KINAZY BIAŁKOWE W SZLAKACH SYGNAŁOWYCH HORMONÓW ROŚLINNYCH

PROTEIN KINASES IN PLANT HORMONE SIGNALING PATHWAYS

Katarzyna MARCINIAK, Emilia WILMOWICZ, Agata KUĆKO,
Jacek KĘSY, Jan KOPCEWICZ

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Wielokomórkowe organizmy wyższe składają się ze współpracujących ze sobą licznych zespołów komórek odpowiadających na różnorodne bodźce zewnętrzne i wewnętrzne. Zarówno u roślin, jak i zwierząt, sygnalizacja komórkowa rozpoczyna się od związania cząsteczki liganda z wysoce specyficznym receptorem błonowym lub wewnątrzkomórkowym, po czym następuje transdukcja sygnału, a efektem końcowym jest przeważnie zmiana aktywności transkrypcyjnej pierwotnych genów odpowiedzi na dany czynnik. Skutkuje to pojawieniem się określonej odpowiedzi fizjologicznej. W szlakach sygnałowych czterech spośród siedmiu podstawowych grup hormonów roślinnych stwierdzono występowanie kinaz białkowych, będących jedną z największych i najlepiej poznanych rodzin białek u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Cechą charakterystyczną kinaz jest zdolność do fosforylacji, która polega na przeniesieniu grupy fosforanowej pochodzącej najczęściej z wysokoenergetycznego związku ATP, na własną cząsteczkę w ramach autofosforylacji, lub na określone reszty aminokwasowe (seryna, treonina, tyrozyna, histydyna) różnorodnych białek. Zmienia to aktywność danego białka, jego lokalizację subkomórkową bądź powinowactwo do innych polipeptydów. W przypadku brasinosteroidów (BR), receptor oraz koreceptor zlokalizowane są w błonie komórkowej i wykazują cechy dwufunkcyjnych kinaz serynowo-treoninowych i tyrozynowych. Receptory cytokinin (CK) i etylenu (ET), mające cechy hybrydowych kinaz histydynowych, zlokalizowane są najprawdopodobniej w błonach retikulum endoplazmatycznego, natomiast kompleks receptorowy wiążący kwas abscysynowy (ABA) nie jest kinazą, ale w kaskadzie dalszych zdarzeń występuje kinaza serynowo-treoninowa. Każdy z inicjowanych szlaków osobno, ale przede wszystkim poprzez sieć wzajemnych oddziaływań, warunkuje prawidłowy wzrost i rozwój roślin na wszystkich etapach ontogenezy. Roślinne szlaki sygnalizacji hormonalnej zostały już w znacznej mierze opisane w polskich czasopismach naukowych [21, 27, 91, 142, 143]. Ciągły postęp w dziedzinie biologii molekularnej skłania jednak do aktualizacji danych i ich podsumowania. Głównym celem niniejszej pracy jest więc kompleksowe przedstawienie zagadnienia oraz zwrócenie uwagi na występujące różnice i podobieństwa, a przede wszystkim podkreślenie istotnej roli kinaz białkowych w każdym ze szlaków sygnalnych. Zainteresowanym Czy-

telnikom polecamy również artykuły dotyczące ligaz ubikwitynowych, których aktywacja jest istotą funkcjonowania trzech pozostałych hormonów – auksyn, jasmonianów (JA) i giberelin (GA) [68, 69].

Słowa kluczowe: kinazy białkowe, hormony roślinne, percepcja i transdukcja sygnału

Summary: Higher multicellular organisms are composed of a number of cooperating groups of cells corresponding to the various internal and external stimuli. In both plants and animals, cell signaling starts to bind ligand molecules with highly specific membrane or intracellular receptor, followed by signal transduction, and the end result is usually a change of the transcriptional activity of primary genes. This leads to the appearance of a particular physiological response. In the signaling pathways four of the seven main groups of plant hormones have been identified protein kinases, which are one of the largest and best known families of proteins in prokaryotic and eukaryotic organisms. A characteristic feature of kinases is the ability to phosphorylate, which consists of the transfer of a phosphate group, usually derived from high-energy ATP compound, on its own molecule in the autophosphorylation, or to specific amino acid residues (serine, threonine, tyrosine, histidine) of various proteins. This changes the activity of the protein, the subcellular localization or affinity to other polypeptides. In the case of brassinosteroids (BR), receptor and coreceptor are located in the cell membrane and exhibit characteristics bifunctional serine-threonine and tyrosine kinases. Cytokinins (CK) and ethylene (ET) receptors, having characteristics of hybrid histidine kinases, are probably located in the endoplasmic reticulum membrane, while the receptor complex binding abscisic acid (ABA) is not a kinase, but downstream in the cascade of events occurs serine-threonine kinase. Each of the initiated pathways separately, but primarily through a network of interactions, determines the proper growth and development of plants in all stages of ontogenesis. The plant hormone signaling pathways have been largely described in the Polish scientific journals [21, 27, 91, 142, 143]. However, continuous advances in molecular biology tends to update the data and summary. The main objective of this paper is therefore to present complex issues and to highlight the differences and similarities, and most of all to emphasize the important role of protein kinases in each of the signaling pathways. Interested Readers we recommend also articles on ubiquitin ligases, which activation is the essence of the functioning of the three other hormones – auxin, jasmonates (JAs) and gibberellins (GAs) [68, 69].

Key words: protein kinases, plant hormones, perception and signal transduction

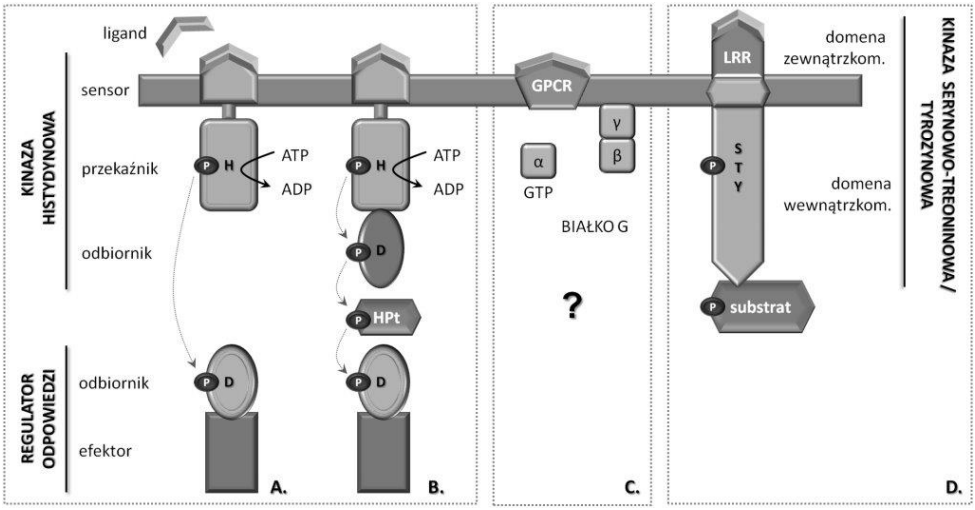
WSTĘP

Fitohormony to drobnocząsteczkowe substancje organiczne wytwarzane przez komórki różnych tkanek roślinnych w celu koordynowania wszystkich procesów wzrostowo-rozwojowych [14]. Syntetyzowane są w niskich stężeniach (około 10^{-6} mol/l) w określonych częściach rośliny, a następnie transportowane do miejsc gdzie wykazują aktywność fizjologiczną, stąd określa się je jako związki oligodynamiczne [5]. W chwili obecnej wyróżniamy siedem klasycznych grup fitohormonów tj. auksyny, cytokininy (ang. *Cytokinins*, CK), gibereliny (ang. *Gibberellins*, GA), kwas abscysynowy (ang. *Abscisic Acid*, ABA), etylen (ang. *Ethylene*, ET), jasmoniany (ang. *Jasmonates*, JA) oraz brasinosteroidy (ang. *Brasinosteroids*, BR). Istnieją także związki, które pretendują do tego miana, m.in. kwas salicylowy (ang.

Salicylic Acid , SA) czy strigolaktony (ang. *Strigolactones*, SL). Wszystkie hormony, posiadając odrębne receptory wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowe, regulują aktywność transkrypcyjną określonego zestawu genów, co wskazuje, że działanie każdego z nich jest wysoce specyficzne. Często jednak skutki działania różnych hormonów nakładają się na siebie, utrudniając wskazanie reakcji, która byłaby charakterystyczna wyłącznie dla jednego z nich. Regulatorowa sieć wiążąca indywidualne szlaki jest bardzo skomplikowana, ponieważ interakcje hormonalne mogą zależeć od organu, stadium rozwojowego czy warunków środowiskowych. Dodatkowo fitohormony działają na zasadzie równowagi, co oznacza, iż wszelkie zakłócenia w biosyntezie i/lub funkcjonowaniu jednego z nich natychmiast aktywują lub dezaktywują syntezę czy szlak przekazywania sygnału drugiego. Analizy mutantów dostarczyły w ostatnim czasie cennego wkładu w poznanie molekularnych mechanizmów działania poszczególnych klas hormonów, co przyczyniło się w znacznej mierze do rozwikłania złożonych sieci ich wzajemnych oddziaływań. Okazało się, że istotą funkcjonowania szlaków sygnalizacyjnych trzech grup hormonów – auksyn, GA i JA, a także SL – jest aktywacja ligaz ubikwitynowych [69, 70]. Pojawienie się bioaktywnych cząsteczek prowadzi do uruchomienia odpowiedniej ligazy E3 typu SCF i w konsekwencji do proteolitycznej degradacji białek represorowych uczestniczących w regulacji aktywności genów docelowych. Pozostałe hormony działają natomiast poprzez kinazy białkowe. W przypadku BR mówimy o jednoskładnikowym układzie transdukcji sygnału, w którym główną rolę odgrywa transbłonowa kinaza serynowo-treoninowa. W przypadku CK i ET mamy do czynienia z systemem dwuskładnikowym funkcjonującym z udziałem kinaz histydynowych i regulatorów odpowiedzi. Nieco inaczej wygląda szlak transdukcji sygnału ABA oparty o układ trzyskładnikowy, w który zaangażowane są receptory, fosfatazy białkowe oraz kinazy serynowo-treoninowe. Sygnalizacja hormonalna prowadzi głównie do regulacji ekspresji genów – odpowiedź wolna, ale istnieją także odpowiedzi szybkie związane np. z polaryzacją błony komórkowej i uruchomieniem odpowiednich kanałów jonowych. W chwili obecnej przypuszcza się, że hormony mogą działać w komórce poprzez więcej niż jeden mechanizm.

CHARAKTERYSTYKA KINAZ BIAŁKOWYCH

Kinazy to jedna z największych i najbardziej znaczących rodzin wśród wszystkich białek, a ich obecność została stwierdzona zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Szlaki przekazywania sygnałów, w których uczestniczą kinazy, są wysoce konserwowane w przebiegu ewolucji. Najprościej ujmując oddziaływanie kinaz z białkami polega na ich fosforylowaniu, czyli przyłączaniu grupy fosforanowej pochodzącej najczęściej z wysokoenergetycznego związku



RYCINA 1. Budowa i mechanizm działania błonowych receptorów roślinnych i białek z nimi współpracujących. (A) Dwuskładnikowy model przekazywania sygnału – kinaza histydynowa i regulator odpowiedzi; (B) Hybrydowa kinaza histydynowa, białko pomostowe HPt i regulator odpowiedzi; (C) Białka GPCR (GCR1, GCR2) i współdziałające z nimi białka G; (D) Jednoskładnikowy model przekazywania sygnału – dwufunkcyjna kinaza serynowo-treoninowo / tyrozynowa z motywem bogatym w powtórzenia leucyny (LRR). Szczegóły w tekście. Na podstawie [46, 58, 110], zmodyfikowane
FIGURE 1. Structure and mechanism of action of membrane bound receptors and collaborators proteins. (A) Two-component signal transduction model – histidine kinase and response regulator; (B) The hybrid histidine kinase, HPt intermediate protein and response regulator; (C) GPCR proteins (GCR1, GCR2) and associated G protein; (D) Single-component signal transduction model – bifunctional serine-threonine / tyrosine kinase with leucine-rich repeat (LRR) motif. Details in the text. According to [46, 58, 110], modified

ATP do różnych reszt aminokwasowych. Zmienia to aktywność białek docelowych, ich lokalizację subkomórkową bądź powinowactwo do innych białek [33]. Większość kinaz wykazuje również zdolność do autofosforylacji. Istotną część wszystkich rodzajów kinaz stanowią tzw. kinazy receptorowe RLK (ang. *Receptor-Like Kinases*). U zwierząt największą rodzinę receptorów zlokalizowanych w błonie komórkowej stanowią receptory o siedmiu helisach transbłonowych (receptory 7TM), współdziałające z białkami G, tzw. GPCR (ang. *G Protein Coupled Receptor*). Genom człowieka zawiera ok. 900 genów kodujących GPCR, a ponadto 17 genów *Gα*, 5 genów *Gβ* i co najmniej 12 genów *Gγ* heterotrimerycznych białek G [48]. Nieporównywalnie mniejsza jest liczba genów *GPCR* u roślin, bowiem genom rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) zawiera dwa geny *GCR1* i *GCR2*. Do niedawna uważano, że oba białka zaangażowane są w sygnalizację ABA [64, 88], jednak obecnie zweryfikowano ten pogląd, ponieważ nie potwierdzono swoistości wiązania tego fitohormonu z potencjalnymi receptorami [97]. Liczba genów kodu-

jących poszczególne podjednostki białek G u roślin jest także niewielka – genomy *A. thaliana* i ryżu (*Oryza sativa*) mają po jednym genie *Gα*, jednym *Gβ* i po dwa *Gγ* [48]. Pomimo tego, że w literaturze naukowej można znaleźć dane pośrednio wskazujące na funkcjonowanie w roślinach białek GPCR i heterotrimerycznych białek G [3] (ryc. 1C), to jednak w odbiorze sygnałów hormonalnych u roślin w znacznej mierze uczestniczą specyficzne białka błonowe, które pełnią swoje funkcje receptorowe poprzez aktywację domeny wewnątrzkomórkowej, wykazującej aktywność kinazy białkowej (ryc. 1ABD) [46].

Kinazy receptorowe są liczną rodziną białek transbłonowych rozpoznających różnorodne sygnały zewnątrzkomórkowe. Posiadają one charakterystyczną strukturę, która obejmuje N-końcową domenę zewnątrzkomórkową, C-końcową cytoplazmatyczną domenę kinazową oraz łączący obie domeny hydrofobowy fragment transbłonowy. Rozpoznanie i związanie liganda przez domenę zewnątrzkomórkową prowadzi do autofosforylacji domeny kinazowej, fosforylacji białka substratowego i przekazania sygnału do wnętrza komórki. Większość receptorowych kinaz białkowych zwierząt to kinazy tyrozynowe, tzw. RTK (ang. *Receptor Tyrosine Kinases*) wykazujące zdolność do autofosforylacji reszt tyrozynowych, choć znane są także przykłady receptorów zawierających motywy charakterystyczne dla kinaz serynowo/treoninowych [114]. Kinazy receptorowe roślin obejmują dwie grupy białek. Do pierwszej grupy należą receptory ET i CK homologiczne z kinazami histydynowymi (ang. *Histidine Kinases*, KH) bakterii funkcjonującymi w tzw. dwuskładnikowych układach przekazywania sygnału. Białka homologiczne z poszczególnymi elementami bakteryjnych systemów zidentyfikowano także w drożdżach *Neurospora crassa* i *Dictyostelium discoideum* [124]. Nie sprawdziły się jednak pierwotne przypuszczenia o powszechności występowania układów dwuskładnikowych u organizmów eukariotycznych, ponieważ okazało się, że genomy *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, myszy, a także człowieka nie zawierają genów KH [58]. Prototypowy dwuskładnikowy system regulacyjny tworzy para białek, w której jedno jest kinazą histydynową, a drugie regulatorem odpowiedzi (ang. *Response Regulator*, RR) (ryc. 1A). N-końcowa domena KH zlokalizowana jest po zewnętrznej stronie błony i odbiera odpowiedni bodziec. Percepcji sygnału przez domenę sensorową towarzyszy zmiana aktywności katalitycznej w wewnętrznej części kinazy określanej jako przekaźnik (ang. *transmitter*). Przekaźnik zbudowany jest z domeny odpowiedzialnej za dimeryzację, w obrębie której znajduje się kluczowy motyw H, oraz domeny katalitycznej zawierającej cztery konserwowane motywy N, G1, F, G2, uczestniczące w wiązaniu nukleotydu. Aktywacja kinazy prowadzi do autofosforylacji pierścienia imidazolowego histydyny i utworzenia wysokoenergetycznego wiązania fosforoamidowego. Przepływ informacji w takim systemie polega na przeniesieniu grupy fosforanowej z przekaźnika na resztę kwasu asparaginowego położoną w odbiorniku RR i utworzeniu wysokoenergetycznego wiązania acylofosforanowego. Niekiedy pojawiają się jednak dodatkowe moduły pomostowe

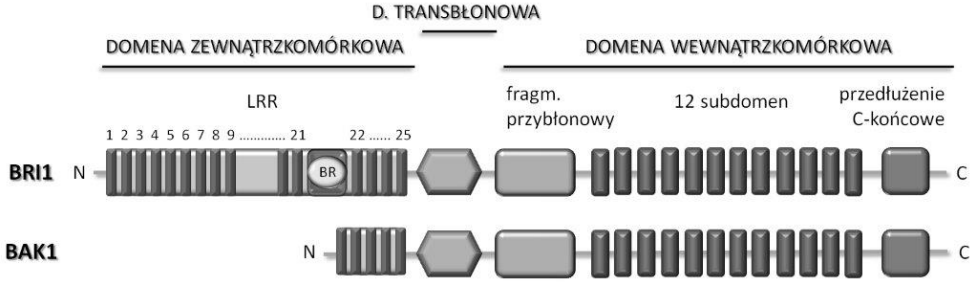
pośredniczące w przekazywaniu grupy fosforanowej pomiędzy KH a RR. Niektóre KH obok domeny przekaźnika zawierają w części C-końcowej domenę odbiornika i wtedy noszą nazwę hybrydowych kinaz histydynowych (ryc. 1B). Genomy organizmów eukariotycznych zawierają ponadto dodatkowe białka, które nie wykazują ani aktywności kinazowej ani fosfatazowej, a ich funkcja polega jedynie na przenoszeniu grupy fosforanowej z asparaginianu położonego w domenie odbiornika hybrydowej KH na resztę asparaginianu w RR. W organizmach prokariotycznych takie białka występują stosunkowo rzadko [58, 118].

