

GENY WCZESNYCH ODPOWIEDZI NA AUKSYNĘ*

EARLY AUXIN-RESPONSIVE GENES

Maciej OSTROWSKI, Anna JAKUBOWSKA

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

Streszczenie: Auksyny stanowią małą grupę hormonów roślinnych (fitohormonów), które odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin związanych z wydłużaniem, podziałami i różnicowaniem komórek. Działanie auksyn związane jest nie tylko z procesami zachodzącymi w obrębie błony komórkowej, ale także z regulacją ekspresji genów. Udział auksyn w regulacji ekspresji genów jest na obecnym etapie badań dobrze udokumentowany. Stosując różne techniki badawcze zidentyfikowano liczne geny indukowane auksyną, przede wszystkim w tkankach podlegających wzrostowi wydłużeniowemu oraz w dzielących się komórkach. Poziom mRNA tych genów zmienia się w ciągu kilku do kilkudziesięciu minut po podaniu auksyny, także w obecności cykloheksymidu, inhibitora syntezy białek. Oznacza to, że synteza białek nie jest konieczna do aktywacji genów, co sugeruje, że sygnał hormonalny jest przekazywany bezpośrednio do jądra za pośrednictwem składników istniejących już w komórce. Z tego względu geny te są określane mianem genów wczesnych lub pierwotnych odpowiedzi na auksynę. Zostały one podzielone na trzy główne klasy: *Aux/IAA*, *GH3* i *SAUR*. Geny należące do rodziny *Aux/IAA* funkcjonują w odpowiedziach na auksynę związanych z działaniem światła. Rodzina *GH3* obejmuje liczne geny, z których część koduje białka enzymatyczne o aktywności adenylującej uczestniczące w tworzeniu koniugatów kwasu indolilo-3-octowego, kwasu salicylowego i kwasu jasmonowego z aminokwasami. Powstawanie nieaktywnych biologicznie koniugatów IAA z aminokwasami reguluje homeostazę auksynową. Analizy mutantów *GH3* wykazują, że białka kodowane przez te geny uczestniczą w procesach fotomorfogenezy, wzrostu wydłużeniowego korzeni i hipokotyli oraz w odpowiedziach na stres biotyczny i abiotyczny. Geny *GH3* są także regulowane przez światło, co wskazuje na udział wspólnych elementów w przekazywaniu szlaku auksynowego i świetlnego. Produktem ekspresji genów *SAUR* są krótko żyjące małe zasadowe białka jądrowe o nieustalonej dotychczas funkcji, niezdolne do regulowania transkrypcji. Niektóre z genów *SAUR* mogą brać udział w odpowiedziach na auksynę, w których pośredniczy kalmodulina. Geny wczesnych odpowiedzi na auksynę zawierają w swoich promotorach konserwatywne sekwencje TGTCTC określane jako elementy odpowiedzi na auksynę (AuxRE). Są one rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne, tzw. czynniki odpowiedzi auksynowej (ARF), które wiążąc się z elementami AuxRE mogą aktywować bądź hamować ekspresję genów docelowych. *Aux/IAA* kodują krótko żyjące białka represorowe tworzące kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi ARF. Powstawanie heterodimerów Aux/IAA-ARF hamuje aktywność transkrypcyjną czynników ARF. Auksyna promuje oddziaływanie pomiędzy Aux/IAA i białkami receptorowymi auksyn, TIR1/AFB, zwiększając tym samym tempo degradacji Aux/IAA w szlaku

*Praca finansowana ze stypendium dla doktorantów ZPORR SPS.IV-3040-UE/334/2009.

ubikwityna/proteasom 26S. Białka ARF uwolnione z kompleksów z represorami regulują aktywność genów indukowanych auksyną. Praca przedstawia postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w badaniach genów wczesnych odpowiedzi na auksynę, szczególnie w poznawaniu ich funkcji fizjologicznych oraz biologicznej roli białek kodowanych przez te geny.

Słowa kluczowe: auksyna, *Aux/IAA*, czynniki odpowiedzi auksynowej, elementy odpowiedzi na auksynę, *GH3*, *SAUR*.

Summary: The plant hormone (phytohormone), auxin plays a crucial role in a wide variety of growth and developmental processes involving cell elongation, division and differentiation. The cellular responses to auxin involve not only electrophysiological changes at the plasma membrane, but also fast alterations of gene expression. Currently, the involvement of auxin in the regulation of gene expression is well-recognized. Using differential screening approaches, a number of auxin-regulated genes have been identified, mainly in elongating tissues and dividing cells. mRNA levels of these genes were altered within minutes after auxin application and were unaffected by treatment with protein synthesis inhibitor, cycloheximide. It means that protein synthesis is not required for their activation, suggesting that the hormonal signal is transmitted to the nucleus via preexisting components. These genes are referred to as early or primary auxin response genes and classified into three major classes known as the *Aux/IAA*, *GH3* and *SAUR* gene families. Members of the *Aux/IAA* gene family are involved in light regulation of auxin responses. Several *GH3* genes encode acyladenylate-forming enzymes that catalyze conjugation of indole-3-acetic acid, jasmonic acid and salicylic acid to amino acids. The *GH3* enzymes regulate auxin homeostasis by conjugating excess hormone to amino acids. Analysis of *GH3* mutants indicated the involvement of these genes in photomorphogenesis, root and hypocotyl elongation and both biotic and abiotic stress adaptation responses. *GH3* genes are also regulated by light suggesting a role of *GH3* proteins in light-auxin interactions. *SAUR* are small short-lived basic nuclear proteins that physiological functions remain unknown. Some members of *SAUR* family have been implicated in calcium/calmodulin-mediated auxin responses. The conserved sequences TGTCTC named the auxin response elements (AuxREs) within the promoters of early auxin response genes have been identified and a family of auxin response factors (ARFs) binding to AuxRE has also been characterized. ARF proteins either promote or inhibit target gene expression. *Aux/IAA* genes encode short lived nuclear proteins that themselves do not directly bind DNA, but bind to ARF proteins resulting in repression of their transcriptional activity. Auxin promotes the interaction between *Aux/IAA* and TIR1/AFB proteins and increases the degradation rate of *Aux/IAA* proteins in ubiquitin/proteasom 26S pathway, such that ARF activity is derepressed and numerous auxin-mediated transcriptional changes occur. ARF proteins released from their repressor counterparts regulate the transcription of auxin response genes. This review describes recent advances in studies on early auxin response genes and physiological functions of the proteins encoded.

Key words: auxin, auxin response element, auxin response factor, *Aux/IAA*, *GH3*, *SAUR*.

WSTĘP

Auksyny stanowią małą grupę hormonów roślinnych (fitohormonów), które odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin związanych z wydłużaniem, podziałami i różnicowaniem komórek. Różnorodność odpowiedzi na auksynę wskazuje na złożony mechanizm działania fitohormonu. Poznanie tego mechanizmu jest jednym z wiodących problemów badawczych w biologii roślin od czasu identyfikacji pierwszej, najważniejszej auksyny, tj. kwasu indolilo-3-octowego (IAA). Już w latach 80. ubiegłego wieku rezultaty licznych badań wskazywały, że działanie auksyn związane jest nie tylko z procesami zachodzącymi w obrębie błony komórkowej, ale także z regulacją ekspresji genów [18,79]. Ostatecznym dowodem na udział auksyn w szybkiej i specyficznej indukcji wielu genów było odkrycie przed

kilkoma laty jądrowego receptora auksyn, białka TIR1, wiążącego hormon i jednocześnie oddziałującego z białkami hamującymi aktywność czynników transkrypcyjnych, które regulują transkrypcję genów auksynowych [7,27].

Wśród genów regulowanych przez auksyny zidentyfikowano wiele takich, które bardzo szybko ulegają ekspresji w odpowiedzi na wzrost stężenia hormonu i dlatego są one określane jako tzw. geny wczesnych lub geny pierwotnych odpowiedzi na auksynę [1]. mRNA tych genów identyfikowano już w ciągu 2–5 minut po podaniu auksyny, a ich ekspresja nie była hamowana przez cykloheksymid, inhibitor biosyntezy białka. Oznacza to, że elementy systemu transkrypcyjnego są obecne w komórce i transkrypcja tych genów jest niezależna od syntezy czynników białkowych *de novo*. Większość genów indukowanych auksyną zawiera w regionie promotora konserwatywne elementy *cis* określane jako elementy odpowiedzi na auksynę – AuxRE (ang. *Auxin Response Element*) [18]. Z elementami AuxRE wiążą się specyficznie czynniki transkrypcyjne z rodziny ARF (ang. *Auxin Response Factor*), które aktywują lub hamują transkrypcję genów docelowych. Auksyny regulują szybką i przejściową ekspresję genów wczesnych wpływając na typ oddziaływań pomiędzy czynnikami ARF a ich represorami, białkami Aux/IAA (ang. *Auxin/Indole-3-Acetic Acid*) [18].

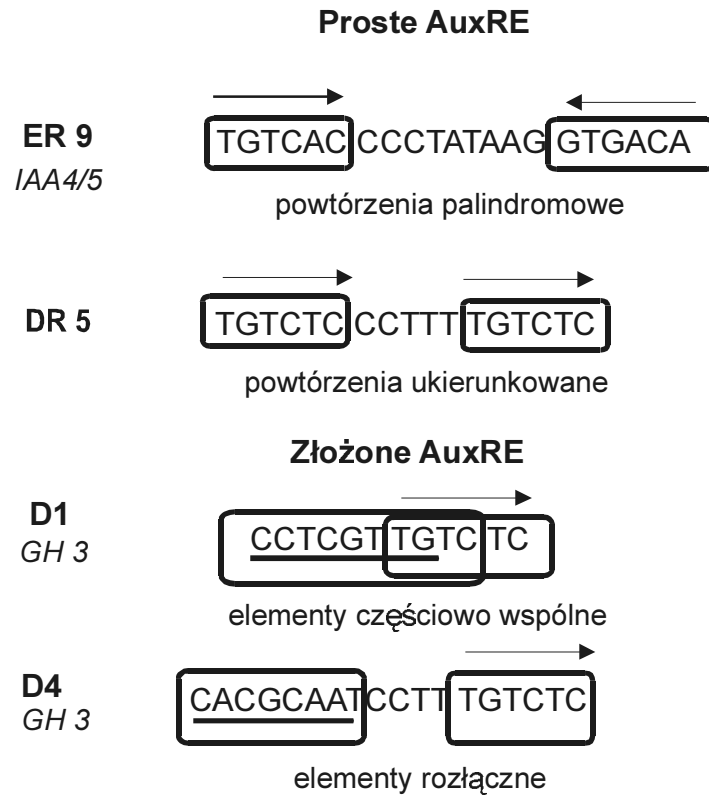
Geny wczesnych odpowiedzi na auksynę zawierające w sekwencjach promotorowych elementy AuxRE zostały podzielone na 3 klasy na podstawie stopnia homologii nukleotydowej: *Aux/IAA*, *GH3* oraz *SAUR* [18]. Są one najszerzej badane i najlepiej poznane u *Arabidopsis thaliana*, ale zidentyfikowano je także u innych roślin dwuliściennych, takich jak: soja, groch, tytoń czy pomidor oraz u jednoliściennych, np. ryż [13]. Badania tych genów, szczególnie charakterystyka obszarów promotorowych zawierających elementy odpowiedzi na auksynę, a także identyfikacja czynników transkrypcyjnych oraz związanych z nimi białek regulatorowych, są kluczowe dla poznania szlaku transdukcji sygnału hormonalnego i pełnego zrozumienia mechanizmu działania auksyn na poziomie molekularnym. Wyniki tych badań przedstawione są w kilku anglojęzycznych pracach przeglądowych [18,40,76,79], natomiast w polskim piśmiennictwie temat genów wczesnych odpowiedzi na auksynę był poruszany częściowo w artykułach publikowanych w „Postęпах Biologii Komórki” [85] oraz „Postęпах Biochemii” [30].

