rozwoju. Wyniki prowadzonych od dziesięcioleci badań fizjologicznych wykazywały pleiotropowość działania hormonów roślinnych (fitohormonów), co w świadomości wielu fizjologów roślin wytworzyło przekonanie o ich niespecyficzności. W miarę poznawania molekularnych mechanizmów funkcjonowania fitohormonów staje się jasne, że działanie każdego z nich jest jednak specyficzne, czego podstawą są odrębne receptory i związane z nimi szlaki sygnałowe. Przyczyną obserwowanych efektów pleiotropowych są liczne interakcje, do jakich dochodzi pomiędzy szlakami przekazywania sygnałów poszczególnych fitohormonów. Percepcja, a następnie transdukcja sygnału określonego hormonu prowadzi często do aktywacji bądź represji charakterystycznego zestawu białek i/lub genów, wśród których znajdują się białka i geny związane z metabolizmem i szlakami sygnałowymi innych fitohormonów. Charakterystyczne dla hormonów roślinnych jest również to, że obiekty docelowe

ich działania mogą być inne w zależności od stężenia użytego hormonu, rodzaju tkanki i fazy rozwojowej rośliny. Można jednak wskazać wiele reakcji roślin na fitohormony wykazujących dużą specyficzność, choćby stymulacja przez gibereliny ekspresji genów enzymów amylolitycznych w komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż lub stymulacja przez auksyny genów, których białkowe produkty odpowiedzialne są za biosyntezę etylenu [18, 72].

Mechanizmy działania poszczególnych fitohormonów zostały już w znacznej mierze opisane w polskich kwartalnikach [6, 37, 38, 41, 53, 69, 80], istnieje jednak potrzeba uwzględnienia najnowszych doniesień oraz dokonania pewnego podsumowania w tej dziedzinie. W niniejszej pracy chcielibyśmy zwrócić uwagę Czytelnika na fakt, że poza oczywistą różnicą w naturze hormonów roślinnych i zwierzęcych, dosyć odmienne są także ich szlaki sygnałowe. U zwierząt tworzą je przede wszystkim kinazy białkowe i wtórne przekaźniki, jak, np. cykliczne nukleotydy, trójfosforan inozytoli czy diacyloglicerol. U roślin natomiast, w przypadku trzech spośród siedmiu najbardziej znanych hormonów, istotą działania szlaku sygnalizacyjnego, oprócz wtórnych przekaźników, kinaz i fosfataz, jest aktywacja ligaz ubikwitynowo-białkowych. Sytuacja taka ma miejsce w przypadku auksyn, jasmonianów oraz giberelin. Pojawienie się fitohormonu prowadzi do aktywacji odpowiedniej ligazy i w konsekwencji do uruchomienia procesu proteolitycznej degradacji białek represorowych uczestniczących w regulacji aktywności genów odpowiedzi na te hormony.

2. LIGAZY UBIKWITYNOWO-BIAŁKOWE W SZLAKACH SYGNAŁOWYCH AUKSYN, JASMONIANÓW I GIBERELIN

W komórkach eukariontów występują dwa podstawowe systemy degradacyjne białek – lizosomalny oraz ubikwitynowo-proteasomalny – UPS (ang. *Ubiquitin-26S Proteasome System*) [21]. Szlak ubikwitynowo-proteasomalny, którego istotą jest

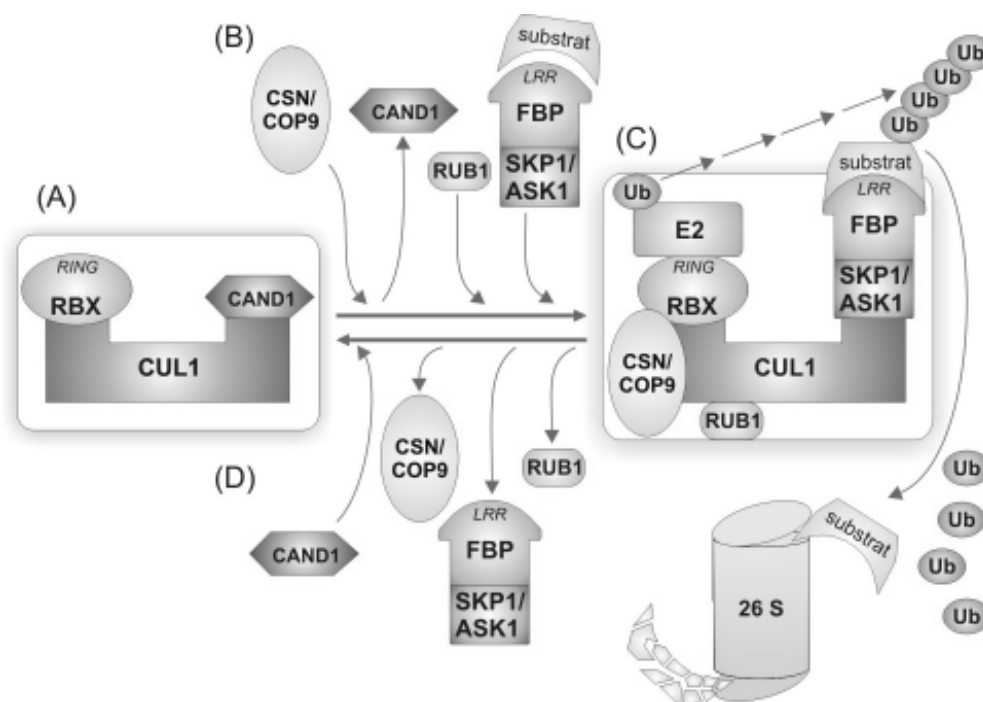


RYCINA 1. Szlak ubikwitylacji białek (szczegóły w tekście)

FIGURE 1. The protein ubiquitination pathway (for details see text)

zdolność do selektywnego wybierania białek przeznaczonych do hydrolizy, odpowiedzialny jest w komórce za degradację licznych białek regulatorowych. W genomie *Arabidopsis thaliana* występuje około 1400 genów kodujących poszczególne elementy UPS, z czego około 90% genów koduje monomeryczne lub polimeryczne ligazy ubikwitynowo-białkowe E3 [49].

Główną funkcją ligaz jest rozpoznawanie i wiązanie białkowego substratu oraz przeniesienie na niego białka znacznikowego – ubikwityny (Ub) (ryc. 1). Przyłączenie ubikwityny do białka substratowego poprzedzone jest reakcją aktywacji ubikwityny katalizowaną przez enzym aktywujący E1. W pierwszym etapie dochodzi do utworzenia ubikwityloadenylnu (Ub-AMP), a następnie powstaje wysokoenergetyczne wiązanie tioestrowe pomiędzy ubikwityną a resztą cysteiny w centrum katalitycznym enzymu E1. Zaktywowana w ten sposób ubikwityna zostaje przeniesiona na resztę cysteiny w enzymie koniugującym E2, skąd ligaza ubikwitynowo-białkowa E3 przenosi ją na białkowy substrat. Proces ten powtarza się kilkakrotnie, aż zostanie utworzony łańcuch poliubikwitynowy. Wyznakowane polipeptydy są następnie degradowane w proteasomach [36, 61].



RYCINA 2. Budowa i regulacja aktywności ligazy E3 typu SCF: (A) – nieaktywna ligaza; (B) – tworzenie funkcjonalnego kompleksu ligazy; (C) – aktywna ligaza; (D) – deaktywacja ligazy (za [21, 54] zmodyfikowane, szczegóły w tekście)

FIGURE 2. The structure and the regulation of E3 SCF ligase activity: (A) – inactive ligase; (B) – formation of functional ligase complex; (C) – active ligase; (D) – inactivation of ligase (according to [21, 54] modified, for details see text)

Roślinne ligazy E3 tworzą dużą rodzinę białek lub kompleksów białkowych z charakterystycznymi domenami RING-finger (ang. *Really Interesting New Gene*), HECT (ang. *Homologous to the E6-AP C-Terminus*) lub U-box [61]. Najważniejsze, z punktu widzenia regulacji szlaków przekazywania sygnałów hormonalnych, są jednak wspomniane ligazy ubikwityny E3 typu SCF (ang. *SKP1-Cullin-F-box-RBX1*) (ryc. 2). Są to kompleksy białkowe zbudowane z co najmniej 4 podjednostek. Rdzeń ligazy tworzy kulina i białko RBX1/ROC1 (ang. *Ring Box protein 1/Regulator Of Cullins 1*) natomiast białka SKP1/ASK1 (ang. *S-phase Kinase associated Protein 1/Arabidopsis SKP 1-related*) oraz FBP (ang. *F-Box Protein*) stanowią wymienne elementy kompleksu. Białka FBP, zawierające charakterystyczną domenę F, decydują o swoistości wiązania substratów przeznaczonych do degradacji i są najliczniejszą rodziną białek rzodkiewnika (jest ich ponad 700, co stanowi 2,7% wszystkich białek kodowanych przez genom) [26].

Tworzenie aktywnej ligazy E3 typu SCF rozpoczyna się od przyłączenia do nieaktywnego kompleksu CUL1-RBX1-CAND1 wielopodjednostkowego kompleksu COP9/CSN (ang. *COstitutive Photomorphogenic 9/COP9 Signalosome*) z jednoczesnym odłączeniem białka CAND1 (ang. *Cullin-Associated and Neddylation-Dissociated 1*) (ryc. 2). Następnie do kuliny przyłącza się białko RUB1 (ang. *Related to Ubiquitin 1* – u zwierząt NEDD8), co powoduje jej modyfikację i w konsekwencji dołączenie podjednostki SKP1/ASK1 oraz białka FBP wraz z substratem mającym ulec ubikwitylacji. Białko CAND1 współzawodniczy z podjednostką SKP1/ASK1 o wiązanie z kulina, ale tylko wówczas, gdy nie jest ona połączona z białkiem RUB1/NEDD8 [79]. Zbudowany z ośmiu polipeptydów kompleks białkowy COP9/CSN jest niezbędny w przebiegu procesu ubikwitylacji substratu. Wykazano jednak, że uczestniczy on również w reakcji derubinyłacji/denedylacji kuliny, hamując w ten sposób aktywność ligazy SCF. Przyłączanie do kuliny białka RUB1 (zwane rubinyłacją), jest reakcją trójstopniową. Biorą w niej udział enzymy analogiczne do E1 i E2 uczestniczące w aktywacji i koniugacji ubikwityny oraz ligaza, którą jest białko RBX1 będące podjednostką kompleksu ligazy SCF [27].