Drugą grupę kinaz receptorowych stanowią białka posiadające cechy strukturalne podobne do receptorowych kinaz tyrozynowych zwierząt, ale różniące się od nich specyficznością domeny katalitycznej, która wykazuje przede wszystkim aktywność kinazy serynowo/treoninowej [113]. Podstawą podziału tego typu kinaz roślinnych na ponad 20 klas jest występowanie w obrębie zróżnicowanych domen zewnątrzkomórkowych charakterystycznych motywów białkowych. Motywy te są odpowiedzialne za oddziaływania z różnorodnymi cząsteczkami sygnałowymi: peptydami, białkami, glikoproteinami i cukrowcami będącymi składnikami ścian komórkowych roślin i mikroorganizmów. Niektóre motywy, np. LRR (ang. *Leucine-Rich Repeat*), EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*), TNFR (ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor*), LysM (ang. *Lysine Motif*) czy PAN (ang. *Plasminogen/Apple/Nematode protein domain*) są spotykane w białkach mikroorganizmów, roślin i zwierząt. Z kolei motyw L-lektyny lub DUF26 (ang. *Domain of Unknown Function 26*) występuje tylko w białkach roślin. Ogromna różnorodność kinaz receptorowych w części wiążącej ligand umożliwia komórkom odbiór wielu sygnałów pochodzących zarówno ze środowiska, jak i od innych komórek, co znajduje swoje odbicie w zróżnicowaniu funkcjonalnym RLK [46]. Największą i najlepiej poznaną klasą RLK są jednak białka zawierające w domenie receptorowej motyw LRR, które u *A. thaliana* stanowią ponad połowę receptorowych kinaz serynowo/treoninowych [128] (ryc. 1D). Motyw LRR, odpowiedzialny za oddziaływania typu białko -białko, jest spotykany w wielu białkach pełniących różnorodne funkcje, od białek bakterii po białka człowieka, jednak żadne z poznanych białek zwierząt z motywem LRR nie jest receptorową kinazą białkową [113]. Specyficzny dla kinaz receptorowych roślin motyw LRR składa się z 23-25 reszt aminokwasowych zawierających zachowane w ewolucji reszty leucyny [128]. Liczba tandemowo ułożonych powtórzeń LRR jest zmienna, a w niektórych białkach występują między nimi sekwencje dodatkowe tworzące tzw. wstawki, które mogą mieć kluczowe znaczenie dla wiązania ligandów. Na podstawie różnic w domenie zewnątrzkomórkowej kinazy LRR dzieli się na 13 oddzielnych podrodzin (LRR I-XIII) [46, 113]. Fenotypy mutantów pokazują, że kinazy receptorowe z motywem LRR funkcjonują w różnych procesach biologicznych związanych ze wzrostem i rozwojem roślin, a z punku widzenia tematu tej pracy są niezwykle istotne, ponieważ funkcjonują w szlaku sygnałowym

BR. W szlaku ABA także potwierdzono obecność kinaz serynowo-treoninowych, ale w tym układzie nie pełnią one roli receptora, a jedynie pozytywnego elementu kaskady zdarzeń zainicjowanej przez cząsteczki hormonu. Jak dotąd, nie zidentyfikowano u roślin typowej receptorowej kinazy tyrozynowej, a jedynie w kilku przypadkach stwierdzono podwójną specyficzność kinazową, polegającą na zdolności fosforylacji reszt seryny/treoniny i tyrozyny [101]. U roślin brakuje także małych białek G z rodziny Ras, które u zwierząt współdziałają z kinazami tyrozynowymi. Na obecnym etapie badań, za kinazy receptorowe można definitywnie uznać tylko nieliczne białka, ponieważ dla większości z nich nie są poznane ligandy [46].

BRASINOSTEROIDY

Pierwszym zidentyfikowanym przedstawicielem brasinosteroidów (BR) był brasinolid (BL) wyizolowany w 1979 r. z ziaren pyłku *Brassica napus*. Obecność hormonu stwierdzono u przedstawicieli zielenic, mszaków, paprotników, roślin nago- (3 rodziny) i okrytozalążkowych (16 rodzin u roślin dwu- i 5 u jednoliściennych) [27]. BR są polihydroksylowanymi pochodnymi steroli, których prawidłowy metabolizm zapewnia odpowiedni przebieg ontogenezy. Wpływają one na takie procesy fizjologiczne jak embriogeneza i kiełkowanie nasion, podziały i wydłużanie komórek, rozwój pylników, kiełkowanie mikrospor, wzrost łagiewki pyłkowej, różnicowanie elementów trachealnych, polaryzację błon komórkowych oraz starzenie i obumieranie liści. Modulują również odpowiedź roślin na szeroki zakres stresów środowiskowych, jak i regulują aktywność akwaporyn odpowiedzialnych za transbłonowy transport wody. Zmiany prowadzące do defektów w ich biosyntezie, powodują zaburzenia morfologii i architektury roślin [13].



RYCINA 2. Budowa białek tworzących kompleks wiążący BR u *A. thaliana* – receptor BRI1 i koreceptor BAK1. Szczegóły w tekście. Na podstawie [13, 110, 148], zmodyfikowane
FIGURE 2. The structure of proteins that form a complex which bind BRs in *A. thaliana* – BRI1 receptor and coreceptor BAK1. Details in the text. According to [13, 110, 148], modified

Wyniki najnowszych badań molekularno-genetycznych pozwoliły na stworzenie modelu szlaku transdukcji sygnału BR [13, 38, 111] (ryc. 2). Cząsteczki hormonu zostają związane na powierzchni błony komórkowej przez transbłonowy peptyd BRI1 (ang. *Brassinosteroid Insensitive 1*), mający cechy dwufunkcyjnej kinazy zdolnej do fosforylacji zarówno reszt seryny, treoniny, jak i tyrozyny [84]. Zidentyfikowano szereg genów kodujących enzymy katalizujące różne typy reakcji chemicznych, z których część funkcjonuje jako pozytywne, a część jako negatywne regulatory szlaku transdukcji sygnału. Związanie BR przez receptor powoduje dezaktywację inhibitorów sygnalizacji oraz akumulację czynników transkrypcyjnych prowadzącą do zmiany ekspresji genów warunkujących molekularną odpowiedź na obecność bioaktywnych cząsteczek hormonu.

KOMPLEKS RECEPTOROWY BRI1-BAK1

Kinaza BRI1 jest obecnie jedną z najlepiej poznanych roślinnych kinaz białkowych pełniących funkcję receptora błonowego [38, 111]. Razem z inną kinazą BAK1 (ang. *BRI1 Associated receptor Kinase 1*) tworzy kompleks wiążący BR [84, 85]. Gen *BRI1*, który zidentyfikowano analizując mutanta *A. thaliana* niewrażliwego na 24-epibrasinolid, koduje polipeptyd zawierający w domenie zewnątrzkomórkowej 25 powtórzeń LRR oraz 70-aminokwasową wstawkę pomiędzy 21 a 22 powtórzeniem (584-654 aa), której główną funkcją jest wiązanie fitohormonu [55] (ryc. 2). Wyniki badań krystalograficznych wykazały, że polipeptyd BRI1 w formie niezwiązanej z BR funkcjonuje jako monomer [111]. Struktura zewnątrzkomórkowej domeny przypomina superhelikalny solenoid we wnętrzu którego na wklęsłej powierzchni znajduje się wspomniana wstawka połączona z rdzeniem LRR dwoma długimi pętlami oraz dodatkowo stabilizowana mostkami dwusiarczkowymi [38]. Pomimo, że domena LRR białka BRI1 jest strukturalnie spokrewniona z domenami bakteryjnymi, a także roślinnymi domenami białek PGIP (ang. *Polygalacturonase Inhibiting Protein*) [15], to w budowie żadnej receptorowej kinazy białkowej nie stwierdzono występowania domeny insercyjnej we wnętrzu solenoidu. Na podstawie najnowszych doniesień zaproponowano następujący mechanizm wiązania BL do BRI1: łańcuch alkilowy cząsteczki hormonu dopasowuje się do małej, hydrofobowej kieszeni utworzonej przez reszty izoleucyny (Ile563), tryptofanu (Trp564), metioniny (Met657) i fenyloalaniny (Phe658) oraz przez dwie stabilne pętle łączące wstawkę z rdzeniem LRR [38]. Związanie cząsteczki BL najprawdopodobniej nie prowadzi do homodimeryzacji lub homooligomeryzacji w obrębie domeny LRR receptora BRI1 [38, 111]. Niemniej jednak nigdy nie zakwestionowano wyników sugerujących, że cytoplazmatyczna domena kinazowa BRI1 może tworzyć dimery [45], czy że homooligomery BRI1 są obecne w warunkach *in vivo* [37, 102, 139, 140]. W funkcjonowaniu receptora po stronie apoplastu, szczególnie w enzyma-

tycznej obróbce dodatkowych elementów uczestniczących we wczesnych etapach sygnalizacji, może również brać udział karboksypeptydaza serynowa – BRS1 (ang. *BRI1 Supressor 1*) [154].

Białko BRI1 zawiera pojedynczą domenę transbłonową, a po stronie cytoplazmy posiada krótki fragment przybłonowy, 12 subdomen charakterystycznych dla kinaz serynowo/treoninowych oraz krótkie przedłużenie C-końcowe (ryc. 2). Wyniki badań Wang'a i wsp. z 2005 i 2006 r. wskazują na fosforylację kilku reszt serynowych i treoninowych zarówno w regionie przybłonowym, w tzw. pętli aktywacyjnej oraz w przedłużeniu C-końcowym. Dowiedziono wówczas, że: (1) fosforylacja reszty treoniny w regionie przybłonowym hamuje aktywność katalityczną enzymu, (2) fosforylacja reszt aminokwasowych (Ser1044, Thr1049) w pętli aktywacyjnej warunkuje aktywność BRI1, a (3) fosforylacja w przedłużeniu C-końcowym przypuszczalnie znosi autohamowanie aktywności kinazowej [137, 139, 140]. Wyniki najnowszych badań wskazują natomiast na podwójną specyficzność kinazy BRI1, która może fosforylować reszty seryny, treoniny, a także tyrozyny. Zarówno *in vivo*, jak i *in vitr*o autofosforylacja dwóch reszt tyrozyny (Tyr831 i Tyr956), jest kluczowa dla funkcjonowania receptora i dalszego przekazywania informacji. Zlokalizowana w piątej subdomenie kinazowej, 956 reszta tyrozyny odpowiada za aktywność receptora, natomiast umiejscowiona we fragmencie przybłonowym 831 reszta tyrozyny nie pełni takiej funkcji. Wykazano zaś, że jest ona niezbędna w sygnalizacji BR *in vivo*, ponieważ wszelkie mutacje w jej obrębie skutkują zmianami fenotypowymi takimi jak większe liście roślin czy wcześniejsze zakwitanie [84].

W genie *AtBRI1* scharakteryzowano 15 mutacji zlokalizowanych w rejonach kodujących różne domeny receptora. Mutacja *bri1-5* dotyczy jednej z cystein w N-terminalnej części peptydu, a 4 mutacje *bri1-6, bri1-7, bri1-113* i *bri1-116* zlokalizowane są we fragmencie genu kodującym 70-aa wstawkę. Dwie mutacje *bri1-9* i *bri1-102* dotyczą domeny LRR poprzedzającej rejon transbłonowy, a pozostałe mutacje *bri1-1, bri1-8, bri1-101, bri1-104, bri1-107, bri1-108, bri1-115* i *bri1-117* zlokalizowane są we fragmencie genu kodującym domenę kinazową. Fenotypy tych mutantów charakteryzują się różnym poziomem karłowatości zależnym od mutacji oraz zmienioną morfologią liści, zredukowaną dominacją apikalną, deetiolacją podczas wzrostu w ciemności oraz wydłużonym cyklem rozwojowym i sterylnością. Cechą szczególną mutantów *bri1* odróżniającą je od mutantów z defektem w procesie biosyntezy BR jest niewrażliwość na działanie hormonu oraz ich akumulacja, co wiąże się z rolą receptorów BR w mechanizmie regulacji ich syntezy polegającą na negatywnym sprzężeniu zwrotnym [13, 27]. U *A. thaliana* występują trzy homologi genu *BRI1*, a mianowicie *BRL1-3* (ang. *BRI1-Like receptor kinase*), spośród których BRL1 i BRL3 kodują kinazy białkowe z 23 powtórzeniami LRR oraz 65-aminokwasową wstawką wiążącą BR [7]. Ortologi *BRI1* zidentyfikowano także w genomach grochu (*Pisum sativum*), ryżu, bawełny (*Gossypium hirsutum*) i jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [46]. U pomidora (*Solanum lycopersicum*) gen *tBRI1*

koduje kinazę identyczną z poznanym wcześniej białkiem SR160 funkcjonującym jako receptor systeminy, peptydu sygnałowego informującego organizm o zranieniach. Białko tBRI1/SR160 jest więc kinazą białkową o podwójnej funkcji receptorowej [121].

Po bezpośrednim związaniu cząsteczki BR przez receptor BRI1 następuje autofosforylacja kinazy powodująca asocjację i fosforylację drugiego elementu transbłonowego receptora, jakim jest polipeptyd BAK1 (ang. *BRI1-Associated receptor Kinase 1*) [63, 136] lub jeden z jego homologów: BKK1/SERK4 (ang. *BAK1-like*) czy SERK1 (ang. *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1*) [54]. Mutacje typu *knockout* w genie *BAK1* powodują fenotyp półkarłowaty, co wskazuje, że białkowe produkty genów należących do rodziny SERK wzajemnie się uzupełniają [27]. Transbłonowy heterodimer BRI1-BAK1 ma budowę asymetryczną, ponieważ polipeptyd BAK1 zawiera tylko pięć powtórzeń LRR (ryc. 2). Dodatkowo BAK1 nie ma 70-aa domeny wiążącej cząsteczki hormonu, w związku z tym BRI1 jest jedynym składnikiem kompleksu receptora, odpowiedzialnym za wiązanie bioaktywnych BR [50]. Oprócz udziału w szlaku sygnalizacji BR, BAK1 pełni również funkcję koreceptora dla białka FLS2 (ang. *Flagellin Sensitive 2*) będącego głównym receptorem flageliny [135]. Do niedawna uważano, że fosforylacja treoniny (Thr455) w pętli aktywacyjnej kinazy BAK1 jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania białka w szlaku przekazywania sygnału BR [139]. Ostatnio zaproponowano jednak nowy model wzajemnej transfosforylacji kompleksu BRI1/BAK1, który pokazuje, że tak jak w przypadku BRI1, również przy BAK1 zachodzi proces autofosforylacji C-końcowej reszty tyrozyny (Tyr610) zależnej od obecności BR [85]. Heterodimeryzacja peptydów BRI1 i BAK1 prowadzi również do endocytozy fragmentów plazmalemy zawierających te polipeptydy, co może stanowić mechanizm ułatwiający interakcję BRI1-BAK1 z białkami cytoplazmatycznymi, stanowiącymi kolejne składniki szlaku przekazywania sygnału BR [26].

