

## GIBERELINY – PERCEPCJA I TRANSDUKCJA SYGNAŁU U ROŚLIN\*

### GIBBERELLINS – PERCEPTION AND SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS

Katarzyna MARCINIAK, Brygida ŚWIEŻAWSKA, Jacek KĘSY,  
Andrzej TRETYN, Jan KOPCEWICZ

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w  
Toruniu

*Streszczenie:* Gibereliny (GA), jako jedne z podstawowych fitohormonów, kontrolują tak ważne procesy wzrostu i rozwoju roślin jak kielkowanie nasion, wydłużanie łodyg i indukcję kwitnienia. Z ponad stu trzydziestu różnych GA zidentyfikowanych u roślin, grzybów i bakterii tylko nieliczne – GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>6</sub>, GA<sub>7</sub> – wykazują aktywność biologiczną, natomiast pozostałe są ich prekursorami lub produktami katabolizmu. W ciągu ostatniej dekady, dzięki użyciu biochemicznych, genetycznych i molekularnych technik badawczych szczegółowo poznano mechanizm percepcji i transdukcji sygnału giberelinowego u roślin (ryc. 11). W pierwszym etapie sygnał GA odbierany jest przez wewnątrzkomórkowy receptor GID1 (ang. *GA insensitive dwarf 1*) zlokalizowany zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze. W genomie ryżu (*Oryza sativa*) zidentyfikowano pojedynczy gen *GID1*, natomiast w genomie rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) odkryto trzy jego ortologi *GID1a*, *GID1b*, *GID1c* pełniące częściowo nakładające się funkcje. Wiązanie bioaktywnych GA do receptora GID1 promuje interakcje pomiędzy GID1 a domeną DELLA obecną w białkach DELLA będących głównymi represorami szlaku giberelinowego. Wyniki badań potwierdziły, że motyw DELLA jest niezwykle istotny dla tego typu oddziaływań, ponieważ jego usunięcie skutkuje brakiem zdolności do tworzenia kompleksu GID1-DELLA pomimo obecności GA. Podczas gdy u ryżu stwierdzono obecność zaledwie jednego białka DELLA – SLR1 (ang. *slender rice 1*), to u rzodkiewnika odkryto pięć takich białek – GAI (ang. *GA insensitive*), RGA (ang. *repressor of GAI-3*) RGL1, RGL2 i RGL3 (ang. *rga like 1/2/3*), które pod względem struktury zalicza się do rodziny roślinnych regulatorów transkrypcji GRAS (ang. *gai, rga, scarecrow*). Związanie białek DELLA przez GA-GID1 zwiększa ich powinowactwo do ligaz ubikwitynowo-białkowych E3 typu SCF (ang. *SKP1-cullin-F-box-RBX1*) zawierających białka z domeną F (FBP, ang. *F-box proteins*) – AtSLY1 u rzodkiewnika i OsGID2 u ryżu. Wyznakowane łańcuchem poliubikwitynowym białka represorowe są następnie degradowane w proteasomach 26S. Opisany cykl zdarzeń prowadzi do odblokowania określonych czynników transkrypcyjnych, które oddziałując z promotorami regulują geny docelowe. Przedstawiony w pracy

\*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu grantu MNiSW nr N N303 811240

nowatorski mechanizm przekazywania sygnału hormonalnego został jak dotąd opisany jedynie u roślin, jednak nie jest wykluczone, że może występować również u innych organizmów.

*Słowa kluczowe:* fitohormony, szlak giberelinowy, receptor GA – GID1, białka DELLA, ligazy ubikwityny

*Summary:* Gibberellins (GAs), as one of the most important phytohormones, control different aspect of plant growth and development including seed germination, stem elongation and flower induction. Among more than a hundred and thirty GAs identified from plants, fungi and bacteria only a small number of them, such as GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>6</sub> and GA<sub>7</sub>, are thought to function as bioactive hormones. Therefore, many non-bioactive GAs exist in plants as precursors or deactivated metabolites. Recent biochemical, genetic and molecular studies have elucidated in detail the mechanism of GA perception and signal transduction in plants (fig. 11). In the first step the GA signal is perceived by the GA receptor – GID1 (*GA insensitive dwarf 1*), which is a soluble protein that is localized to both cytoplasm and nucleus. There is a single *GID1* gene in rice (*Oryza sativa*), but three orthologues in *Arabidopsis thaliana* (*GID1a*, *GID1b*, *GID1c*) with overlapping functions. The binding of bioactive GAs to GID1 promotes an interaction between GID1 and the DELLA-domain of DELLA proteins, which are main repressors of gibberellin pathway. The DELLA motif is essential for this interaction, because its deletion results in an inability to interact with GID1, despite the presence of GAs. Whereas rice has only one DELLA protein – SLR1 (*slender rice 1*), the *Arabidopsis* genome encodes five DELLAs – GAI (*GA insensitive*), RGA (*repressor of GA1-3*), RGL1, RGL2 and RGL3 (*rga like 1/2/3*). Structurally, DELLAs are a subgroup of proteins that belong to the GRAS (*gai*, *rga*, *scarecrow*) family of transcriptional regulators. The binding of DELLA by GA-GID1 enhances the affinity between DELLA and a specific SCF E3 ubiquitin-ligase complex involving the F-box proteins AtSLY1 and OsGID2 in *Arabidopsis* and rice, respectively. In turn, SCF<sup>SLY1/GID2</sup> promotes the ubiquitinylation and subsequent destruction of DELLAs by the 26S proteasome. This situation is a key event in GA signaling and affect on transcription factors which regulate activity of target genes. The mechanism of hormonal signal transduction, presented in this paper has been described only in plants, however it can supposed, that this novel mechanism may also exist in other organisms.

*Key words:* phytohormones, gibberellin pathway, GA receptor – GID1, DELLA proteins, ubiquitin ligases

## WSTĘP

Rodzina związków nazywanych ogólnie giberelinami (GA) obejmuje dużą grupę metabolitów pośrednich szlaku biosyntezy bądź dezaktywacji GA, oraz zaledwie kilka biologicznie aktywnych fitohormonów (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>6</sub>, GA<sub>7</sub>). W chwili obecnej znanych jest 136 w pełni scharakteryzowanych cząsteczek (GA<sub>1</sub> – GA<sub>136</sub>). 128 z nich zostało zidentyfikowanych u różnych gatunków roślin naczyniowych, natomiast pozostałych osiem u bakterii i grzybów (<http://www.plant-hormones.info/ga1info.htm>). Spośród siedmiu „klasycznych” hormonów roślinnych, GA zajmują kluczową pozycję w regulacji wzrostu i rozwoju roślin kontrolując między innymi takie procesy fizjologiczne jak kiełkowanie nasion, wzrost wydłużeniowy hypokotyli czy indukcję kwitnienia [43].

Przez wiele lat główny nurt badań związanych z GA dotyczył identyfikacji poszczególnych związków oraz poznania szlaków biosyntezy i mechanizmów regulujących zawartość cząsteczek hormonu w roślinie. Obecny kierunek poszukiwań koncentruje uwagę przede wszystkim na tematyce związanej z percepcją i transdukcją sygnału giberelinowego. Pierwotne doświadczenia nad mechanizmami działania GA wykonywane były na komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż [13]. Komórki te nie zawierają wykrywalnych ilości GA, za to reagują na fitohormon wydzielaniem na zewnątrz enzymów hydrolitycznych, koniecznych do degradacji skrobi zmagazynowanej w bielmie. Oprócz najlepiej poznanych białek MYB, HRT (ang. *hordeum repressor of transcription*) i ABF1/2 regulujących transkrypcję genów  $\alpha$ -amylaz, w szlak przekazywania sygnału giberelinowego zaangażowane są również heterotrimeryczne białka G, 1,4,5-trifosforany inozytolu, jony wapnia, kalmodulina, cykliczne nukleotydy oraz kinazy i fosfatazy białkowe [7, 18]. Mimo wielu lat badań do dzisiaj nie udało się jednak wskazać konkretnego receptora błonowego, który mógłby współdziałać z tymi elementami w regulacji ekspresji genów odpowiedzi na ten hormon. Przełomowym momentem w poznaniu szlaku percepcji i transdukcji sygnału giberelinowego było odkrycie wewnątrzkomórkowego receptora giberelinu *GID1* (ang. *gibberellin insensitive dwarf1*) [24, 38]. Mechanizm jego działania połączono z innymi, znanymi już wcześniej białkami DELLA oraz białkami będącymi składnikami ligaz ubikwityny – OsGID2 / AtSLY1. Postępy w biochemiczno-molekularnych badaniach, skupiających się na poznaniu sposobów oddziaływania pomiędzy tymi elementami, rzuciły właściwe światło na sposób funkcjonowania GA. Niniejsza praca jest podsumowaniem aktualnego stanu wiedzy na temat percepcji i transdukcji sygnału giberelinowego u roślin.