Odkrycia ostatnich lat wykazały, że roślinne białka AtTIR1 (ang. *A. thaliana Transport Inhibitor Response 1*) [35], OsGID1 (ang. *O. sativa Gibberellin Insensitive Dwarf 1*) [66] oraz AtCOI1 (ang. *A. thaliana COronatine Insensitive 1*) [34], pełniące podstawową rolę w odpowiedzi roślin na auksyny, gibereliny i kwas jasmonowy, są białkami FBP (TIR1 i COI) lub blisko z nimi współdziałają (GID1).

2.1. Auksyny

Auksyny są podstawowymi fitohormonami odpowiedzialnymi za prawidłowy przebieg embriogenezy, stymulację podziałów komórek i ich wzrost na długość, kontrolę morfogenezy tkanek i całych organów, dominację wierzchołkową, jak i odpowiedzi tropiczne. Najważniejszą naturalną auksyną jest kwas indolilo-3-octowy – IAA (ang. *Indole-3-Acetic Acid*) [55, 74].

Badania nad molekularnymi mechanizmami działania auksyn rozpoczęły się na początku lat 70. ubiegłego stulecia wykryciem białka ABP1 (ang. *Auxin Binding*

Protein 1), charakteryzującego się wysokim powinowactwem i specyficznością względem auksyn oraz uczestnictwem w indukowanych przez ten hormon odpowiedziach komórkowych zachodzących w obrębie błony plazmatycznej. ABP1 został uznany za receptor błonowy auksyn, jednak mimo upływu blisko 40 lat od jego odkrycia funkcja, jaką pełni, nie jest do końca zrozumiała. Powodem tego jest niejasna lokalizacja subkomórkowa ABP1, brak jednoznacznie określonych dalszych elementów szlaku sygnałowego związanego z tym białkiem, a także trudność w wykazaniu udziału tego receptora w regulacji ekspresji genów odpowiedzi na auksynę [53].

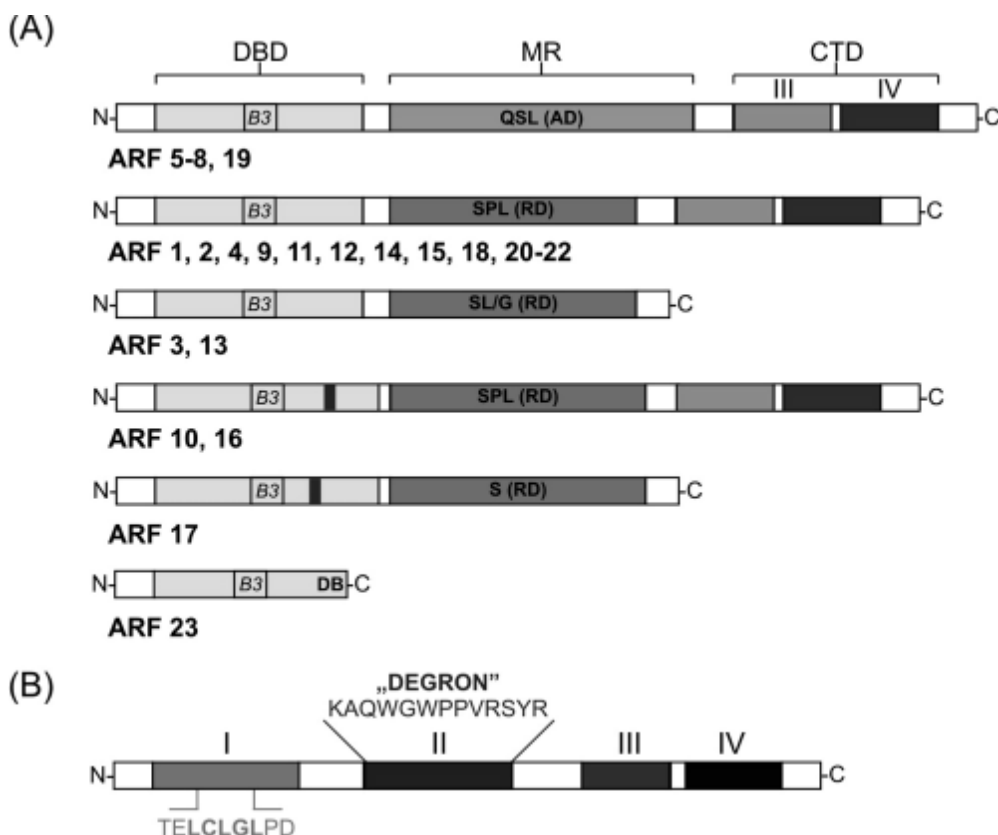
2.1.1. Czynniki odpowiedzi auksynowych ARF i białka represorowe AUX/IAA

Traktowanie roślin auksyną, poza pewnymi zmianami na poziomie błon, prowadzi do wzrostu ekspresji specyficznych genów (tab. 1). Wśród nich do najlepiej scharakteryzowanych należą 3 rodziny: AUX/IAA (ang. *AUXin/Indole-3-Acetic Acid*), SAUR (ang. *Small Auxin Up RNA*) i GH3, a także geny kodujące syntazy ACC [55]. Promotory pierwotnych genów odpowiedzi na auksynę zawierają charakterystyczną sekwencję nukleotydową TGTCTC nazwaną AuxRE (ang. *Auxin Responsive Element*). Poznanie tej sekwencji pozwoliło na identyfikację w komórkach *A. thaliana* czynników transkrypcyjnych ARF (ang. *Auxin Response Factors*) regulujących aktywność genów odpowiedzi na auksynę. W genomie *A. thaliana* odkryto 23 geny ARF, z czego jeden – *ARF23* jest pseudogenem. Białkowe produkty tych genów wiążą się z AuxRE za pośrednictwem znajdującej się na N-końcu domeny DBD (ang. *DNA Binding Domain*) (ryc. 3A). Składa się ona z ok. 350 aminokwasów i zawiera w swej centralnej części motyw B3 występujący także w innych roślinnych czynnikach transkrypcyjnych, takich jak: ABI3, FUSCA3, RAV1 i RAV2. W białkach

TABELA 1. Wybrane geny wczesnej odpowiedzi na auksynę

TABLE 1. Selected early auxin response genes

Geny	Gatunek rośliny	Czas odp. na IAA (min)
1. Rodzina genów AUX/IAA		
GmAUX22	<i>Glycine max</i> (soja zwyczajna)	15
GmAUX28		30
GH1		15
PS-IAA4-5	<i>Pisum sativum</i> (groch zwyczajny)	5
PS-IAA6		8
ARG3	<i>Vigna radiata</i> (fasola mung)	20
ARG4		20
AtAUX2-11 (IAA4)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (rzodkiewnik pospolity)	30
AtAUX2-27 (IAA5)		90
IAA1-IAA6		5–25
IAA7, IAA8		60–120
IAA9-IAA14		15–60
2. Rodzina genów SAUR		
SAURs	<i>Glycine max</i>	3–5
ARG7	<i>Vigna radiata</i>	5
SAUR-AC1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	–
3. Rodzina genów GH3		
GH3	<i>Glycine max</i>	5
4. Geny kodujące syntazy ACC		
ACS4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	25
CmACS2	<i>Cucurbita maxima</i> (dynia olbrzymia)	20
OsACS1	<i>Oryza sativa</i> (ryż siewny)	–



RYCINA 3. Budowa czynników odpowiedzi auksynowych ARF (A) i białek represorowych AUX/IAA (B) *A. thaliana*: DBD – domena wiążąca DNA (kolorem ciemnoniebieskim zaznaczono dodatkowe aminokwasy); MR – domena regulatorowa (AD – aktywująca, RD – represorowa); CTD – domena odpowiedzialna za dimeryzację białek ARF. QSL, SPL, SL/G, S – domeny bogate w glutaminę (Q), serynę (S), leucynę (L), prolinę (P) lub glicynę (G) (za [22] zmodyfikowane, szczegóły w tekście)

FIGURE 3. The structure of auxin response factors ARF (A) and repressor proteins AUX/IAA (B) in *A. thaliana*: DBD – DNA-binding domain (with the dark-blue color additional amino acids were depicted); MR – regulatory domain (AD – activating, RD – repressing); CTD – dimerization domain; QSL, SPL, SL/G, S – glutamine (Q), serine (S), leucine (L), proline (P) or glycine (G) rich domain (according to [22], modified, for details see text)

ARF10, 16 i 17 domena DBD zawiera dodatkowo 32–36 reszt aminokwasowych, a w przypadku ARF23 jest niepełnej długości. C-koniec większości białek ARF zawiera domenę CTD (ang. *Carboxy-Terminal Dimerization domain*) z dwoma charakterystycznymi motywami III i IV, odpowiedzialnymi za dimeryzację [22]. W środkowej części ARF występuje zmienna domena MR (ang. *Middle Region*). W różnych białkach ARF region ten może działać jako domena aktywująca AD (ang. *Activation Domain*) lub jako domena represorowa RD (ang. *Repression Domain*). Domena AD bogata jest w reszty glutaminy, seryny i leucyny, natomiast domena RD w reszty seryny oraz w niektórych przypadkach w reszty proliny, leucyny i/lub glicyny. Białka ARF5-8 i ARF19 funkcjonują jako aktywatory transkrypcji wczesnych genów odpowiedzi na auksyny, natomiast przyjmuje się, że pozostałe białka ARF działają jako represory transkrypcji, choć potwierdzone to

zostało jedynie w przypadku ARF2-4 i 9. Ekspresja genów *ARF* zachodzi we wszystkich dojrzałych organach i w większości przypadków nie jest regulowana przez auksyny [71] natomiast wiadomo, że poziom co najmniej pięciu transkryptów *ARF* u rzodkiewnika jest regulowany przez microRNA [14].