BKI, TTL I TRIP – REGULATORY SYGNALIZACJI BR

Jednym z regulatorów sygnalizacji BR jest kinaza BKI1 (ang. *BRI1 Kinase Inhibitor 1*). Nadekspresja genu *BKI1* wywołuje karłowaty fenotyp spowodowany zredukowaną wrażliwością na BR, podczas gdy wyciszenie ekspresji przez mechanizm RNAi skutkuje zwiększonym wzrostem hipokotyla, co wskazuje na rolę białka BKI1, jako negatywnego elementu szlaku transdukcji sygnału. Polipeptyd BKI1 specyficznie wiąże się z C-końcową domeną kinazową receptora BRI1, uniemożliwiając jego interakcje z BAK1, blokując tym samym przekazywanie sygnału na poziomie błony [50]. Istotną rolę w regulacji lokalizacji komórkowej białka BKI1 odgrywa proces fosforylacji reszty tyrozyny. Umiejscowiony na N-końcu polipeptydu motyw bogaty w lizynę i argininę (ang. *lysine (K) – arginine (R) rich motif,* KR)

umożliwia zakotwiczenie białka BKI1 w błonie komórkowej, natomiast 20 reszt aminokwasowych zlokalizowanych w domenie C-końcowej pośredniczy w interakcjach z receptorem BRI1. Fosforylacja konserwowanej tyrozyny 211 (Y211) w motywie 3 (200-221 aa) białka BKI1 jest kluczowa w procesie jego oddysocjowania od błony komórkowej. Mutacja w obrębie tej tyrozyny powoduje, że białko BKI1 nie ma możliwości odłączenia się od błony, natomiast konstytutywna fosforylacja tej reszty aminokwasowej przyczynia się do występowania białka tylko na terenie cytoplazmy. Stąd wniosek, że związanie cząsteczek BR przez BRI1 powoduje w konsekwencji fosforylację Y211 BKI1, która prowadzi do oddysocjowania polipeptydu od receptora i inicjację formowania kompleksu BRI1-BAK1 [45, 137]. Należy dodać, że w ostatnim czasie ukazała się praca wskazująca, że BKI1, w wyniku interakcji z cytoplazmatycznym białkiem 14-3-3, może również funkcjonować jako pozytywny regulator szlaku BR [141].

Innymi negatywnym regulatorami transdukcji sygnału BR są białka TTL (ang. *Transthyretin-Like protein*) oraz TRIP1 (ang. *TGF-β Receptor Interacting Protein 1*), które są fosforylowane przez kompleks receptorowy BRI1-BAK1 [18, 79]. Roślinne białko TTL podobne jest do zwierzęcego białka uczestniczącego w transporcie hormonów tarczycy, a jego wstępna funkcja została określona na podstawie fenotypu roślin *A. thaliana*, u których doszło do insercji elementu T-DNA w obrębie genu kodującego ten peptyd. Rośliny takie cechują się zwiększonym wzrostem. Jednocześnie formy wykazujące nadekspresję genu *TTL* charakteryzują się karłowatością. Z kolei białko TRIP1 wykazuje homologię do ssaczego białka oddziałującego z receptorem TGF-β. Dokładna rola TRIP1 i TTL w regulacji sygnalizacji hormonalnej pozostaje jednak nieznana [27].

BIAŁKA SUBSTRATOWE BSK1-3, FOSFATAZA BSU1 I KINAZA BIN2

Większość składników szlaku sygnalizacji BR poznano stosunkowo szybko, natomiast przez długi czas poszukiwano białka substratowego bezpośrednio fosforylowanego przez kompleks receptorowy BRI1-BAK1. Sytuacja wyjaśniła się w 2008 r., kiedy Tang i wsp. zidentyfikowali polipeptyd BSK1 (ang. *BR Signaling Kinase 1*) oraz jego dwa homologi BSK2 i BSK3 [123]. Białka te, należące do kinaz typu RLCK (ang. *Receptor-Like Cytoplasmic Kinases*), są zakotwiczone w błonie komórkowej dzięki mirystylacji przy N-końcu. Ufosforylowane przez receptor białko BSK1 (S230) zostaje uwolnione z kompleksu BRI1-BAK1-BSK1 i w takiej postaci może wiązać fosfatazę BSU1 (ang. *BRI1 Suppresor 1*), prowadząc do jej aktywacji [54]. W budowie polipeptydu BSU1 można wyróżnić charakterystyczne powtórzenia motywu Kelch. W kolejnym etapie fosfataza BSU1 wiąże i defosforyluje (Y200), a tym samym dezaktywuje kinazę serynowo-treoninową BIN2 (ang. *Brassinosteroid Insensitive 2*) wykazującą wysokie podobieństwo do kinaz GSK3

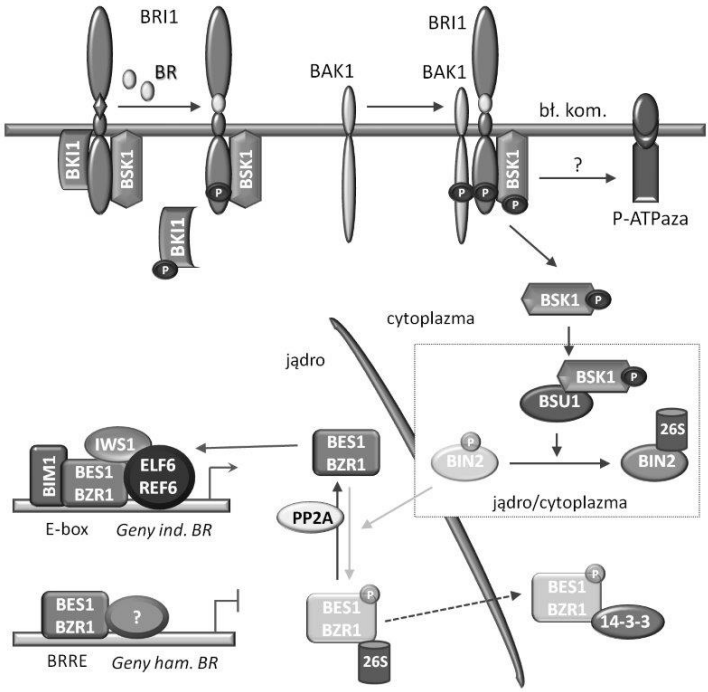
ssaków lub kinazy SHAGGY z *Drosophilla melanogaster*. Przy braku aktywnych cząsteczek BR kinaza BIN2 jest negatywnym elementem szlaku sygnałowego, natomiast w obecności hormonu ulega proteolitycznej degradacji w proteasomach 26S. Zastosowanie inhibitora proteasomu (MG132) powoduje odwrócenie zależnego od BR spadku akumulacji BIN2 [148]. Zarówno fosfataza BSU1, jak i kinaza BIN2 są jądrowo-cytoplazmatycznymi regulatorami wpływającymi na subkomórkową lokalizację czynników transkrypcyjnych regulujących aktywność transkrypcyjną pierwotnych genów odpowiedzi na BR [103].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE BES1/BZR1

Substratami dla kinazy BIN2 są czynniki transkrypcyjne BES1 (ang. *Bri-1-EMS-Suppressor 1*) i BZR1 (ang. *Brassinazole-Resistant 1*), a przypuszczalnie także BEH1-4 (ang. *BES1/BZR1 Homolog 1-4*) [62]. Białka BES1 i BZR1 wykazują 88% identyczności sekwencji aminokwasowej, a w ich budowie można wyróżnić domenę DBD (ang. *DNA Binding Domain*), domenę fosforylowaną przez BIN2 z więcej niż 20. miejscami fosforylacji (S/TxxxS/T) oraz domenę CTD (ang. *C-Terminal Domain*). Domena C-końcowa zawiera 12 aminokwasów tworzących motyw DM, który wiąże kinazę BIN2. Fosforylacja BES1/BZR1 hamuje aktywność tych białek przez różne, ale niewykluczające się mechanizmy tj. degradacja w proteasomach 26S, eksport z jądra i zatrzymanie na terenie cytoplazmy w wyniku interakcji z białkami 14-3-3 czy obniżona zdolność do wiązania się z DNA [148]. Związanie cząsteczek BR przez kompleks receptorowy prowadzi do wzrostu poziomu nieufosforylowanych białek BES1/BZR1, które aktywują lub hamują ekspresję odpowiednich genów. Heterotrimeryczną fosfatazą serynowo -treoninową odpowiedzialną za zwiększanie puli defosforylowanych czynników transkrypcyjnych jest PP2A (ang. *Protein Phosphates 2A*). W jej budowie można wyróżnić podjednostkę A, katalityczną podjednostkę C i regulatorową podjednostkę B, która oddziałuje z substratami [47]. Wykazano również, że PP2A może pełnić funkcję inhibitora szlaku sygnalizacyjnego BR. Polega to na defosforylacji receptora BRI1 i promowaniu jego degradacji [16, 144]. W dalszym ciągu zdarzeń, czynniki transkrypcyjne wiążą się ze specyficznymi sekwencjami nukleotydowymi (E-box) w obrębie promotorów genów docelowych, działając jako aktywatory transkrypcji. Swoją funkcję spełniają współdziałając z grupą trzech białek BIM (ang. *BES1-Interacting Myc-like*), IWS1 (ang. *Interacting With SPT6*-1) oraz ELF4/REF6. Wiążąc się do innych sekwencji promotorowych (BRRE), BES1/BZR1 mogą również hamować ekspresję wybranych genów. Łącznie stwierdzono występowanie tysięcy genów bezpośrednio regulowanych przez BR [81]. Zainteresowanym Czytelnikom polecamy artykuły [119, 153].

SZLAK TRANSDUKCJI SYGNAŁU BR – PODSUMOWANIE

Pod nieobecność BR kompleks receptorowy zlokalizowany w obrębie błony komórkowej nie jest aktywny. Receptor BRI1 jest związany z białkiem BKI1, hamującym interakcje z drugim elementem – koreceptorem BAK1 (ryc. 3). Kinaza BIN2 jest konstytutywnie aktywna i fosforyluje czynniki transkrypcyjne BES1/BZR1, co uniemożliwia ich wiązanie z promotorami genów i blokuje transdukcję sygnału BR. W odpowiedzi na BR, dochodzi do oddysocjowania ufosforylowanego peptydu BKI1, a receptor BRI1 i koreceptor BAK1 ulegają wzajemnej aktywacji przez fosforylację. Dodatkowo kompleks receptorowy fosforyluje białko substratowe BSK1, które w takiej postaci może wchodzić w interakcje z fosfatazą BSU1. Będąc pozytywnym elementem szlaku BR, polipeptyd BSU1 hamuje działanie kinazy BIN2, która zostaje skierowana na drogę proteolitycznej degradacji.



RYCINA 3. Funkcjonowanie szlaku sygnałowego BR od związania cząsteczki hormonu przez kompleks receptorowy do zmian w aktywności transkrypcyjnej pierwotnych genów odpowiedzi na BR. Szczegóły w tekście. Na podstawie [110], zmodyfikowane

FIGURE 3. The functioning of the BR signaling pathway from the hormone molecule binding by receptor complex to changes in transcriptional activity of primary response genes. Details in the text. According to [110], modified

W rezultacie czynniki transkrypcyjne ulegają defosforylacji pod wpływem fosfatazy PP2A i akumulacji w obrębie jądra komórkowego, gdzie regulują ekspresję genów przy udziale czynników BIM, IWS1 oraz ELF6/REF6. Receptor BRI może najprawdopodobniej wpływać również na funkcjonowanie P-ATPazy (ang. *Proton ATPase*) w sposób zależny od obecności BR [6] (ryc. 3). Fosforylacja P-ATPazy czyni enzym aktywnym, należy jednak zbadać czy receptor BRI1 wpływa bezpośrednio na stopień jej ufosforylowania i jaki jest mechanizm tego procesu. Od momentu kiedy odkryto receptorowową rolę kompleksu BRI1-BAK1, badania z zakresu biologii molekularnej pozwoliły dokładniej opisać proces wzajemnej transfosforylacji koreceptorów, która prowadzi do aktywacji szlaku transdukcji sygnału BR. Najbardziej istotne wydaje się jednak wykazanie podwójnej specyficzności kompleksu receptorowego, tzn. obok aktywności kinaz serynowo-treoninowych, zarówno BRI1, jak i BAK1, wykazują również aktywność kinaz tyrozynowych. Powyższe odkrycia są nowością w biologii roślin, ponieważ do tej pory uważano, że fosforylacja reszt tyrozyny jest wysoce specyficzna i charakterystyczna tylko i wyłącznie dla zwierząt. W wyniku ciągłego rozwoju nowych technik i dostępu do różnych narzędzi badawczych, postęp wiedzy jest niezwykle szybki. W chwili obecnej wydaje się, że większość białek w szlaku BR może pełnić podwójne funkcje – zarówno stymulatorów, jak i inhibitorów. Dotyczy to m.in. białek PP2A [16, 144], BKI1 czy 14-3-3 [141]. Dokładne omówienie tych zagadnień znacznie wykracza jednak poza ramy niniejszego opracowania.

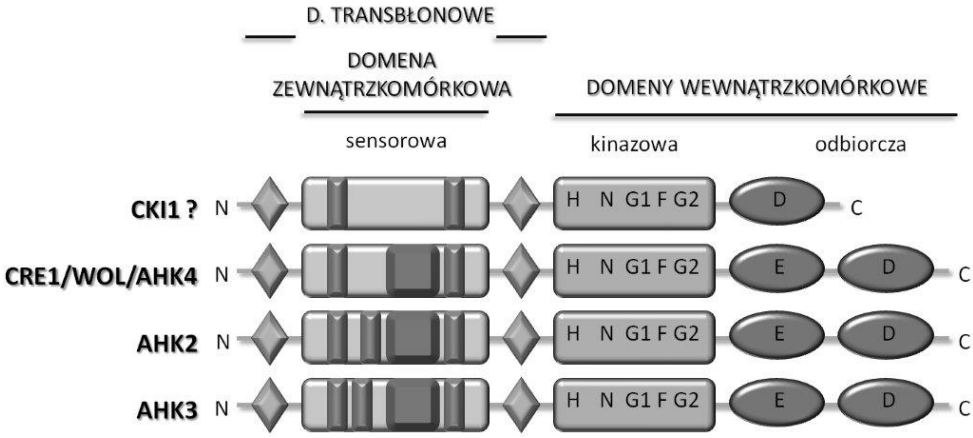
CYTOKININY

Cytokininy (CK), jako pochodne zasady purynowej adeniny, są jedną z kluczowych grup fitohormonów regulujących wzrost i rozwój całej rośliny, w tym głównie kontrolują podziały komórkowe, tworzenie merystemów wierzchołkowych, różnicowanie liści i korzeni, rozwój chloroplastów oraz odporność na stres i starzenie [34]. W przyrodzie najpowszechniej występują CK z alifatycznym podstawnikiem izopentenylowym w różnych modyfikacjach chemicznych (zeatyna, dihydrozeatyna), natomiast CK z aromatycznym podstawnikiem benzylowym (benzyloadenina) lub jego hydroksylowymi pochodnymi są rzadziej spotykane. Znane są również syntetyczne analogi CK adeninowych tj.: N^6-farnezyloadenina, N^6-geranyloadenina i N^6-furfuryloadenina (FA), czyli kinetyna, która jest jedną z najbardziej bioaktywnych CK. Została ona wyizolowana przez Millera i wsp. w 1955 r. jako artefakt powstały podczas preparatyki kwasów nukleinowych z komórek zwierzęcych i drożdży [75]. W/w CK mogą wiązać się do różnych receptorów z odmiennym powinowactwem, co zapewnia szerokie spektrum ich działania w różnych komórkach roślinnych [100, 150]. Wyraźny przełom w poznawaniu zarówno receptorów CK, jak i białek tworzących ich szlaki sygnałowe miał

miejsce dopiero w latach 90. XX w. dzięki możliwości wykorzystania podstawowych technik biologii molekularnej [19, 116]. W chwili obecnej specyficzna odpowiedź pojawiająca się w wyniku reakcji komórek na CK została stosunkowo dobrze poznana [1, 34, 52], a aktualny stan wiedzy opisano w poszczególnych podrozdziałach.