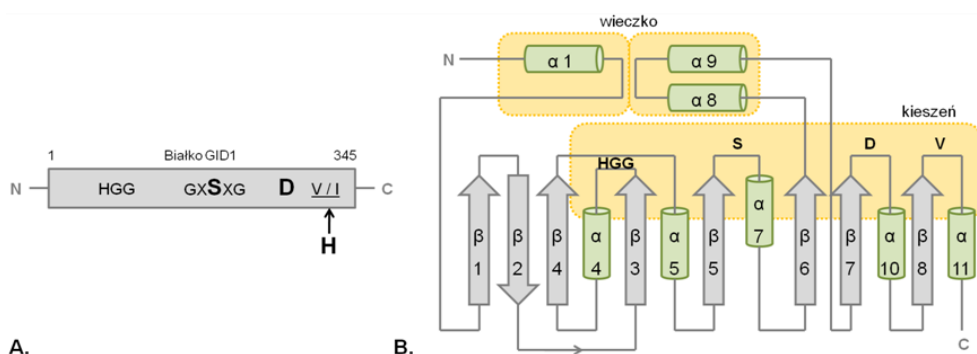
## WEWNĄTRZKOMÓRKOWY RECEPTOR GA

Receptor GA – *GID1* po raz pierwszy zidentyfikowano u ryżu [38], następnie trzy jego ortologi – *GID1a*, *GID1b* i *GID1c* u rzodkiewnika [24] oraz kolejno u paproci [45], bawełny [1], jęczmienia [4] i osiki [23].

### Lokalizacja i budowa *GID1*

Białko *GID1* (345 aminokwasów, 38-40 kD) funkcjonuje jako rozpuszczalny, nie związany z błoną receptor występujący na terenie cytoplazmy i jądra [38, 42]. Jego sekwencja aminokwasowa zawiera dwa silnie konserwowane motywy – HGG i GX SXG (ryc. 1A) przez co wykazuje duże podobieństwo do lipaz wrażliwych na hormony HSL (ang. *hormone-sensitive lipases*), których główną funkcją jest uczestnictwo w metabolizmie tłuszczu (przede wszystkim hydroliza triacylglicerolu). Pomiedzy *GID1* a rodziną białek HSL występuje jednak istotna

różnica polegająca na braku u *GID1* znajdującej się blisko C-końca silnie konserwowanej reszty histydy (H), która została zamieniona na walinę (V) lub rzadziej na izoleucynę (I), w wyniku czego receptor GA nie wykazuje aktywności enzymatycznej. Cechą charakterystyczną białek *GID1* jest obecność katalitycznej triady – S/D/V, która wraz z motywem HGG tworzy kieszeń wiążącą ligand (GA). Z kolei do cech wspólnych *GID1* i HSL zalicza się sposób sfałdowania białek, który jest podobny u wszystkich  $\alpha/\beta$ -hydrolaz (ryc. 1B). W strukturze drugorzędowej można wyróżnić osiem centralnie położonych  $\beta$ -harmonijek ( $\beta 1 - \beta 8$ ) ułożonych po dwóch stronach  $\alpha$ -helis. Cechą wspólną jest również obecność wieczka utworzonego przez dwie  $\alpha$ -helisy ( $\alpha 8/\alpha 9$ ) znajdujące się w środkowej części białka (pomiędzy 6 a 7  $\beta$ -harmonijką) i tworzące prawą część wieczka oraz przez pierwszą  $\alpha$ -helisę znajdującą się na N-końcu polipeptydu i tworzącą lewą część wieczka [35, 41].



RYCINA 1. (A) Silnie konserwowane motywy charakterystyczne dla receptora *GID1* oraz innych białek z rodziny HSL. Większą i wytłuszczoną czcionką zaznaczono trzy aminokwasy (triada katalityczna S/D/H), których obecność zapewnia białkom z rodziny HSL aktywność enzymatyczną; (B) Struktura drugorzędowa białka *GID1*. Zaznaczono wieczko oraz kieszeń wiążącą ligand. Szczegóły w tekście. Na podstawie Ueguchi-Tanaka i in., 2007b i Sun, 2008, zmodyfikowane

FIGURE 1. (A) Highly conserved motifs characteristic for the *GID1* receptor and other HSL family proteins. Three amino acids (catalytic triad S/D/H) responsible for enzymatic activity of HSL family proteins are enlarged and bolted; (B) The secondary structure of *GID1* protein. The cap and ligand binding pocket are marked. Details in the text. According to Ueguchi-Tanaka et al., 2007b and Sun, 2008, modified

### Rola *GID1*

Mimo wielu dowodów na istnienie receptora błonowego, obecne badania wskazują, że głównym receptorem GA jest białko *GID1*. Mutacja w genie *GID1* u ryżu skutkuje fenotypem silnie karłowatym, a komórki warstwy aleuronowej nie produkują i nie wydzielają  $\alpha$ -amylazy [40]. W przypadku rzodkiewnika, nasiona potrójnego mutantu *gid1a gid1b gid1c* w ogóle nie kiełkują, a fenotyp tej rośliny jest jeszcze bardziej karłowaty niż w przypadku mutantu szlaku biosyntezy GA

*gal-3*. Z kolei fenotypy pojedynczych mutantów receptora GA są bardzo zbliżone do fenotypu rośliny typu dzikiego, natomiast podwójne mutanty wykazują już bardzo specyficzne cechy wskazujące na pełnione przez nie funkcje. Na przykład podwójny mutant *gid1a gid1c* charakteryzuje się zredukowanym wzrostem łodygi, natomiast *gid1a gid1b* obniżoną męską płodnością [9, 15, 42]. Bardziej szczegółowa, filogenetyczno-funkcjonalna analiza wykazała, że AtGID1b należy do innej klasy białek niż AtGID1a i AtGID1c, wykazuje wyższe powinowactwo do GA w porównaniu z pozostałymi receptorami oraz wchodzi w interakcje z białkami DELLA zarówno w obecności, jak i przy braku cząsteczek hormonu. Dane te wskazują na pełnienie przez receptor AtGID1b u rzodkiewnika wyjątkowej roli [24].

Receptor GID1 oddziałuje z bioaktywnymi GA, natomiast nie oddziałuje z ich prekursorami lub produktami katabolizmu. Według modelu zaproponowanego przez Shimada i wsp. [31, 32] u ryżu, giberelina A<sub>4</sub> wiązana jest bezpośrednio do receptora OsGID1 za pomocą wiązań wodorowych utworzonych pomiędzy grupą hydroksylową występującą przy 198 serynie (Ser198) i grupą karboksylową zlokalizowaną przy 296 asparaginie (Asp296) białka GID1, a grupą karboksylową zlokalizowaną przy 6 atomie węgla pierścienia B gibereliny A<sub>4</sub>. Mogą to być również oddziaływania za pośrednictwem cząsteczek wody połączonych z hydrofilowymi aminokwasami znajdującymi się na powierzchni kieszeni, która wiąże GA. Z kolei 326 reszta waliny (Val326) białka GID1 zaangażowana jest w niepolarne interakcje z  $\gamma$ -laktonem utworzonym pomiędzy 4 i 10 atomem węgla w cząsteczce GA [31]. Oprócz opisanych powyżej oddziaływań hydrofilowych, GID1 może również wchodzić w interakcje z GA za pomocą oddziaływań hydrofobowych. Do najważniejszych można zaliczyć te, które tworzą się pomiędzy resztami aminokwasowymi znajdującymi się w zlokalizowanym na N-końcu białka GID1 wieczku, a węglami: C1-C2 (pierścień A), C11-C12 i C14 (pierścień C) oraz C17 w cząsteczce GA. Można więc stwierdzić, że wieczko pomaga utrzymać hormon w kieszeni, w której został związany [31, 39].