Białka ARF mogą wiązać się do sekwencji AuxRE jako monomery, homodimery, heterodimery z innymi białkami ARF lub jako heterodimery z białkami AUX/IAA. Kontrola aktywności białek ARF zachodzi poprzez interakcje z białkami AUX/IAA. Aktywność tych ostatnich regulowana jest przez proteolityczną degradację z udziałem UPS. Istotne znaczenie w tym procesie odgrywa ligaza ubikwityny SCF^{TIR1}. U *A. thaliana* występuje 29 białek AUX/IAA, natomiast u ryżu 31 białek i większość z nich zawiera cztery konserwatywne domeny oznaczane numerami I–IV [29, 42]. Występujące na C-końcu domeny III i IV wykazują znaczne podobieństwo do domen III i IV obecnych w białkach ARF (ryc. 3B) oraz odpowiedzialne są za oddziaływania pomiędzy AUX/IAA-ARF. Heterodimery AUX/IAA-ARF hamują aktywność transkrypcyjną pierwotnych genów odpowiedzi na auksyny. Przypuszcza się, że w procesie represji aktywnie uczestniczy także domena I białek AUX/IAA zawierająca motyw LxLxL [42], który oddziałuje z korepresorem TPL (ang. *TOPELESS*), co najmniej w przypadku IAA12/BDL (ang. *IAA12/BODENLOS*) [62]. Utworzona przez 13 reszt aminokwasowych domena II białek AUX/IAA – oznaczana jako „DEGRON” – decyduje o ich stabilności. Dzięki niej dochodzi do połączenia z białkiem TIR1 (ang. *Transport Inhibitor Response 1*) wchodzącym w skład ligazy ubikwitynowej SCF^{TIR1} odpowiedzialnej za znakowanie do degradacji [56].

2.1.2. Wiązanie białek represorowych do kompleksu ligazy SCF^{TIR1}

Odpowiedzialne za specyficzne wiązanie AUX/IAA do kompleksu ligazy białko TIR1, zostało zidentyfikowane około 10 lat temu. Dopiero niedawno jednak odkryto, że odgrywa ono wyjątkową rolę w mechanizmie funkcjonowania auksyn. Okazało się, że TIR1 ma zdolność wiązania auksyn, co wpływa bezpośrednio na tworzenie kompleksu TIR1-IAA-AUX/IAA [11, 35]. Wcześniej przypuszczano, że oddziaływania ligazy SCF^{TIR1} z AUX/IAA zachodzą w następstwie modyfikacji kowalencyjnych (fosforylacja, hydroksylacja, acetylacja) lub izomeryzacji *cis-trans* wiązania peptydowego położonego za jedną z dwóch konserwatywnych reszt proliny w domenie II białka AUX/IAA [36].

TIR1 wykazuje lokalizację jądrową i ma typową budowę białek FBP. Na C-końcu łańcucha polipeptydowego występuje domena zawierająca 18 powtórzeń leucynowych LRR (ang. *Leucine Rich Repeat*) wiążąca auksynę i białka AUX/IAA, natomiast na N-końcu występuje domena F pośrednicząca w interakcjach z białkiem SKP1/ASK1 kompleksu ligazy E3. Domena F ma także wpływ na zależne od hormonu, tworzenie kompleksu TIR1-AUX/IAA, bowiem jej delecja lub mutacje punktowe w konserwatywnych resztach aminokwasowych obniżają lub całkowicie znoszą powstawanie tych kompleksów [11, 35].

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano pięć homologów TIR1, wykazujących 45–87% identyczności sekwencji aminokwasowej. Trzy spośród tych białek: AFB1-3 (ang. *Auxin signaling F-Box protein 1-3*) wykazują najwyższy stopień identyczności (61–72%). Podobnie jak białko TIR1 zawierają one domenę LRR i wiążą AUX/IAA w sposób zależny od IAA. Białka kodowane przez geny *TIR1*,

AFB1-3 występują w nadmiarze i każde z nich może być zastąpione innym. Tylko poczwórna mutacja *tir1/afb1/afb2/afb3* powoduje brak odpowiedzi na auksynę. Do chwili obecnej niewiele wiadomo na temat regulacji ekspresji genów *TIR1/AFB*. Nieliczne badania wskazują na udział w tym procesie interferujących mikroRNA (np. miR393) [11, 12].

Istotne znaczenie w aktywacji kompleksu ligazy ubikwityny SCF^{TIR1} ma opisany wcześniej mechanizm rubinyłacji kuliny. Uczestniczący w tym procesie enzym typu E1 składa się z dwóch białek: AXR1 (ang. *Auxin Resistant 1*) i ECR1 (ang. *E1 C-terminal Related 1*), natomiast enzym E2 to białko RCE1 (ang. *Rub1 Conjugating Enzyme 1*). Mutanty z defektami w genach *AXR1* i *RCE1* wykazują szereg zmian rozwojowych, a podwójne mutanty *axr1/rce1* są letalne. We właściwym przebiegu degradacji białek AUX/IAA bierze także udział sygnałom COP9/CSN związany z procesem derubinyłacji kompleksu SCF^{TIR1} [10, 54].

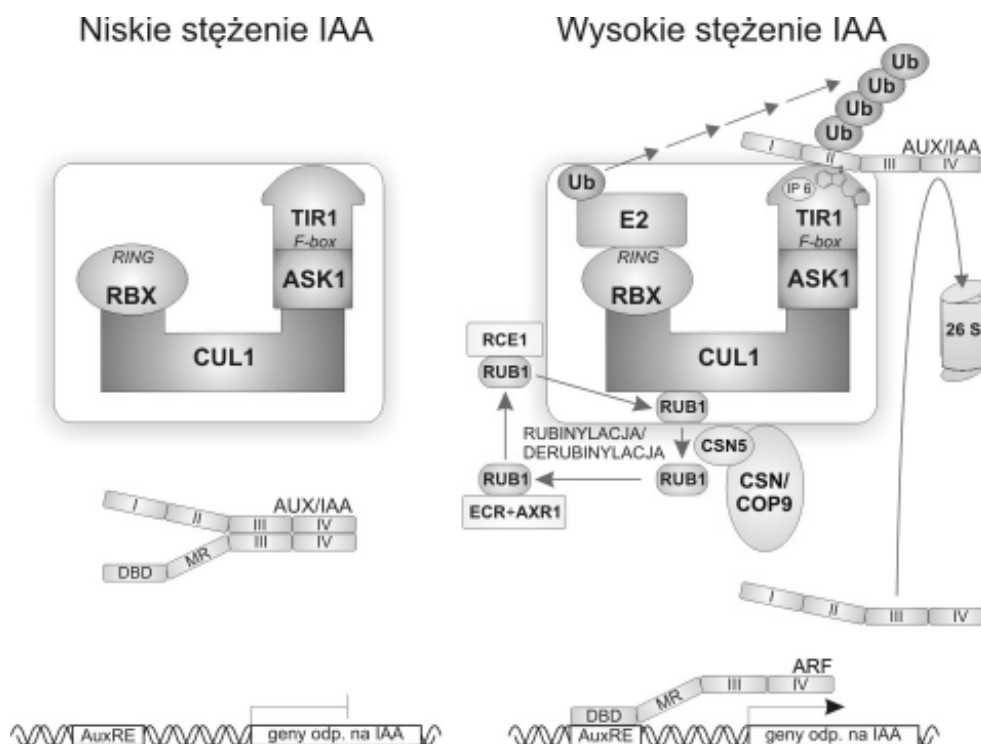
2.1.3. Oddziaływanie białka TIR1 z auksyną

Miejsce wiązania auksyny do białka receptorowego TIR1 znajduje się w specjalnej kieszeni utworzonej przez domenę LRR. Hormon przyłącza się do hydrofobowego dna tej kieszeni poprzez oddziaływania hydrofobowe, van der Waalsa i wiązania wodorowe. W tym samym miejscu wiązane są również białka AUX/IAA. Analiza modelowa receptora wolnego i związanego z ligandem wykazała, że cząsteczka hormonu nie zmienia kształtu TIR1, natomiast zachowuje się jak „klej molekularny” (ang. *molecular glue*) zwiększając powierzchnię wiązania AUX/IAA do TIR1 i stabilizując oddziaływania między tymi białkami. W interakcjach TIR1-IAA bierze także udział sześćiofosforan inozytolu (IP6), który jest ściśle związany z TIR1. Właściwości oraz przestrzenne usytuowanie miejsca wiążącego IP6 wskazują, że pełni on prawdopodobnie funkcję kofaktora TIR1 [63].

Oprócz IAA, białko TIR1 wiąże także auksyny syntetyczne, jak np. kwas 2-4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) czy kwas naftylo-1-octowy (1-NAA), ale ich powinowactwo do receptora jest niższe [35]. Pod tym względem receptor TIR1 różni się od receptora błonowego ABP1, ponieważ wykazano, że powinowactwo ABP1 do 1-NAA jest wyższe niż do IAA [5]. Z kolei antyauksyny, przez podobieństwo swojej cząsteczki do auksyn, konkurują z nią o miejsce wiązania na receptorze. Wykazano, że antyauksyna zawierająca dodatkowy łańcuch akrylowy w pozycji α w cząsteczce IAA, wiąże się do TIR1 w taki sam sposób jak IAA, jednak dodatkowy łańcuch blokuje interakcje TIR1 z AUX/IAA [24]. Ostateczny rezultat działania antyauksyn zależy od stosunku ich stężenia do stężenia auksyn.

2.1.4. Ogólny model regulacji ekspresji genów przez auksyny

Mechanizm aktywujący proteolityczną degradację białek AUX/IAA z udziałem białka TIR1 ma elementarne znaczenie w regulowanych przez auksyny procesach wzrostu i rozwoju. Przy niskim stężeniu auksyn lub ich braku, białka AUX/IAA tworzą heterodimery z czynnikami odpowiedzi auksynowej ARF blokując w ten sposób ich aktywujące lub hamujące działanie na ekspresję pierwotnych genów odpowiedzi auksynowej (ryc. 4). Wysokie stężenie auksyn powoduje natomiast wiązanie hormonu do białka TIR1 lub jego homologów przy udziale IP6, a następnie



RYCINA 4. Mechanizm działania auksyn u *A. thaliana* (szczegóły w tekście)
 FIGURE 4. Mechanism of auxin action in *A. thaliana* (for details see text)

po przyłączeniu substratu powstaje kompleks TIR1-IAA-AUX/IAA. Do białek AUX/IAA zostaje dołączona ubikwityna przy udziale ligazy E3 regulowanej przez układ rubinyłacja/derubinyłacja kuliny, białko CAND1 i sygnałom COP9/CSN. Degradacja białka AUX/IAA prowadzi do uwolnienia z heterodimeru AUX/IAA-ARF odpowiedniego białka ARF, które może aktywować lub hamować ekspresję pierwotnych genów odpowiedzi na auksyny.