BIAŁKA RECEPTOROWE WIĄŻĄCE CK

Białka wiążące CK, określane jako CBP (ang. *Cytokinin Binding Proteins*) (ryc. 4), zostały zidentyfikowane we frakcji cytosolowej, mikrosomalnej i błonach tylakoidów komórek roślinnych. Najnowsze wyniki badań prowadzonych na *A. thaliana* wskazują jednak na ich umiejscowienie głównie w błonach retikulum endoplazmatycznego [145], a nie w błonie komórkowej [53]. Jednym z białek pełniących rolę domniemanego receptora CK jest CKI1 (ang. *Cytokinin Independent 1*), którego gen został zidentyfikowany jako pierwszy w 1996 r. [49]. Zbudowane z 1122 aa (m.cz. = 125 kDa) białko CKI1 posiada N-końcową domenę receptorową (sensorową) o długości 300 aa zawierającą 11 potencjalnych miejsc N-glikozylacji, dwa fragmenty transbłonowe, C-końcową domenę kinazy histydynowo-asparaginowej (przekaźnik) oraz domenę regulatora odpowiedzi (odbiorczą) znajdującą się we wnętrzu komórki. Po przyłączeniu CK do domeny sensorowej następuje indukcja dimeryzacji i autofosforylacji polipeptydu. Receptorową rolę CKI1 poddają jednak w wątpliwość wyniki doświadczeń, w których wykazano, że błony izolowane z komórek drożdży dzielących się (*Shizosaccharomyces pombe*) transformowanych genem *CKI1* nie wiążą izopentenyloadeniny [147]. Bezspornym receptorem CK jest natomiast CRE1 (ang. *Cytokinin Resistant 1*) [43]. Jego receptorową rolę potwierdzają liczne wyniki badań, w tym fakt, że białko uzyskane w drożdżowym układzie ekspresyjnym wiąże naturalne i syntetyczne CK pochodne aminopuryny i difenylomocznika [120, 129, 147]. Polipeptyd CRE1 (1080 aa) jest nietypową hybrydową kinazą histydynową posiadającą N-końcową, zewnątrzkomórkową domenę sensorową (277 aa) ograniczoną dwiema domenami transbłonowymi, domenę katalityczną oraz dwie C-końcowe domeny odbiornika. Obok klasycznej domeny jednego odbiornika posiadającej resztę asparaginianu (D) występuje druga dodatkowa domena podobna do odbiornika RL (ang. *Receiver-Like*), która w miejscu asparaginianu zawiera resztę kwasu glutaminowego (E). Stąd też CRE1 może pełnić rolę receptora i generatora sygnału, który pojawia się w komórce po związaniu CK. Szczegółowe analizy ujawniły, że gen *CRE1* jest poznanym wcześniej genem *WOL* (ang. *Woden Leg*) zidentyfikowanym u mutanta *A. thaliana* o zmienionej organizacji tkanki naczyniowej w korzeniu i dolnej części hipokotyla, zahamowanym wzroście korzenia oraz zredukowanej liczbie komórek [66, 108]. Kolejny gen *AHK4* (ang. *Arabidopsis Histidine Kinase 4*) również okazał się tożsamy z *CRE1*/*WOL* [130].



RYCINA 4. Rodzina białek receptorowych wiążących CK. Szczegóły w tekście. Na podstawie [52, 58], zmodyfikowane
FIGURE 4. The family of CK binding receptors. Details in the text. According to [52, 58], modified

Kolejnymi receptorami CK należącymi tak jak CRE1/WOL/AHK4 do rodziny KH są AHK2 (1176 aa) i AHK3 (1036 aa) [36]. Geny kodujące te białka zostały zidentyfikowane nie tylko u roślin kwiatowych (*Betula pendula*, *Populus trichocarpa*, *Catharanthus roseus*, *Medicago sativa*, *Lupinus albus*, *Lotus japonicus*, *Oryza sativa*, *Vitis vinifera*, *Zea mays*), ale także u mszaków (*Physcomitrella patens*) i widłaków (*Selaginella moellendorfii*) [34]. W części C-końcowej białka AHK2 i AHK3 są bardzo podobne do CRE1/WOL/AHK4 (włącznie z dodatkowym elementem RL), natomiast w części N-końcowej zawierają trzy, a nie dwa transbłonowe fragmenty hydrofobowe. Wszystkie kinazy histydynowe (AHK2, AHK3 i CRE1/WOL/AHK4) w domenie zewnątrzkomórkowej mają konserwowaną, 220 aa sekwencję CHASE (ang. *Cyclase Histidine kinase Associated Sensory Extracellular*), niezbędną do związania cząsteczek liganda [43, 146]. Do chwili obecnej nie poznano struktury tej domeny, jednak wykorzystując specjalistyczne programy komputerowe przeprowadzono analizy bioinformatyczne na podstawie których dowiedziono, że domena CHASE posiada min. 12 aminokwasów funkcyjnych. Zamiana 4 z nich na alaninę (T317, T301, F304, R305) skutkuje utratą zdolności do wiązania substratu przez receptor CRE1/WOL/AHK4. Reszta aminokwasowa T317 znajduje się prawdopodobnie w utworzonej przez strukturę centralnych β-kartek kieszeni wiążącej substrat, natomiast pozostałe trzy aminokwasy występują poza nią [35]. Zidentyfikowano również aminokwasy, których substytucja powodowała u *A. thaliana* konstytutywną aktywność receptora CRE1/WOL/AHK4. Mutacje te występowały w obrębie drugiej domeny transbłonowej łączącej domenę CHASE z cytoplazmatyczną częścią receptora [76]. Różnice pomiędzy poszczególnymi

receptorami z rodziny AHK dotyczą m.in. miejsca percepcji sygnału. U *A. thaliana* receptor CRE1/WOL/AHK4 pośredniczy głównie w odbiorze i przekazywaniu sygnału CK w korzeniu, a AHK2 i AHK3 w liściach [36]. Taka sama relacja ma miejsce u wielu innych gatunków roślin, np. u kukurydzy (*Zea mays*) [150]. Interesujący jest fakt, że w zależności od stężenia CK polipeptyd CRE/WOL/AHK4 wykazuje zarówno aktywność kinazową, jak i fosfatazową, natomiast nie zostało to potwierdzone w przypadku pozostałych receptorów [67]. Związanie CK powoduje aktywację KH (a nie jej hamowanie tak jak np. w przypadku receptorów ET) polegającą na autofosforylacji reszty histydyny. Prowadzi to do przekazania grupy fosforanowej na resztę asparaginy zlokalizowaną w odbiorniku KH, a następnie na resztę histydyny w jednym z łącznikowych białek HPt/AHP (ang. *His-containing Phosphotransfer/Arabidopsis Histidine Phosphotransfer proteins)*, mających możliwość przemieszczania się pomiędzy cytoplazmą a jądrem [40, 52, 92, 127].

BIAŁKA POMOSTOWE HPT I REGULATORY ODPOWIEDZI ARR TYPU A I B

Zawierające histydynę fosfotransferowe białka HPt/AHP wchodzą w interakcje z receptorami CK i funkcjonują jako swoistego rodzaju pomost przenoszący grupę fosforanową pomiędzy domeną odbiornika hybrydowej KH, a odbiornikiem RR zgodnie ze schematem His-Asp-His-Asp [2]. U *A. thaliana* występuje 6 białek AHP. Nazwa białek AHP jest używana od niedawna, dlatego obok nowych nazw w nawiasach podano dawniej używane akronimy: AHP1 (AtHP3), AHP2 (AtHP1), AHP3 (AtHP2), AHP4, AHP5, AHP6 (APHP1). Zbudowane z 154-157 aa białka AHP1-5 zawierają motyw X<u>H</u>QXKGSSXS z resztą histydyny, która ulega fosforylacji. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej niektórych białek jest duże, np. AHP2 i AHP3 są identyczne w 81%. Homologia między pozostałymi białkami jest mniejsza i nie przekracza na ogół 45% [41]. Ekspresja poszczególnych genów *AHP* jest zróżnicowana – obecność transkryptu genu *AHP1* stwierdzono jedynie w korzeniu, *AHP2* i *AHP3* we wszystkich dojrzałych tkankach, *AHP5* w korzeniu i w liściach, a ekspresji *AHP4* nie wykryto do tej pory w żadnej tkance. CK wymuszają transport białek AHP1 i AHP2 do jądra, chociaż podobnej zmiany lokalizacji subkomórkowej nie zaobserwowano w przypadku AHP5. Poszczególne białka AHP mogą oddziaływać z różnymi KH typu hybrydowego, a ufosforylowane białka AHP1 i AHP2 są potencjalnymi donorami grupy fosforanowej, która może zostać przeniesiona na różne regulatory odpowiedzi [58].

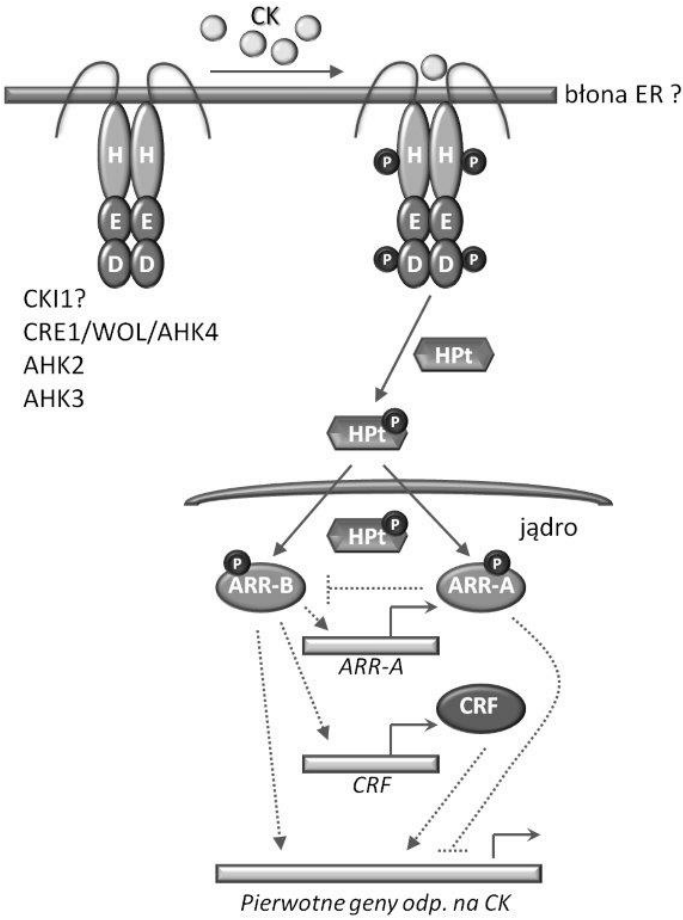
U *A. thaliana* występują dwa typy regulatorów odpowiedzi: 11 RR określanych jako ARR typu A (ang. *Arabidopsis Response Regulator type A*, ARR-A) i 11 typu B (ARR-B). Ponadto występują białka z nietypową domeną odbiornika określane

jako APRR1-9 (ang. *Arabidopsis Pseudo-Response Regulator 1-9*). Do ARR-A zaliczamy białka ARR3-ARR9, ARR15-ARR17 i ARR22 zawierające domenę odbiornika oraz krótkie fragmenty N- i C-końcowe. Białka ARR5/6/7-A są zlokalizowane w jądrze, a np. ARR4-A występuje zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie. Rodzina białek ARR-B składa się z trzech podrodzin. Do I zalicza się 7 polipeptydów, a do II i III po dwa [71]. Wśród nich najistotniejszą rolę w generowaniu odpowiedzi cytokininowej odgrywają ARR1, ARR10 i ARR12 [2, 44]. Oprócz domeny odbiornika zlokalizowanej w części N-końcowej ARR-B zawierają fragment o różnej długości w części C-końcowej tworzący domenę efektorową. W obrębie tej domeny znajduje się krótki region utworzony przez aminokwasy kwaśne, ok. 80. aa motyw B podobny do domeny wiążącej DNA w białkach c-Myb, końcowy region bogaty w glutaminę i prolinę, a także jeden lub kilka motywów NLS kierujących białko do jądra [105]. Obecność w ARR-B motywów charakterystycznych dla białek regulujących aktywność transkrypcyjną genów, jak również swoiste wiązanie oligonukleotydu o określonej sekwencji przez motyw B białek ARR1/2-B sugerują, że białka ARR -B pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych. Wyniki wieloletnich doświadczeń wskazują, że sygnał docierający do ARR1/2-B znosi hamowanie domeny efektorowej przez domenę odbiornika lub usuwa jakiś nieznany do tej pory represor związany z domeną odbiornika. Odblokowany ARR-B aktywuje ekspresję co najmniej niektórych genów *ARR-A*, które są ich bezpośrednim celem [42]. Białka ARR-B uznawane są za pozytywne elementy sygnalizacji CK, natomiast ARR-A pełnią rolę czynników negatywnych [126]. Zsyntetyzowane białka ARR-A działają jako czynniki hamujące zwrotnie aktywność transkrypcyjną genów *ARR-B* w sytuacji gdy stężenie CK utrzymuje się na bardzo wysokim poziomie przez dłuższy czas [125]. Ciągle otwarte pozostaje jednak pytanie o ich pośrednictwo w negatywnej pętli sprzężenia zwrotnego. W części C-końcowej ARR-A nie posiadają domeny za pomocą której mogłyby wiązać się do DNA. Przyjmuje się więc, że regulują one aktywność transkrypcyjną genów za pośrednictwem innych czynników transkrypcyjnych [1]. Białka ARR-B łącząc się z sekwencjami promotorowymi różnych genów *CRG* (ang. *Cytokinin Regulated Genes*) mogą wpływać także na inne kaskady czynników zależnych od obecności CK, m.in. CRF (ang. *Cytokinin Response Factor*) [94] czy GeBP/GPL (ang. *Glabrous 1 enhancer-Binding Protein/Glabrous-Like*) [10], co w konsekwencji wyzwala określoną odpowiedz fizjologiczną.

SZLAK SYGNAŁOWY CK – PODSUMOWANIE

Podsumowanie dotyczące szlaku CK przedstawiono na ryc. 5. Wszystkie elementy szlaku przekazywania sygnału CK (receptory, białka AHP, RR) pojawiły się w toku ewolucji bardzo wcześnie, jednak dopiero rośliny lądowe (ok. 725 milionów lat temu) wykształciły właściwą zdolność do odbioru bodźca [52]. Receptory CK,

będące hybrydowymi kinazami histydynowymi, są pozytywnymi regulatorami inicjowanego szlaku. Mutant *A. thaliana ahk2 ahk3 ahk4* nie wykazuje odpowiedzi na CK, co oznacza, że w genomie tej rośliny nie ma innych białek receptorowych. Zastanawiający jest jedynie fakt, że potrójne mutanty nie są letalne już na etapie embriogenezy. Stan wiedzy na temat receptorów jest zadowalający, ale niekompletny, a kluczową sprawą wydaje się poznanie ich struktury krystalograficznej. Umożliwi to szczegółowe opisanie sposobu i rodzajów oddziaływań pomiędzy domeną CHASE, a ligandem. W najbliższej przyszłości szukać się będzie również odpowiedzi na pytania: jaka jest precyzyjna, subkomórkowa lokalizacja receptorów?



RYCINA 5. Percepcja i szlak transdukcji sygnału cytokininowego. Szczegóły w tekście. Na podstawie [110], zmodyfikowane

FIGURE 5. Perception and signal transduction pathway of cytokinins. Details in the text. According to [110], modified

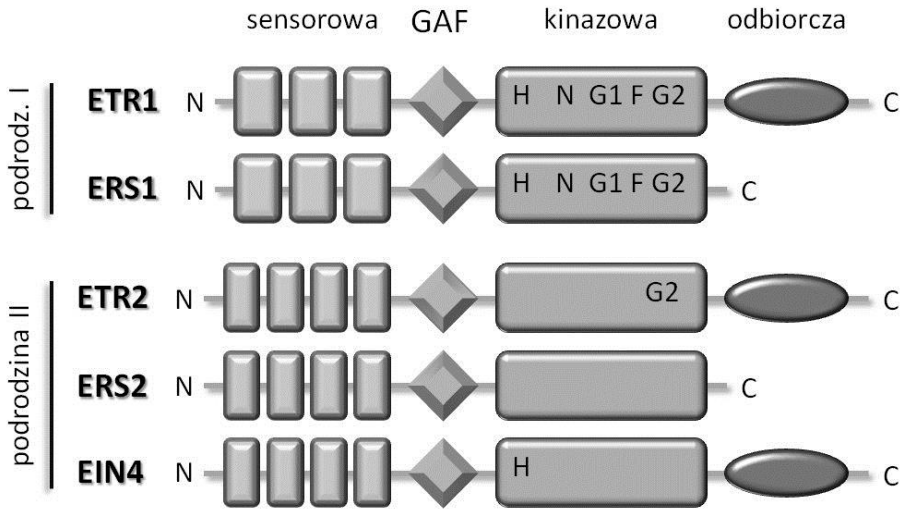
Czy funkcjonują one także jako heteromery? Jak dochodzi do przekazywania sygnału pomiędzy błoną a cytoplazmą? W porównaniu do pozostałych fitohormonów, odbiór i przekazywanie sygnału cytokininowego jest stosunkowo proste i podobne do dwuskładnikowego bakteryjnego systemu regulacyjnego, gdzie obserwuje się przepływ reszty fosforanowej His-Asp. Warto wspomnieć, że transdukcja sygnału w układach dwuskładnikowych różni się zasadniczo od typowej kaskady kinaz białkowych, w której jedna kinaza może fosforylować wiele docelowych białek wpływając w ten sposób na wzmocnienie sygnału. Przeważające w roślinach KH typu hybrydowego wydłużają jednak łańcuch przekazywania fosforanu (His-Asp-His-Asp), a tym samym zwiększają liczbę potencjalnych miejsc regulujących przepływ informacji oraz rozszerzają możliwości komunikowania się pomiędzy poszczególnymi szlakami sygnałowymi.