Prezentowana praca przedstawia charakterystykę wczesnych genów auksynowych należących do wspomnianych trzech klas, ich promotory, czynniki regulatorowe i mechanizm ekspresji jak również białka kodowane przez te geny.

PROMOTORY, CZYNNIKI REGULATOROWE I MECHANIZM EKSPRESJI GENÓW AUKSYNOWYCH

Elementy odpowiedzi auksynowych w promotorach genów wczesnych

Zastosowanie metod genetycznych, biochemicznych i biologii molekularnej okazało się niezwykle skuteczne w szczegółowym poznaniu regionów promotorowych wielu



RYCINA 1. Przykłady prostych i złożonych elementów odpowiedzi auksynowej (AuxRE). Każdy AuxRE zawiera element TGTCTC (TGTCNC), zaznaczony strzałką w prostokącie. Proste AuxRE zawierają powtórzenia palindromowe, np. ER9 występujący w promotorze genu *IAA4/5* grochu lub powtórzenia ukierunkowane, np. syntetyczny DR5. Złożone AuxRE, np. D1 i D4 w promotorze genu *GH3* soi zawierają oprócz TGTCTC dodatkowe elementy konstytutywne/sprzężone, zaznaczone podkreśleniem w prostokącie, bez których AuxRE jest funkcjonalnie nieaktywny. Elementy te mogą być częściowo wspólne z motywem TGTCTC, jak w przypadku D1 lub występować oddzielnie, tak jak w D4

FIGURE 1. Composite and simple AuxREs. Each AuxREs contain a TGTCTC (TGTCNC) element (boxes with arrows). Simple AuxRE contain palindromic repeats e.g. ER5 which are found in pea *IAA4/5* promoter or direct repeats e.g. DR5. The composite D1 and DR AuxREs are found in the soybean *GH3* promoter and contain both TGTCTC and constitutive/coupling elements (boxes with the underlines), which are required for AuxREs activity. A constitutive element may overlap with the TGTCTC motif like in D1 or be separated from the TGTCTC motif like in D4

genów indukowanych auksyną, w tym większości genów wczesnych należących do Aux/IAA, GH3 oraz SAUR [13,79]. Porównując promotory tych genów zidentyfikowano elementy *cis* zawierające fragmenty wspólne, istotne dla odpowiedzi auksynowych. Elementy odpowiedzi auksynowych, AuxRE, charakteryzują się obecnością krótkiej sekwencji TGTCTC lub jej odmian – TGTCAC bądź TGTCNC – występujących w formie ukierunkowanych lub palindromowych powtórzeń (ryc. 1). Mogą one funkcjonować jako proste elementy odpowiedzi na hormon lub

stanowią składnik złożonych elementów AuxRE występując w kombinacji z innymi elementami niezbędnymi dla ich aktywności.

Przykładem prostego typu AuxRE jest region promotorowy genu *PS-IAA4/5* z grochu, który był pierwszym zidentyfikowanym elementem *cis* AuxRE w genach wczesnych odpowiedzi na auksynę [2]. Gen *PS-IAA4/5* należy do klasy genów *Aux/IAA*, a jego funkcjonalnie aktywny region AuxRE składa się ze 164 par zasad (pz), z których część stanowi dwie oddzielne domeny: domenę A (48 pz) i domenę B (44 pz). Domeny te funkcjonują kooperatywnie stymulując transkrypcję w odpowiedzi na hormon, przy czym domena A działa jako włącznik, natomiast domena B pełni funkcję wzmacniacza.

W złożonym typie AuxRE, np. takim, jaki zidentyfikowano w promotorze genu *GH3* z soi [36], motyw TGTCTC jest funkcjonalnie aktywny tylko w połączeniu z określonymi elementami konstytutywnymi/sprzężonymi, które warunkują konstytutywną ekspresję genu indukowanego auksyną. Promotor *GH3* z soi zawiera trzy elementy AuxRE oznaczone jako E1, D1 i D4. Elementy D1 i D4 zawierają sekwencję TGTCTC, która jest niezbędna, ale niewystarczająca dla funkcjonalnej aktywności promotora indukowanego auksyną. Do aktywacji konieczne są dodatkowe sekwencje (konstytutywne/sprzężone), które mogą zachodzić na motyw TGTCTC, tak jak w przypadku D1 lub być oddzielone od motywu TGTCTC, tak jak w elemencie D4. W tego typu złożonym AuxRE, sekwencja TGTCTC wpływa na represję lub aktywację elementów konstytutywnych, w zależności od stężenia hormonu. Element E1 obejmuje sekwencję powyżej elementów D1 i D4, ale jego funkcja wciąż nie jest ostatecznie ustalona. Występująca w tym obszarze kasetka TGA stanowi miejsce silnie wiążące białka z ekstraktów jądrowych oraz wpływa na intensywność odpowiedzi promotora *GH3* na auksynę. Warto wspomnieć, że wykorzystując szczegółowo poznaną strukturę złożonego typu AuxRE z promotora genu *GH3* skonstruowano proste syntetyczne elementy AuxRE, takie jak: P3(4X), ER7 czy najbardziej popularny, DR5, które zawierają palindromowe powtórzenia sekwencji TGTCTC [18]. Sekwencje syntetyczne powodują 5–10-krotnie silniejszą aktywację transkrypcji w odpowiedzi na hormon, w porównaniu z naturalnymi AuxRE i jako konstrukty z genami reporterowymi znalazły powszechne zastosowanie w badaniach ekspresji genów indukowanych auksyną w różnych typach komórek, tkanek i całych organów roślin.

Białka ARF – czynniki odpowiedzi auksynowej

Czynniki odpowiedzi auksynowej, ARF (ang. *Auxin Response Factor*) są to białka jądrowe wiążące się specyficznie do elementów AuxRE w promotorach genów indukowanych auksyną. Pierwszym poznanym czynnikiem odpowiedzi auksynowej był ARF1 z *Arabidopsis thaliana*, który zidentyfikowano metodą dwuhybrydowego systemu drożdżowego, stosując jako „przynętę” syntetyczny AuxRE zawierający palindromowe powtórzenie sekwencji TGTCTC [72,73]. ARF1 jest przedstawicielem rodziny czynników transkrypcyjnych kodowanych u *A. thaliana* przez 23 geny, z których jeden, *ARF23*, jest pseudogenem i nie koduje funkcjonalnego polipeptydu [14,15]. W genomie ryżu znaleziono 25 loci *ARF*, w większości homologicznych do genów z rzodkiewnika [15]. Obecność genów *ARF* wydaje się

ARF**Aux/IAA**

RYCINA 2. Schemat budowy czynników transkrypcyjnych ARF i ich represorów Aux/IAA (szczegółowy opis w tekście, na podstawie [31], zmieniono)

FIGURE 2. ARF and Aux/IAA structures (based on [31], modified)

być typowa dla królestwa roślin, ponieważ nie stwierdzono, jak dotąd, ich występowania w komórkach zwierzęcych.

Białka ARF z *A. thaliana* mają masę cząsteczkową w zakresie 67–129 kDa i charakteryzują się, podobnie jak inne czynniki transkrypcyjne, strukturą modułową (ryc. 2) [14,15]. Większość z nich zawiera cztery (I–IV) charakterystyczne domeny. Konserwatywna N-końcowa domena DBD (ang. *DNA-Binding Domain*) zawiera sekwencję aminokwasów zasadowych i determinuje oddziaływania z DNA. Jest ona unikalna dla roślin i umożliwia specyficzne wiązanie się ARF do sekwencji TGTCTC w elementach AuxRE. Centralny fragment tej domeny, zawierający około 100 reszt aminokwasowych, wykazuje podobieństwo do wiążącej DNA domeny B3 w innych czynnikach transkrypcyjnych, takich jak: VP1 z kukurydzy czy ABI3 i FUSCA3 z *A. thaliana* [14]. Domena II białek ARF, określana także jako region środkowy MR (ang. *Middle Region*), jest zróżnicowana i decyduje o funkcji danego ARF jako aktywatora lub represora transkrypcji [69,74]. U *A. thaliana*, pięć spośród 22 funkcjonalnych polipeptydów ARF, tj. ARF5-8 i ARF19 aktywuje transkrypcję genów indukowanych auksyną. Regiony środkowe tych białek zawierają motyw bogaty w tripeptyd QSL. Z kolei białka ARF hamujące transkrypcję genów auksynowych cechują się obecnością w domenie II jednego z trzech innych motywów. Najczęściej występuje sekwencja bogata w motyw SPL zidentyfikowany w ARF1, 2, 4, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 20–22. Białka ARF3 i ARF13 mają domenę II bogatą w SL/G, natomiast ARF17 ma w tym miejscu reszty seryny. W części C-końcowej białek ARF, z wyjątkiem ARF3, 13 i 17, występuje domena CTD (ang. *Carboxy-Terminal Domain*), w której wyróżnia się dwa charakterystyczne motywy, III i IV. Motywy te są homologiczne do domeny III i IV w białkach Aux/IAA i umożliwiają homo-