Najważniejszą rolę w procesach wzrostu i rozwoju kontrolowanych przez auksynę wydają się odgrywać białkowe produkty genów SAUR. Ekspresja wczesnych genów odpowiedzi auksynowej AUX/IAA jest natomiast elementem mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego działania auksyn, umożliwiającego zatrzymanie odpowiedzi w przypadku obniżenia się stężenia bodźca. Podobnemu celowi służy także stymulacja ekspresji genów GH3, których produkty białkowe są enzymami inaktywującymi auksynę przez koniugację z aminokwasami. Ten podwójny mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego sugeruje istotne znaczenie „wyłączania” działania bodźca auksynowego [55].

Istotną cechą funkcjonowania opisanego szlaku sygnałowego auksyn jest wyraźne skrócenie drogi jego przebiegu oraz bezpośrednie powiązanie z procesem transkrypcji. Jawi się to jako zupełnie nowy mechanizm regulacyjny w działaniu hormonów. Podobny przebieg szlaków sygnalizacyjnych obserwuje się również w przypadku jasmonianów i giberelin.

2.2. Jasmoniany

Jasmoniany to substancje organiczne powstające w wyniku przemian kwasu linolenowego [70]. Po raz pierwszy wyizolowano je na początku lat 60. z *Jasminum grandiflorum*, jednak dopiero na początku lat 80. uznano je za jedne z ważnych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin. Odgrywają one istotną rolę w kontroli wielu procesów, ale szczególnie ważny jest ich udział w reakcjach roślin na stres biotyczny i abiotyczny [39]. Początkowo zakładano, że biologicznie aktywny jest wolny kwas jasmonowy – JA (ang. *Jasmonic Acid*) i/lub jego lotny ester metylowy (JA-Me). Obecne badania dowodzą, że bioaktywną molekułą jest koniugat JA z aminokwasem izoleucyną – JA-Ile. W literaturze polskiej mechanizm działania tego fitohormonu został szczegółowo opisany przez Frankowskiego i innych w 2009 r. [19].

2.2.1. Białka COI1 i JAZ jako kluczowe elementy szlaku jasmonianowego

COI1 – białko z domeną F. Badania percepcji i transdukcji sygnału jasmonianowego stały się możliwe dzięki wyselekcjonowaniu niewrażliwego na koronatynę mutantu *A. thaliana-coi1* (ang. *coronatine insensitive 1*). Koronatyna jest fitotoksyną syntetyzowaną przez patogena roślin *Pseudomonas syringae*, wykazującą duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do JA-Me i JA-Ile. Gen *COI1* koduje polipeptyd będący podjednostką ligazy E3 typu SCF (SCF^{COI1}), mający na N-końcu domenę F, a na C-końcu powtórzenia bogate w leucynę LRR. Mutacja w obrębie domeny F, uniemożliwiająca oddziaływanie COI1 z białkiem ASK1 kompleksu ligazy, objawia się utratą wrażliwości rośliny na jasmoniany [32, 33].

Białko COI1 jest blisko spokrewnione z rodziną TIR1/AFB. Podobnie jak w białku TIR1, w strukturze I-rzędowej COI1 obecne są reszty hydrofobowych aminokwasów, które mogą tworzyć kieszeń wiążącą hormon i białkowy substrat. Do dzisiaj nie ma jednak ostatecznych dowodów na to, że COI1 jest receptorem jasmonianów, ani czy do związania hormonu wymagana jest obecność kofaktora, jakim w przypadku TIR1 jest IP6 [32].

Białka JAZ – represory transkrypcji. Substratem dla ligazy ubikwityny SCF^{COI1} są zidentyfikowane w 2007 r. białka JAZ (ang. *JAsmonate ZIM-domain*), które ulegają szybkiej degradacji w obecności jasmonianów i są represorami transkrypcji genów aktywowanych przez te fitohormony [7, 64, 76]. U *A. thaliana* zidentyfikowano 12 białek JAZ (ryc. 5), z których JAZ1, JAZ3, JAZ6, JAZ10 występują na terenie jądra komórkowego [7, 64], natomiast lokalizacja pozostałych nie jest dobrze określona. Wszystkie one mają w swej N-końcowej części 28-aminokwasową domenę ZIM (ang. *Zinc-finger Inflorescence Meristem*) o nieznannej funkcji oraz 26-aminokwasowy motyw Jas na C-końcu. Z uwagi na obecność w obrębie domeny ZIM charakterystycznej sekwencji aminokwasów TIF[F/Y]XG, białka JAZ nazywane są też TIFY. Obecność funkcjonalnej domeny Jas jest niezbędna dla oddziaływania białek JAZ z COI1, bowiem mutacje w obrębie tego motywu hamują proteolityczną degradację białek JAZ i prowadzą do ich nadmiernej akumulacji w komórce [59]. W przypadku JAZ3 wykazano jednak, że za interakcję z COI1 odpowiada N-koniec, a nie C-koniec białka, co wskazuje na złożoność oddziaływań między białkami JAZ i COI1 [7, 33, 76].



RYCINA 5. Porównanie budowy białek z rodziny JAZ *A. thaliana* (za [7, 60, 68], zmodyfikowane, szczegóły w tekście)

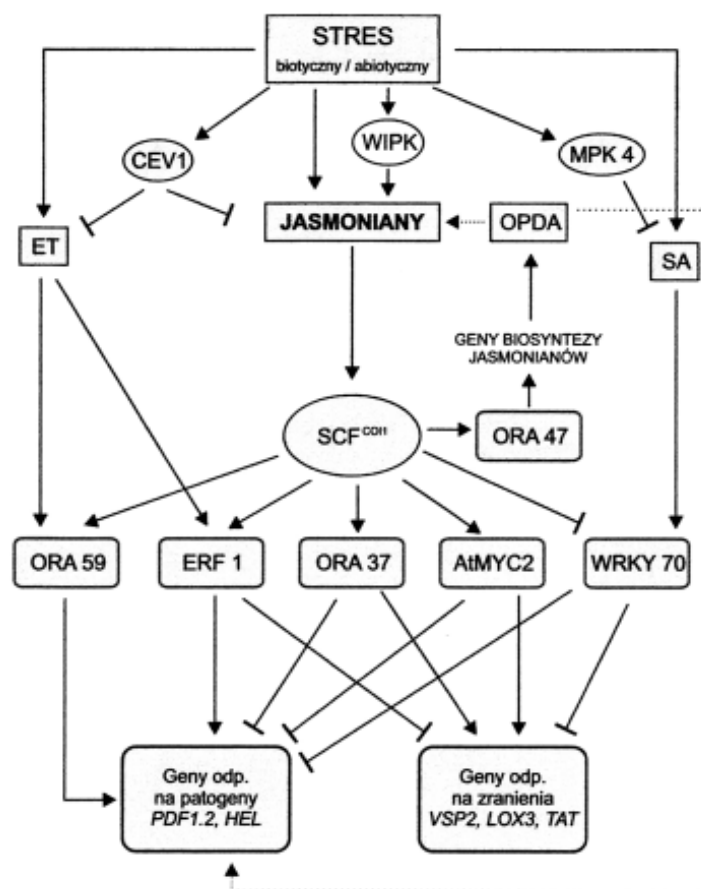
FIGURE 5. Comparison of structure of JAZ family proteins in *A. thaliana* (according to [7, 60, 68], modified, for details see text)

Białka JAZ, podobnie jak funkcjonujące w szlaku auksynowym białko AUX/IAA, nie mają domeny, za pomocą której mogłyby wiązać się bezpośrednio do DNA, dlatego swoje funkcje represyjne spełniają przez tworzenie kompleksów z czynnikami transkrypcyjnymi.

2.2.2. Czynniki transkrypcyjne

Analizy sekwencji nukleotydowych wykazały, że w promotorach genów regulowanych przez jasmoniany znajdują się charakterystyczne, sześci nukleotydowe motywy typu G (ang. *G-box*) [7, 13]. Wszystkie one mogą być miejscem wiązania czynników transkrypcyjnych AtMYC2/JIN1 (ang. *AtMYC2/Jasmonate INsensitive 1*) zawierających w swych cząsteczkach domenę bHLH (ang. *basic Helix-Loop-Helix*). Białka te, wiążąc się z DNA, aktywują geny odpowiedzi na zranienia i stres oksydacyjny (m.in. *VSP2*, *LOX3*, *TAT*), a hamują jednocześnie aktywność transkrypcyjną genów odpowiedzi związanych z obroną roślin przed patogenami (m.in. *PDF1.2*, *HEL*) (ryc. 6) [13, 43]. Wspomniane grupy genów regulowane są także przez czynnik odpowiedzi na etylen – ERF1 (ang. *Ethylene Response Factor 1*), jednakże jego działanie jest przeciwstawne. Geny, których aktywność jest hamowana przez ERF1, pod wpływem AtMYC2 ulegają aktywacji i odwrotnie. Biosynteza białek ERF1, jak i niektórych innych białek należących do rodziny czynników transkrypcyjnych ERF, kontrolowana jest także przez jasmoniany [43, 44].