ETYLEN

Na początku XX w. zaobserwowano, że etylen (ET) wywiera wpływ na wzrost roślin, ale nikt wtedy nie przypuszczał, że rośliny same wytwarzają ten gaz. Okazało się jednak, że ET odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu roślin na wszystkich etapach ich rozwoju począwszy od kiełkowania nasion, a na starzeniu organów skończywszy [117]. Zastosowanie technik biologii molekularnej i biochemii umożliwiło kompleksowe poznanie szlaku przekazywania sygnału etylenowego. Wiedzie on od ER do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do zmian aktywności transkrypcyjnej pierwotnych genów odpowiedzi na ET, co skutkuje powstaniem specyficznych odpowiedzi fizjologicznych. Czytelnikom zainteresowanym tematyką związaną zarówno z biosyntezą, percepcją i transdukcją sygnału, jak i wpływem ET na poszczególne procesy polecamy obszerne opracowanie autorstwa van der Ent i Pieterse, 2012 [133].

ETR1/2, ERS1/2 I EIN4 – RECEPTORY ET

Pierwsze informacje na temat receptora ET pochodzą z lat 60. XX w., jednak dopiero pod koniec lat 80. wyselekcjonowano mutanta *etr1* (ang. *ethylene response 1*) *A. thaliana* niewrażliwego na ten hormon. W późniejszym czasie zidentyfikowano 4 kolejne receptory: ETR2 (ang. *Ethylene Response 2*), ERS1/ERS2 (ang. *Ethylene Response Sensor 1/2*) i EIN4 (ang. *Ethylene Insensitive 4*) [21, 117]. Drugą rośliną, u której prawdopodobnie poznano wszystkie geny kodujące receptory ET jest pomidor [56]. Jego genom zawiera 6 genów kodujących białka homologiczne z ETR1 lub ETR2 (LeETR1-6). Szereg pojedynczych genów sklonowano również u takich roślin jak męczennica jadalna, melon, fasola, ogórek, pelargonia, goździk, tytoń, róża, mango, brzoskwinia czy szczaw [58].



RYCINA 6. Rodzina receptorów ET u *A. thaliana* będących kinazami histydynowymi (podrodzina I) lub serynowo-treoninowymi (podrodzina II). Szczegóły w tekście. Na podstawie [21], zmodyfikowane
FIGURE 6. The family of ET receptors in *A. thaliana* which are histidine kinases (first subfamily) or serine-threonine kinases (second subfamily). Details in the text. According to [21], modified

Większość receptorów poszczególnych fitohormonów funkcjonuje jako pozytywne regulatory ich szlaków sygnałowych, natomiast w przypadku ET jest inaczej, ponieważ wszystkie poznane receptory są regulatorami negatywnymi [39]. Przy braku ET tworzą one kompleks z innymi kinazami CTR1 hamując dalsze przekazywanie informacji. W budowie receptorów można wyróżnić domenę sensorową, GAF, kinazową (przekaźnik) i odbiorczą (ryc. 6). Znajdująca się na N-końcu białka domena sensorowa zakotwicza receptor w błonie ER umożliwiając łatwy i szybki dostęp liganda [8]. W obrębie odcinków transbłonowych znajdują się również miejsca odpowiedzialne za wiązanie hormonu – EBD (ang. *Ethylene Binding Domain*) oraz kofaktora – Cu(I), a także za dimeryzację receptorów. Cytoplazmatyczna domena kinazowa wykazuje wysokie podobieństwo do kinaz histydynowych, w których centrum katalitycznym występuje 5 kluczowych regionów (H, N, G1, F, G2). Tylko ETR1 i ERS1 posiadają wszystkie wymienione regiony, natomiast pozostałe receptory nie, co powoduje, że funkcjonują one jako kinazy serynowo-treoninowe. Zbudowana z ok. 125 aa domena odbiorcza podobna jest do regulatora odpowiedzi bakteryjnych kinaz dwuskładnikowych. Domena ta zlokalizowana jest na C-końcach trzech spośród pięciu receptorów (ETR1, ETR2 i EIN4) [21].

Porównując sekwencję nukleotydową genów, liczbę i położenie intronów oraz analizując sekwencję aminokwasową kodowanych przez nie białek, receptory ET można podzielić na dwie podrodziny. Do pierwszej należą ETR1 i ERS1, które są

typowymi hybrydowymi kinazami histydynowymi posiadającymi w części N-końcowej trzy hydrofobowe regiony transbłonowe. W skład II podrodziny wchodzą ETR2, ERS2 i EIN4 zawierające dodatkowy czwarty fragment hydrofobowy, a w domenie przekaźnika posiadające sekwencję aminokwasową w mniejszym lub większym stopniu odbiegającą od struktury pierwszorzędowej klasycznych KH. Białko EIN4 ma konserwowaną resztę histydyny (motyw H), lecz nie posiada pozostałych motywów uczestniczących w wiązaniu ATP, ETR2 ma tylko motyw G2, a ERS2 nie zawiera żadnego z pięciu motywów występujących w przekaźniku [51, 58]. Wszystkie receptory ET ulegają autofosforylacji, a obecność funkcjonalnej domeny kinazowej jest konieczna dla przekazywania sygnału. W polipeptydach obu podrodzin można także wyodrębnić ok. 200 aa fragment nazywany domeną GAF (ang. *cGMP binding phosphodiesterases, Adenylate cyclases, transcription factor FhlA*). Domena ta występuje w różnych białkach sygnałowych organizmów prokariotycznych i eukariotycznych [72], a jej funkcja w przypadku receptorów ET wiązana jest z dimeryzacją i tworzeniem w błonie homodimerów. Wydaje się, że może ona wiązać małe ligandy, jak np. tetrapirole czy nukleotydy, stanowiąc miejsce dodatkowej regulacji aktywności receptorów.

Badając genetycznie zmodyfikowane białko ETR1 wykazano, że do związania ET istotnych jest 7 reszt aminokwasowych zlokalizowanych w obrębie pierwszego (Asp25, Tyr32, Ile35, Pro36) i drugiego (Ile62, Cys65, His69) odcinka transbłonowego [138]. Regiony te prawdopodobnie tworzą kieszeń wiążącą ET i jony Cu(I). Trzeci region transbłonowy przypuszczalnie stabilizuje strukturę kieszeni. W wiązaniu jonów Cu(I) uczestniczą dwa aminokwasy: Cys65 i His69, a w ich dostarczaniu białkowy transporter – RAN1 (ang. *Responsive to Antagonist 1*). Białko ETR1 wiąże także jony srebra, chociaż kompleks ETR1-Ag, wiążący nadal ET, nie jest w stanie przekazać informacji do części cytoplazmatycznej receptora [32]. Białkiem *A. thaliana*, które z dużym prawdopodobieństwem wchodzi w interakcje z receptorem ETR1 jest RTE1 (ang. *Reversion To Ethylene sensitivity 1*) [17, 96]. Jest ono zlokalizowane w błonie, ale jego funkcja nie została dokładnie określona. Przypuszcza się, że RTE1 wpływa na ETR1 poprzez modulacje jego aktywności [99]. Zidentyfikowany u pomidora gen *GR* (ang. *Green Ripe*) okazał się być ortologiem genu kodującego polipeptyd RTE1 [4].

BIAŁKO REPRESOROWE CTR1

W warunkach braku lub niskiego stężenia ET, aktywne białko CTR1 (ang. *Constitutive Triple Response 1*) funkcjonuje jako represor aktywności kolejnego składnika szlaku sygnalizacyjnego – białka EIN2. Gen kodujący białko CTR1 zidentyfikowano analizując mutanta *ctr1*, odznaczającego się fenotypem ciągłej odpowiedzi etylenowej, nieustępującej nawet po podaniu inhibitorów biosyntezy tego hormonu. U *A.*

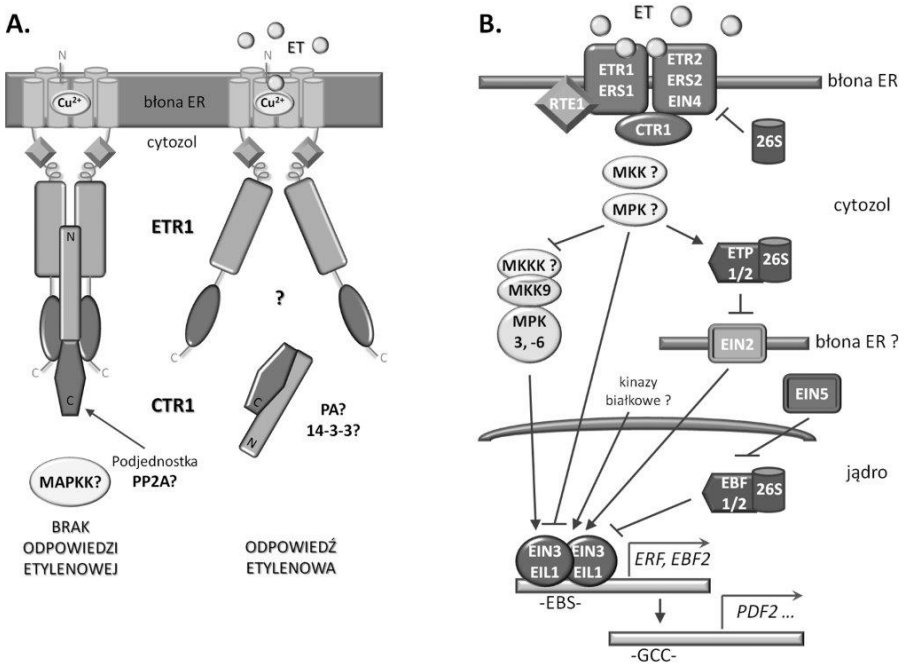
thaliana zidentyfikowano pojedynczy gen *CTR1*, natomiast u pomidora aż trzy jego homologi [133]. CTR1 jest kinazą serynowo-treoninową zawierającą 11 charakterystycznych subdomen. Na N-końcu CTR1 zlokalizowana jest domena odpowiedzialna za fizyczne oddziaływanie z domeną kinazową i domeną odbiornika poszczególnych receptorów w obrębie błony ER. Interakcje receptor-CTR1 są na tyle silne, że białka funkcjonują w postaci kompleksów (sygnałosomów) (ryc. 7A). Początkowo zakładano, że związanie cząsteczek ET powoduje oddysocjowanie CTR1 od kompleksu sygnałowego. Z czasem pojawiła się również koncepcja, że derepresja szlaku sygnałowego następuje wskutek zmian konformacyjnych powstałych w obrębie kompleksu receptor-CTR1 po związaniu ET [25]. W chwili obecnej, co najmniej w przypadku receptora ETR2, postuluje się, że może dochodzić do jego degradacji, która jest indukowana związaniem liganda [9]. Z kolei C-koniec polipeptydu CTR1 podobny jest do białek z rodziny kinaz Raf, co sugeruje istnienie w szlaku przekazywania sygnału ET kaskady kinaz MAP (ang. *Mitogen Activated Protein kinase*) [117]. W 2003 r. pojawiły się doniesienia wskazujące, że białko CTR1 *A. thaliana* funkcjonuje jako pierwszy składnik kaskady kinaz MAPK fosforylującej, m.in. białko MPK6 [87]. Z czasem okazało się jednak, że zarówno obniżenie, jak i zahamowanie ekspresji genu *MPK6* nie zaburza odpowiedzi roślin na ET, co sugeruje, że białko MPK6 bierze udział raczej w regulacji biosyntezy ET, a nie w przekazywaniu jego sygnału. Podobieństwo CTR1 do kinaz MAP ogranicza się być może jedynie do wysokiej zgodności ich sekwencji aminokwasowych [74]. Mimo to nigdy nie zakwestionowano całkowicie udziału kinaz MAP w szlaku etylenowym, a ich istnienie jest nadal sprawą kontrowersyjną. Wyniki badań Yoo i wsp. z 2008 r. wskazują, że inaktywacja kompleksu receptor -CTR1 przez ET skutkuje aktywacją kaskady kinaz obejmującej MKK9 i MPK3, co ostatecznie zmienia stan ufosforylowania czynnika transkrypcyjnego EIN3 [151].

Wśród czynników potencjalnie regulujących aktywność domeny kinazowej zlokalizowanej na C-końcu białka CTR1, można wyróżnić proces defosforylacji, białko 14-3-3 czy kwas fosfatydowy (ang. *Phosphatidic Acid*, PA) (ryc. 7A). Najprawdopodobniej przyłączenie białka 14-3-3 do fosforylowanej reszty Ser259 stabilizuje oddziaływania pomiędzy N- i C-końcem białka CTR1. Z kolei defosforylacja Ser259 przez białko PP2A uniemożliwia związanie 14-3-3, co skutkuje aktywacją domeny kinazowej. W warunkach *in vitro* wykazano również, że domena C-końcowa może oddziaływać z PA, który jest najprostszym fosfolipidem występującym w błonie komórkowej [133].

BIAŁKA EIN2 ORAZ ETP1/2 I EER5

Wszystkie znane reakcje roślin wywoływane przez ET wymagają obecności białka EIN2 (ang. *Ethylene Insensitive* 2) (1294 aa, 141 kDa), co świadczy, że jest ono kluczowym elementem szlaku. Mimo to do chwili obecnej białko to stanowi

największą niewiadomą w całym szlaku etylenowym. Niejasna jest także subkomórkowa lokalizacja polipeptydu, choć sugeruje się jego obecność w błonie ER [5]. Gen kodujący EIN2 poznano ponad 20 lat temu na podstawie analizy mutantów niewrażliwych na ET. Mutanty te wykazywały również odporność na egzogennie podany parakwat (herbicyd) i JA, co sugeruje, że EIN2 jest zaangażowany również w powstawanie odpowiedzi roślin na stres. N-koniec białkowego produktu (461 aa), posiadający 12 hydrofobowych fragmentów transbłonowych, odpowiada za odbiór sygnału ET od kompleksu receptor-CTR1, natomiast C-koniec (833 aa) zawiera domenę CC (ang. *Coiled Coil*), odpowiedzialną za oddziaływania białko-białko. Przyjmuje się, że ta część peptydu odpowiada za przekazywanie sygnału do kolejnych komponentów szlaku, gdyż transgeniczne linie *A. thaliana* z nadekspresją C-końcowego fragmentu białka EIN2 charakteryzują się konstytutywną aktywacją odpowiedzi etylenowych [117].



RYCINA 7. Szlak sygnalizacji etylenowej. (A) Interakcja pomiędzy receptorem ETR1, a kinazą serynowo-treoninową CTR1 po związaniu cząsteczki hormonu; (B) Kompleksowy model odbioru i przekazywania sygnału ET, który prowadzi do wyzwolenia określonej odpowiedzi fizjologicznej. Szczegóły w tekście. Na podstawie [110, 133], zmodyfikowane

FIGURE 7. Ethylene signaling pathway. (A) Interaction between ETR1 receptor and serine-threonine kinase CTR1 after hormone molecule binding; (B) A comprehensive model of ethylene perception and signal transduction pathway, which leads to the liberation of a particular physiological response. Details in the text. According to [110, 133], modified

Istotnym krokiem w zrozumieniu mechanizmów funkcjonowania białka EIN2 było zidentyfikowanie dwóch białek FBP (ang. *F-Box Protein*), a mianowicie ETP1 i ETP2 (ang. *EIN2-Targeting F-box Protein 1 and 2*). Uczestniczą one w proteasomalnej degradacji EIN2, bowiem są elementem specyficznych ligaz białkowych E3 typu $SCF^{ETP1/ETP2}$ [93]. Wyniki badań wykazały również, że ETP1/ETP2 bezpośrednio wchodzą w interakcje z wysoce konserwowaną domeną znajdującą się na C-końcu białka EIN2. W przypadku braku lub bardzo niskiego stężenia ET, poziom ETP1 i ETP2 jest wysoki, co skutkuje brakiem białek EIN2. Z kolei w przypadku wysokiego stężenia ET, obniża się zawartość ETP1 i ETP2 i konsekwentnie zwiększa EIN2, co powoduje aktywację dalszych elementów szlaku. Na ilość białka EIN2 w komórce wpływają wszystkie elementy szlaku etylenowego znajdujące się powyżej EIN2 (receptory, CTR1), ponieważ modulują one stabilność zarówno ETP1, jak i ETP2. Z kolei elementy szlaku znajdujące się poniżej EIN2, czyli np. EIN3 i EIL1, nie uczestniczą w regulacji wyżej opisanych procesów [93]. U podwójnego mutanta *etp1 etp2* dochodzi do wysokiej akumulacji EIN2, co skutkuje ciągłą odpowiedzią etylenową i specyficznym fenotypem roślin, podczas gdy nadekspresja genu *ETP1* lub *ETP2* u roślin poddawanych ciągłej aplikacji ET i tak przyczynia się do obniżenia stężenia EIN2 i czyni rośliny transgeniczne niewrażliwymi na ten hormon. Do chwili obecnej nie poznano jednak mechanizmu regulacji poziomu białek ETP1/ETP2 przez ET.