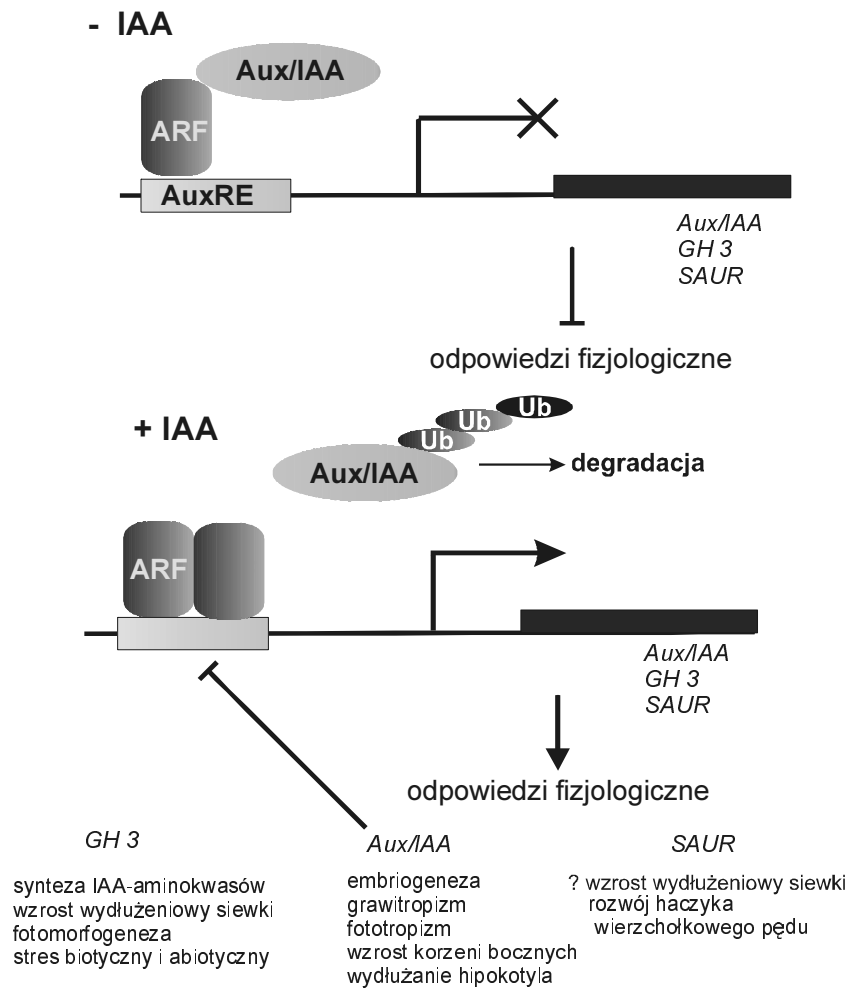
i heterodimeryzację ARF, jak również tworzenie heterodimerów z białkami Aux/IAA [14]. Ekspresja genów *ARF* zachodzi we wszystkich dojrzałych organach rośliny, niezależnie od stężenia auksyny, ale ich aktywność transkrypcyjna jest regulowana przez oddziaływania z Aux/IAA działającymi jako represory genów pierwotnych odpowiedzi na auksynę.

Biologiczne funkcje białek ARF w procesach rozwojowych zależnych od auksyn zostały wykazane w genetycznych badaniach mutantów *A. thaliana*, których charakterystyczne fenotypy były następstwem utraty funkcji genów kodujących ARF. Na przykład, białka kodowane przez geny *ARF3/ETTIN*, *ARF5/MONOPTEROS*, *ARF7/NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL4*, *ARF8/FRUIT WITHOUT FERTILIZATION*, są istotne, odpowiednio dla: prawidłowego rozwój organów kwiatowych, tworzenia osi apikalno-bazalnej i rozwoju tkanki naczyniowej podczas wczesnej embriogenezy, zróżnicowanego wzrostu pod wpływem światła oraz powstawania owoców [84]. Funkcje pozostałych białek ARF są, jak dotąd, nieokreślone, ale izolacja mutantów, których fenotypy są wywołane mutacjami w innych genach *ARF* wskazuje, że oprócz białek pełniących specyficzne funkcje, w rodzinie ARF są też białka o funkcjach częściowo pokrywających się, co oznacza, że występuje tu zjawisko redundancji funkcjonalnej [43,54].

Białka Aux/IAA – represory czynników odpowiedzi auksynowej i mechanizm ekspresji genów wczesnych

Aux/IAA (ang. *Auxin/Indole-3-Acetic Acid*) są to hydrofilowe krótko żyjące (10–60 min) białka jądrowe [34]. Bardzo krótki okres trwania tych białek *in vivo*, od początku sugerował ich rolę jako czynników hamujących ekspresję genów odpowiadających na auksynę. Badania biochemiczne i genetyczne potwierdziły ich rolę jako represorów aktywności czynników ARF [40]. W przeciwieństwie do ARF, białka Aux/IAA nie wiążą się bezpośrednio z DNA, lecz wpływają na ekspresję genów auksynowych poprzez czynniki odpowiedzi auksynowej.

Większość Aux/IAA, których struktura pierwszorzędowa została dobrze poznana, ma cztery (I–IV) zachowane ewolucyjnie domeny rozdzielone obszarami zmiennymi (ryc. 2) [18,34,47]. Domeny I i II są unikalne dla tych białek, natomiast III i IV, znajdujące się w części C-końcowej, są podobne do domeny CTD w białkach ARF i umożliwiają tworzenie homodimerów Aux/IAA lub heterodimerów z ARF. Domena I Aux/IAA zawierająca motyw EAR (ang. *Ethylene response factor-Associated amphiphilic Repression*) z charakterystyczną sekwencją LxLxL, odpowiada za właściwości represorowe [68,70]. Domena II charakteryzuje się obecnością 13-aminokwasowego konserwatywnego w ewolucji fragmentu, tzw. „degronu”, który w sposób zależny od stężenia auksyny decyduje o stabilności białek Aux/IAA. Z domeną II wiąże się receptor auksyn TIR1/AFB będący składnikiem kompleksu ligazy ubikwitynowej SCF^{TIR1}, przesądzając tym samym o proteolitycznej degradacji represorów Au-x/IAA w proteasomie [40]. Szczegółowy opis mechanizmu percepcji auksyny zainteresowany Czytelnik może znaleźć w naszym wcześniejszym artykule opublikowanym na łamach „Postępów Biologii Komórki” [44]. W domenie III



RYCINA 3. Regulacja ekspresji genów auksynowych poprzez zmiany stężenia hormonu. Przy braku auksyny w komórce, czynniki transkrypcyjne ARF występują w postaci nieaktywnych heterodimerów z białkami Aux/IAA. Ekspresja genów *Aux/IAA*, *GH3*, *SAUR* jest zahamowana i brakuje odpowiedzi na hormon. Wzrost stężenia auksyny promuje poliubikwitylację i degradację represorów Aux/IAA, co umożliwia regulację ekspresji genów *Aux/IAA*, *GH3*, *SAUR* przez białka ARF. Aktywacja tych genów wywołuje specyficzne odpowiedzi biochemiczne i fizjologiczne na auksynę. W przypadku genów *Aux/IAA* auksyna działa antagonistycznie aktywując ich transkrypcję równoległe z promowaniem degradacji białek Au-x/IAA. Może to być mechanizm utrzymania poziomu tych białek na zasadzie sprzężenia zwrotnego w sytuacji, kiedy obniża się poziom hormonu

FIGURE 3. Regulation of auxin response gene expression in a hormone-concentration-dependent manner. When auxin level is low, ARF transcription factors form heterodimers with Aux/IAA and auxin response genes *Aux/IAA*, *GH3*, *SAUR* are repressed. When auxin concentration is high, Aux/IAA repressors are polyubiquitinated and degraded, allowing ARFs to regulate gene transcription. Specific auxin-inducible biochemical and physiological responses are triggered. In the case of *Aux/IAA* genes, auxin acts antagonistically by simultaneously promoting their activation and Aux/IAA protein degradation. This mechanism could represent a negative feedback loop that keep Aux/IAA protein levels in a balance and allows for the restoration of their abundance when auxin levels decrease

zidentyfikowano sekwencję aminokwasową podobną do sekwencji charakterystycznej dla struktury $\beta\alpha\alpha$ występującej w domenie wiążącej DNA w niektórych represorach prokariotycznych [72]. Motyw ten jest niezbędny dla dimeryzacji Aux/IAA i oddziaływań typu białko-białko [28]. Domena IV, w której występuje sekwencja lokalizacji jądrowej, może także uczestniczyć w dimeryzacji białek Aux/IAA.

Uzyskane do tej pory wyniki analiz biochemicznych i genetycznych białek ARF i Aux/IAA, prowadzonych głównie u *A. thaliana*, ale także u innych gatunków roślin, pozwoliły na ustalenie modelu, według którego obie grupy białek pośredniczą w odpowiedziach na auksynę na poziomie ekspresji genów (ryc. 3) [57,63]. W modelu tym, białka ARF wiążą się do elementów AuxRE w promotorach genów indukowanych auksyną i w zależności od charakteru domeny II mogą aktywować bądź hamować transkrypcję. Przy niskim stężeniu lub braku hormonu białka Aux/IAA tworzą dimery z ARF hamując ich aktywność. Wzrost stężenia auksyny w komórce jest odbierany przez białko receptorowe TIR1/AFB, które jednocześnie wiąże się z Aux/IAA wyznaczając je do degradacji w szlaku zależnym od ubiquityny. W tych warunkach czynniki transkrypcyjne ARF uwolnione od represora rozpoznają sekwencje AuxRE i regulują transkrypcję genów docelowych. Tak więc stabilność białek Aux/IAA ma kluczowe znaczenie w sygnalizacji szlaku auksynowego. Powyższy model obejmuje także mechanizm regulacji aktywności genów w drodze sprzężenia zwrotnego, ponieważ auksyny indukują wiele genów kodujących białka Aux/IAA. Mnogość i różnorodność procesów zależnych od wrażliwości komórek na auksynę wynika z ogromnej liczby możliwych kombinacji przy powstawaniu homodimerów, tak wśród ARF jak i Aux/IAA, jak również heterodimerycznych połączeń pomiędzy ARF i Aux/IAA. Specyficzność interakcji w takich połączeniach wydaje się być istotna dla zróżnicowanych odpowiedzi na auksynę w różnych typach komórek i tkanek [77]. Dodatkowo, forma, w jakiej występują czynniki transkrypcyjne oddziałujące z elementami AuxRE determinuje intensywność aktywacji lub represji genów docelowych. Formy monomeryczne wywołują najslabszy efekt, natomiast homo- bądź heterodimery znacznie wydajniej regulują ich transkrypcję [15].