Oprócz AtMYC2 i ERF1 znane są także inne czynniki transkrypcyjne uczestniczące w powstawaniu odpowiedzi na jasmoniany. Wśród nich możemy wyróżnić m.in. zawierające charakterystyczną domenę WRKY, białko WRKY70 funkcjonujące jako integrator szlaku jasmonianowego i salicylanowego oraz białko ORA. Te ostatnie u *A. thaliana* są one homologiczne do zidentyfikowanych u *Catha-*



RYCINA 6. Współdziałanie jasmonianów z etylenem i kwasem salicylowym w odpowiedzi rośliny na atak patogenów i zranienia: CEV1 – czynnik transkrypcyjny; ET – etylen; MPK4 – kinaza białkowa aktywowana mitogenem; OPDA – prekursor jasmonianów; SA – kwas salicylowy. WIPK – kinaza białkowa aktywowana zranieniem (za [43, 46, 70], szczegóły w tekście)

FIGURE 6. Cooperation of jasmonates with ethylene and salicylic acid in the reaction on pathogen attack and wounding: CEV1 – Constitutive Expression of VSP 1; ET – Ethylene; MPK4 – Mitogen-Activated Protein Kinase 4; OPDA – jasmonates precursor; SA – Salicylic Acid, WIPK – Wound-Induced Protein Kinase (according to [43, 46, 70], modified, for details see text)

ranthus roseus białek ORCA. Spośród różnych białek rodziny ORA u rzodkiewnika, ORA47 jest zależnym od COI, pozytywnym regulatorem biosyntezy jasmonianów, podczas gdy ORA59 i ORA37 działają pozytywnie lub negatywnie na różne grupy genów związanych z odpowiedzią roślin na warunki stresowe [70].

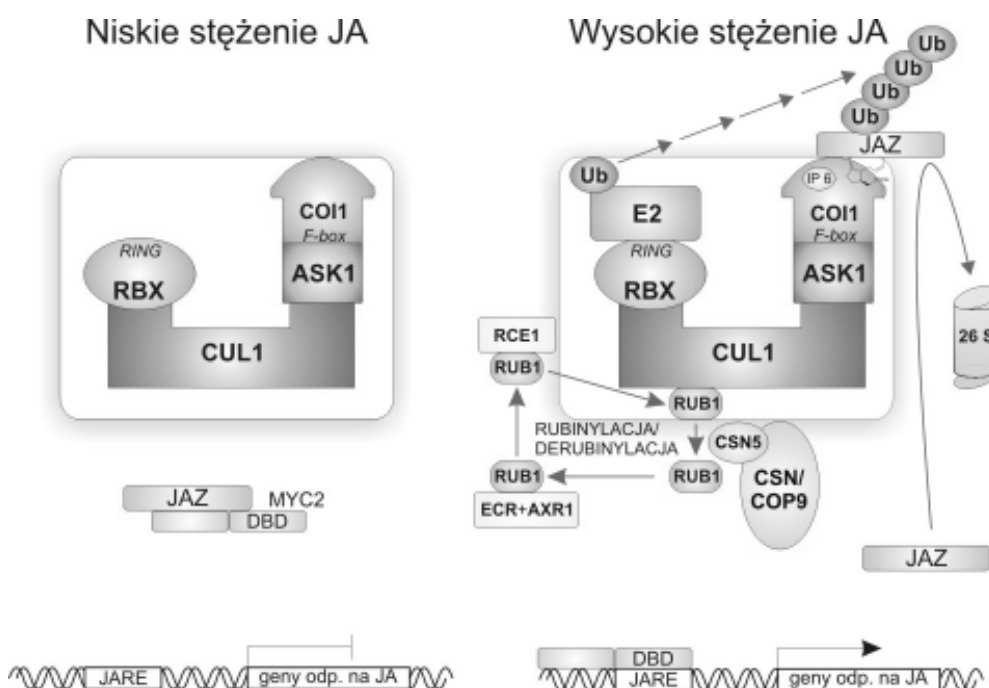
Blokowanie działania czynników transkrypcyjnych AtMYC2 następuje przez fizyczne wiązanie jego N-końcowej części z C-końcową częścią białka JAZ3 [7]. Jednak interakcje czynników transkrypcyjnych kontrolujących aktywność genów odpowiedzi na jasmoniany z represorami transkrypcji JAZ są ciągle mało poznane. Nie wiadomo np., jaka jest ostateczna liczba czynników transkrypcyjnych kontrolujących te reakcje oraz czy wszystkie znane białka represorowe JAZ biorą w nich udział.

2.2.3. Regulacja funkcjonowania szlaku jasmonianowego

Przy niskim stężeniu jasmonianów lub ich braku, C-końcowa domena białek JAZ oddziałuje z N-końcem białka AtMYC2, co bezpośrednio blokuje działanie tego ostatniego, natomiast pojawienie się dużej liczby cząsteczek sygnałowych prowadzi do proteolitycznej degradacji represorów JAZ i następuje uwolnienie MYC2 z kompleksu JAZ-MYC2 (ryc. 7). Białko MYC2 wiąże się z sekwencją JARE zlokalizowaną w promotorach licznych genów odpowiedzi na JA, wpływając na ich ekspresję.

Podobnie jak w przypadku auksyn, również w szlaku jasmonianowym funkcjonuje mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego służący do wyłączenia sygnału w przypadku zmniejszenia się stężenia hormonu. Mechanizm ten polega na aktywacji transkrypcji genów *JAZ* (np. *JAZ3*) przez czynnik transkrypcyjny AtMYC2 [7]. Funkcjonowanie szlaku jasmonianów regulowane jest także przez mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego, w którym uwolnione z heterodimeru czynniki transkrypcyjne zwiększają aktywność transkrypcyjną genów kodujących enzymy biosyntezy kwasu jasmonowego [7, 8, 64]. Zrozumienie znaczenia tego mechanizmu wymaga jednak dalszych badań.

Regulacja szlaku jasmonianowego odbywa się również przez rubinylację/derubinylację kuliny. Mutacja w genie *AXR1*, którego białkowy produkt odpowiedzialny jest za rubinylację, jak i obniżony poziom funkcjonalnego kompleksu COP9/CSN, prowadzi do spadku lub całkowitego braku wrażliwości na jasmoniany [34].



RYCINA 7. Mechanizm działania jasmonianów u *A. thaliana* (szczegóły w tekście)

FIGURE 7. Mechanism of jasmonates action in *A. thaliana* (for details see text)

2.3. Gibereliny

Gibereliny (GA) to tetracykliczne, dwuterpenoidowe kwasy karboksylowe, znane przede wszystkim z ich udziału w kiełkowaniu nasion, regulacji wzrostu pędu na długość oraz indukcji kwitnienia u roślin dnia długiego [17]. Rodzina giberelin liczy ponad 120 substancji, ale tylko cztery z nich GA1, GA3, GA4 i GA7 wykazują aktywność fizjologiczną. Pozostałe są ich prekursorami lub produktami katabolizmu [47, 75].

Pierwotne doświadczenia nad mechanizmami działania giberelin wykonywane były na komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż. Komórki te, same nie zawierając wykrywalnych ilości GA, reagują na fitohormon wydzielaniem enzymów hydrolitycznych, koniecznych do degradacji skrobi zmagazynowanej w bielmie. Jedną z najszybszych odpowiedzi na gibereliny, do jakich dochodzi w komórkach warstwy aleuronowej, jest wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Wyniki badań sugerują, że w przekazywaniu sygnału giberelinowego uczestniczą także heterotrimeryczne białka G, cykliczne nukleotydy oraz kinazy i fosfatazy białkowe [15]. Do dzisiaj nie udało się jednak wskazać konkretnego receptora błonowego, który mógłby współdziałać z tymi elementami w regulacji ekspresji genów odpowiedzi na gibereliny.

Badania ostatnich lat pokazały natomiast, że podobnie jak w przypadku auksyn i jasmonianów, ogromną rolę w powstawaniu odpowiedzi na gibereliny w komórkach roślinnych odgrywa szlak sygnałowy związany z aktywacją ligazy ubikwityny (59).

2.3.1. Represory odpowiedzi giberelinowej

Postępy w badaniach mechanizmów działania giberelin stały się możliwe dzięki wyselekcjonowaniu szeregu mutantów ryżu i *A. thaliana* o zmienionej wrażliwości na ten hormon. Doprowadziło to w konsekwencji do zidentyfikowania genów, których białkowe produkty, zawierające charakterystyczną sekwencję DELLA, są represorami odpowiedzi giberelinowej [4].

Budowa i funkcja białek DELLA. Białka DELLA, stanowiące część licznej nadrodziny roślinnych regulatorów transkrypcji GRAS (ang. *GAI*, *RGA* and *Scarecrow*) [15], mają w swej cząsteczce kilka konserwatywnych domen. Na N-końcu polipeptydu znajduje się 27-aminokwasowy motyw „DELLA” oraz sekwencja TVHYNP, które przedzielone są niekonserwatywnym regionem (ryc. 8). Mutacja w każdej z tych domen wywołuje karłowaty fenotyp, brak wrażliwości roślin na egzogenne gibereliny oraz mniejszą wrażliwość na proteolityczną degradację, co prowadzi do nadmiernej akumulacji białka w komórkach. Kolejna sekwencja – pS/T/V – nie wpływa na stabilność białek DELLA i określana jest jako domena regulatorowa. Domeny LR (ang. *Leucine Repeat*) oraz VHIID odpowiadające za