Innym białkiem mającym wpływ na stabilność EIN2 jest EER5 (ang. *Enhanced Ethylene Response 5*) posiadające charakterystyczną domenę PAM (ang. *Proteasome cop9 initiation factor Associated Module*). EER5 bezpośrednio oddziałuje z C-końcem EIN2 i uchodzi za jego negatywny regulator ze względu na możliwość skierowania EIN2 na zależną od ubikwityny proteasomalną degradację. Co ciekawe EIN2 działa poniżej EER5 lub jest nawet jego substratem w szlaku ET. Nie udowodniono jednak bezpośrednio, że EER5 jest nieodzownym czynnikiem wpływającym na stabilność EIN2 w szlaku etylenowym, jednak jego ważna funkcja jest bezsporna [133].

KASKADA CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

Białko EIN2, w nieznany do chwili obecnej sposób, aktywuje jądrowe białko EIN3 (ang. *Ethylene Insensitive 3*), które zapoczątkowuje kaskadę czynników transkrypcyjnych. U *A. thaliana* białko EIN3 (628 aa, 69 kDa) kodowane jest przez gen należący do małej rodziny, w skład której wchodzą dodatkowo *EIL1-EIL5* (ang. *EIN3-Like 1-5*). Czynniki transkrypcyjne kodowane przez te geny stanowią kolejne elementy kaskady regulującej ekspresję genów indukowanych przez ET. Białka EIN3 i EIL1 charakteryzują się największym podobieństwem i przypisuje się im udział w większości reakcji na ET [29]. Geny kodujące białka spokrewnione

z EIN3 znaleziono również u tytoniu, pomidora i fasoli [21]. Pod nieobecność ET białko EIN3 wiązane jest przez zawierające kasetę F białka EBF1 i EBF2 (ang. *EIN3 Binding F-box factor 1/2*) i przy udziale pozostałych elementów kompleksu ligazy E3 typu $SCF^{EBF1/EBF2}$ wyznaczane do degradacji w proteasomach 26S [28]. Zwiększona produkcja ET powoduje z kolei zahamowanie degradacji i wzrost ilości EIN3. Mechanizm blokowania degradacji może polegać na wzroście trwałości białka EIN3, bądź też obniżeniu stężenia lub aktywności białek EBF lub innych składników kompleksu ligazy E3 typu SCF. EBF1 kontroluje najprawdopodobniej poziom EIN3 przy niskich stężeniach ET, natomiast EBF2 przy wyższych.

Wszystkie czynniki transkrypcyjne tworzące kaskady w sygnalizacji etylenowej wiążą się bezpośrednio do sekwencji PERE (ang. *Primary Ethylene Response Element*) promotorów genów z rodziny EREBP (ang. *Ethylene Response Element Binding Protein*). Białka EREBP są charakterystyczne tylko dla roślin. Pierwotnie zidentyfikowano je u tytoniu i stwierdzono, że wiążą się one do sekwencji GCC promotorów genów regulowanych przez ET. EIN3, EIL1 i EIL2 wiążą się w postaci homodimerów do krótkiego palindromowego regionu promotora genu *ERF1* (ang. *Ethylene Response Factor 1*) – EBS (ang. *EIN3-Binding Site*). ERF1 jest białkiem z rodziny EREBP, które uczestniczy w reakcjach zahamowania wzrostu korzeni i hipokotyla, ale nie uczestniczy w tworzeniu haczykowatego zagięcia pędu. Stwierdzono, że poznane dotychczas białka ERF1, ERF2 i ERF5 pełnią rolę aktywatorów, natomiast białka ERF3, ERF4, ERF7-ERF12 – represorów genów wtórnych odpowiedzi etylenowych [21]. Ponieważ część genów aktywowanych przez ET nie zawiera w swoich sekwencjach promotorowych zarówno miejsc EBS, jak i kaset GCC, oznacza to, że ich regulacja odbywa się z pominięciem EIN3 i ERF1.

SZLAK ETYLENOWY – PODSUMOWANIE

Podsumowaniem informacji o ET zawartych w poszczególnych podrozdziałach jest ryc. 7B. W szlakach sygnałowych zarówno CK, jak i ET stwierdzono występowanie hybrydowych kinaz histydynowych. Cechą charakterystyczną dla sygnalizacji etylenowej jest to, że domeny kinazowe wszystkich poznanych receptorów są aktywne wówczas, gdy brak jest w ogóle cząsteczek ET lub gdy w wyniku mutacji, domeny sensorowe nie mogą fizycznie wiązać fitohormonu. Liczne wyniki badań prowadzonych na transgenicznych siewkach *A. thaliana* i pomidora wskazują również, że zmiana liczby receptorów w roślinie zmienia jej wrażliwość na ET. Wyłączenie w wyniku mutacji trzech lub czterech receptorów sprawia, że znacznie mniej endogennego ET jest potrzebne do inaktywacji pozostałych niezmutowanych receptorów. Receptory ET wykazują także funkcjonalną redundancję i wydaje się, że nie różnią się powinowactwem do cząsteczek fitohormonu. Różnice pomiędzy poszczególnymi receptorami dotyczą natomiast miejsca i czasu ekspresji ich genów, która

w przypadku *ERS1*, *ERS2* i *ETR2* jest regulowana przez ET, podczas gdy ekspresja pozostałych genów (*ETR1*, *EIN4*) nie podlega takiej regulacji [58]. Istnienie pętli sprzężenia zwrotnego polegające na zwiększaniu puli receptorów przez sam ET ma istotne znaczenie dla funkcjonowania szlaku sygnałowego. Z jednej strony zwiększanie liczby receptorów, będących negatywnymi regulatorami szlaku, prowadzi do obniżenia wrażliwości na hormon (desensytyzacja). Taki mechanizm ogranicza np. rozprzestrzenianie się nekrozy u pomidora, będącej następstwem infekcji patogenami [12]. Z drugiej strony, wyniki licznych badań pokazują, że wiązanie ET z receptorami jest stosunkowo trwałe. W przypadku ETR1 okres połowicznego rozpadu kompleksu hormon-receptor wynosi ponad 12h. W takiej sytuacji tylko synteza nowych receptorów umożliwia roślinie natychmiastową reakcję na spadek stężenia ET (resensytyzacja) [21, 72]. Pomimo, że szlak percepcji i transdukcji sygnału etylenowego został stosunkowo dobrze poznany to istnieje jeszcze wiele pytań, które wymagają wyjaśnienia, m.in. jaki jest dokładny mechanizm oddziaływań receptorów z białkiem CTR1?

KWAS ABSCYSYNOWY

Kwas abscysynowy (ABA) jest seskwiterpenoidem syntetyzowanym przez organizmy trzech królestw, a mianowicie grzyby, rośliny i metazoa [86]. Po raz pierwszy został odkryty i opisany u roślin okrytozalążkowych, gdzie działa jako fitohormon regulujący wiele aspektów ontogenezy, tj. spoczynek i kiełkowanie nasion czy wzrost i rozwój siewek [20]. ABA bierze również udział w procesie adaptacji roślin do warunków stresowych wywołanych zarówno przez czynniki biotyczne, jak i abiotyczne [23]. Wiele szczegółów dotyczących metabolizmu, transportu oraz szlaku transducji sygnału ABA zostało już opisanych [11, 80, 132, 134]. W ciągu ostatnich kilku lat koncentrowano się głównie na poszukiwaniu białka receptorowego, które bezpośrednio wiąże hormon i wyzwala dalszą kaskadę zdarzeń charakterystycznych dla ABA, wpływając tym samym na fizjologię całej rośliny. Poszukiwania właściwego receptora doprowadziły do wielu, czasami dyskusyjnych odkryć, które często wraz z upływem czasu były dementowane [98], a nawet wycofywane przez samych autorów [95]. W krótkim czasie pojawiło się kilka propozycji potencjalnych receptorów, wśród których znalazła się np. podjednostka H (CGLH/GUN5) plastydowej chelatazy wbudowującej jony magnezu do protoporfiryny IX [78, 112], białko błonowe GCR2 [31, 64] oraz białka GTG1 i GTG2 podobne do receptorów sprzężonych z białkami G [89]. Okazało się jednak, że kluczem do sukcesu może być osobliwa klasa małych, rozpuszczalnych białek *A. thaliana* należących do rodziny PYR/PYL/RCAR (ang. *Pyrabactin Resistance / PYR1-Like / Regulatory Component ABA Receptor*), która jednoznacznie posiada cechy wewnątrzkomórkowego receptora [65, 90]. Poznanie roli tych białek można uznać za wydarzenie

przełomowe, a kształtujący się obraz odbioru przez komórkę sygnału ABA ujawnia zaskakująco prosty mechanizm wykazujący pewne podobieństwa do tych, które funkcjonują w szlakach sygnałowych innych fitohormonów. Z drugiej jednak strony prezentuje nowatorski szlak przekazywania sygnału, mogący stanowić odrębną ścieżkę współczesnych badań.

KOMPLEKS RECEPTOROWY PYR/PYL/RCAR

Białka PYR/PYL/RCAR, pełniące rolę receptorów ABA, zostały odkryte i opisane w 2009 r. przez dwa niezależne zespoły badawcze [65, 90]. Białko RCAR1 zidentyfikowano techniką dwuhybrydowego systemu drożdżowego jako białko wchodzące w interakcje z fosfatazami ABI1 i ABI2 (ang. *ABA Insensitive 1/2*) [65]. Mechanizm tych oddziaływań polega na tym, że białko RCAR1 najpierw wiąże ABA i dopiero w formie kompleksu oddziałuje z fosfatazami białkowymi hamując ich aktywność katalityczną. Gen kodujący drugie białko PYR1 sklonowano wykorzystując mutanta niewrażliwego na pyrabaktynę [90]. Jest to syntetyczna substancja wywołująca u roślin odpowiedzi przypominające efekty działania ABA, głównie na wczesnym etapie kiełkowania nasion. Znacznie słabszą odpowiedź na ten związek zarejestrowano w czasie późniejszego wzrostu i rozwoju siewek, co sugeruje, że pyrabaktyna jest wysoce selektywnym agonistą ABA naśladującym tylko określony typ działań hormonu w trakcie ontogenezy. Wyniki badań prowadzonych na transgenicznych roślinach *A. thaliana* wykazały, że mutant *pyr1* wykazuje fenotyp zbliżony do roślin typu dzikiego i w sposób klasyczny odpowiada na podanie ABA [90]. Sugeruje to, że w genomie tej rośliny istnieją inne geny, których białkowe produkty są w stanie rekompensować utratę tego genu (tab. 1). Gen *PYR1* okazał się jednym z czternastu genów kodujących białka z charakterystyczną domeną START (ang. *Star-related lipid-Transfer*), które posiadają hydrofobową kieszeń wiążącą ligand. Pozostałe trzynaście białek poznanych m.in. przez grupę Rodriquez'a i Schroeder'a, nazwano PYL1-13 (ang. *PYR1-Like 1-13*) [83, 107], a opisane wcześniej białko RCAR1 okazało się białkiem PYL9 [65]. Analizy potrójnych (*pyr1 pyl1 pyl4*) i poczwórnych (*pyr1 pyl1 pyl2 pyl4*) mutantów wykazały, że charakteryzują się one znacznie zmniejszoną wrażliwością na ABA zarówno w procesie kiełkowania nasion, jak i wzrostu siewki [90]. Poczwórny mutant wykazał dodatkowo zmniejszoną wrażliwość na cząsteczki hormonu w procesie zamykania aparatów szparkowych [83]. Zgodnie z oczekiwaniami nadekspresja genów *PYL1* i *PYL4* u potrójnego mutanta przywróciła fenotyp rośliny typu dzikiego [90]. Wyciszenie genu *RCAR1* przy udziale interferującego RNA spowodowało zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej pierwotnych genów odpowiedzi na ABA, podczas gdy jego nadekspresja wzmocniła reakcje na podanie ABA [65]. Podobne efekty uzyskano tworząc mutanty z nadekspresją m.in. genu *PYL5* czy *PYL8* [104, 107].

TABELA 1. Rodzina 14 białek PYR/PYL/RCAR będących receptorami ABA u *A. thaliana*. Na podstawie [30, 82], zmodyfikowane
TABLE 1. Family of 14 proteins named PYR/PYL/RCAR which are ABA receptors in *A. thaliana*. According to [30, 82], modified

PYR/PYL	RCAR	Nr z banku genów NCBI
PYR1	RCAR11	At4g17870
PYL1	RCAR12	At5g46790
PYL2	RCAR14	At2g26040
PYL3	RCAR13	At1g73000
PYL4	RCAR10	At2g38310
PYL5	RCAR8	At5g05440
PYL6	RCAR9	At2g40330
PYL7	RCAR2	At4g01026
PYL8	RCAR3	At5g53160
PYL9	RCAR1	At1g01360
PYL10	RCAR4	At4g27920
PYL11	RCAR5	At5g45860
PYL12	RCAR6	At5g45870
PYL13	RCAR7	At4g18620

Kluczowe dla kompleksowego zrozumienia mechanizmu wiązania cząsteczek ABA do receptora okazały się wyniki analiz krystalograficznych dotyczących białek PYR1 [82, 106], PYL1 [73, 77, 149] oraz PYL2 [73, 149]. Ich strukturę trzeciorzędową stanowi siedem wstęg β, jedna wydłużona C-końcowa α-helisa oraz krótkie odcinki α-helis w N-końcowej i środkowej części polipeptydu. Przy udziale grupy karboksylowej cząsteczki hormonu wiązane są w specjalnej kieszeni receptora, która zawiera konserwowaną resztę lizyny i otoczona jest przez dwie pętle zlokalizowane pomiędzy wstęgami β3/β4 oraz β5/β6. Główną funkcją tych pętli jest ograniczanie dostępu do kieszeni wiążącej ABA. Przed związaniem cząsteczek hormonu obie pętle są wygięte na zewnątrz – czyli wejście do kieszeni jest otwarte. W momencie związania ABA dochodzi do zmian konformacyjnych, które powodują zgięcie pętli i zamknięcie wejścia [77, 82, 106, 149]. Bardziej obrazowo pętle te opisuje się jako swoistego rodzaju pokrywy lub zatrzaski [73]. W takiej sytuacji możliwe jest dalsze związanie fosfataz białkowych PP2C (np. ABI1 lub HAB1) i powstanie kompleksu PYR1/PYL/RCAR-ABA-PP2C. Mechanizm blokowania aktywności hydrolitycznej PP2C polega na tym, że pętla β3/β4 zawierająca resztę seryny znajduje się w bliskim sąsiedztwie z centrum katalitycznym fosfatazy i dochodzi do interakcji z resztą glutaminianu w wyniku czego fosfataza jest nieaktywna. Udowodniono również, że fosfataza oddziałuje bezpośrednio z ABA przyczyniając się w ten sposób do mocniejszego związania hormonu w kieszeni [73, 77]. Niektórzy postulują, że oddziałujące z kompleksem PYR1/PYL/RCAR-ABA fos-

fatazy białkowe zasługują na miano koreceptorów [73]. Inni uważają białka PYR1/PYL/RCAR za jedyne receptory i unikają terminu koreceptor, głównie dlatego, że według nich hormon jest całkowicie związany przez PYR/PYL/RCAR, a PP2C oddziałuje z nim tylko pośrednio za pomocą cząsteczek wody [149].

Białko PYL13, które posiada resztę glutaminy zamiast lizyny w miejscu gdzie dochodzi do związania ABA, nie wiąże hormonu i tym samym PP2C [73, 82, 149]. Jego funkcja pozostaje więc niejasna. Opisana zamiana kluczowego aminokwasu decydującego o roli danego białka nie jest jedyną, a drobne różnice strukturalne wśród białek PYR/PYL/RCAR odgrywają prawdopodobnie istotną rolę w interakcjach między receptorami i stereoizomerami ABA oraz pomiędzy receptorami, a różnymi białkami PP2C. Jeśli weźmiemy pod uwagę różnorodność rodziny białek PYR/PYL/RCAR, PP2C oraz SnRK2 staje się jasne, że szlak przekazywania sygnału ABA może być znacznie bardziej skomplikowany, a ilość możliwych połączeń pomiędzy poszczególnymi białkami może być znacząca. U podstaw tej różnorodności strukturalnej może leżeć również funkcjonalna plastyczność rośliny, która jest niezbędna w trakcie trwania całej ontogenezy w stale zmieniających się warunkach środowiska. Możliwe jest również, że niektóre z białek PYR/PYL/RCAR wiążą także intermediaty biosyntezy lub metabolity ABA.