Na obecnym etapie badań niewiele jest wiadomo na temat molekularnych mechanizmów funkcjonujących w aktywacji lub represji genów auksynowych przez białka ARF i Aux/IAA. Pojedyncze, jak dotąd, dane eksperymentalne sugerują, że konieczne mogą być dodatkowe białka regulatorowe o aktywności aktywatorów lub represorów transkrypcji, które oddziałują zarówno z białkami ARF, jak i Aux/IAA. Kandydatami na koregulatory współdziałające z ARF są obecnie trzy białka. Pierwsze z nich to białko PICKLE (PKL) z *Arabidopsis thaliana*, które wykazuje aktywność deacetylazy histonowej i pośredniczy w zależnym od ATP remodelowaniu chromatyny [11]. Może ono funkcjonować w regulacji genów auksynowych aktywowanych przez ARF7 i ARF19. Geny *ARF7* i *ARF19* ulegają koekspresji z *IAA14/SLR* podczas wczesnego etapu rozwoju korzeni bocznych. Z kolei białko SEUSS (SEU) funkcjonujące jako koaktywator, oddziałuje z ARF3/ETTIN w ustalaniu wzorca i promowaniu wzrostu organów kwiatowych [51]. Ostatnio zidentyfikowano białko TOPLESS (TPL), które pełni rolę korepresora *IAA12/BDL* [61].

Ciekawym aspektem regulacji aktywności genów wczesnej odpowiedzi na auksynę jest możliwość udziału w tym procesie kilku miRNA, które mogą kontrolować ekspresję genów *ARF*. Najnowsze wyniki badań pokazują, że niektóre z nich, np. *ARF2-ARF4*, *ARF6*, *ARF8*, *ARF10*, *ARF16* czy *ARF17*, są genami docelowymi dla miR167 lub miR160 [38,78,80]. Szczególnie interesujące są wyniki [38], które sugerują udział regulowanego przez miR160 *ARF17* w modulacji ekspresji niektórych genów *GH3*, uczestniczących w regulacji poziomu endogennej auksyny przez tworzenie nieaktywnych form związanych fitohormonu.

GENY *AUX/IAA* I BIOLOGICZNE FUNKCJE BIAŁEK *AUX/IAA*

Pierwsze geny należące do rodziny *Aux/IAA* zidentyfikowano w tkankach soi i grochu na podstawie szybkiego (w ciągu kilku minut) i intensywnego pojawiania się ich transkryptów po podaniu egzogennej auksyny [cyt. za 47]. Poziom tych transkryptów wzrastał w obecności cykloheksymidu, znanego inhibitora biosyntezy białka [1]. Fakt ten, w połączeniu z bardzo krótkim okresem trwania białek *Aux/IAA*, od początku wskazywał na ich funkcje jako czynników hamujących odpowiedzi auksynowe na poziomie transkrypcji genów indukowanych tym hormonem. Na podstawie wyników porównywania sekwencji nukleotydowych do znanych *Aux/IAA* oraz badania białek *Aux/IAA* w drożdżowym układzie dwuhybrydowym, zidentyfikowano i wyizolowano podobne geny z wielu innych gatunków roślin, takich jak: rzodkiewnik, fasola mung, tytoń, ogórek, ziemniak, pomidor, ryż, kukurydza, pszenica, topola kalifornijska, sosna [10,24,26,53,56,66,67,75]. Wydaje się, że geny *Aux/IAA* są unikalne dla roślin, ponieważ nie stwierdzono, jak dotąd, ich obecności w genomach bakterii, grzybów i zwierząt. Ekspresja różnych *Aux/IAA* zachodzi według odrębnych wzorców przestrzennych i czasowych, przyczyniając się do różnorodności odpowiedzi na auksynę w różnych tkankach i organach roślin oraz na różnych etapach rozwoju.

Podobnie jak w przypadku czynników odpowiedzi auksynowej, geny *Aux/IAA* i kodowane przez nie białka są najszerzej badane i najlepiej poznane u *Arabidopsis thaliana*. W genomie tej rośliny stwierdzono obecność 29 genów oznaczonych jako *IAA1-20* i *IAA26-34*, zlokalizowanych na każdym z pięciu chromosomów [34,47]. Białka *Aux/IAA* różnią się dość znacznie masą cząsteczkową: od około 18 kDa (*IAA31*) do około 36 kDa (*IAA9*), a także punktami izoelektrycznymi: 4,51 (*IAA30*) – 9,74 (*IAA12*). Podobieństwo sekwencji aminokwasowej *Aux/IAA* jest ogólnie niskie, choć mocno różni się w przypadku pojedynczych białek, np. dla pary *IAA20/IAA30* wynosi ono 85%, natomiast dla pary *IAA8/IAA33* tylko 10% [47].

Na podstawie uzyskanych do tej pory wyników badań wiadomo, że ekspresja genów indukowanych auksyną jest wrażliwa na poziom białek *Aux/IAA* [9]. Kluczowa dla okresu trwania *Aux/IAA* jest konserwowana w ewolucji domena II, która decyduje o stabilności tych białek łącząc bezpośrednio ich stężenie z poziomem hormonu. Rola poszczególnych białek *Aux/IAA* w procesach fizjologicznych,

realizowana wspólnie z białkami ARF przez regulację ekspresji genów wczesnych odpowiedzi na auksynę, jest stopniowo poznawana dzięki izolacji mutantów *A. thaliana* ze zmienionymi odpowiedziami na auksynę. Zidentyfikowane do tej pory dominujące mutacje typu *gain-of function* w 11 genach *Aux/IAA* (*IAA1/AXR5*, *IAA3/SHY2*, *IAA6/SHY1*, *IAA7/AXR2*, *IAA9*, *IAA12/BDL*, *IAA14/SLR1*, *IAA17/AXR3*, *IAA18*, *IAA19/MSG2*, *IAA28*) wskazują, że geny te są kluczowe dla takich procesów jak embriogeneza, wzrost korzeni bocznych, wydłużanie hipokotyła, grawitropizm czy fotomorfogeneza [34,40,53,-71,75,83]. Mutacje określonych genów *Aux/IAA* prowadzą do wyraźnie odmiennych jak i podobnych fenotypów, co sugeruje, że białka *Aux/IAA* pełnią w roślinach typu dzikiego zarówno odrębne, ale także częściowo wspólne funkcje. Na przykład, wzrost stabilności *SHY2/IAA3* ogranicza wzrost kielka, natomiast stabilizacja białek *BDL/IAA12* i *IAA13* hamuje powstawanie korzenia zarodkowego [77].

Szczegółowe analizy 11 mutantów *aux/iaa A. thaliana* wykazały, że wszystkie mutacje są spowodowane zamianą pojedynczego aminokwasu w domenie II odpowiedniego białka *Aux/IAA* (tab. 1). Uniemożliwia to oddziaływanie pomiędzy *Aux/IAA* a receptorem auksyny, *TIR1/AFB*, prowadząc do wzrostu stabilności, a tym samym akumulacji białek represorowych hamujących transkrypcję genów odpowiadających na auksynę. Wzrost stabilności białek *Aux/IAA* na skutek mutacji w domenie II obserwowano np. u mutantów *iaa3/shy2* oraz *iaa17/axr3*, przy czym białko tego ostatniego ma aż 7-krotnie dłuższy czas trwania w porównaniu z białkiem typu dzikiego [6,46].

Biorąc pod uwagę opisany wcześniej model funkcjonowania białek *Aux/IAA* w regulacji ekspresji genów auksynowych, należałoby oczekiwać, że u wspomnianych mutantów charakterystyczne odpowiedzi na auksynę powinny być hamowane. Jednak analizy fenotypowe wykazały, że mutacje typu *gain-of-function* w wymienionych 11 genach *Aux/IAA* wywołują zróżnicowaną wrażliwość na auksynę i powodują plejotropowe defekty we wzroście i rozwoju roślin [34,79]. U większości mutantów, między innymi: *iaa3/shy2*, *iaa7/axr2* czy *bdl/iaa12*, rzeczywiście obserwowano cechy obniżonej wrażliwości na hormon, takie jak zahamowany wzrost i grawitropizm korzenia, hipokotyła czy łodygi kwiatostanu oraz hamowanie tworzenia korzeni bocznych i włóśników korzeniowych. Szczególnie dramatyczne zmiany wywołane

TABELA 1. Substytucje aminokwasów w obrębie motywu VVGWPPVR (DEGRON) domeny II białek *Aux/IAA* (na podstawie [13,53,83], zmieniono)

TABLE 1. Amino acid substitutions in VVGWPPVR (DEGRON) motif of domain II in *Aux/IAA* proteins (based on [13,53,83], modified)

Białko	Mutacja	Zmutowana sekwencja
AXR5/IAA1	axr5-1	VVGWPSVR
AXR2/IAA7	axr2-1	VVGWSPVR
AXR3/IAA17	axr3-1 axr3-3	VVGWPLVR VVGWPPGR
SHY2/IAA3	shy2-2 shy2-3	VVGWSPVR EVGWPPSVR
IAA28	iaa28-1	VVGWLPVR
SLR/IAA14	slr1-1	VVGWPSVR
BDL/IAA12	bdl1-1	VVGWSPIG
MSG2/IAA19	msg2-1 msg2-2 msg2-3 msg2-4	VVGWPSVC VVGRRPVC VVGWPLVC VVGWLPVC

upośledzeniem odpowiedzi na auksynę opisano w przypadku mutantu *bdl/iaa12* (*bodenlos*). Wykazuje on głębokie defekty rozwojowe podczas wczesnej embriogenezy, w postaci braku korzenia, a czasem także hipokotyła [19]. Z kolei fenotypy innych mutantów, np. *iaa17/axr3*, charakteryzowały się wzmożoną dominacją wierzchołkową i rozwojem korzeni przybyszowych, co jest przejawem zwiększonej wrażliwości na auksynę. Poznanie funkcji określonych białek Aux/IAA na podstawie analizy fenotypów dominujących mutantów *aux/iaa* nie jest łatwe. Wydaje się, że mniej problematyczne byłoby ich poznanie na podstawie efektów wywołanych mutacjami typu *loss-of-function* w odpowiadających im genach. Jednak, jak do tej pory, zidentyfikowano jedynie dwie takie mutacje i obie tylko w niewielkim stopniu wpływały na wzrost i rozwój mutantów [34]. Sugeruje to możliwość zastąpienia jednego polipeptydu przez inny (ang. *functional redundancy*) lub jest wynikiem złożonej, zachodzącej na zasadzie sprzężenia zwrotnego, kontroli ekspresji genów *Aux/IAA* [34,54,79]. Jednocześnie, kolejne analizy wskazały na zróżnicowany profil ekspresji pokrewnych Aux/IAA w poszczególnych organach oraz na określonym etapie rozwoju [47]. Specyficzność ekspresji białek Aux/IAA w połączeniu z różnorodnością odpowiedzi na auksynę potwierdzałyby, że białka te, pomimo pokrewieństwa filogenetycznego i częściowo pokrywających się funkcji, mogą także pełnić całkowicie odrębne funkcje fizjologiczne.