### **Powinowactwo GA do GID1**

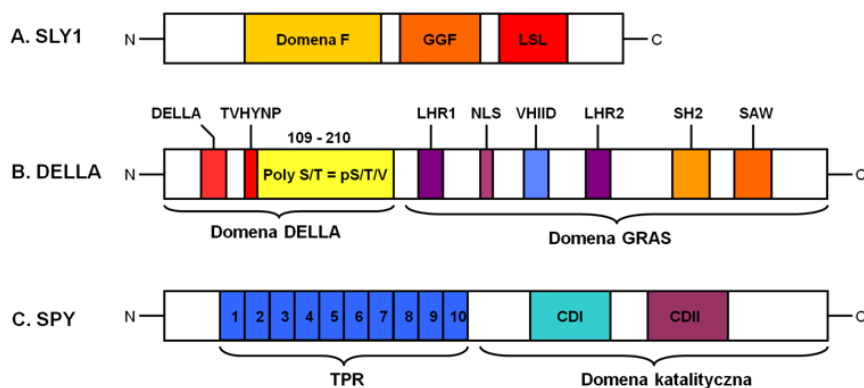
U rzodkiewnika powinowactwo GA do trzech receptorów AtGID1a, AtGID1b i AtGID1c jest podobne, jak powinowactwo GA do receptora GID1 u ryżu [24]. Wskazuje to, że białka receptorowe zarówno u roślin jednoliściennych, jak i dwuliściennych, wiążą hormon z podobnym rezultatem. Należy jednak zaznaczyć, że te dwa gatunki posiadają odmienne zestawy głównych, bioaktywnych GA, a ich rodzaj zależy od fazy rozwoju każdej z roślin. W przypadku ryżu, w fazie wegetatywnej jedyną biologicznie czynną gibereliną jest GA<sub>1</sub>, podczas gdy w fazie reprodukcyjnej jest to GA<sub>4</sub>. Z kolei u rzodkiewnika aktywną GA w fazie wzrostu wegetatywnego i generatywnego jest GA<sub>4</sub> [21, 35].

## BIĄŁKA DELLA – REPRESORY ODPOWIEDZI GIBERELINOWEJ

Celem dla kompleksu GA-GID1 są białka DELLA będące głównymi represorami odpowiedzi giberelinowej. Interakcje pomiędzy nimi możliwe są dzięki specjalnej budowie wieczka receptora GID1. Rezultaty badań wykonanych na ryżu dowiodły, że zamiana hydrofobowych aminokwasów wieczka na inne (np. alaninę) wyraźnie zmniejsza możliwość oddziaływań OsGID1-DELLA w komórkach drożdży. Stwierdzono również, że receptor ze zmienionymi aminokwasami nie wiąże aktywnych biologicznie cząsteczek GA, co całkowicie uniemożliwia powstanie kompleksu GA-GID-DELLA [31].

### Lokalizacja i budowa białek DELLA

Białka DELLA wykazują jądrową lokalizację, którą potwierdzają wyniki badań wykonanych na transgenicznym roślaku z użyciem białka zielonej fluorescencji (GFP – ang. *green fluorescent protein*) [5]. Białka DELLA posiadają dwie podstawowe domeny – położoną na N-końcu, regulatorową domenę DELLA ściśle związaną z odpowiedzią na GA, oraz położoną na C-końcu białka domenę GRAS, która jest charakterystyczna dla całej rodziny roślinnych regulatorów transkrypcji GRAS (ang. *GAI, RGA and Scarecrow*) (ryc. 2B) [47].



RYCINA 2. Budowa różnych białek związanych ze szlakiem giberelinowym u rzodkiewnika. (A) Białko SLY1 (151 aa; 17,5 kDa); (B) Białko DELLA (587 aa; 57-64 kDa); (C) Białko SPY (914 aa; 104 kDa). Szczegóły w tekście. Na podstawie [35], zmodyfikowane

FIGURE 2. The structure of various proteins involved in the gibberellin pathway in *Arabidopsis thaliana*. (A) SLY1 protein (151 aa; 17,5 kDa); (B) DELLA protein (587 aa; 57-64 kDa); (C) SPY protein (914 aa; 104 kDa). Details in the text. According to [35], modified

Domena DELLA zawiera dwa silnie konserwowane motywy DELLA i TVHYNP oraz zmienny region bogaty w serynę, treoninę i niekiedy walinę (Poly

S/T = pS/T/V). Zbudowany z 27 aminokwasów motyw DELLA i motywy TVHYNP są istotne dla utrzymania stabilności białek DELLA, w związku z tym jakiejkolwiek mutacje w ich obrębie (np. *gai-1*, *rga-Δ17*, *rgl1-Δ17*) skutkują fenotypem karłowatym, brakiem wrażliwości roślin na egzogenną aplikację GA oraz mniejszą wrażliwością na proteolityczną degradację, co prowadzi do nadmiernej akumulacji białek w komórkach [8, 35]. Motywy DELLA i TVHYNP uczestniczą również w rozpoznawaniu sygnału giberelinowego w wyniku interakcji z wieczkiem receptora *GID1*. W tym procesie istotne znaczenie ma długość sekwencji aminokwasowej pomiędzy motywem DELLA a TVHYNP, jednak odcinek ten nie jest konserwowany. Z kolei nie wpływający na stabilność białek DELLA motyw Poly S/T posiada potencjalne miejsce fosforylacji i/lub glikozylacji i określany jest jako region regulujący sygnał giberelinowy [10, 42].

Druga domena GRAS zawiera powtórzenia leucyny LHR1/LHR2 (ang. *leu heptad repeats*), przypuszczalny sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. *nuclear localisation signal*), rejon VHIID, oraz motywy SH2 i SAW. Zarówno motywy LHR1/LHR2, jak i znajdujący się pomiędzy nimi region VHIID odpowiadają za dimeryzację białek, która jest ważna zarówno dla percepcji GA, jak i proteasomalnej degradacji białek DELLA. Z kolei za pomocą motywów SH2 i SAW białka DELLA oddziałują z białkami typu F-box (FBP) wchodzącymi w skład ligaz ubikwitynowo-białkowych. Tworzenie kompleksu DELLA-FBP u rzodkiewnika następuje w sposób bezpośredni, natomiast u ryżu potrzebny jest do tego dodatkowy czynnik [41, 47].

U rzodkiewnika białka DELLA kodowane są przez się pięć genów: *RGA* (ang. *repressor of GAI-3*), *GAI* (ang. *GA-insensitive*) i *RGL1/RGL2/RGL3* (ang. *RGA like 1/2/3*), natomiast w genomie ryżu przez pojedynczy gen – *SLR1* (ang. *slender rice 1*). Ortologi genów DELLA zidentyfikowano również u innych gatunków roślin, m. in. u pszenicy (*Rht*, ang. *reduced height protein1*), kukurydzy (*D8*, ang. *Dwarf 8*), winorośli (*VvGAI1*) czy jęczmienia (*SLN1*, ang. *slender 1*) [35]. Rezultaty badań powinowactwa pięciu białek DELLA do trzech białek *GID1* u rzodkiewnika z wykorzystaniem trzyhybrydowego systemu drożdżowego (Y3H) pozwoliły podzielić białka DELLA na dwie grupy. Do pierwszej zaliczamy białka *GAI* i *RGA*, które wykazują wyższe powinowactwo do *AtGID1b*, niż do pozostałych dwóch receptorów (*AtGID1a* i *AtGID1c*), natomiast do drugiej grupy należą *RGL1/2/3*, które wykazują największe powinowactwo do *AtGID1a* [36].

### Funkcje białek DELLA

Funkcje współdziałających ze sobą białek DELLA u rzodkiewnika zostały poznane na podstawie obserwacji pojedynczych i wielokrotnych mutantów w poszczególnych genach na różnych etapach rozwoju rośliny (ryc. 3). W procesie kiełkowania nasion na świetle główną funkcję pełnią białka *RGL2*, choć niewykluczone jest ich współdziałanie z białkami *RGL3*, których funkcja nie jest jasna do chwili obecnej. Niektóre rezultaty badań wskazują, że proces ten może

być znacznie szerzej regulowany w wyniku interakcji białek RGL2/RGL1/GAI/RGA. Z kolei białka GAI i RGA hamują rozwój wegetatywny wpływając przede wszystkim na takie procesy jak wydłużanie łodygi czy rozwój liści. Współdziałając dodatkowo z białkami RGL1 i RGL2, białka GAI i RGA modulują również proces kwitnienia, jak i rozwój pyłku kwiatowego, choć główną funkcję w procesie kwitnienia przypisuje się RGL1 [3, 35].