FOSFATAZY PP2C – REGULATORY NEGATYWNE

Udział fosfataz białkowych PP2C grupy A (ang. *Protein Phosphatase 2C group A*) został potwierdzony w sygnalizacji ABA dużo wcześniej niż udział wewnątrzkomórkowego receptora, natomiast zagadkę stanowiła funkcja jaką pełnią te białka w odbiorze bodźca i dalszym przekazywaniu informacji. Białka PP2C odkryto i opisano we wszystkich królestwach, ale stanowią one wyjątkowo dużą i różnorodną rodzinę głównie u roślin [109]. Wśród najbardziej znanych białek tej rodziny możemy wyróżnić ABI1/ABI2, HAB1/HAB2 (ang. *Hypersensitive to ABA 1/2*) oraz AHG1/AHG3 (ang. *ABA Hypersensitive Germination 1/3*). Wszystkie one biorą udział w negatywnej regulacji sygnalizacji ABA, ponieważ wykazują zdolność do bezpośrednich oddziaływań z kinazami serynowo-treoninowymi hamując ich aktywność katalityczną [59, 131, 152] Wyniki badań wykorzystujących techniki mikromacierzy DNA pokazują, że białko ABI1 odgrywa kluczową rolę w szlaku ABA, ponieważ pojedyncza mutacja *abi1-1* zmienia ekspresję aż 84,5% z 1354 genów regulowanych przez ten fitohormon. Wyraźną funkcjonalną redundancję wykazują najbliżej spokrewnione z ABI1 fosfatazy ABI2 i HAB1/2. Pozostałe dwa elementy AHG1 i AHG3, tworzące oddzielną gałąź filogenetyczną, uczestniczą w szlaku ABA regulującym kiełkowanie nasion. Ponadto AHG3 oddziałuje z kanałami K^+-AKT2 z rodziny *shaker* oraz z AKT3 transportującymi do komórki jony potasu. Pojedyncze doniesienia sugerują, że w sieci sygnałowej ABA uczestniczą także niektóre heterotrimeryczne fosfatazy

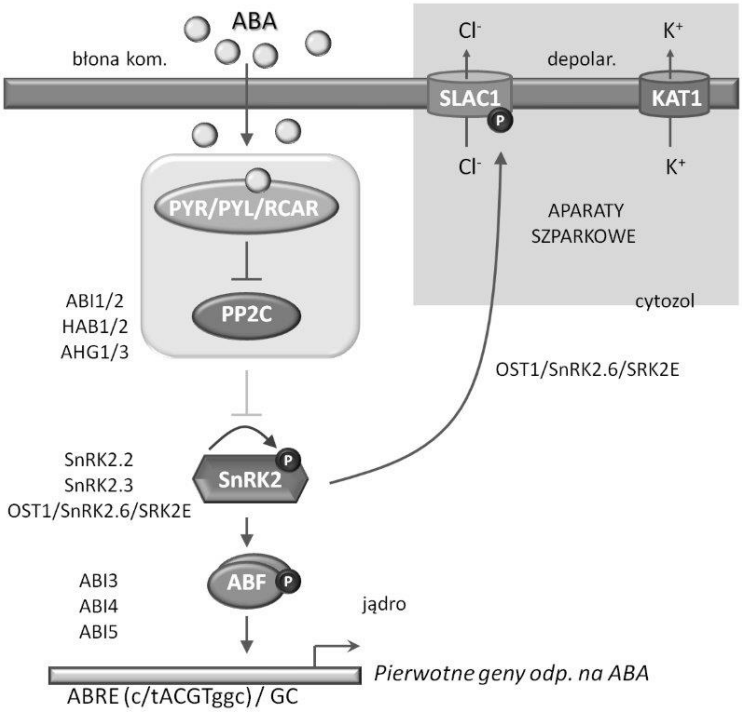
PP2A, które w komórkach szparkowych pośredniczą w aktywowanej przez ABA produkcji tlenku azotu. W tym odgałęzieniu szlaku sygnałowego wykorzystywane są cząsteczki sygnalne drugiego rzędu, tj. cADPR, $InsP_3$, $InsP_6$, DAG, których udział w sygnalizacji ABA badany jest od wielu lat [142].

KINAZY SNRK2 I CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE ABF – REGULATORY POZYTYWNE

Rolę pozytywnych regulatorów w szlaku transdukcji sygnału ABA pełnią kinazy należące do podrodziny SnRK2 (ang. *2 SNF1* (*sucrose non fermentation 1*) – *Related Kinases*). U *A. thaliana* scharakteryzowano 10 kinaz tego typu, ale pierwszą odkrytą u pszenicy (*Triticum aestivum*) była kinaza PKABA1. Jej wzmożona aktywność katalityczna indukowana przez cząsteczki hormonu, prowadzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych typu bZIP określanych jako ABF (ang. *ABA responsive element Binding Factor*). Inną kinazą SnRK2 zidentyfikowaną u bobu (*Vicia faba*) jest AAPK. Jest ona zaangażowana przede wszystkim w regulację ruchu komórek szparkowych. Homologiem AAPK u *A. thaliana* jest białko OST1/SnRK2.6/SRK2E (ang. *Open Stomata 1*) pełniące taką samą funkcję. Mechanizm tego procesu polega na regulacji stanu ufosforylowania kanałów SLAC1 (ang. *Slow Anion Channel associated 1*) zlokalizowanych w błonie komórkowej przez kinazę, która jest aktywna w warunkach wysokiego stężenia ABA (ryc. 8). Do kanałów SLAC1 dołączana jest grupa fosforanowa, co powoduje ich aktywację i jednocześnie wypływ jonów Cl^- z komórki. W wyniku depolaryzacji błony wypustowe kanały potasowe KAT1 (ang. *potassium channel in A. thaliana 1*) otwierają się przez co zmniejsza się również zawartość jonów K^+. We wnętrzu komórki dochodzi do wzrostu potencjału chemicznego wody, która w związku z tym wypływa do komórek sąsiednich gdzie potencjał wody jest mniejszy. Dalszym skutkiem jest zmniejszenie turgoru i zamykanie komórek szparkowych. Rolę białka OST1/SnRK2.6/SRK2E potwierdziły również wyniki badań nad mutantami, które wykazały, że *ost1* jest niewrażliwy na ABA, a rośliny charakteryzują się nadmierną utratą wody, która transpiruje przez otwarte aparaty szparkowe nawet w warunkach silnej suszy [60]. Oprócz kontroli kanałów jonowych, kluczowym wydarzeniem w szlaku transdukcji sygnału ABA jest aktywacja określonych czynników transkrypcyjnych. Dwie inne kinazy białkowe *A. thaliana* – SnRK2.2 i SnRK2.3, należące do tej samej grupy co OST1/SnRK2.6/SRK2E, fosforylują czynniki transkrypcyjne ABF, tj. ABI3 czy ABI5, które aktywują z kolei ekspresję genów mających w promotorach motyw ABRE (ang. *ABA-Responsive Elements*) [24, 83, 115, 152]. Inne czynniki typu AP2 (np. ABI4) łączą się natomiast z sekwencjami promotorów bogatych w nukleotydy GC. Podwójny mutant *snrk2.2 snrk2.3* charakteryzuje się całkowitym brakiem wrażliwości na ABA na etapie kiełkowania nasion, jak i wzrostu korzenia [24].

SZLAK TRANSDUKCJI SYGNAŁU ABA – PODSUMOWANIE

Przegląd białkowych elementów szlaku sygnałowego ABA pokazuje, że działają one w kompleksowej sieci wzajemnych powiązań. Niektóre z tych elementów łączą sygnalizację ABA ze szlakami aktywowanymi przez czynniki stresowe, a także przez cukry, GA czy ET. Poznanie mechanizmu hamowania fosfatazy PP2C przez kompleks PYR1/PYL/RCAR-ABA zmieniło dotychczasowe wyobrażenie o mechanizmie funkcjonowania ABA [22, 30]. W warunkach braku lub bardzo niskiego stężenia aktywnych cząsteczek hormonu (ryc. 8) białka PYR/PYL/RCAR występują w formie homodimeru, natomiast fosfataza białkowa PP2C z grupy A oddziałuje z kinazą serynowo-treoninową typu SnRK2, co prowadzi do jej defosforylacji. Mechanizm blokowania aktywności kinazy polega na konstytutywnej hydrolizie wiązania fosfoserynowego/fosfotreoninowego w pętli aktywacyjnej SnRK2.



RYCINA 8. Percepcja i transdukcja sygnału ABA. Uwzględniono zarówno mechanizm regulujący ruchy aparatów szparkowych, jak i aktywację czynników transkrypcyjnych zmieniających ekspresję pierwotnych genów odpowiedzi na hormon. Szczegóły w tekście. Na podstawie [110], zmodyfikowane
FIGURE 8. Perception and signal transduction of ABA. Takes into account both the mechanism regulating stomatal movements and activation of transcription factors changing the expression of hormone response genes. Details in the text. According to [110], modified

Taka sytuacja uniemożliwia w konsekwencji fosforylowanie czynników transkrypcyjnych ABF i aktywację pierwotnych genów odpowiedzi na hormon. W przypadku wysokiego stężenia ABA w komórce dochodzi do powstania kompleksu PYR1/PYL/RCAR-ABA-PP2C, co powoduje autofosforylację kilku reszt serynowych i treoninowych kinaz białkowych. Trzy najlepiej poznane kinazy SnRK2 (SnRK2.2, SnRK2.3 i SnRK2.6) fosforylują czynniki transkrypcyjne ABF, które w formie ufosforylowanej tworzą homo- lub heterodimery wiązane przez sekwencje ABRE/GC występujące w promotorach genów regulowanych przez ABA [73, 131, 143]. Kinazy kontrolują także stan ufosforylowania kanałów jonowych zlokalizowanych w błonie komórkowej, przez co regulują otwieranie i zamykanie komórek szparkowych. Eksperymentalna weryfikacja kaskady zdarzeń rozpoczętych przez związanie ABA z receptorem sprawiła, że uwaga badaczy koncentruje się w chwili obecnej na szukaniu odpowiedzi na pytania o funkcjonalną redundancję pomiędzy 14. białkami PYR1/PYR/RCAR poznanymi u *A. thaliana*, 10. fosfatazami grupy A PP2C i 10. kinazami SnRK2 [22, 82, 107]. Niektóre z uzyskanych już wyników zwracają uwagę na zależności pomiędzy odpowiednimi receptorami PYR1/PYR/RCAR wchodzącymi w skład tworzonych kompleksów, a plastycznością i wrażliwością odpowiedzi na czynniki stresowe [122, 143].

PODSUMOWANIE

Procesy związane z odbiorem i przekazywaniem informacji pochodzących ze środowiska, jak również sygnalizacja międzykomórkowa mają kluczowe znaczenie dla prawidłowego wzrostu i rozwoju wszystkich organizmów. W ostatnich kilkunastu latach intensyfikacja badań molekularnych doprowadziła do poznania wielu roślinnych białek receptorowych odgrywających kluczową rolę w pierwszych etapach odbioru bodźca. W przypadku trzech hormonów roślinnych, tj. BR, CK i ET, funkcję receptora pełni kinaza białkowa, natomiast w szlaku ABA kinazy są elementami dalszej kaskady zdarzeń. Mimo wielu podobieństw, w szlakach sygnałowych tych hormonów istnieją również różnice. Receptory ABA – PYR/PYL/RCAR zlokalizowane są we wnętrzu komórki [149], natomiast receptory pozostałych fitohormonów, tj. BR – BRI1 [61], ET – ETR1/2, ERS1/2 i EIN4 [8] oraz CK – AHK2/3/4 [43] związane są z błonami, przy czym w przypadku BR jest to błona komórkowa, a w pozostałych są to najprawdopodobniej wewnątrzkomórkowe błony ER. Często mamy do czynienia z występowaniem kompleksu receptorowego (receptor-koreceptor), np. BRI-BAK, czy sygnałosomu ETR1-CTR1. W sygnalizacji ABA sprawą dyskusyjną jest czy PYR/PYL/RCAR jest jedynym receptorem, czy też fosfatazę PP2C powinniśmy uznać jako jego koreceptor. W przypadku CK pewne jest, że receptor nie wchodzi w interakcje z żadnym innym białkiem.

Związanie bioaktywnych cząsteczek hormonu powoduje różne skutki. Najczęściej dochodzi do aktywacji receptora będącego pozytywnym elementem szlaku (BR, CK, ABA). Czasami jednak, tak jak w przypadku sygnalizacji ET, aktywność receptora blokuje szlak prowadzący do zmiany ekspresji pierwotnych genów odpowiedzi na ten hormon. Dopiero związanie ET prowadzi do dezaktywacji receptora, co w konsekwencji znosi represję szlaku (derepresja). Przekazywanie sygnału w dwuskładnikowych systemach regulacyjnych opiera się na przepływie grupy fosforanowej z kinazy histydynowej na regulator odpowiedzi. W odróżnieniu od bakterii, u roślin często pojawiają się dodatkowe moduły, które umożliwiają przepływ informacji między kolejnymi elementami szlaku. W przypadku CK szlak jest stosunkowo prosty i mało skomplikowany, natomiast w sygnalizacji ET pojawiają się już dodatkowe kaskady fosforylacyjne. Dodatkowo regulacja aktywności licznych białek regulatorowych będących składnikami szlaku zarówno ET, jak i BR, odbywa się poprzez ich selektywną degradację w proteasomach 26S. Taki układ pozwala roślinie efektywniej reagować na zmiany stężenia hormonu. Sygnał pochodzący od BR komórki roślinne odbierają za pośrednictwem receptorowych kinaz białkowych, które fosforylują reszty seryny, treoniny i tyrozyny. Odkrycie podwójnej specyficzności kompleksu receptorowego jest nowością w świecie roślin, ponieważ do tej pory przypuszczano, że fosforylacja reszt tyrozyny jest wysoce specyficzna i charakterystyczna tylko i wyłącznie dla zwierząt. W przypadku sygnalizacji ABA mamy do czynienia z kinazami serynowo -treoninowymu, ale tak jak wcześniej było już wspomniane, nie pełnią one funkcji receptorowej, a jedynie pozytywnego elementu szlaku sygnałowego tego hormonu.

Przedstawione w niniejszej pracy mechanizmy percepcji i transdukcji sygnału czterech, spośród siedmiu kluczowych grup hormonów roślinnych są wciąż dalekie od pełnego zrozumienia i wymagają dalszych badań, jednak ich ważność nie podlega żadnym wątpliwościom.

PODZIĘKOWANIA

Praca została sfinansowana z grantu MRiRW nr 149/2011 oraz grantu UMK nr 1530-B

LITERATURA

[1] Argueso CT, Raines T, Kieber JJ. Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Curr Opin Plant Biol* 2010; **13**: 533-539.

[2] Argyros RD, Mathews DE, Chiang YH, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE. Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell* 2008; **20**: 2102-2116.

[3] Assmann SM. G proteins go green: a plant G protein signaling. *Science* 2005; **310**: 71-73.

[4] Barry CS, Mcquinn RP, Thompson AJ, Seymour GB, Grierson D, Giovannoni JJ. Ethylene insensitivity conferred by the greenripe and never-ripe 2 ripening mutants of tomato. *Plant Physiol* 2005; **138**: 267-275.

[5] Bisson MM, Bleckmann A, Allekotte S, Groth G. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *Biochem J* 2009; **424**: 1-6.

[6] Caesar K, Elgass K, Chen Z, Huppenberger P, Witthoft J, Schleifenbaum F, Blatt MR, Oecking C, Harter K. A fast brassinolide regulated response pathway in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2011; **66**: 528-540.

[7] Cano-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-Garcia S, Cheng JC, Nam KH, Li J, Chory J. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* 2004; **131**: 5341-5351.

[8] Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 19861-19866.

[9] Chen YF, Shakeel SN, Bowers J, Zhao XC, Etheridge N, Schaller GE. Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2007; **282**: 24752-24758.

[10] Chevalier F, Perazza D, Laporte F, Le Henanff G, Hornitschek P, Bonneville JM, Herzog M, Vachon G. GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that regulate cytokinin response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008; **146**: 1142-1154.

[11] Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E. Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol* 2006; **8**: 314-325.

[12] Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ. Response to *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiol* 2000; **123**: 81-92.

[13] Clouse SD. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 2011; **23**: 1219-1230.

[14] Davies PJ. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! Dordrecht Kluwer Academic Publishers 2004, The Netherlands, 63-94.

[15] Di Matteo A, Federici L, Mattei B, Salvi G, Johnson KA, Savino C, De Lorenzo G, Tsernoglou D, Cervone F. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine rich repeat protein involved in plant defense. *PNAS USA* 2003; **100**: 10124-10128.

[16] Di Rubbo S, Irani NG, Russinova E. PP2A phosphatases: the "on-off" regulatory switches of brassinosteroid signaling. *Sci Signal* 2011; **4**: 25.

[17] Dong CH, Rivarola M, Resnick JS, Maggin BD, Chang C. Subcellular co-localization of *Arabidopsis* RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signalling. *Plant J* 2008, **53**: 275-286.

[18] Ehsan H, Ray WK, Phinney B, Wang X, Huber SC, Clouse SD. Interaction of *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF-β receptor interacting protein. *Plant J* 2005; **43**: 251-261.

[19] Faiss M, Zalubilova J, Strnad M, Schmulling T. Conditional transgenic expression of the *IPT* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J* 1997; **12**: 401-415.

[20] Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD. Abscisic acid signalling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 2002; 14: 15-45.