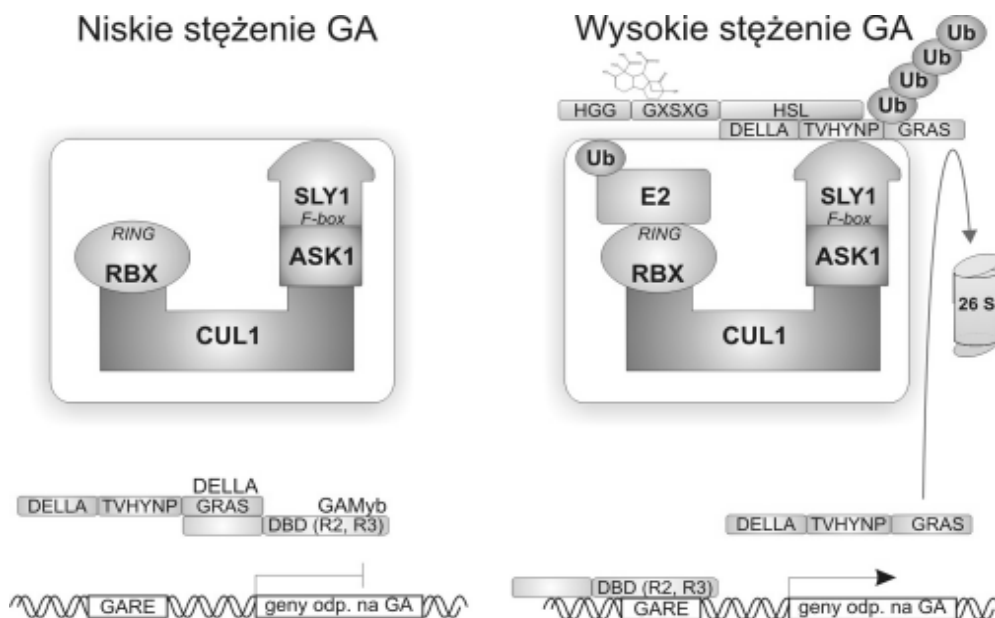


RYCINA 8. Najważniejsze domeny występujące w cząsteczkach białek DELLA (szczegóły w tekście)
FIGURE 8. Most important domains of DELLA proteins (for details see text)

dimeryzację białek, są istotne w mechanizmach represji transkrypcji, jaka ma miejsce z udziałem białek DELLA [73]. Domena „GRAS”, występująca na C-końcu białek DELLA, składa się z dwóch poddomen SH2 i SAW, za pomocą których białka te oddziałują z białkami FBP wchodzącymi w skład kompleksu ligazy ubikwitynowej SCF^{SLY1/GID2}. Tworzenie kompleksu DELLA-FBP u *A. thaliana* następuje w sposób bezpośredni, natomiast u ryżu potrzebny jest do tego dodatkowy czynnik [67].

W genomie *A. thaliana* znajduje się 5 genów *DELLA*: *RGA* (ang. *Repressor of GA 1-3*), *GAI* (ang. *GA-Insensitive*), *RGL1* (ang. *RGA Like 1*), *RGL2* (ang. *RGA Like 2*), *RGL3* (ang. *RGA Like 3*), natomiast w genomie ryżu jest tylko jeden gen – *SLR1* (ang. *SLender Rice 1*). Homologi genów *DELLA* zidentyfikowano również u innych gatunków roślin. Charakterystykę oraz funkcję kodowanych przez nie białek przedstawiono w tabeli 2. U *A. thaliana* białka *GAI* i *RGA* są głównymi represorami w czasie wzrostu wegetatywnego i indukcji kwitnienia, *RGL1* i *RGL2* odgrywają istotną rolę w kiełkowaniu nasion, *RGA*, *RGL1* i *RGL2* wspólnie modulują rozwój kwiatu, natomiast funkcja *RGL3* nie została do tej pory wyjaśniona [1, 30].

Udział białek DELLA w regulacji transkrypcji genów odpowiedzi na gibereliny. Przy braku lub w warunkach niskich stężeń giberelin białka DELLA łączą się z czynnikami transkrypcyjnymi kontrolującymi ekspresję pierwotnych genów odpowiedzi na gibereliny, powodując hamowanie transkrypcji. Wzrost stężenia giberelin w komórkach aktywuje proteolityczną degradację białek DELLA w proteasomach, co prowadzi do uwolnienia wspomnianych czynników transkrypcyjnych i aktywacji genów [23] (ryc. 9).



RYCINA 9. Mechanizm działania giberelin u *A. thaliana* (więcej szczegółów w tekście)

FIGURE 9. Mechanism of gibberellin action in *A. thaliana* (more details in the text)

TABELA 2. Charakterystyka i funkcja białek DELLA u wybranych gatunków roślin
 TABLE 2. Characterization and function of DELLA proteins in selected plants species

Gatunek	Nazwa białka	Charakterystyka i funkcja białka
<i>A. thaliana</i>	GAI syn. RGA2 (<i>Restoration of Growth on Ammonia 2</i>), AtGRAS-3	533 AA; w odróżnieniu od białek RGA są mniej wrażliwe na GA; hamują kiełkowanie nasion, wzrost wegetatywny i indukcję kwitnienia
	RGA syn. GRS (<i>GAI-Related Sequence</i>), RGA1 (<i>Restoration of Growth on Ammonia 1</i>), AtGRAS-10	587 AA; spośród wszystkich białek DELLA są najbardziej wrażliwe na aplikację egzogennych GA, osłabienie transportu auksyn opóźnia ich degradację indukowaną przez GA; hamują kiełkowanie nasion, wzrost wegetatywny, indukcję kwitnienia oraz rozwój kwiatu
	RGL1 syn. AtGRAS-9	511 AA; regulują rozwój kwiatu, uczestniczą w kiełkowaniu nasion oraz w rozwoju załążka i pylnika
	RGL2 syn. SCL19 (<i>SCarecrow-Like protein 19</i>), AtGRAS-15	547 AA; funkcjonują jako główne represory w procesie kiełkowania nasion, regulują rozwój kwiatu (płatki, pręciki, pylniki)
	RGL3 syn. AtGRAS-27	523 AA, nieznana funkcja
<i>Oryza sativa</i>	SLR1 syn. OsGAI	625 AA
<i>Triticum aestivum</i>	RHT1 (<i>Reduced Height protein 1</i>)	623 AA
<i>Zea mays</i>	D8 (<i>Dwarf-8</i>)	630 AA
<i>Vitis vinifera</i>	VvGAI1	590 AA
<i>Hordeum vulgare</i>	SLN1 (<i>SLender 1</i>)	618 AA

AA – aminokwasy

Najwcześniej poznanymi czynnikami transkrypcyjnymi oddziałującymi z białkami DELLA są białka GAMyb, choć należy zaznaczyć, że ich funkcjonowanie budzi do tej pory wiele wątpliwości (15). Aktywują one ekspresję genów enzymów amylolitycznych w komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż oraz genów związanych z powstawaniem i rozwojem kwiatów zarówno u zbóż [31], jak i u *A. thaliana* [45]. Spośród kilku *GAMyb* znajdujących się w genomie *A. thaliana*, największą homologię do tego typu genów z ziarniaków zbóż wykazują *AtGAMyb33* i *AtGMYb65*. Wspólną cechą białek GAMyb jest obecność charakterystycznej domeny DBD, złożonej z dwóch fragmentów R2 i R3. W obrębie każdego fragmentu zawarte są trzy motywy tworzące helisy, z których po dwie z każdego fragmentu uczestniczą w rozpoznawaniu specyficznych sekwencji DNA, określanych jako GARE (ang. *Gibberellic Acid Response Element*). Sekwencje GARE złożone są z 21 nukleotydów i znajdują się w promotorach większości genów odpowiedzi na giberelinę [65]. Analiza funkcjonalna wykazała, że sekwencja GARE jest też istotna z punktu widzenia interakcji giberelin i kwasu abscysynowego.

Innymi niezwykle ważnymi czynnikami transkrypcyjnymi, których aktywność jest regulowana przez DELLA są białka PIF (ang. *Phytochrome Interacting Factors*) [9, 16], należące do rodziny czynników transkrypcyjnych negatywnie regulujących różne aspekty zależnego od światła rozwoju siewek. Białka PIF hamują kiełkowanie

[51], stymulują wydłużanie hypokotyła [50] i kwitnienie oraz kontrolują biosyntezę chlorofilu [23]. Mają one trzy konserwatywne domeny: domenę APB, za pomocą której mogą oddziaływać z fitochromem, domenę DBD oraz domenę bHLH, która bierze udział w interakcjach białko-białko. Po raz pierwszy białka PIF zostały zidentyfikowane jako elementy szlaku sygnałowego fitochromu B. W ciemności wiążą się one z sekwencją G (ang. *G-box*) znajdującą się w promotorach genów związanych ze wzrostem siewek. Przekształcenie na świetle fitochromu do aktywnej formy P_{fr} powoduje jego transport do jądra i połączenie z białkami PIF (m.in. PIF3 i PIF4) [3]. Wywołuje to szybką degradację tych białek w proteasomach i w rezultacie zahamowanie transkrypcji kontrolowanych przez nie genów [50, 58]. Pod nieobecność giberelin białka DELLA wiążą się z białkami PIF (PIF3, 4, 5), przeciwdziałając wiązaniu do DNA. Przy braku światła dochodzi do wzrostu poziomu giberelin w komórkach, co pociąga za sobą aktywację proteolitycznej degradacji białek DELLA, a tym samym uwolnienie białek PIF i aktywowanie procesów etiolowanego wzrostu siewek [9, 16, 57].

Białka DELLA nie mają wyraźnej domeny oddziałującej z DNA, wydaje się jednak, że mogą wpływać również bezpośrednio na transkrypcję genów, tak jak inne białka z nadrodziny GRAS, np. SHR (ang. *SHort-Root*) lub SCR (ang. *Scarecrow*) [40]. W tych przypadkach białka DELLA zachowują się jak aktywatory transkrypcji. Do genów aktywowanych przez białka DELLA należą między innymi te, których produkty białkowe katalizują biosyntezę giberelin (*GA20ox*, *GA3ox*) oraz gen *XERICO*, którego produkt białkowy związany jest z akumulacją ABA. Aktywowana giberelinami proteolityczna degradacja białek DELLA prowadzi do zahamowania aktywności tych genów, a tym samym zatrzymania syntezy giberelin i akumulacji ABA. Co więcej, powoduje to także aktywację transkrypcji genu *GA2ox*, którego białkowy produkt odpowiedzialny jest za katabolizm giberelin. Aktywacja i deaktywacja genów *GA20ox*, *GA3ox* i *GA2ox* z udziałem białek DELLA jest elementem mechanizmu kontrolującego homeostazę giberelin [78].

2.3.2. Wiązanie białek DELLA do kompleksu ligazy SCF^{SLY1/GID2}

Początkowo zakładano, że przyłączanie białek DELLA do kompleksu ligazy ubikwitynowo-białkowej jest spowodowane ich fosforylacją, glikozylacją lub hydroksylacją [36]. Ostatecznie jednak wykazano, że modyfikacje te nie mają ścisłego związku z proteolizą tych białek [28]. Warunkiem koniecznym i wystarczającym do degradacji białek DELLA jest ich połączenie z kompleksem GA-GID1. Powstały agregat GA-GID1-DELLA jest następnie rozpoznawany przez białko FBP kompleksu ligazy SCF^{SLY1/GID2}. Prowadzi to do szybkiego obniżenia poziomu białek DELLA, co umożliwia ekspresję genów odpowiedzi na gibereliny [25].