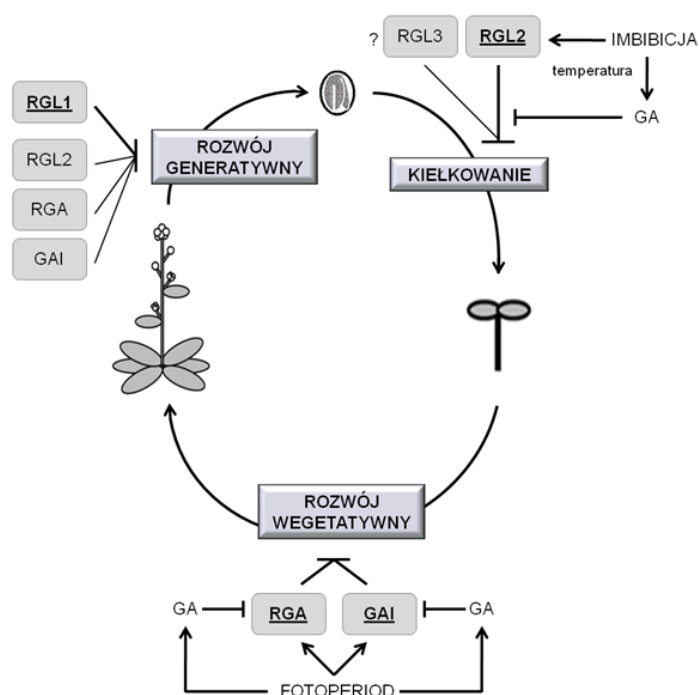
### Modyfikacje białek DELLA

U roślin białka DELLA występują zarówno w formie fosforylowanej, jak i niefosforylowanej, ale rola tych modyfikacji jest wciąż mało poznana i kontrowersyjna. W ciągu ostatnich kilku lat ukazało się kilka prac eksperymentalnych, jednak ich wyniki są odmienne. Pierwotnie wskazywano, że fosforylacja kluczowych motywów tj. DELLA, TVHYNP, PolyS/T czy GRAS jest niezbędna, aby białka DELLA prawidłowo spełniały swoje funkcje. Później okazało się, że fosforylacja białek DELLA u ryżu (SLR1) nie jest warunkiem koniecznym do ich proteasomalnej degradacji, ponieważ zarówno w formie fosforylowanej, jak i niefosforylowanej wykazują one po aplikacji GA podobny czas połowicznego rozpadu oraz takie samo powinowactwo do białek typu F-box. Dalsze badania doprowadziły do dyskusyjnego wniosku, że do zmniejszenia poziomu białek DELLA u rzodkiewnika (RGL2) przyczynia się proces ich wcześniejszej defosforylacji [40].

Białka DELLA mogą być również modyfikowane przez wykazujące jądrocytoplazmatyczną lokalizację białka SPY (ang. *spindly*). Pod względem budowy wykazują one wysokie podobieństwo do ssaczy transferaz *O*-N-acetyloglukozaminy – OGT (ang. *O-linked N-acetylglucosamine transferases*). Na N-końcu białka SPY posiadają 10 motywów TPR (ang. *tetratricopeptide repeats*) odpowiedzialnych za oddziaływania białko-białko, natomiast na C-końcu domenę katalityczną składającą się z dwóch poddomen – CDI i CDII (ryc. 2C). Tak jak występujące u zwierząt polipeptydy OGT, białka SPY modyfikują białka docelowe poprzez dodanie do ich reszt serynowych lub treoninowych *N*-acetyloglukozaminy (GlcNAc). U roślin z obniżonym poziomem białek SPY zwiększa się ilość fosforylowanych białek DELLA, ale do tej pory nie udało się wyjaśnić przyczyn tego zjawiska [32, 33]. Wiadomo natomiast, że białka DELLA mogą być modyfikowane przez białka SPY tylko w momencie, gdy nie są one fosforylowane. Modyfikacje typu *O*-GlcNAc (*N*-acetyloglukozaminacje) powodują, że białka DELLA hamują wzrost rośliny, a wynika to najprawdopodobniej ze wzmocnienia interakcji białek DELLA z innymi białkami, za pomocą których oddziałują z DNA. Z drugiej jednak strony, modyfikacje typu *O*-GlcNAc powodują, że białka DELLA łączą się z kompleksem GA-GID1, a następnie z białkami FBP i ulegają degradacji w proteasomach 26S. Ogólnie przyjmuje się jednak, że białka SPY pełnią rolę negatywnych regulatorów szlaku giberelinowego poprzez stabilizację białek DELLA [10].



Istnieją przypuszczenia, że kluczowym procesem wpływającym na aktywność białek DELLA w szlaku giberelinowym może być ich dimeryzacja. Udowodniono, że należące do składającej się z 33 polipeptydów rodziny GRAS, dwa białka – SHR (ang. *short root*) i SCR (ang. *scarecrow*) oddziałują ze sobą poprzez motywy LHR i VHIID, które są również obecne w białkach DELLA. Nadal otwarte pozostają jednak pytania, czy potranslacyjne modyfikacje białek DELLA przyczyniają się do ich dimeryzacji i czy formowanie heterodimerów pomiędzy białkami DELLA i/lub innymi białkami z rodziny GRAS wpływa na szlak transdukcji sygnału giberelinowego [35].



RYCINA 3. Rola białek DELLA w ontogenezie rzodkiewnika. Szczegóły w tekście. Na podstawie [3, 35], zmodyfikowane

FIGURE 3. The role of DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana* ontogenesis. Details in the text. According to [3, 35], modified

Do chwili obecnej rola potranslacyjnych modyfikacji białek DELLA (fosforylacji, defosforylacji, N-acetylglikozaminacji itp.) nie została jednoznacznie określona, aczkolwiek zaproponowano hipotetyczny model ich funkcjonowania (ryc. 5C), który z biegiem czasu na pewno będzie systematycznie uzupełniany.

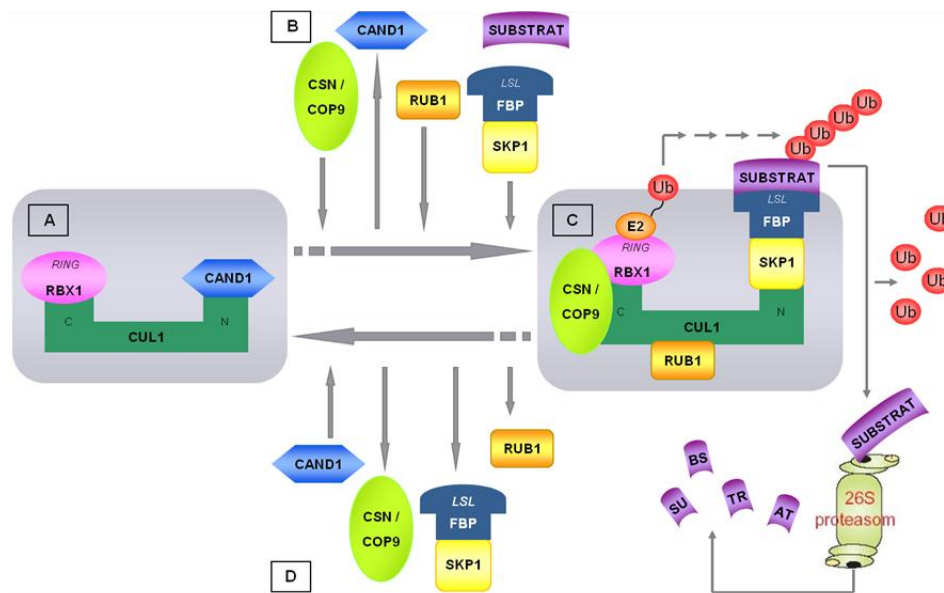
## LIGAZY UBIKWITYNOWO-BIAŁKOWE

Istotą funkcjonowania szlaku giberelinowego jest aktywacja ligaz ubikwitynowo-białkowych. Konsekwencją tych działań jest uruchomienie procesu proteolitycznej degradacji białek represorowych uczestniczących w regulacji aktywności docelowych genów odpowiedzi na GA. W komórkach eukariontów występują dwa podstawowe systemy degradacyjne białek – lizosomalny oraz ubikwitynowo-proteasomalny UPS (ang. *ubiquitin-26S proteasome system*). W genomie rzodkiewnika występuje około 1400 genów kodujących poszczególne elementy UPS, z czego około 90% genów koduje monomeryczne lub polimeryczne ligazy ubikwitynowo-białkowe E3 [25]. Roślinne ligazy E3 tworzą dużą rodzinę białek lub kompleksów białkowych z charakterystycznymi domenami RING-finger (ang. *really interesting new gene*), HECT (ang. *homologous to the E6-AP C-terminus*) lub U-box. Najważniejsze, z punktu widzenia regulacji szlaku przekazywania sygnału giberelinowego, są jednak ligazy ubikwityny E3 typu SCF (ang. *SKP1-cullin-F-box-RBX1*) [34].