Funkcjonalne zróżnicowanie białek Aux/IAA może być efektem różnych preferencji wobec partnerów z rodziny ARF, z którymi uczestniczą one w konwersji sygnału auksynowego, do specyficznych odpowiedzi poprzez tworzenie dimerów regulujących ekspresję genów docelowych. Z tego względu badania procesów rozwojowych na poziomie transkrypcji genów indukowanych auksyną są obecnie skupione na identyfikacji funkcjonalnych par białek Aux/IAA i ARF pośredniczących w określonych procesach zależnych od auksyny. Niezwykle przydatne w tych badaniach są mutanty *arf* z mutacjami typu *loss-of-function* oraz mutanty *aux/iaa* z mutacjami stabilizującymi domenę II, ponieważ ich fenotypy są niemal identyczne [40]. Izolacja takich mutantów u *A. thaliana* oraz badania w drożdżowym układzie dwuhybrydowym oddziaływań typu białko-białko między określonymi białkami Aux/IAA i ARF umożliwiły identyfikację funkcjonalnych dimerów, istotnych dla specyficznych odpowiedzi komórkowych indukowanych auksyną. W ten sposób ustalono, że współdziałanie dimeru BODENLOS/IAA12 i MONOPTEROS/ARF5 jest konieczne dla ustalenia osi apikalno-bazalnej zarodka, prawidłowej organizacji merystemu korzeniowego i rozwoju tkanki naczyniowej podczas wczesnej embriogenezy [19,77]. Uzyskane ostatnio wyniki wskazują, że w tym przypadku właściwe funkcjonowanie dimeru BDL/IAA12-MP/ARF5 wymaga obecności wspomnianego wcześniej białka TOPLESS (TPL), które oddziałując z domeną I IAA12 pełni rolę korepresora [61]. Przy braku lub niedostatecznym stężeniu auksyny czynnik transkrypcyjny MP/ARF5 tworzy heterodimery z kompleksem IAA12/BDL-TPL i w takiej formie jest niezdolny do regulacji transkrypcji.

Innym poznanym przykładem funkcjonalnych dimerów ARF-Aux/IAA, których oddziaływanie prowadzi do ekspresji genów indukowanych auksyną jest para MASSUGU2/IAA19 i NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL4/ARF7, kluczowa

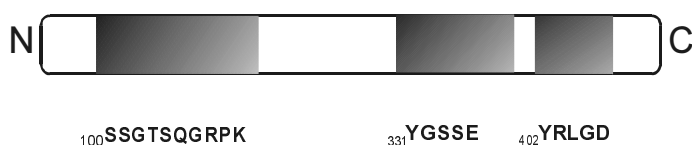
dla wzrostu hipokotyła i korzeni bocznych [64,77]. Fenotyp mutantu *massugu2* (*msg2*), charakteryzujący się brakiem reakcji siewek etiolowanych na światło i grawitację oraz niedorozwojem korzeni bocznych, wywołany jest mutacją w genie *Aux/IAA19* powodującą substytucję pojedynczego aminokwasu w obrębie domeny II białka MSG2/IAA19 [64]. Podobne cechy wykazuje inny niewrażliwy na auksynę mutant, *non-phototropic hypocotyl4* (*nph4*), który charakteryzuje się utratą funkcji genu *ARF7* [20]. Jak wykazały badania z zastosowaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego, IAA19 oddziałuje z C-końcem czynnika transkrypcyjnego ARF7 i zgodnie z proponowanym przez autorów mechanizmem, dimer ten funkcjonuje w zróżnicowanych odpowiedziach wzrostowych hipokotyła i korzeni bocznych na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego [64]. Indukowana auksyną ekspresja *IAA19* jest bowiem zależna od aktywności czynnika transkrypcyjnego ARF7, ale ta z kolei, jest hamowana przez białko IAA19 tworzące z ARF7 nieaktywny heterodimer. Taka pętla regulacyjna umożliwia precyzyjną czasowo-przestrzenną kontrolę odpowiedzi tropicznych, które wynikają z przejściowych zmian w intensywności i kierunku wzrostu zachodzących podczas ekspansji komórek w odpowiedzi na bodźce tropiczne.

Na obecnym etapie badań nieznane są inne przykłady funkcjonalnych dimerów ARF-Aux/IAA istotnych dla określonej odpowiedzi komórkowej indukowanej auksyną. Wprawdzie zidentyfikowano dwie inne mutacje wywołane utratą funkcji genów *ARF*, tj. mutację w genie *ETTIN/ARF3* [51] oraz genie *FRUIT WITHOUT FERTILIZATION/ARF8* [12], ale, jak dotąd, nie zidentyfikowano białek Aux/IAA, które mogą współdziałać z ETT/ARF3 w prawidłowym rozwoju kwiatu oraz z FWF/ARF8 podczas powstawania owoców.

GENY *GH3* I BIOLOGICZNE FUNKCJE BIAŁEK *GH3*

mRNA genów *GH3* (ang. *Glycine max Homology*) zidentyfikowano po raz pierwszy ponad dwadzieścia lat temu w siewkach soi jako jeden z czterech transkryptów pojawiających się po podaniu auksyny [17]. *GH3* są zaliczane do genów wczesnych odpowiedzi na auksynę, ponieważ pierwsze mRNA *GH3* powstają już w 5 minut po podaniu auksyny, a ich pojawianie się jest niezależne od cykloheksymidu, inhibitora biosyntezy białka. Ekspresja genów *GH3* jest specyficznie indukowana aktywnymi, zarówno naturalnymi jak i syntetycznymi, auksynami, natomiast prekursorzy auksyn, indol i tryptofan, a także inne fitohormony, nie wpływają na ekspresję *GH3*.

W ciągu ostatnich 20 lat, geny homologiczne do *GH3* z soi zidentyfikowano u wielu innych gatunków roślin z różnych grup taksonomicznych, między innymi u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), ryżu (*Oryza sativa*), tytoniu (*Nicotiana tabacum*), papyryki (*Capsicum chinese*), pszenicy (*Triticum aestivum*), kukurydzy (*Zea mays*), jęczmienia (*Hordeum vulgare*), sosny (*Pinus pilaster*), a także u mchu *Physcomitrella patens* [76]. Warto dodać, że analizy baz danych dostarczyły



RYCINA 4. Trzy konserwatywne motywy adenylacji w białku JAR1/GH3.11 (na podstawie [59], zmieniono)

FIGURE 4. Three conserved motifs in JAR1/GH3.11 protein (based on [59], modified)

informacji o występowaniu genów pokrewnych do *GH3* także u sinicy *Synechocystis* sp. oraz u myszy, człowieka i innych kręgowców, natomiast nie zidentyfikowano ich w genomach drożdży, nicienia *Caenorhabditis elegans* i muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [18].

Pod koniec XX wieku specyficzne funkcje genów *GH3* wciąż były nieustalone, lecz doświadczenia, w których badano ekspresję reporterowego genu *GUS* znajdującego się pod kontrolą promotora *GH3* (*GH3::GUS*) dostarczyły przekonujących dowodów na to, że geny te uczestniczą w odbieraniu subtelnych zmian poziomu hormonu w procesach fizjologicznych kontrolowanych przez auksyny [33]. Wzrost ekspresji *GUS* towarzyszył dominacji wierzchołkowej pędu transgenicznego tytoniu i był skorelowany z obniżeniem stężenia auksyny pod wpływem zmiany wektora sił grawitacji w korzeniu.

Przełom w poszukiwaniach funkcji *GH3* związanych z działaniem auksyn nastąpił na początku obecnej dekady, kiedy zidentyfikowano mutantu *A. thaliana jar1-1* (ang. *jasmonate resistant1-1*) niewrażliwego na jasmonian metylu (MeJA) [58]. Gen *JAR1* koduje białko podobne do lucyferazy ze świetlika, wykazujące aktywność adenylującą względem kwasu jasmonowego. Lucyferazy mają aktywność enzymatyczną syntetaz (ligaz), które w pierwszym etapie katalizowanej reakcji aktywują grupę karboksylową $-COOH$ substratu przez adenylację z udziałem ATP i jonów Mg^{2+} [4]. Według tego mechanizmu funkcjonują m.in. ligaza acylo~CoA, ligaza 4-kumarylo~CoA, syntetaza aminoacylo~tRNA, czy wspomniana lucyferaza katalizująca utlenienie adenylowanego białka – lucyferyny. Struktura pierwszorzędowa białka *JAR1* charakteryzuje się obecnością trzech (I–III) konserwatywnych motywów wiążących ATP, typowych dla białek z nadrodziny lucyferazy ze świetlika oraz bakteryjnych ligaz syntetyzujących połączenia kwasów organicznych z koenzymem A (ryc. 4) [4]. Motyw I (SSGTSQGRPKF) jest w wysokim stopniu podobny, a motywy: II (YGSSE) i III (YRLGD) są identyczne z motywami występującymi w strukturze pierwszorzędowej białka syntetazy IAA- ϵ -lizyny z *Pseudomonas savastanoi* [55].