Białka z kasetą F kompleksu SCF^{SLY1/GID2}. Białkami kompleksu ligazy, biorącymi udział w oddziaływaniach z białkami DELLA, są u *A. thaliana* SLY1 (ang. *SLEEPY 1*) i jego homolog SNE (ang. *SNEEZY*), a u ryżu GID2 (ang. *Gibberellin Insensitive Dwarf 2*). Na N-końcu tych białek znajduje się domena F, za pomocą której oddziałują bezpośrednio z SKP1/ASK1 oraz pośrednio z pozostałymi składnikami kompleksu ligazy – kuliną i białkiem RBX1. Na C-końcu

wszystkich białek FBP, biorących udział w wiązaniu białek DELLA, znajduje się motyw LSL, uczestniczący w interakcjach między tymi białkami [77].

W odróżnieniu od białek FBP funkcjonujących w szlaku sygnałowym auksyn i jasmonianów, białka SLY1, SNE czy GID2, uczestniczące w szlaku sygnałowym giberelin, nie wykazują zdolności do wiązania cząsteczki hormonu. Receptorem giberelin jest w tym przypadku białko GID1.

GID1 – wewnątrzkomórkowy receptor giberelin. Odkrycie receptora GID1 u ryżu miało niezwykle istotne znaczenie dla zrozumienia funkcjonowania szlaku percepcji i transdukcji sygnału giberelinowego [48, 66]. GID1 koduje białko o strukturze podobnej do zwierzęcych lipaz wrażliwych na hormony HSL (ang. *Hormone Sensitive Lipase*) pozbawione jednak aktywności tych enzymów, ponieważ ma tylko dwie z trzech reszt aminokwasowych istotnych dla ich aktywności katalitycznej. W cząsteczce GID1 występują dwa konserwowane motywy HGG oraz GX SXG, które są niezbędne do tworzenia kompleksu GA-GID1. Szybkość wiązania GA do białka GID1 wzrasta wyraźnie w obecności polipeptydu SLR1, a kluczowe dla oddziaływania tych białek ze sobą są domeny DELLA/TVHYNP białka SLR1 oraz motyw HSL białka GID1. GID1 występuje przede wszystkim w jądrze i nie stwierdza się zmiany jego lokalizacji w zależności od stężenia fitohormonu [66].

U *A. thaliana* zidentyfikowano trzy geny *AtGID1a*, *AtGID1b* i *AtGID1c* [20, 48, 66], których białkowe produkty pełnią podobną funkcję jak GID1 u ryżu. Zależna od GA interakcja pomiędzy białkami *AtGID1* i białkami *AtDELLA* u *A. thaliana* może zachodzić na wiele sposobów z różnym powinowactwem w poszczególnych kombinacjach [20, 73]. Zrozumienie znaczenia tych interakcji wymaga dalszych badań.

2.3.3. Porównanie szlaku giberelinowego ze szlakami auksyn i jasmonianów

Szlak sygnałowy związany z działaniem giberelin ma podobny przebieg do szlaku auksynowego i jasmonianowego, występują jednak pewne różnice. Do związania hormonu i aktywacji kompleksu ligazy ubikwityny nie wystarcza jedynie białko FBP, jak w przypadku TIR1 i COI1, a konieczny jest jeszcze dodatkowy czynnik GID1. Białko to po związaniu gibereliny przyłącza się do białka substratowego przeznaczonego do degradacji i dopiero razem wiążą się do białka FBP (np. GID2) kompleksu ligazy. Różnica w mechanizmie działania hormonów polega również na nieco odmiennym funkcjonowaniu białek represorowych. Kiedy AUX/IAA oraz JAZ działają jedynie jako białka inaktywujące czynniki transkrypcyjne, białka DELLA mogą również wpływać na transkrypcję przez bezpośrednie wiązanie się z DNA. W przypadku szlaku giberelinowego nie obserwuje się również istnienia pętli negatywnego sprzężenia biosyntezy białek represorowych. Wprawdzie w kielkujących nasionach ekspresja genów *GAI* i *RGA* aktywowana jest przez działający w szlaku fitochromowym czynnik transkrypcyjny PIL5 (ang. *Phytochrome Interacting factor3-Like 5*) [51], to jednak nie wiadomo, czy jego aktywność regulowana jest przez białka DELLA. Podobnie jak w przypadku szlaku auksynowego, w szlaku GA funkcjonuje sprzężenie zwrotne, regulujące poziom hormonu. Ponieważ białka DELLA hamują aktywność genów *GA2ox* związanych z inaktywacją giberelin to indukowana przez GA degradacja białek DELLA powoduje ich aktywację. Jednakże kontrola homeostazy giberelin jest znacznie bardziej złożona i zależna od wielu czynników, m.in. światła, czynników stresowych i rodzaju tkanki (75).

W przypadku giberelin do tej pory nic nie wiadomo na temat funkcjonowania szlaku rubinytacji kuliny przez białko RUB1 oraz udziału kompleksu COP9 w procesie derubinytacji. Zostało to natomiast potwierdzone w przypadku auksyn i jasmonianów.

3. PODSUMOWANIE

Proteasomalna degradacja białek z udziałem ubikwityny odgrywa bardzo ważną rolę w regulacji przebiegu większości najistotniejszych procesów fizjologicznych zarówno u zwierząt, jak i u roślin. Odkrycie i opisanie tego zjawiska zostało uhonorowane w 2004 r. nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Jednak funkcjonowanie kompleksu ligazy ubikwitynowo-białkowej, jako układu receptorowego istotnych substancji regulatorowych, jakimi są u roślin auksyny, gibereliny i jasmoniany, jest zupełnie nowym sposobem przekazywania informacji w komórkach. Z uwagi na fakt, że w następstwie proteolizy białek dochodzi do znaczących zmian w poziomie ekspresji genów, a w konsekwencji do zmian we wzroście i rozwoju, ten sposób przekazywania sygnałów musi zostać uznany za równorzędny z dotychczas znanymi.

Aktywacja kompleksu ligazy ubikwitynowo-białkowej u roślin ma także miejsce w przekazywaniu sygnałów światła niebieskiego. Receptory tego światła – białka z rodziny ZTL (ang. *ZEITLUPE*) należą do białek zawierających kasetę F (FBP) i są składnikiem kompleksu ligazy ubikwityny SCF^{ZTL}. Kompleks SCF^{ZTL} uczestniczy w kontroli poziomu białek funkcjonujących w powstawaniu rytmów okołodobowych w komórkach roślinnych. U zwierząt w podobny sposób funkcjonuje ligaza ubikwityny CUL4B^{AhR} [52], która jest układem receptorowym węglowodorów aromatycznych (AhR). Ponieważ zarówno u roślin, jak i u zwierząt funkcjonują jeszcze setki innych ligaz ubikwitynowych, można spodziewać się, że podobnych szlaków sygnałowych istnieje więcej.

Opisane w niniejszej pracy mechanizmy przekazywania sygnałów hormonów roślinnych są jeszcze dalekie od pełnego zrozumienia, jednak ich ważność nie podlega żadnej wątpliwości.

LITERATURA

- [1] ACHARD P, GENSHIK P. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* 2008; **60**: 1085–1092.
- [2] ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Podstawy biologii komórki t. 2. Przekł. pod red. Hanny Kmity i Przemysława Wojtaszka. PWN, 2005.
- [3] AL-SADY B, NI W, KIRCHER S, SCHAFER E, QUAIL PH. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome mediated degradation. *Mol Cell* 2006; **4**: 439–446.
- [4] ALVEY L, HARBERD NP. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? *Physiol Plant* 2005; **123**: 153–160.
- [5] BADESCU GO, NAPIER RM. Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 217–223.
- [6] BARAŃSKA J. Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej. *Post Biochem* 1998; **44**: 201–207.
- [7] CHINI A, FONSECA S, FERNANDEZ G, ADIE B, CHICO JM, LORENZO O, GARCIA-CASADO G, LOPEZ-VIDRIERO I, LOZANO FM, PONCE MR, MICOL JL, SOLANO R. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 2007; **448**: 666–671.
- [8] CHUNG HS, KOO AJK, GAO X, JAYANTY S, THINES B, JONES AD, HOWE GA. Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 2008; **146**: 952–964.