### Budowa ligaz ubikwityny E3 typu SCF

Ligazy ubikwityny E3 typu SCF zbudowane są z co najmniej czterech podjednostek (ryc. 4). Rdzeń ligazy tworzy kulina (CUL1, ang. *cullin 1*) i białko RBX1 (ang. *ring box protein 1*), natomiast białka SKP1 (ang. *S-phase kinase associated protein 1*) oraz FBP (ang. *F-box protein*) stanowią elementy wymienne [34]. Białka FBP, zawierające charakterystyczną domenę F, decydują o swoistości wiązania substratów przeznaczonych do degradacji i są najliczniejszą rodziną białek rzodkiewnika [12]. Wśród białek FBP związanych ze szlakiem giberelinowym możemy wyróżnić jądrowe białko SLY1 (ang. *sleepy 1*) u rzodkiewnika (ryc. 2A) i białko GID2 (ang. *gibberellin insensitive dwarf 2*) u ryżu. Na N-końcu tych białek znajduje się domena F (~ 44 aminokwasy), za pomocą której oddziałują bezpośrednio z SKP1 oraz pośrednio z pozostałymi składnikami kompleksu ligazy. Z kolei na C-końcu wszystkich białek biorących udział w wiązaniu białek DELLA znajduje się motyw LSL, uczestniczący w interakcjach między tymi białkami. Mutant *sly1* wykazuje fenotyp półkarłowaty, co sugeruje obecność w genomie rzodkiewnika innego aktywnego homologa, którym z czasem okazało się białko SNE (ang. *sneezy*) posiadające motyw F. Różnica pomiędzy SLY1 i SNE polega na tym, że transkrypt *SLY1* wykryto we wszystkich badanych tkankach, natomiast transkrypt *SNE* tylko w kwiatach [46]. W aktywacji / inaktywacji kompleksu ligazy E3 typu SCF biorą dodatkowo udział takie białka / kompleksy białkowe jak: CAND1 (ang. *cullin-associated and neddylation-dissociated 1*), wielopodjednostkowy kompleks COP9/CSN (ang. *constitutive photomorphogenetic 9/COP9 signalosome*) oraz RUB1 (ang. *related to ubiquitin 1*). Białko CAND1 współzawodniczy z podjednostką SKP1 o wiązanie

z kuliną, ale tylko wówczas, gdy nie jest ona połączona z białkiem RUB1. Przyłączanie do kuliny białka RUB1 (zwane rubinylacją) jest reakcją trójstopniową. Biorą w niej udział enzymy analogiczne do E1 i E2 uczestniczące w aktywacji i koniugacji ubikwityny oraz ligaza, którą jest białko RBX1, będące podjednostką kompleksu ligazy SCF. Z kolei zbudowany z ośmiu polipeptydów kompleks białkowy COP9/CSN jest niezbędny w przebiegu procesu ubikwitylacji substratu, wykazano jednak, że uczestniczy on również w reakcji derubinylacji kuliny, hamując w ten sposób aktywność ligazy [14, 22].



RYCINA 4. Budowa i regulacja aktywności ligazy E3 typu SCF. (A) Nieaktywna ligaza zbudowana z kuliny (CUL1) i białka RBX1, które razem tworzą jej rdzeń oraz białka CAND1 współzawodniczącego z podjednostką SKP1 o wiązanie z kuliną, ale tylko wówczas, gdy nie jest ona połączona z białkiem RUB1; (B) Tworzenie funkcjonalnego kompleksu ligazy poprzez oddysocjowanie białka CAND1 w wyniku przyłączenia kompleksu CSN/COP9 oraz białka RUB1, SKP1, FBP, jak i substratu, który w dalszej kolejności ulegnie proteolitycznej degradacji; (C) Aktywna ligaza, której główną funkcją jest przeniesienie białka znacznikowego – ubikwityny (Ub) na związany substrat przeznaczony do degradacji w proteasomie 26S; (D) Inaktywacja ligazy polegająca na odłączeniu białka RUB1, FBP, SKP1 i kompleksu CSN/COP9, oraz ponownym przyłączeniu CAND1. Szczegóły w tekście. Na podstawie [22], zmodyfikowane

FIGURE 4. The structure and activity regulation of SCF-type E3 ligase. (A) Inactive ligase is composed of cullin (CUL1), RBX1 protein (together forming the core) and CAND1 protein which compete with SKP1 subunit for binding to cullin, but only if it is not combined with RUB1 protein; (B) The forming of functional ligase complex through the dissociation CAND1 protein as a result of joining CSN/COP9 complex, RUB1, SKP1, FBP proteins and the substrate, which subsequently is proteolytic degraded; (C) The active ligase with the main function of transferring the marker protein – ubiquitin (Ub) to the bound substrate which is designed for degradation by the 26S proteasome; (D) Inactivation of the ligase consisting in RUB1, FBP, SKP1 proteins and CSN/COP9 complex removal. After this the CAND1 protein is re-joined. Details in the text. According to [22], modified

### **Funkcje ligaz ubikwityny E3 typu SCF**

Główną funkcją ligaz jest rozpoznawanie i wiązanie białkowego substratu oraz przeniesienie na niego białka znacznikowego – ubikwityny. Przyłączenie ubikwityny do białka substratowego poprzedzone jest reakcją aktywacji ubikwityny katalizowaną przez enzym aktywujący E1. W pierwszym etapie dochodzi do utworzenia ubikwityloadenylationu, a następnie powstaje wysokoenergetyczne wiązanie tioestrowe pomiędzy ubikwityną a resztą cysteiny w centrum katalitycznym enzymu E1. Tak zaktywowana ubikwityna zostaje przeniesiona na resztę cysteiny w enzymie koniugującym E2, skąd ligaza E3 przenosi ją na białkowy substrat. Proces ten powtarzany jest kilkakrotnie, aż zostanie utworzony łańcuch poliubikwitynowy. Badania prowadzone na rzodkiewniku pokazały, że przy tworzeniu łańcucha poliubikwitynowego dołączanego do białek DELLA, główną funkcję pełni lizyna 29 ubikwityny. Wyznakowane polipeptydy są następnie degradowane w proteasomach 26S [17, 34].

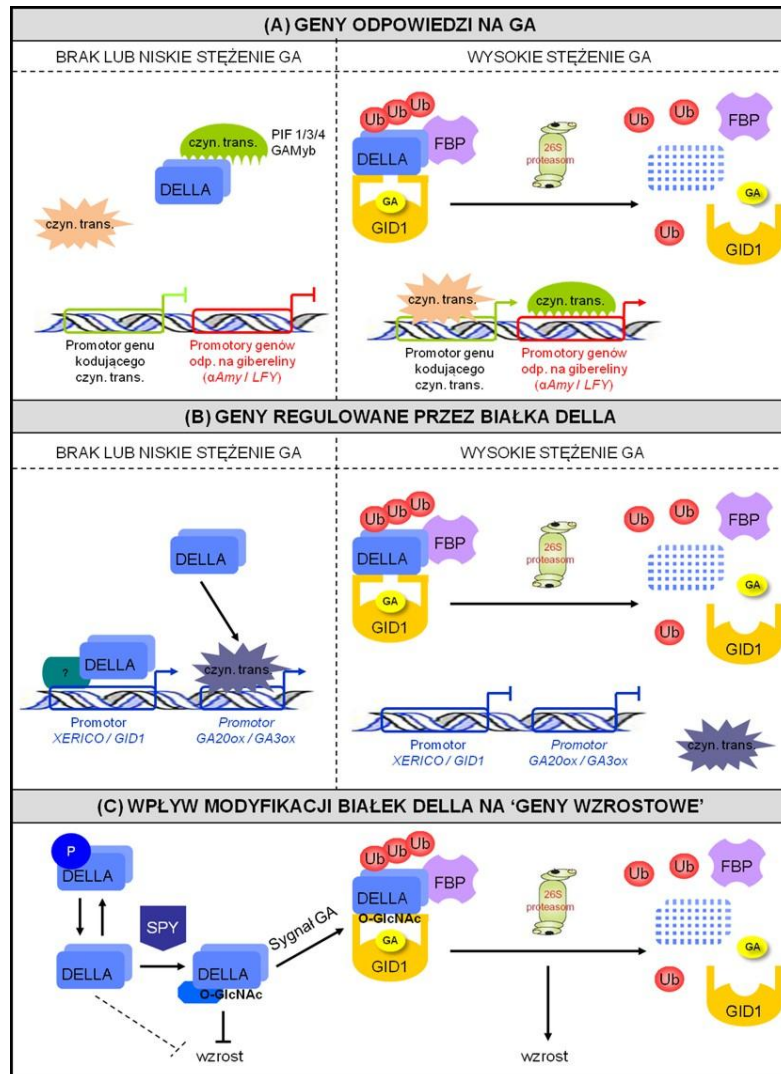
### **REGULACJA TRANSKRYPCJI GENÓW KODUJĄCYCH BIAŁKA ZAANGAŻOWANE W SZŁAK GIBERELINOWY**

Proteolityczna degradacja białek DELLA ma różne skutki. Najczęściej dochodzi do odblokowania określonych czynników transkrypcyjnych wpływających na ekspresję genów docelowych, których białkowe produkty pozytywnie regulują szlak giberelinowy (ryc. 5A). Innym następstwem degradacji represorów jest zahamowanie aktywności transkrypcyjnej genów bezpośrednio lub pośrednio regulowanych przez białka DELLA (ryc. 5B). Istotny jest również przypuszczalny wpływ potranslacyjnych modyfikacji białek DELLA na transkrypcję genów, które kodują białka związane głównie ze wzrostem roślin (ryc. 5C).