Wykazano [58,59], że rekombinowane białko *JAR1* przejawia aktywność enzymatyczną acyloadenylazy kwasu jasmonowego, a sześć innych białek, homologicznych do *JAR1*, adenylowało IAA, w tym jedno z białek, także kwas salicylowy (SA). Analizy kinetyczne *JAR1* potwierdziły, iż enzym cechuje się stereospecyficznością wyraźnie preferując izomer (–) JA [16]. Podobnie wysoką specyficzność stwierdzono względem przyłączanych do JA aminokwasów, ponieważ

uprzywilejowanym substratem JAR1 była izoleucyna [60]. Wcześniejsze analizy [16] ujawniły też dodatkowe właściwości katalityczne syntetazy JA-IIe. JAR1, podobnie jak niektóre inne syntetazy, wobec braku aminokwasu i kwasu będącego akceptorem AMP, wykazuje aktywność ATPazy. Reakcja zachodząca w powyższych warunkach jest wykorzystywana również w biosyntezie polifosforanów adenozy (p_nA) oraz dinukleozydopolifosforanów. JAR1 nie tworzył tych ostatnich, ale wykazywał zdolność do biosyntezy tetrafosforanu adenozy (p₄A), którego rola w metabolizmie i fizjologii roślin jest obecnie nieznana. Uzyskane rezultaty sugerowały potencjalną rolę tych enzymów w regulacji metabolizmu auksyn i kwasu jasmonowego [58]. Jedną z możliwości był udział adenylowanego produktu pośredniego w syntezie koniugatów IAA, JA i SA. Rezultaty dalszych badań wykazały, iż adenylacja JA poprzedza biosyntezę jasmonylo-L-izoleucyny (JA-IIe), aktywnego biologicznie koniugatu amidowego JA. Poziom JA-IIe był dramatycznie niski u dwóch mutantów allelicznych, jar1-1 i jar1-8, a przywrócenie aktywności biologicznej (odpowiedzi na atak patogena) było możliwe dopiero po podaniu egzogennej JA-IIe. Poziom innych koniugatów amidowych, jasmonylo-L-leucyny (JA-Leu), jasmonylo-L-feniloalaniny (JA-Phe) i jasmonylo-L-waliny (JA-Val) pozostawał bez zmian, co potwierdzało wysoką specyficzność substratową JAR1 i sugerowało obecność innych enzymów syntetyzujących połączenia amidowe z jasmonianem.

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano 20 genów *GH3*, które kodują cytoplazmatyczne białka o masie cząsteczkowej 65–70 kDa, pozbawione charakterystycznych cech strukturalnych skorelowanych ze specyficznymi funkcjami, z wyjątkiem występującej w części C-końcowej niektórych białek potencjalnej domeny o strukturze superhelisy (ang. *coiled-coil*) [18,21,35].

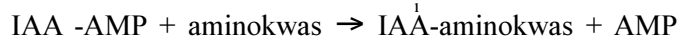
Rodzina *GH3* z *Arabidopsis thaliana* obejmuje oprócz opisanego wyżej JAR1, 19 innych białek, z których sześć (GH3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 i 3.17) wykazuje aktywność acyloadenylaz wobec IAA *in vitro*, a GH3.5, dodatkowo wobec SA.

TABELA 2. Białka z rodziny GH3 rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) (na podstawie [18,76], zmieniono)
TABLE 2. GH3 family from *Arabidopsis thaliana* (based on [18,76], modified)

Białka GH3	Synonim	Substrat adenylacji	Grupa
GH3.1			II
GH3.2	YDK1	IAA	II
GH3.3		IAA	II
GH3.4		IAA	II
GH3.5	WES1	IAA/SA	II
GH3.6	DFL1	IAA	II
GH3.7			III
GH3.8			III
GH3.9		IAA	II
GH3.10	DFL2		I
GH3.11	JAR1/FIN219	JA	I
GH3.12	PBS3/GDG1		III
GH3.13			III
GH3.14			III
GH3.15			III
GH3.16			III
GH3.17		IAA	II
GH3.18			III
GH3.19			III
GH3.20 /skrócony			III

Na podstawie analiz przewidywanych sekwencji aminokwasowych oraz aktywności enzymatycznej białka te zostały podzielone na trzy (I–III) grupy (tab. 2) [58,59,76]. Do grupy I zaliczane są dwa białka z rzodkiewnika (GH3.10/DFL2, GH3.11/JAR1/FIN219) oraz podobne białka z mchu, pomidora i ryżu. Grupa II, która jest najliczniejsza, obejmuje osiem białek z rzodkiewnika (GH3.1-GH3.4, GH3.5/GH3a/WES1, GH3.6, GH3.9, GH3.17) oraz GH3 z papryki, pomidora, ryżu, soi i tytoniu. Najślabiej poznane są białka GH3.7, 3.8, 3.12-16, 3.18, 3.19 z rzodkiewnika należące do grupy III i niewykazujące aktywności acyloadenylaz. Ostatnio jednak, do grupy tej zaliczono dwa białka GH3 z mchu *Physcomitrella patens* wykazujące aktywność amidosyntetaz IAA [37].

Białka GH3 wykazujące aktywność amidosyntetaz uczestniczą w koniugacji fitohormonów w reakcji zachodzącej z wytworzeniem wysokoenergetycznego intermediatu acyloadenylanowego, która w przypadku auksyny przebiega według poniższych równań:



Difosforan (pirofosforan, PP_i) uwalniany w pierwszym etapie reakcji jest hydrolizowany przez difosfatazę (pirofosfatazę, PPazę), dzięki czemu drugi etap tej reakcji jest nieodwracalny [58].

Na obecnym etapie badań scharakteryzowano sześć rekombinowanych amidosyntetaz z *A. thaliana* (AtGH3.2 - 3.6 i 3.17) i dwa, wspomniane wyżej, białka z mchu *P. patens* (PpGH3-1 i 3–2), przede wszystkim pod kątem preferencji auksyn i aminokwasów jako substratów do syntezy koniugatów amidowych [37,59]. Białka te charakteryzują się niską specyficznością zarówno względem auksyn, jak i aminokwasów, choć różnią się aktywnością względem substratów do adenyacji oraz rodzajem koniugowanych aminokwasów. W przypadku GH3 z rzodkiewnika, IAA oraz inne naturalne auksyny, takie jak kwas indolilo-3-masłowy (IBA) i kwas indolilo-3-propionowy (IPA) były dobrymi akceptorami reszty adenylowej, jednak wszystkie z badanych enzymów z najwyższą wydajnością adenylowały syntetyczną auksynę, kwas fenylooctowy (PAA) [59]. Wszystkie też syntetyzowały podobny zestaw IAA-aminokwasów.

Mimo stosunkowo wysokiej homologii z białkami GH3 z rzodkiewnika, oba białka z mchu różnią się od nich specyficznością w stosunku do aminokwasów [37]. PpGH3-1 wykazuje jedynie słabą zdolność do syntezy IAA-alaniny i IAA-asparaginy, co wyraźnie odróżnia je od dotychczas poznanych syntetaz IAA-amidów, ponieważ żaden z rekombinowanych polipeptydów GH3 nie tworzył koniugatu z asparaginą. Z kolei białko PpGH3-2 jest mało specyficzne i uczestniczy w powstawaniu koniugatów z różnymi aminokwasami przypominając niektóre GH3 z rzodkiewnika. Oba białka z mchu wykazują zdecydowanie inną, w porównaniu z białkami z rzodkiewnika, specyficzność substratową względem akceptorów reszt aminokwasowych, ponieważ z dużą wydajnością syntetyzują połączenia z IAA, IBA i JA.

Oprócz *A. thaliana*, geny *GH3* szczegółowo scharakteryzowano także u ryżu [23,65]. Genom *Oryza sativa* zawiera 13 genów kodujących białka GH3, z których cztery są zaliczane do grupy I (OsGH3.3, 3.5, 3.6, 3.12), a pozostałe osiem do grupy II (OsGH3.1, 3.2, 3.4, 3.8–3.11, 3.13) [65]. W przeciwieństwie do dobrze poznanych

mutantów *A. thaliana* pozwalających na identyfikację mutacji w obrębie genów *GH3*, mutanty ryżu nie dają pewności, co do roli tych genów i kodowanych przez nie białek. Fenotypy ośmiu mutantów insercyjnych genów *OsGH3-5* i *OsGH 3-7*, które wykazują karłowatość, niepłodność i usychanie liści, potwierdzają znaczenie białek GH3 dla regulacji wzrostu i rozwoju roślin [23]. Obecność trzech zachowanych ewolucyjnie motywów w przewidywanej strukturze białek *OsGH3* uczestniczących w wiązaniu ATP sugeruje, że białka te mogą być syntetazami IAA-aminokwasów. Sugestia ta została potwierdzona [5] dzięki scharakteryzowaniu rekombinowanego *OsGH3-8* wykazującego aktywność syntetazy IAA-Asp.

Enzymatyczną syntezę koniugatów IAA z aminokwasami *in vitro* wykazano po raz pierwszy w ekstrakcie z niedojrzałych nasion grochu [45]. Na podstawie analizy produktów reakcji metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) stwierdzono, że głównym koniugatem amidowym syntetyzowanym w niedojrzałych nasionach grochu jest IAA-asparaginian (IAA-Asp).

Na obecnym etapie badań proponuje się, że indukowane auksyną geny *GH3* i kodowane przez nie białka uczestniczą w procesach wzrostu i rozwoju regulując poziom endogennego IAA. Dotyczy to przede wszystkim białek GH3 z I i II grupy, które wykazują aktywność amidosyntetaz koniugujących IAA do aminokwasów. Mutanty *A. thaliana* z nadekspresją genów *GH3*, takie jak: *df11-D*, *ydk1-D* czy *wes1-D* mają obniżony poziom wolnego IAA, a w niektórych przypadkach także podwyższony poziom IAA-Asp [41,49,62]. Fenotypy tych mutantów, wywołane wzmożoną ekspresją *GH3*, są podobne do siebie i charakteryzują się wyraźnie zahamowanym wzrostem typowym dla niedoboru auksyn. Efekty te spowodowane są aktywnością adenylującą białek DFL1/AtGH3.6, YDK1/AtGH3.2 oraz WES1/At.GH3.5 (tab. 2). Tak więc szybka indukcja *GH3* przez auksyny pomaga utrzymać homeostazę hormonalną przez związanie nadmiaru hormonu do postaci nieaktywnej biologicznie. Należy jednak podkreślić, że mechanizm funkcjonowania genów *GH3* może być bardziej złożony, ponieważ tylko część z nich jest indukowaną przez auksyny. Jedną z możliwości pojawia się np. w związku z tym, że DFL1 i WES1 wykazują aktywność adenylującą, ale różnią się specyficznością substratową, ponieważ DFL1 adenyluje IAA, natomiast WES1 zarówno IAA, jak i SA [58]. Sugeruje to, że białko to może być wspólnym elementem szlaków sygnałowych IAA i SA. Dodatkowo, możliwa jest zróżnicowana regulacja genów kodujących te białka. W przypadku genu *WES1* obserwowano, że jego ekspresja może być także indukowana przez ABA oraz biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe [49]. Analizy genetyczne wskazują, że część genów *GH3* jest indukowana światłem, co oznacza, że percepcja światła jest mocno związana z sygnalizacją auksynową przez geny wczesnych odpowiedzi na auksynę [3,50,76].