- [9] de LUCAS M, DAVIERE JM, RODRIGUEZ-FALCON M, PONTIN M, IGLESIAS-PEDRAZ JM, LORRAIN S, FANKHAUSER C, BLAZQUEZ MA, TITARENKO E, PRAT S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 2008; **451**: 480–484.
- [10] DELKER C, RASCHKE A, QUINT M. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta* 2008; **227**: 929–941.
- [11] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 441–445.
- [12] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, WEIJERS D, LECHNER E, YAMADA M, HOBBIE L, EHRLSMANN JS, JURGENS G, ESTELLE M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Dev Cell* 2005; **9**: 109–119.
- [13] DOMBRECHT B, XUE GP, SPRAGUE SJ, KIRKEGAARD JA, ROSS JJ, REID JB, FITT GP, SEWELAM N, SCHENK PM, MANNERS JM, KAZAN K. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 2225–2245.
- [14] ECKARDT NA. MicroRNAs regulate auxin homeostasis and plant development. *Plant Cell* 2005; **17**: 1335–1338.
- [15] FAN LM, FENG XY, WANG Y, DENG XW. Gibberellin signal transduction in rice. *J Integr Plant Biol* 2007; **49**: 731–741.
- [16] FENG S, MARTINEZ C, GUSMAROLI G, WANG Y, ZHOU J, WANG F, CHEN L, YU L, IGLESIAS-PEDRAZ JM, KIRCHER S, SCHAFER E, FU X, FAN LM, DENG XW. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 2008; **451**: 475–479.
- [17] FLEET C, SUN T. A DELLA cate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 77–85.
- [18] FRANKOWSKI K, KĘSY J, WOJCIECHOWSKI W, KOPCEWICZ J. Light- and IAA-regulated ACC synthase gene (PnACS) from *Pharbitis nil* and its possible role in IAA-mediated flower inhibition. *J Plant Physiol* 2008; **166**: 192–202.
- [19] FRANKOWSKI K, ŚWIEŻAWSKA B, WILMOWICZ E, KĘSY J, KOPCEWICZ J. Szlak sygnałowy kwasu jasmonowego – nowe informacje. *Post Biochem* 2009; **55**: 337–341.
- [20] GRIFFITHS J, MURASE K, RIEU I, Zentella R, ZHANG ZL, POWERS SJ, GONG F, PHILLIPS AL, HEDDEN P, SUN TP, THOMAS SG. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; **18**: 3399–3414.
- [21] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Zależna od ubikwityny degradacja białek. Nagroda Nobla z chemii w 2004 roku. *Kosmos – problemy nauk biologicznych* 2005; **54**: 133–148.
- [22] GUILFOYLE TJ, HAGEN G. Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 453–460.
- [23] HARTWECK LM. Gibberellin signaling. *Planta* 2008; **229**: 1–13.
- [24] HAYASHI K, TAN X, ZHENG N, HATATE T, KIMURA Y, KEPINSKI S, NOZAKI H. Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 5632–5637.
- [25] HIRANO K, UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M. GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 192–199.
- [26] HO MS, OU C, CHAN Y, CHIEN C-T, PI H. The utility F-box for protein destruction. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 1977–2000.
- [27] HOTTON SK, CALLIS J. Regulation of cullin RING ligases. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 467–489.
- [28] ITOH H, SASAKI A, UEGUCHI-TANAKA M, ISHIYAMA K, KOBAYASHI M, HASEGAWA Y, MINAMI E, ASHIKARI M, MATSUOKA M. Dissection of the phosphorylation of rice DELLA protein, SLENDER RICE1. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1392–1399.
- [29] JAIN M, KAUR N, GARG R, THAKUR JK, TYAGIAK, KHURANA JP. Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct Integr Genomics* 2006; **6**: 47–59.
- [30] JIANG C, FU X. GA action: turning on de-DELLA repressing signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 461–465.
- [31] KANEKO M, INUKAI Y, UEGUCHI-TANAKA M, ITOH H, IZAWA T, KOBAYASHI Y, HATTORI T, MIYAO A, HIROCHIKA H, ASHIKARI M, MATSUOKA M. Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair α -amylase expression in aleurone and flower development. *Plant Cell* 2004; **16**: 33–44.
- [32] KATSIR L, CHUNG HS, KOO AJK, HOWE GA. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr Opin Plant Biol* 2008; **11**: 428–435.
- [33] KATSIR L, SCHILLMILLER AL, STASWICK PE, HE SY, HOWE GA. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 7100–7105.

- [34] KAZAN K, MANNERS JM. Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol* 2008; **146**: 1459–1468.
- [35] KEPINSKI S, LEYSER O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 446–451.
- [36] KOWALCZYK S, HADOWSKAE, PIEKARSKA A. Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych. *Post Biochem* 2005; **51**: 171–187.
- [37] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Gibereliny – percepcja i transdukcja sygnału. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 397–423.
- [38] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Receptory etyleny, cytokinin i brasinosteroidów – transmembranowymi kinazami białkowymi? *Post Biol Kom* 1999; **26**: 3–32.
- [39] KRÓL P, KĘPCZYŃSKA E. Rola jasmonianów w indukowanej systemicznej odporności roślin przeciwko patogenom. *Biotechnologia* 2008; **80**: 122–135.
- [40] LEVESQUE MP, VERNOUX T, BUSH W, CUI H, WANG JY, BLILOU I, HASSAN H, NAKAJIMA K, MATSUMOTO N, LOHMANN JU, SCHERES B, BENFEY PN. Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 2006; **4**: 739–752.
- [41] LEWAK S. Hormony roślinne, kierunki badań ostatniego dziesięciolecia. *Kosmos* 1995; **44**: 601–622.
- [42] LI H, CHENG Y, MURPHY A, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Constitutive repression and activation of auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2009; **149**: 1277–1288.
- [43] LORENZO O, CHICO JM, SANCHEZ-SERRANO JJ, SOLANO R. JASMONATE-INSENSITIVE 1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **16**: 1938–1950.
- [44] LORENZO O, SOLANO R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 532–540.
- [45] MILLAR AA, GUBLER F. The *Arabidopsis* GAMYB-like genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* 2005; **17**: 705–721.
- [46] MUR LA, KENTON P, ATZORN R, MIERSCH O, WASTERNAK C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 2006; **140**: 249–262.
- [47] MUTASA-GOTTGENS E, HEDDEN P. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J Exp Bot* 2009; **60**: 1979–1989.
- [48] NAKAJIMA M, SHIMADAA, TAKASHI Y, KIM YC, PARK SH, UEGUCHI-TANAKA M, SUZUKI H, KATOH E, IUCHI S, KOBAYASHI M, MAEDA T, MATSUOKA M, YAMAGUCHI I. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* 2006; **46**: 880–889.
- [49] NANDI D, TAHILIANI P, KUMAR A, CHANDU D. The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci* 2006; **31**: 137–155.
- [50] NOZUE K, COVINGTON M, 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.
- [51] OH E, YAMAGUCHI S, HU J, YUDUKE 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.
- [52] OHTAKE F, BABAA, TAKADA I, OKADA M, IWASAKI K, MIKI H, TAKAHASHI S, KOUZMENKO A, NOHARA K, CHIBA T. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 2007; **446**: 562–566.
- [53] OSTROWSKI M, JAKUBOWSKA A. Receptory auksyn. *Post Biol Kom* 2008; **35**: 79–95.
- [54] PETROSKI MD, DESHAIES RJ. Function and regulation of Cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 9–20.
- [55] QUINT M, GRAY WM. Auxin signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 448–453.
- [56] SATO A, YAMAMOTO KT. What's the physiological role of domain II-less Aux/IAA proteins? *Plant Signal Behav* 2008; **3**: 496–497.
- [57] SCHWECHHEIMER C, WILLIGE BC. Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* 2009; **12**: 57–62.
- [58] SHEN Y, KHANNA R, CARLE CM, QUAIL PH. Phytochrome induces rapid PIF phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol* 2007; **145**: 1043–1051.
- [59] SPARTZ AK, GRAY WM. Plant hormone receptors: new perception. *Genes Dev* 2008; **22**: 2139–2148.
- [60] STASWICK PE. JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 66–71.

- [61] STONE SL, CALLIS J. Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 624–632.
- [62] SZEMENYEI H, HANNON M, LONG JA. TOPLESS mediates IAA12/BODENLOS transcriptional repression during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Science* 2008; **319**: 1384–1386.
- [63] TAN X, CALDERON-VILLALOBOS L, SHARON M, ZHENG CH, ROBINSON CV, ESTELLE M, ZHENG N. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 2007; **446**: 640–645.
- [64] THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, NIU Y, MANDAOKARA, LIU G, NOMURA K, HE SY, HOWE GA, BROWSE J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* 2007; **448**: 661–665.
- [65] TSUJI H, AYA K, UEGUCHI-TANAKA M, SHIMADA Y, NAKAZONO M, WATANABE R, NISHIZAWA NK, GOMI K, SHIMADAA, KITANO H, ASHIKARI M, MATSUOKA M. GAMBYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J* 2006; **47**: 427–444.
- [66] UEGUCHI-TANAKA M, ASHIKARI M, NAKAJIMA M, ITOH H, KATOH E, KOBAYASHI M, CHOW TY, HSING Y, KITANO H, YAMAGUCHI I, MATSUOKA M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 2005; **437**: 693–698.
- [67] UEGUCHI-TANAKA M, NAKAJIMA M, KATOH E, OHMIYA H, ASANO K, SAJI S, HONGYU X, ASHIKARI M, KITANO H, YAMAGUCHI I, MATSUOKA M. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* 2007; **19**: 2140–2155.
- [68] VANHOLME B, GRUNEWALD W, BATEMAN A, KOHCHIT, GHEYSEN G. The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Sci* 2007; **12**: 239–244.
- [69] WASĄG P, KOWALCZYK S. Węwnątrzkomórkowe i błonowe receptory kwasu abscysynowego. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 3–22.
- [70] WASTERNAK C. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 2007; **100**: 681–697.
- [71] WEI HB, CUI BM, REN YL, LI JH, LIAO WB, XU NF, PENG M. Research progresses on auxin response factors. *J Integrat Plant Biol* 2006; **48**: 622–627.
- [72] WEISS D, ORI N. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol* 2007; **144**: 1240–1246.
- [73] WILLIGE BC, GHOSH S, NILL C, ZOURELIDOU M, DOHMANN EMN, MAIER A, SCHWECHHEIMER C. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF 1 a gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 1209–1220.
- [74] WOODWARD AW, BARTEL B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 2005; **95**: 707–735.
- [75] YAMAGUCHI S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 225–251.
- [76] YAN Y, STOLZ S, CHETELAT A, REYMOND P, PAGNI M, DUBUGNON L, FARMER EE. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 2007; **19**: 2470–2483.
- [77] YU H, WU J, XU N, PENG M. Roles of F-box proteins in plant hormone responses. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007; **39**: 915–922.
- [78] ZENTELLA R, ZHANG Z, PARK M, THOMAS SG, ENDO A, MURASE K, FLEET CM, JIKUMARU Y, NAMBARA E, KAMIYA Y. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 3037–3057.
- [79] ZHANG W, ITO H, QUINT M, HUANG H, NOEL LD, GRAY WM. Genetic analysis of CAND1-CUL1 interactions in *Arabidopsis* supports a role for CAND1-mediated cycling of the SCF^{TIR1} complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 8470–8475.
- [80] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 27.08. 2009 r.

Przyjęto: 03.01. 20210 r.

dr Jacek Kęsy,

Uniwersytet Mikołaja Kopernika

ul. św. Józefa 7C m 11, 87-100 Toruń

e-mail: kesy@biol.uni.torun.pl