#### **Charakterystyka genów odpowiedzi na GA oraz czynników transkrypcyjnych regulujących ich ekspresję**

Przy braku lub bardzo małej ilości GA, pierwotne geny odpowiedzi na GA nie ulegają ekspresji z powodu braku czynników transkrypcyjnych, które w takich warunkach tworzą kompleks z białkami DELLA. Wzrost stężenia GA w komórkach aktywuje proteolityczną degradację białek DELLA, co prowadzi do uwolnienia wspomnianych czynników transkrypcyjnych i aktywacji genów (ryc. 5A) [10].

Wśród pierwotnych genów odpowiedzi na GA, najlepiej poznano te, które kodują enzymy hydrolityczne ( $\alpha$ -amylazy, proteazy, rybonukleazy,  $\beta$ -glukanazy) niezbędne do degradacji skrobi w komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków

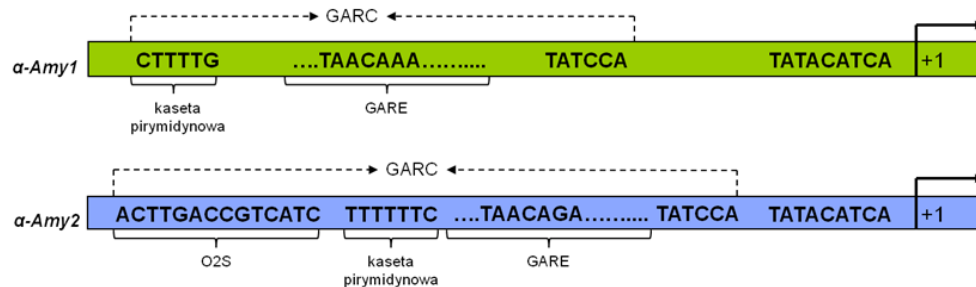


RYCINA 5. Udział białek DELLA w regulacji odpowiedzi na GA. (A) Przy braku lub niskim stężeniu GA, pierwotne geny odpowiedzi na hormon (np. *αAmy* / *LFY*) nie ulegają ekspresji z powodu braku czynników transkrypcyjnych (np. GAMyb, PIF 1/3/4), które w takich warunkach tworzą kompleks z białkami DELLA. Wzrost stężenia GA w komórkach aktywuje proteolityczną degradację białek DELLA w proteasomach 26S, co prowadzi do uwolnienia wspomnianych czynników transkrypcyjnych i aktywacji genów (wśród których znajdują się również geny kodujące czynniki transkrypcyjne); (B) Przy braku lub niskim stężeniu GA dochodzi do wzmożonej aktywności transkrypcyjnej genów bezpośrednio (*XERICO*, *GID1*) lub pośrednio (*GA20ox*, *GA3ox*) regulowanych przez białka DELLA. Wzrost stężenia GA w komórkach aktywuje proteolityczną degradację białek DELLA w proteasomach 26S, co prowadzi do zahamowania ekspresji wymienionych genów; (C) Hipotetyczny model przedstawiający wpływ potranslacyjnych modyfikacji białek DELLA na transkrypcję genów kodujących białka związane głównie ze wzrostem roślin.

Białka DELLA mogą być modyfikowane przez białka SPY tylko w momencie, gdy nie są one fosforylowane. Modyfikacje typu O-GlcNAc sprawiają, że białka DELLA hamują wzrost roślin. Z drugiej jednak strony, modyfikacje te powodują, że białka DELLA łączą się z kompleksem GA-GID1, a następnie z białkami FBP i ulegają degradacji w proteasomach 26S, co w dalszej konsekwencji pozytywnie wpływa na wzrost roślin. Szczegóły w tekście. Na podstawie [10], zmodyfikowane

FIGURE 5. Participation of DELLA proteins in GA response regulation. (A) During the absence or low concentration of GA, the primary hormone response genes (eg *aAmy* / *LFY*) are not expressed due to lack of transcription factors (eg GAMyb, PIF 1/3/4), which in these conditions form a complex with DELLA proteins. Increase of GA concentration in the cells activates the proteolytic degradation of DELLA proteins in the 26S proteasomes, which leads to the release of mentioned transcription factors and activation of genes (among which are the genes encoding transcription factors); (B) During the absence or low concentration of GA comes to increased transcriptional activity of genes which are directly (*XERICO*, *GID1*) or indirectly (*GA20ox*, *GA3ox*) regulated by DELLA proteins. Increase of GA concentration in the cells activates the proteolytic degradation of DELLA proteins in the 26S proteasomes, which leads to inhibition of these gene expression; (C) A hypothetical model showing the influence of post-translational modification of DELLA proteins on the transcription of genes encoding proteins involved in plant growth. DELLA proteins can be modified by the SPY proteins only if they are not phosphorylated. The O-GlcNAc type modifications make the DELLA proteins inhibit plant growth. On the other hand, these modifications make the DELLA proteins bind to the GA-GID1 complex and then to the F-box protein. This situation causes degradation of DELLA proteins in the 26S proteasomes, which in consequence has a positive effect on growth. Details in the text. According to [10], modified

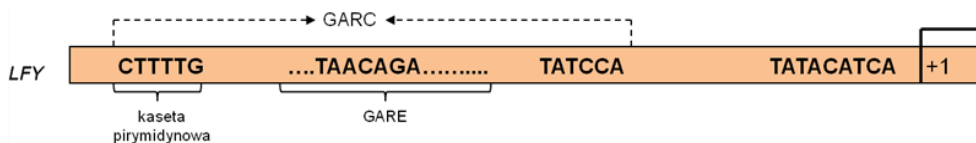
zboż. Postępy w klonowaniu genów  $\alpha$ -amylaz umożliwiły podział tej licznej i mocno zróżnicowanej rodziny na dwie klasy. Klasa A obejmuje podrodziny genów *Amy1* i *Amy2* ulegających ekspresji w komórkach aleuronowych jęczmienia i pszenicy oraz kodujących białka o wysokim ( $\alpha$ -*Amy1*) i niskim ( $\alpha$ -*Amy2*) punkcie izoelektrycznym. Z kolei klasa B obejmuje podrodzinę *Amy3*, a produkty tych genów są obecne w komórkach aleuronowych ryżu i rozwijających się ziarniakach pszenicy. Analizy sekwencji promotorowych w/w genów wykazały obecność trzech specyficznych motywów tworzących kompleks odpowiedzi giberelinowej GARC (ang. *gibberellin responsive complex*) (ryc. 6) [18]. W przypadku genów  $\alpha$ -*Amy1* fragment GARC, składający się z kasety pirymidynowej – CTTTTG, kasety TAACAAA i kasety TATCCA, jest wystarczający do hormonalnej regulacji ekspresji tego genu, która jest silnie indukowana przez GA, a hamowana przez ABA. Fragment obejmujący 21 zasad, w obrębie którego położona jest wysoce konserwowana sekwencja TAACAAA określany jest jako GARE (ang. *gibberellin responsive element*). W przypadku genów  $\alpha$ -*Amy2*, element GARE warunkuje transkrypcję genów tylko w obecności innego krótkiego fragmentu ACTTGACCGTCATC nazywanego O2S (ang. *opaque-2 similar*). Kaseta O2S jest jednym z dwóch lub kilku fragmentów tworzących tzw. elementy sprzęgające CE (ang. *coupling element*), które odgrywają istotną rolę w modyfikowaniu ekspresji genów indukowanych przez GA [37].



RYCINA 6. Sekwencje regulatorowe w promotorach genów  $\alpha Amy1$  i  $\alpha Amy2$  kodujących  $\alpha$ -amylazę w komórkach warstwy aleuronowej pszenicy. Na schematach zaznaczono również położenie kasety TATA oraz sekwencję CATCA w motywie inicjującym transkrypcję. Szczegóły w tekście. Na podstawie [18], zmodyfikowane

FIGURE 6. Regulatory sequences in the promoters of  $\alpha Amy1$  and  $\alpha Amy2$  genes encoding  $\alpha$ -amylase in the cells of the aleurone layer of wheat. On the schemes the TATA cassette and CATCA sequence in initiating transcription motif are marked. Details in the text. According to [18], modified

Do pierwotnych genów odpowiedzi na GA należą także geny związane z kwitnieniem – *SOC1* (ang. *suppressor of overexpression of constans 1*) i *LFY* (ang. *leafy*). Analiza strukturalna genu *LFY* ujawniła w jego promotorze typowy element odpowiedzi na GA – GARE o sekwencji TAACAGA, jak również kasety CTTTTG i TATCCA, które razem tworzą kompleks odpowiedzi giberelinowej GARC (ryc. 7). GA regulują również częściowo aktywność transkrypcyjną genu *SOC1*, jednak do tej pory nie wyjaśniono molekularnego mechanizmu tego procesu. Wiadomo jednak, że białkowy produkt genu *SOC1* wiąże się bezpośrednio do promotora genu *LFY*, stąd przyjmuje się, że GA regulują aktywność transkrypcyjną genu *LFY* w szlaku zależnym i niezależnym od *SOC1*. Białkowe produkty zarówno genu *LFY*, jak i *SOC1* indukują ekspresję kolejnych genów zaangażowanych bezpośrednio w rozwój kwiatu – *AP1*, *AP2*, *AP3* (ang. *apetal1/2/3*), *PI* (ang. *pistillata*) i *AG* (ang. *agamous*) [20].