[21] Frankowski K, Kęsy J, Kotarba W, Kopcewicz J. Szlaki przekazywania sygnałów indukowane przez etylen. *Post Biochem* 2008; **54**: 99-106.

[22] Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK. *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 2009; **462**: 660-664.

[23] Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signalling networks. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 436-442.

[24] Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T et all. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2009; **50**: 2123-2132.

[25] Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem* 2003; **278**: 34725-34732.

[26] Geldner N, Hyman DL, Wang X, Schumacher K, Chory J. Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev* 2007; **21**:1598-1602.

[27] Gruszka D, Małuszyński M. Brasinosteroidy – struktura chemiczna, genetyczne podstawy biosyntezy i transdukcji sygnału oraz funkcje fizjologiczne. *Post Biol Kom* 2010; **37**: 381-407.

[28] Guo H, Ecker Jr. Plant responses to ethylene gas are mediated by $SCF^{EBF1/EBF2}$-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 2003; **115**: 667-677.

[29] Guo H, Ecker Jr. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 40-49.

[30] Guo J, Yang X, Weston DJ, Chen JG. Abscisic acid receptors: past, present and future. *J Int Plant Biol* 2011; **53**: 469-479.

[31] Guo J, Zeng Q, Emami M, Ellis BE, Chen J. The GCR2 gene family is not required for ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *PLOS One* 2008; **3**: 2982.

[32] Hall B, Shakeel S, Schaller G. Ethylene receptors: ethylene perception and signaling transduction. *J Plant Growth Regul* 2007; **26**: 118-130.

[33] Hardie DG. Roles of protein kinases and phosphatases in signal transduction. *Symp Soc Exp Biol* 1990; **44**: 241-255.

[34] Heyl A, Riefler M, Romanov Ga, Schmulling T. Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *Eur J Cell Biol* 2012; **91**: 246-256.

[35] Heyl A, Wulfetange K, Pils B, Nielsen N, Romanov GA, Schmulling T. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol Biol* 2007; **7**: 62.

[36] Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M et all. *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *PNAS USA* 2004; **101**: 8821-8826.

[37] Hink MA, Shah K, Russinova E, De Vries SC, Visser AJWG. Fluorescence fluctuation analysis of *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinase and Brassinosteroid Insensitive 1 receptor oligomerization. *Biophys J* 2008; **94**: 1052-1062.

[38] Hothorn M, Belkhadir Y, Dreux M, Dabi T, Noel JP, Wilson IA, Chory J. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* 2011; **474**: 467-471.

[39] Hua J, Meyerowitz EM. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 1998; **94**: 261-271.

[40] Hutchison CE, Kieber JJ. Signaling via histidine-containing phosphotransfer proteins in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 2007; **2**: 287-289.

[41] Hwang I, Chen HC, Sheen J. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; **129**: 500-515.

[42] Hwang I, Sheen J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* signal transduction. *Nature* 2001; **413**: 383-389.

[43] Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 2001; **409**: 1060-1063.

[44] Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, Mizuno T. Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2008; **49**: 47-57.

[45] Jaillais Y, Hothorn M, Belkhadir Y, Dabi T, Nimchuk ZL, Meyerowitz EM, Chory J. Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev* 2011; **25**: 232-237.
[46] Jakubowska A, Ostrowski M, Kowalczyk S. Kinazy receptorowe roślin. *Post Biochem* 2007; **53**: 133-142.
[47] Janssens V, Longin S, Goris J. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci* 2008; **33**: 113-121.
[48] Jones AM, Assmann SM. Plants: the latest model system for G protein research. *EMBO* 2004; **5**: 572-578.
[49] Kakimoto T. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 1996; **274**: 982-985.
[50] Karlova R, De Vries SC. Advances in understanding brassinosteroid signaling. *Sci STKE* 2006; **354**: 36.
[51] Kendrick MD, Chang C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr Opin Plant Biol* 2008; **11**: 479-485.
[52] Kieber JJ, Schaller GE. The perception of cytokinin: a story 50 years in the making. *Plant Physiol* 2010; **154**: 487-492.
[53] Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *PNAS USA* 2006; **103**: 814-819.
[54] Kim TW, Wang ZY. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 2010; **61**: 681-704.
[55] Kinoshita T, Cano-Delgado A, 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**: 167-170.
[56] Klee H, Tieman D. The tomato ethylene receptor gene family: form and function. *Physiol Plant* 2002; **115**: 336-341.
[57] Kopcewicz J, Lewak S. Fizjologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2012, Warszawa.
[58] Kowalczyk S, Hetmann A. Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Post Biochem* 2003; **49**: 298-318.
[59] Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *PNAS USA* 2009; **106**: 21419-21424.
[60] Lee SC, Luan S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Env* 2012; **35**: 53-60.
[61] Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 1997; **90**: 929-938.
[62] 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.
[63] Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 2002; **110**: 213-222.
[64] Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH, Ma L. A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 2007; **315**: 1712-1716.
[65] Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 2009; **324**: 1064-1068.
[66] Mahonen AA, Bonke M, Kauppinen L, Riikone M, Benfey PN, Helariutta Y. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 2000; **14**: 2938-2943.
[67] Mahonen AP, Higuchi M, Tormakangas K, Miyawaki K, Pischke MS, Sussman MR, Helariutta Y, Kakimoto T. Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2006; **16**: 1116-1122.

[68] Marciniak K, Świeżawska B, Kęsy J, Tretyn A, Kopcewicz J. Gibereliny – percepcja i transdukcja sygnału u roślin. *Post Biol Kom* 2012; 39: 25-48.

[69] Marciniak K, Turowski T, Wilmowicz E, Frankowski K, Kęsy J, Kopcewicz J. Ligazy ubikwitynowo-białkowe w szlakach sygnałowych auksyn, jasmonianów i giberelin. *Post Biol Kom* 2010; **37**: 409-432.

[70] Marzec M, Muszyńska A. Strigolaktony – nowi kandydaci na hormony roślinne. *Post Biol Kom* 2012; **39**: 63-86.

[71] Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; **17**: 3007-3018.

[72] Mason MG, Schaller GE. Histidine kinase activity and the regulation of ethylene signal transduction. *Can J Bot* 2005; **83**: 563-570.

[73] Melcher K, Ng LM, Zhou XE et all. A gate–latch–lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 2009; **462**: 602-608.

[74] Menke FLH, Van Pelt JA, Pieterse CMJ, Klessiga DF. Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **42**: 897-907.

[75] Miller CO, Skoog F, Von Saltzam H, Strong F. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 1955; 77: 1392.

[76] Miwa K, Ishikawa K, Terada K, Yamada H, Suzuki T, Yamashino T, Mizuno T. Identification of amino acid substitutions that render the *Arabidopsis* cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. *Plant Cell Physiol* 2007; **48**: 1809-1814.

[77] Miyazono KI, Miyakawa T, Sawano Y et all. Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 2009; **462**: 609-614.

[78] Muller AH, Hansson M. The barley magnesium chelatase 150-kDa subunit is not an abscisic acid receptor. *Plant Physiol* 2009; **150**: 157-166.

[79] 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.

[80] Nambara E, Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann Rev Plant Biol* 2005; **56**: 165-185.

[81] Nemhauser JL, Hong FX, Chory J. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 2006; **126**: 467-475.

[82] Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED. Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 2009; **326**: 1373-1379.

[83] Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K et all. PYR/PYL/RCAR family members are major *in-vivo* ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *Plant J Cell Mol Biol* 2010; **61**: 290-299.

[84] Oh MH, Wang X, Kota U, Goshe MB, Clouse SD, Huber SC. Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *PNAS USA* 2009; **106**: 658-663.

[85] Oh MH, Wang X, Wu X, Zhao Y, Clouse SD, Huber SC. Autophosphorylation of Tyr-610 in the receptor kinase BAK1 plays a role in brassinosteroid signaling and basal defense gene expression. *PNAS USA* 2010; **107**: 17827-17832.

[86] Oritani T, Kiyota H. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. *Nat Prod Rep* 2003; **20**: 414-425.

[87] Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt HA. MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J* 2003; **22**: 1282-1288.

[88] Pandey S, Assmann SM. The *Arabidopsis* putative G protein coupled receptor GCR1 interacts with the G protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* 2004; **16**: 1616- 1632.

[89] Pandey S, Nelson DC, Assmann SM. Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 2009; **136**: 136-148.
[90] Park SY, Fung P, Nishimura N et all. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 2009; **324**: 1068-1071.
[91] Piotrowska A, Czerpak R. Molekularne mechanizmy działania cytokinin. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 93-115.
[92] Punwani JA, Hutchison CE, Schaller GE, Kieber JJ. The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *Plant J* 2010; **62**: 473-482.
[93] Qiao H, Chang KN, Yazaki J, Ecker Jr. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2009; **23**: 512-521.
[94] Rashotte AM, Mason MG, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ. A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediatescytokinin responses inconcert with a two-component pathway. *PNAS USA* 2006; **103**: 11081-11085.
[95] Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD. Retraction. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 2008; **456**: 824.
[96] Resnick JS, Wen CK, Shockey JA, Chang C. Reversion-to-ethylene sensitivity 1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in *Arabidopsis*. *PNAS USA* 2006; **103**: 7917-7922.
[97] Risk JM, Day CL, Macknight RC. Reevaluation of abscisic acid-binding assays shows that G-protein-coupled receptor 2 does not bind abscisic acid. *Plant Physiol* 2009; **150**: 6-11.
[98] Risk JM, Macknight RC, Day CL. FCA does not bind abscisic acid. *Natur*e 2008; **456**: 5-6.
[99] Rivarola M, Mcclellan CA, Resnick JS, Chang C. ETR1-specific mutations distinguish ETR1 from other *Arabidopsis* ethylene receptors as revealed by genetic interaction with RTE1. *Plant Physiol* 2009; **150**: 547-551.
[100] Romanov GA, Lomin SN, Schmulling T. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot* 2006; **57**: 4051-4058.
[101] Rudrabhatla P, Reddy MM, Rajasekharan R. Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Mol Biol* 2006; **60**: 293-319.
[102] Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, Chory J, De Vries SC. Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* 2004; **16**: 3216-3229.
[103] Ryu H, Kim K, Cho H, Hwang I. Predominant actions of cytosolic BSU1 and nuclear BIN2 regulate subcellular localization of BES1 in brassinosteroid signaling. *Mol Cells* 2010; **29**: 291-296.
[104] Saavedra X, Modrego A, Rodriguez D, Gonzalez-Garcia MP, Sanz L, Nicolas G, Lorenzo O. The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of the *Fagus sylvatica* FSPP2C1 is a positive regulator of ABA signalling in seeds and stress. *Plant Physiol* 2010; **152**: 133-150.
[105] Sakai H, Aoyama T, Oka A. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* 2000; **24**: 703-711.
[106] Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park SY, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* 2009; **462**: 665-668.
[107] Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Marquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL. Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* 2009; **60**: 575-588.
[108] Scheres B, Di Laurenzo L, Willemsen V, Hauser MT, Janmaat K, Weisbeek P, Benfey PN. Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 1995; **121**: 53-62.
[109] Schweighofer A, Hirt H, Meskiene L. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signalling. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 236-243.
[110] Shan X, Yan J, Xie D. Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* 2012; **15**: 84 –91.

[111] She J, Han Z, Kim TW, Wang J, Cheng W, Chang J, Shi S, Wang J, Yang M, Wang ZY, Chai J. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* 2011; **474**: 472-476.
[112] Shen Y, Wang X, Wu F, Du S, Cao Z, Shang Y, Wang X, Peng C, Yu X, Zhu S et all. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 2006; **443**: 823-826.
[113] Shiu SH, Bleecker AB. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci Sig Trans Knowl Environ* 2001; 113: 22.
[114] Shiu SH, Bleecker AB. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *PNAS USA* 2001; **98**: 10763-10768.
[115] Sirichandra C, Davanture M, Turk BE, Zivy M, Valot B, Leung J, Merlot S. The *Arabidopsis* ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLOS One* 2010: **5**: 13935.
[116] Smigocki AC. Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. *Plant Mol Biol* 1991; **16**: 105-115.
[117] Stepanova AN, Alonso JM. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol* 2009; **12**: 548-555.
[118] Stock JB, Stock AM, Mottonen JM. Signal transduction in bacteria. *Nature* 1990; **344**: 395-400.
[119] Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang W, He K, Zhu JY, He JX, Bai MY, Zhu S, Oh E, Patil S, Kim TW, Ji H, Wong WH, Rhee SY, Wang ZY. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 2010; **19**: 765-777.
[120] Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H, Mizuno T. The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinin. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 107-113.
[121] Szekeres M. Brassinosteroid and systemin: two hormones perceived by the same receptor. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 102-104.
[122] Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E. Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J* 2010; **61**: 25-35.
[123] Tang W, Kim TW, Oses-Prieto JA, Sun Y, Deng Z, Zhu S, Wang R, Burlingame AL, Wang ZY. BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science* 2008; **321**: 557-560.
[124] Thomason P, Kay R. Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J Cell Sci* 2000; **113**: 3141-3150.
[125] To JPC, Deruere J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ. Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* 2007; **19**: 3901-3914.
[126] To JPC, Haberer G, Ferreira FJ, Deruere J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ. Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* 2004; **16**: 658-671.
[127] To JPC, Kieber JJ. Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 85-92.
[128] Torii KU. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* 2004; **234**: 1-46.
[129] Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 231-235.
[130] Ueguchi C, Sato S, Katot, Tabata S. The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 751-755.
[131] Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi- Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *PNAS USA* 2009; **106**: 17588-17593.

[132] Urano K, Maruzama K, Ogata Y et all. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *Plant J* 2009; **57**: 1065-1078.
[133] Van Der Ent S, Pieterse CMJ. Ethylene: multi-tasker in plant–attacker interactions. [W:] *Ann Plant Rev* 2012; 44: The plant hormone ethylene (ed M. T. McManus), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
[134] Verslues PE, Zhu JK. New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 447-452.
[135] Wang ZY. Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels. *PNAS USA* 2012; 109: 7-8.
[136] Wang X, Kota U, He K, Blackburn K, Li J, Goshe MB, Huber SC, Clouse SD. Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell* 2008; **15**: 220-235.
[137] Wang X, Chory J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* 2006; **313**: 1118-1122.
[138] Wang W, Esch JJ, Shiu SH, Agula H, Binder BM, Chang C, Patterson SE, Bleecker AB. Ident ification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; **18**: 3429-3442.
[139] Wang X, Goshe MB, Soderblom 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-insensitive 1 receptor kinase. *Plant Cell* 2005; **17**: 1685-1703.
[140] Wang X, Li X, Meisenhelder J, Hunter T, Yoshida S, Asami T, Chory J. Autoregulation and homodimerization are involved in the action of the plant steroid receptor BRI1. *Dev Cell* 2005; **8**: 855-865.
[141] Wang H, Yang C, Zhang C, Wang N, Lu D, Wang J, Zhang S, Wang Zx, Ma H, Wang X. Dual role of BKI1 and 14-3-3 s in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors. *Dev Cell* 2011; 21: 825-834.
[142] Wasąg P, Kowalczyk S. Wewnątrzkomórkowe i błonowe receptory kwasu abscysynowego. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 3-22.
[143] Wasąg P, Kowalczyk S. Stresujące pomyłki i spektakularne sukcesy w poszukiwaniach receptorów ABA – roślinnego hormonu stresu. *Post Biol Kom* 2010; **37**: 713-720.
[144] Wu G, Wang X, Li X, Kamiya Y, Otegui MS, Chory J. Methylation of a phosphatase specifies dephosphorylation and degradation of activated brassinosteroid receptors. *Sci Signal* 2011; **4**: 29.
[145] Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmulling T. The cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana* are locating mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* 2011; **156**: 1808-1818.
[146] Wulfetange K, Saenger W, Schmulling T, Heyl A. *E. coli*-based cell-free expression, purification and characterization of the membrane-bound ligand binding CHASE-TM domain of the cytokinin receptor CRE1/AHK4 of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biotechnol* 2011; **47**: 211-219.
[147] Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 1017-1023.
[148] Ye H, Li L, Yin Y. Recent advances in the regulation of brassinosteroid signaling and biosynthesis pathways. *J Int Plant Biol* 2011; 53: 455-468.
[149] Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan X, Wu D, Pang Y, Yan C, Li W, Wang J, Yan N. Structural insights into the mechanism of abscisic acid signalling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**: 1230-1236.
[150] Yonekura-Sakakibara K, Kojima M, Yamaya T, Sakakibara H. Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiol* 2004; **134**: 1654-1661.
[151] Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* 2008; **451**: 789-795.

[152] Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2006; **281**: 5310-5318.
[153] Yu X, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H, Foudree A, Guo H, Anderson S, Aluru S, Liu P, Rodermel S, Yin Y. A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BESI target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2011; **65**: 634-646.
[154] Zhou A, Li J. *Arabidopsis* BRS1 is a secreted and active serine carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2005; **280**: 35554-35561.

Redaktor prowadzący –

Otrzymano: 13.01.2013
Przyjęto: 21.03.2013
Katarzyna Marciniak
ul. Rakowicza 7B/62
87-100 Toruń
e-mail: kasia_swiniarska@o2.pl