Złożoną naturę mechanizmów kontrolujących homeostazę hormonalną z udziałem genów *GH3* komplikuje fakt, że ich aktywność może także ulegać zmianom pod wpływem elicytorów wydzielanych zarówno przez organizmy patogenne [8,22,42,49,50], jak i symbiotyczne [52]. Wyznacza to nowy kierunek poszukiwań funkcji genów *GH3* jak również mechanizmów regulujących ich ekspresję.

SAUR – MAŁE BIAŁKA JĄDROWE O NIEUSTALONEJ FUNKCJI

Geny *SAUR* (ang. *Small Auxin-Up RNA*) to trzecia, najmniej poznana klasa genów wczesnych odpowiedzi na auksyny. Zidentyfikowano je u soi, fasoli mung, grochu, rzodkiewnika, ryżu, a także w rzepie, tytoniu, jabłoni i kukurydzy, co świadczy o powszechności ich występowania wśród roślin [18,25,32,48,81,82]. Najliczniejsza reprezentacja genów *SAUR* występuje u rzodkiewnika (70 genów) oraz u ryżu (58) [25].

SAUR kodują krótko żyjące, pozbawione intronów (oprócz *SAUR11*) transkrypty, których produktami ekspresji są małe białka jądrowe o masie cząsteczkowej od 9,88 do 26,62 kDa [25]. Obecność konserwatywnych elementów DST (ang. *Down-Stream*) poniżej regionu 3'UTR (ang. *UnTranslated Region*) w transkryptach *SAUR* determinuje ich krótki czas życia wskazując, iż ekspresja białek *SAUR* jest regulowana potranskrypcyjnie. Region promotorowy genów *SAUR* zawiera motywy DUE/NDE (ang. *Distal Upstream Element/NDe1restriction site Element*), na które składają się sekwencje TGTCTC oraz GGTCCCAT [1,81].

SAUR są słabo poznanymi białkami, o nieustalonej dotychczas funkcji. Niewiele też wiadomo na temat regulacji ich ekspresji. Inhibitor translacji, cykloheksymid, nie tylko nie hamuje ekspresji genów *SAUR*, ale jest induktorem ich transkrypcji. Jest to potwierdzenie, że geny te funkcjonują we wczesnej odpowiedzi na fitohormon, a ich ekspresja nie wymaga syntezy czynników białkowych *de novo* oraz sugestia, że cykloheksymid hamując biosyntezę enzymów degradujących transkrypty lub białka, stabilizuje krótko żyjące *SAUR*. Jądrowa lokalizacja wewnątrzkomórkowa *SAUR* sugeruje ich udział w procesach związanych z ekspresją informacji genetycznej, a szybka degradacja nukleolityczna transkryptów, wskazuje na istotną funkcję w szlaku sygnałowym auksyn.

Przypuszcza się, że białka *SAUR* odgrywają rolę w regulacji wzrostu wydłużeniowego, ponieważ głównym miejscem ich ekspresji są komórki epidermy stref elonacyjnych epikotyli i hipokotyli, a w przypadku roślin jednoliściennych, strefy wydłużeniowe koleoptyli i mezokotyle [29,32]. Nietypowym białkiem z tej rodziny jest białko AAM1 (ang. *Abolished Apical hook Maintenance1*), które występuje w jądrze komórkowym i odpowiada za rozwój haczyka wierzchołkowego pędu u rzodkiewnika [48]. Ekspresja genu *AAM1* zawierającego w swoim promotorze dwa motywy AuxRE, jest indukowana auksyną w komórkach haczyka tylko podczas wzrostu siewek w ciemności. Niewykluczone, że AAM1, podobnie jak niektóre białka GH3, uczestniczy w odpowiedziach związanych z działaniem światła i auksyny.

Interesujący aspekt badań białek *SAUR* związany jest z możliwością oddziaływania tych białek z kalmoduliną. Dowody takich interakcji uzyskano dla białek SAUR1 i SAUR2 z kukurydzy [29,82]. 13-aminokwasowy konserwatywny fragment N-końca ZmSAUR1 wykazuje duże podobieństwo do odcinka kinazy białkowej zależnej od kalmoduliny, CCaMK (ang. *Ca²⁺/calModulin-dependent protein Kinase*). Motyw ten tworzy amfipatyczną α -helisę z wyeksponowanymi aminokwasami hydrofobowymi i zasadowymi. Reszty alaniny, leucyny, tryptofanu i waliny uczestniczą w oddziaływaniach hydrofobowych z kalmoduliną w obecności wapnia, co

zostało potwierdzone w badaniach, w których delecja fragmentu genu kodującego N-końcowy odcinek białka znosiła zdolność tworzenia kompleksu CaM/ZmSAUR1. Podobnego efektu nie obserwowano, gdy w rezultacie mutacji otrzymano SAUR1 pozbawione C-końca. Innym konserwatywnym motywem w obrębie ZmSAUR jest Ser⁷⁷ będąca substratem kinazy kazeinowej II [29]. Zachowanie tego aminokwasu w toku ewolucji sugeruje, że poza oddziaływaniami z kalmoduliną, białka SAUR mogą być regulowane potranslacyjnie przez fosforylację.

LITERATURA

- [1] ABEL S, THEOLOGIS A. Early genes and auxin action. *Plant Physiol* 1996; **111**: 9–17.
- [2] BALLAS N, WONG LM, THEOLOGIS A. Identification of the auxin-responsive element, AuxRE, in the primary indoleacetic acid-inducible gene, *PS-IAA4/5*, of pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol* 1993; **233**: 580–596.
- [3] BIERFREUND NM, TINTELNOT S, RESKI R, DECKER EL. Loss of *GH3* function does not affect phytochrome-mediated development in a moss, *Physcomitrella patens*. *J Plant Physiol* 2004; **161**: 823–835.
- [4] CHANG KH, XIANG H, DUNAWAY-MARINO D. Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate/thioester-forming enzyme superfamily: a site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas* sp. strain CBS 4-chlorobenzoate: coenzyme A ligase. *Biochemistry* 1997; **36**: 15650–15655.
- [5] CHEN Q, ZHANG B, HICKS LM, WANG S, JEZ JM. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based assay for indole-3-acetic acid-amido synthetase. *Anal Biochem* 2009; **390**: 149–154.
- [6] COLÓN-CARMONA A, CHEN DL, YEH K-C, ABEL S. Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1728–1738.
- [7] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 441–445.
- [8] DING X, CAO Y, HUANG L, ZHAO J, XU C, LI X, WANG S. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell* 2008; **20**: 228–240.
- [9] DREHER KA, BROWN J, SAW RE, CALLIS J. The *Arabidopsis* Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell* 2006; **18**: 699–714.
- [10] FUJI N, KAMADA M, YAMASAKI S, TAKAHASHI H. Differential accumulation of *Aux/IAA* mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 731–740.
- [11] FUKAKI H, TANIGUCHI N, TASAKA M. PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during *Arabidopsis* lateral root formation. *Plant J* 2006; **48**: 380–389.
- [12] GOETZ M, VIVIAN-SMITH A, JOHNSON SD, KOLTUNOW AM. *AUXIN RESPONSE FACTOR8* is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; **18**: 1873–1886.
- [13] GUILFOYLE TJ. Aux/IAA proteins and auxin signal transduction. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 205–207.
- [14] GUILFOYLE TJ, HAGEN G. Auxin response factors. *J Plant Growth Regul* 2001; **20**: 281–291.
- [15] GUILFOYLE TJ, HAGEN G. Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 453–460.
- [16] GURANOWSKIA, MIERSCH O, STASWICK PE, SUZA W, WASTERNAK C. Substrate specificity and products of side-reactions catalyzed by jasmonate:amino acid synthetase (JAR1). *FEBS Lett* 2007; **581**: 815–820.
- [17] HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 1197–1203.
- [18] HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 373–385.
- [19] HAMANN T, BENKOVA E, BÄURLE I, KIENZ M, JÜRGENS G. The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Gen Dev* 2002; **16**: 1610–1615.