RYCINA 7. Sekwencja regulatorowa w promotorze genu *LFY* kodującego białko LFY w merystemie wierzchołkowym pędu. Na schemacie zaznaczono również położenie kasety TATA oraz sekwencję CATCA w motywie inicjującym transkrypcję. Szczegóły w tekście. Na podstawie [18], zmodyfikowane

FIGURE 7. Regulatory sequence in the promoter of the *LFY* gene encoding the LFY protein in the shoot apical meristem. On the scheme the TATA cassette and CATCA sequence in initiating transcription motif are marked. Details in the text. According to [18], modified

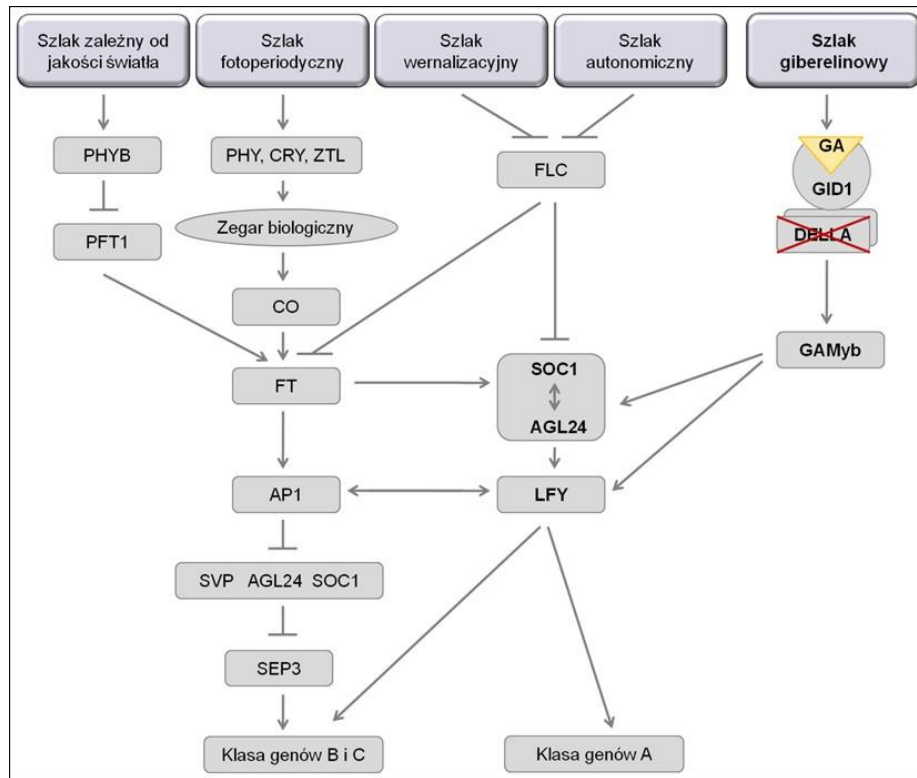
Poznanie sekwencji promotorowych genów odpowiedzi na GA ułatwiło poszukiwanie białek regulatorowych wiążących się z kompleksem GARC. Najlepiej scharakteryzowanymi białkami aktywującymi ekspresję zarówno genów enzymów amylolitycznych w komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż, jak i genów związanych z powstawaniem i rozwojem kwiatów u zbóż i rzodkiewnika są czynniki transkrypcyjne GAMyb. Zostały one po raz pierwszy zidentyfikowane i opisane u rośliny jednoliściennej – jęczmienia (*Hordeum vulgare*), a ich wspólną cechą jest obecność charakterystycznej domeny DBD (ang. *DNA binding domain*), złożonej z dwóch fragmentów R2 i R3. W obrębie każdego fragmentu zawarte są trzy motywy tworzące helisy, z których po dwie z każdego fragmentu uczestniczą w rozpoznawaniu sekwencji GARE. Białka GAMyb zawierają również trzy kasety o silnie zachowanych sekwencjach nazwane BOX1, BOX2 i BOX3. Przypuszczalnym sposobem regulacji mechanizmów funkcjonowania białek GAMyb jest ich fosforylacja, a badania z wykorzystaniem Y2H pokazały, że odbywa się to z udziałem kinaz serynowo-treoninowych – KGM. Zwiększona ilość KGM blokuje aktywność białek HvGAMyb przez co nie wiążą się one do sekwencji promotorowej genu  $\alpha$ -Amy1 u jęczmienia. Białka KGM pełnią więc funkcje represorowe [7].

Wszystkie białka typu Myb, kodowane są u rzodkiewnika przez 198 genów *Myb*, ale ekspresja tylko trzech z nich – *Myb33*, *Myb65* i *Myb101* – promowana jest przez GA. Białkowe produkty tych genów wpływając na ekspresję genów *SOC1* i *LFY* regulują czas kwitnienia [44]. Oprócz szlaku giberelinowego istotny wpływ na proces kwitnienia wywierają również takie szlaki jak: fotoperiodyczny, zależny od jakości światła, wernalizacyjny i autonomiczny, a ich zintegrowanie zapewnia pełny sukces rozrodczy rośliny (ryc. 8) [20].

Oprócz GAMyb, z regulacją aktywności transkrypcyjnej genów enzymów hydrolitycznych związane są także białka HRT (ang. *hordeum repressor of transcription*), ABF1, ABF2 oraz DOF. Zbudowane z 548 aminokwasów białka HRT, w odróżnieniu od białek GAMyb, pełnią funkcję represorową w wyniku wiązania się do sekwencji GARE w warunkach braku lub bardzo niskiego stężenia GA. Z kolei białka ABF1 (389 aa) i ABF2 (349 aa) zawierają pojedynczy lub podwójny motyw palców cynkowych, za pomocą których wiążą się do motywu O2S obecnego w promotorach genów  $\alpha$ -Amy2 komórek aleuronowych owsa [18, 28]. Do tej pory, mało jest jednak wiadomo na temat pełnionych przez nie funkcji i sposobów regulacji aktywności transkrypcyjnej genów. Wśród białek DOF wyróżniamy m. in. znajdujące się w komórkach warstwy aleuronowej kielkujących nasion jęczmienia białka BPBF, które wiążą się z kasetą pirymidynową promotorów genów  $\alpha$ -Amy2, co prowadzi do zahamowania transkrypcji tych genów. W przeciwieństwie do białek BPBF, blisko spokrewnione białko SAD funkcjonują jako aktywatory transkrypcji genów kodujących enzymy hydrolityczne, co prowadzi z kolei do wzmożonej ich ekspresji [48]. Do chwili obecnej nie zostało zidentyfikowane białko, które mogłoby wiązać się z motywem zawierającym sekwencję TATCCA, dlatego całościowe poznanie

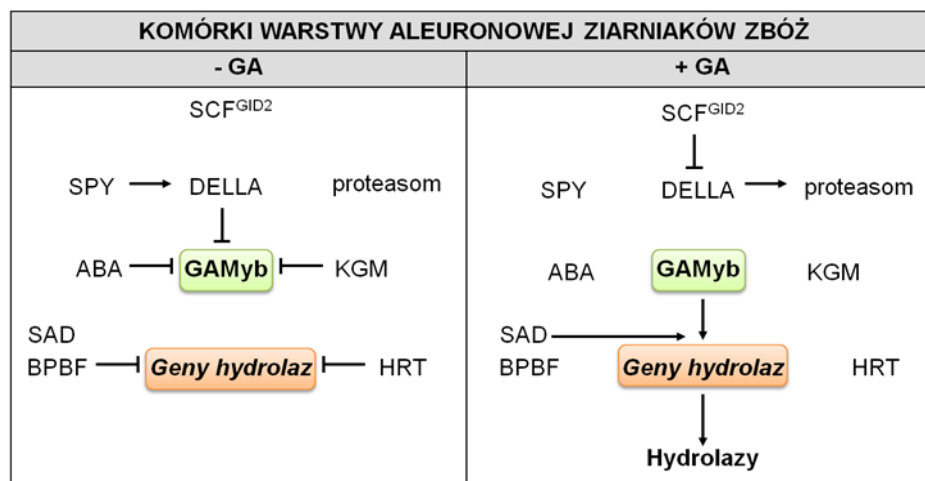


złożonego kompleksu regulującego aktywność genów enzymów hydrolitycznych wymaga dalszych badań. Na podstawie zebranych powyżej informacji można stworzyć ogólny model transdukcji sygnału giberelinowego w komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż (ryc. 9).