- [20] HARPER RM, STOWE-EVANS EL, LUESSE DR, MUTO H, TATEMATSU K, WATAHIKI MK, YAMAMOTO K, LISCUM E. The *NPH4* locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell* 2000; **12**: 757–770.
- [21] HSIEH HL, OKAMOTO H, WANG M, ANG LH, MATSUI M, GOODMAN H, DENG XW. *FIN219*, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Gen Dev* 2000; **14**: 1958–1970.
- [22] JAGADEESWARAN G, RAINA S, ACHARYA BR, MAQBOLLAB, MOSHER SL, APPEL HM, SCHULTZ JC, KLESSIG DF, RAINA R. *Arabidopsis GH3-LIKE DEFENSE GENE 1* is required for accumulation of salicylic acid, activation of defense responses and resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant J* 2007; **51**: 234–246.
- [23] JAIN M, KAURN, TYAGIAK, KHURANA JP. The auxin-responsive GH3 family in rice (*Oryza sativa*). *Funct Integr Genom* 2006; **6**: 36–46.
- [24] JAIN M, KAURN, GARG R, THAKUR JK, TYAGIAK, KHURANA JP. Structure and expression analysis of early auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct Integr Genom* 2006; **6**: 47–59.
- [25] JAIN M, TYAGIAK, KHURANA JP. Genome-wide analysis, evolutionary expansion, and expression of early auxin-responsive *SAUR* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Genomics* 2006; **88**: 360–371.
- [26] KALLURI UC, DIFAZIO SP, BRUNNERAM, TUSKAN GA. Genome-wide analysis of *Aux/IAA* and *ARF* gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* 2007; **7**: 59–73.
- [27] KEPINSKI S, LEYSER O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 446–451.
- [28] KIM J, HARTER K, THEOLOGIS A. Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11786–11791.
- [29] KNAUSS S, ROHRMEIER T, LEHLE L. The auxin-induced maize gene *ZmSAUR2* encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. *J Biol Chem* 2003; **278**: 23936–23943.
- [30] KOWALCZYK S, HADOWSKA E, PIEKARSKA A. Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych. *Post Biochem* 2005; **51**: 171–187.
- [31] LAU S, JÜRGENS G, DE SMET I. The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 2008; **20**: 1738–1746.
- [32] LI Y, SHI X, STRABALA TJ, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins show increased tolerance to exogenous auxin and auxin transport inhibitors. *Plant Sci* 1994; **100**: 9–14.
- [33] LI Y, WU YH, HAGEN G, GUILFOYLE T. Expression of the auxin-inducible GH3 promo-ter/GUS fusion gene as a useful molecular marker for auxin physiology. *Plant Cell Physiol* 1999; **40**: 675–682.
- [34] LISCUM E, REED J. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 387–400.
- [35] LIU K, KANG B-C, JIANG H, MOORE SL, LI H, WATKINS CB, SETTER TL, JAHN MM. A *GH3*-like gene, *CcGH3*, isolated from *Capsicum chinese* L. fruit is regulated by auxin and ethylene. *Plant Mol Biol* 2005; **58**: 447–464.
- [36] LIU Z-B, ULMASOV T, SHI X, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Soybean *GH3* promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* 1994; **6**: 645–657.
- [37] LUDWIG-MÜLLER J, JÜLKE S, BIERFREUND NM, DECKER EL, RESKI R. Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis. *New Phytol* 2009; **97**: 627–634.
- [38] MALLORY AC, BARTEL DP, BARTEL B. Micro-RNA-directed regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR 17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 2005; **17**: 1360–1375.
- [39] MCSTEEN P, ZHAO Y. Plant hormones and signaling: common themes and new developments. *Dev Cell* 2008; **14**: 467–473.
- [40] MOCKAITIS K, ESTELLE M. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2008; **24**: 55–80.
- [41] NAKAZAWA M, YABE N, ICHIKAWA T, YAMAMOTO YY, YOSHIZUMI T, HASUNUMA K, MATSUI M. *DFL1*, an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J* 2001; **25**: 213–221.

- [42] NOBUTA K, OKRENT RA, STOUTEMYER M, RODIBAUGH N, KEMPEMAL, WILDERMUTH MC, INNES RW. The GH3 acyl adenylase family member PBS3 regulates salicylic acid-dependent defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2007; **144**: 1144–1156.
- [43] OKUSHIMA Y, OVERVOORDE PJ, ARIMAK, ALONSO JM, CHANA, CHANG C, ECKER JR, HUGHES B, NGUYEN D, ONODERA C, QUACH H, SMITH A, YU G, THEOLOGIS A. Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell* 2005; **17**: 444–463.
- [44] OSTROWSKI M, JAKUBOWSKA A. Receptory auksyn. *Post Biol Kom* 2008; **35**: 79–95.
- [45] OSTROWSKI M, JAKUBOWSKA A. Identification of enzyme activity that conjugates indole-3-acetic acid to aspartate in immature seeds of pea (*Pisum sativum*). *J Plant Physiol* 2008; **165**: 564–569.
- [46] OUELLET F, OVERVOORDE PJ, THEOLOGIS A. IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* 2001; **13**: 829–841.
- [47] OVERVOORDE PJ, OKUSHIMA Y, ALONSO JM, CHANA, CHANG C, ECKER JR, HUGHES B, LIU A, ONODERA C, QUACH H, SMITH A, YU G, THEOLOGIS A. Functional genomic analysis of the *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2005; **17**: 3282–3300.
- [48] PARK J-E, KIM Y-S, YOON H-K, PARK C-M. Functional characterization of a *small auxin-up RNA* gene in apical hook development in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 2007; **172**: 150–157.
- [49] PARK J-E, PARK J-Y, KIM Y-S, STASWICK PE, JEON J, YUN J, KIM S-Y, KIM J, LEE Y-H, PARK C-M. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2007; **282**: 10036–10046.
- [50] PARK J-E, SEO PJ, LEE A-K, JUNG J-H, KIM Y-S, PARK C-M. An *Arabidopsis GH3* gene, encoding an auxin-conjugating enzyme, mediates phytochrome B-regulated light signals in hypocotyl growth. *Plant Cell Physiol* 2007; **48**: 1236–1251.
- [51] PFLUGER J, ZAMBRYSKI P. The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development* 2004; **131**: 4697–4707.
- [52] REDDY SM, HITCHIN S, MELAYAH D, PANDEY AK, RAFFIER C, HENDERSON J, MARMEISSE R, GAY G. The auxin-inducible *GH3* homologue *Pp-GH3.16* is downregulated in *Pinus pinaster* root systems on ectomycorrhizal symbiosis establishment. *New Phytol* 2006; **170**: 391–400.
- [53] REED JW. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 420–425.
- [54] REMINGTON DL, VISION TJ, GUILFOYLE TJ, REED JW. Contrasting modes of diversification in the *Aux/IAA* and *ARF* gene families. *Plant Physiol* 2004; **135**: 1738–1752.
- [55] ROBERTO FF, KLEE H, WHITE F, NORDEEN R, KOSUGE T. Expression and fine structure of the gene encoding N^ε-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase from *Pseudomonas savastanoi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5797–5801.
- [56] SONG Y, YOU J, XIONG L. Characterization of *OsIAA1* gene, a member of rice Aux/IAA family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses and plant morphogenesis. *Plant Mol Biol* 2009; **70**: 297–309.
- [57] SPARTZ AK, GRAY WM. Plant hormone receptors: new perceptions. *Gen Dev* 2008; **22**: 2139–2148.
- [58] STASWICK PE, TIRYAKII, ROWE ML. Jasmonate response locus *JAR1* and several *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acid in an assay for adenylation. *Plant Cell* 2002; **14**: 1405–1415.
- [59] STASWICK PE, SERBAN B, ROWE M, TIRYAKII, MALDONADO MT, MALDONADO MC, SUZA W. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 2005; **17**: 616–627.
- [60] SUZA WP, STASWICK PE. The role of *JAR1* in jasmonoyl-L-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta* 2008; **227**: 1221–1232.
- [61] SZEMENYEI H, HANNON M, LONG JA. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 2008; **319**: 1384–1386.
- [62] TAKASE T, NAKAZAWA M, ISHIKAWA A, KAWASHIMA M, ICHIKAWA T, TAKAHASHI N, SHIMADA H, MANABE K, MATSUI M. *ydk1-D*, an auxin-responsive *GH3* mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *Plant J* 2004; **37**: 471–483.
- [63] TAN X, CALDERON-VILLALOBOS LIA, SHARON M, ZHENG CH, ROBINSON CV, ESTELLE M, ZHENG N. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 2007; **446**: 640–645.
- [64] TATEMATSU K, KUMAGAI S, MUTO H, SATO A, WATAHIKI MK, HARPER RM, LISCUM E, YAMAMOTO KT. *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2004; **16**: 379–393.

- [65] TEROL J, DOMINGO C, TALÓN M. The GH3 family in plants: genome wide analysis in rice and evolutionary history based on EST analysis. *Gene* 2006; **371**: 279–290.
- [66] THAKUR JK, TYAGI AK, KHURANA JP. *OsIAA1*, an *Aux/IAA* cDNA from rice, and changes in its expression as influenced by auxin and light. *DNA Res* 2001; **8**: 193–203.
- [67] THAKUR JK, JAIN M, TYAGIAK, KHURANA JP. Exogenous auxin enhances the degradation of a light down-regulated and nuclear-localized *OsIAA1*, an *Aux/IAA* protein from rice, via proteasome. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1730**: 196–205.
- [68] TIWARI SB, WANG X-J, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. *AUX/IAA* proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 2001; **13**: 2809–2822.
- [69] TIWARI SB, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 2003; **15**: 533–543.
- [70] TIWARI SB, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. *Aux/IAA* proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* 2004; **16**: 533–543.
- [71] UEHARA T, OKUSHIMA Y, MIMURA T, TASAKA M, FUKAKI H. Domain II mutations in *CRANE/IAA18* suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2008; **49**: 1025–1038.
- [72] ULMASOV T, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. *ARF1*, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 1997; **276**: 1865–1868.
- [73] ULMASOV T, MURFETT J, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. *Aux/IAA* proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 1997; **9**: 1963–1971.
- [74] ULMASOV T, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5844–5849.
- [75] WANG H, JONES B, LI Z, FRASSE P, DELALANDE C, REGAD F, CHAABOUNI S, LATCHÉ A, PECH J-C, BOUZAYEN M. The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 2005; **17**: 2676–2692.
- [76] WANG H, TIAN C, DUAN J, WU K. Research progresses on *GH3s*, one of family of primary auxin-responsive genes. *Plant Growth Regul* 2008; **56**: 225–232.
- [77] WEIJERS D, BENKOVA E, JÄGER KE, SCHLERETH A, HAMANN T, KIENZ M, WILMOTH JC, REED JW, JÜRGENS G. Developmental specificity of auxin response by pairs of *ARF* and *Aux/IAA* transcriptional regulators. *EMBO J* 2005; **24**: 1874–1885.
- [78] WILLIAMS L, CARLES CC, OSMONT KS, FLETCHER JC. A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis ARF2*, *ARF3*, and *ARF4* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 9703–9708.
- [79] WOODWARD AW, BARTEL B. Auxin: regulation, action and interaction. *Ann Bot* 2005; **95**: 707–735.
- [80] WU M-F, TIAN Q, REED JW. *Arabidopsis microRNA 167* controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* 2006; **133**: 4211–4218.
- [81] XU N, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Multiple auxin response modules in the soybean *SAUR 15A* promoter. *Plant Sci* 1997; **126**: 193–201.
- [82] YANG T, POOVAIAH BW. Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. *J Biol Chem* 2000; **275**: 3137–3143.
- [83] YANG X, LEE S, SO J, DHARMASIRI S, DHARMASIRI N, GE L, JENSEN C, HANGARTERR, HOBBIE L, ESTELLE M. The *IAA1* protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of *SCF^{TR1}*. *Plant J* 2004; **40**: 772–782.
- [84] ZAGO MK, GALVAN-AMPUDIA S, OFFRINGA R. Signaling in auxin-dependent plant development. W: Bögre L, Beemster G [red.] *Plant Growth Signaling*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 2008: 155–178.
- [85] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 20.10. 2009 r.

Przyjęto: 12.01.2010 r.

Maciej Ostrowski

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

e-mail: maciejo@stud.umk.pl