RYCINA 8. Pięć podstawowych szlaków prowadzących do indukcji kwitnienia u rzodkiewnika. Szlaki te wspólnie modulują ekspresję tzw. genów integratorowych *FT* (ang. *flowering locus T*) i *SOC1* (ang. *suppressor of overexpression of constans 1*) determinujących w dalszej kolejności wzorzec różnicowania wierzchołka wzrostu pędu. Szlak wernalizacyjny i autonomiczny regulują aktywność transkrypcyjną genu *FLC* (ang. *flowering locus C*), którego białkowy produkt uznawany jest za główny represor kwitnienia u tej rośliny. *PHYB* (ang. *phytochrome B*), *PFT1* (ang. *phytochrome and flowering time 1*), *CRY* (ang. *cryptochrome*), *ZTL* (ang. *zeitlupe*), *CO* (ang. *constans*), *AP1* (ang. *apetala 1*), *SVP* (ang. *short vegetative phase*), *AGL24* (ang. *agamous-like 24*), *SEP3* (ang. *sepatala 3*). Na podstawie [20], zmodyfikowane

FIGURE 8. The five basic pathways leading to the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*. These pathways modulate the expression of integrator genes like *FT* (*flowering locus T*) and *SOC1* (*suppressor of overexpression of constans 1*), which subsequently determine the pattern of differentiation of the shoot apex growth. The vernalization and autonomous pathway regulate the transcriptional activity of the *FLC* (*flowering locus C*) gene, whose protein product is considered to be the main repressor of flowering in this plant. *PHYB* (*phytochrome B*), *PFT1* (*phytochrome and flowering time 1*), *CRY* (*cryptochrome*), *ZTL* (*zeitlupe*), *CO* (*constant*), *AP1* (*apetala 1*), *SVP* (*short vegetative phase*), *AGL24* (*agamous-like 24*), *SEP3* (*sepatala 3*). According to [20], modified

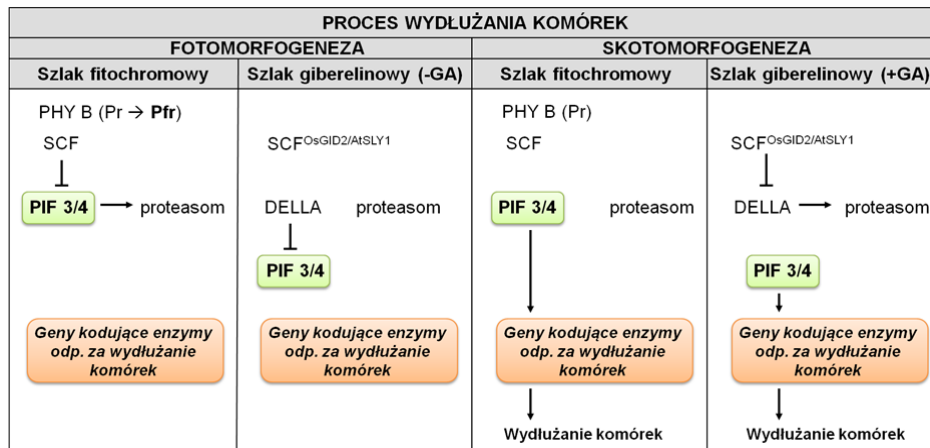


RYCINA 9. Model transdukcji sygnału giberelinowego w komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż. Brak lub niskie stężenie GA powoduje unieczynnienie czynników transkrypcyjnych GAMyb, co skutkuje brakiem aktywności transkrypcyjnej genów kodujących hydrolazy odpowiedzialne za degradację skrobi zmagazynowanej w bielmie. W sytuacji wysokiego stężenia GA dochodzi do proteolitycznej degradacji białek DELLA w proteasomach 26S, co prowadzi do odblokowania wspomnianych czynników transkrypcyjnych i w rezultacie pozytywnej regulacji genów hydrolaz. Szczegóły w tekście. Na podstawie [18, 35, 43], zmodyfikowane

FIGURE 9. The model of gibberellin signal transduction in aleurone layer cells of the cereal grain. The absence or low concentration of GA causes inactivation of GAMyb transcription factors, resulting in a lack of transcriptional activity of genes encoding hydrolases responsible for degradation of starch stored in the endosperm. In the case of high concentration of GA, proteolytic degradation of DELLA proteins in the 26S proteasomes is done, which leads to unlocking mentioned transcription factors and positive regulation of hydrolases genes. Details in the text. According to [18, 35, 43], modified

Innymi białkami aktywującymi ekspresję pierwotnych genów odpowiedzi na GA są białka PIF (ang. *phytochrome interacting factors*) należące do rodziny czynników transkrypcyjnych negatywnie regulujących różne aspekty zależnego od światła rozwoju siewek [6, 8]. Białka PIF hamują kiełkowanie nasion [27], stymulują wydłużanie hypokotyła [26] oraz kontrolują biosyntezę chlorofilu [10]. Posiadają one trzy konserwowane domeny: domenę APB za pomocą której mogą oddziaływać z fitochromem, domenę DBD za pomocą której mogą oddziaływać z DNA i domenę bHLH, która bierze udział w interakcjach białko-białko. Po raz pierwszy białka PIF zostały zidentyfikowane jako elementy szlaku sygnałowego fitochromu B (ryc. 10). W ciemności wiążą się one z sekwencją G (ang. *G-box*) znajdującą się w promotorach genów kodujących białka związane ze wzrostem siewek. Przekształcenie na świetle fitochromu do aktywnej formy P<sub>fr</sub> powoduje jego transport do jądra i połączenie z białkami PIF (m. in. PIF3 i PIF4) [2]. Wywołuje to szybką degradację tych białek w proteasomach i w rezultacie zahamowanie transkrypcji kontrolowanych przez nie genów [26, 30]. Pod

nieobecność GA białka DELLA wiążą się z białkami PIF (PIF3, 4, 5), przeciwdziałając wiązaniu do DNA. Przy braku światła dochodzi do wzrostu zawartości GA w komórkach, co pociąga za sobą aktywację proteolitycznej degradacji białek DELLA, a tym samym uwolnienie białek PIF i aktywowanie procesów etiolowanego wzrostu siewek [6, 8, 29].



RYCINA 10. Transdukcja sygnału fitochromowego i giberelinowego w procesach foto- i skotomorfogenezy. SZLAK FITOCHROMOWY – w ciemności (skotomorfogeneza) białka PIF 3/4 wiążą się z promotorami genów kodujących enzymy odpowiedzialne za wydłużanie komórek, co wiąże się ze wzrostem siewek. Na świetle (fotomorfogeneza) dochodzi do szybkiej degradacji białek PIF 3/4 w proteasomach 26S i w rezultacie ekspresja kontrolowanych przez nie genów zostaje zahamowana. SZLAK GIBERELINOWY – w warunkach braku lub niskiego stężenia GA (fotomorfogeneza) białka DELLA wiążą się z białkami PIF 3/4 przeciwdziałając wiązaniu do DNA. Przy braku światła (skotomorfogeneza) ilość aktywnych cząsteczek GA w komórkach jest zwiększona, co pociąga za sobą aktywację proteolitycznej degradacji białek DELLA, a tym samym uwolnienie białek PIF 3/4 i aktywowanie procesów etiolowanego wzrostu siewek. Szczegóły w tekście. Na podstawie [19], zmodyfikowane

FIGURE 10. Phytochrome and gibberellin signal transduction in photo- and skotomorphogenesis. PHYTOCHROME PATHWAY – in the darkness (skotomorphogenesis) PIF 3/4 proteins are associated with the promoters of genes encoding enzymes responsible for cell elongation connected with an increase of seedlings. In light (photomorphogenesis) is investigated a rapid degradation of PIF 3/4 proteins in 26S proteasomes and consequently the expression in 26S proteasomes and consequently the expression of genes controlled by them is inhibited. GIBBERELLIN PATHWAY – during the absence or low concentrations of GA (photomorphogenesis) DELLA proteins bind to PIF 3/4 proteins preventing binding to DNA. In the absence of light (skotomorphogenesis) the number of active GA in the cells is increased, which involves the activation of proteolytic degradation of DELLA proteins, thereby releasing PIF 3/4 proteins and activation processes connected with etiolated growth of seedlings. Details in the text. According to [19], modified

### Geny regulowane przez białka DELLA

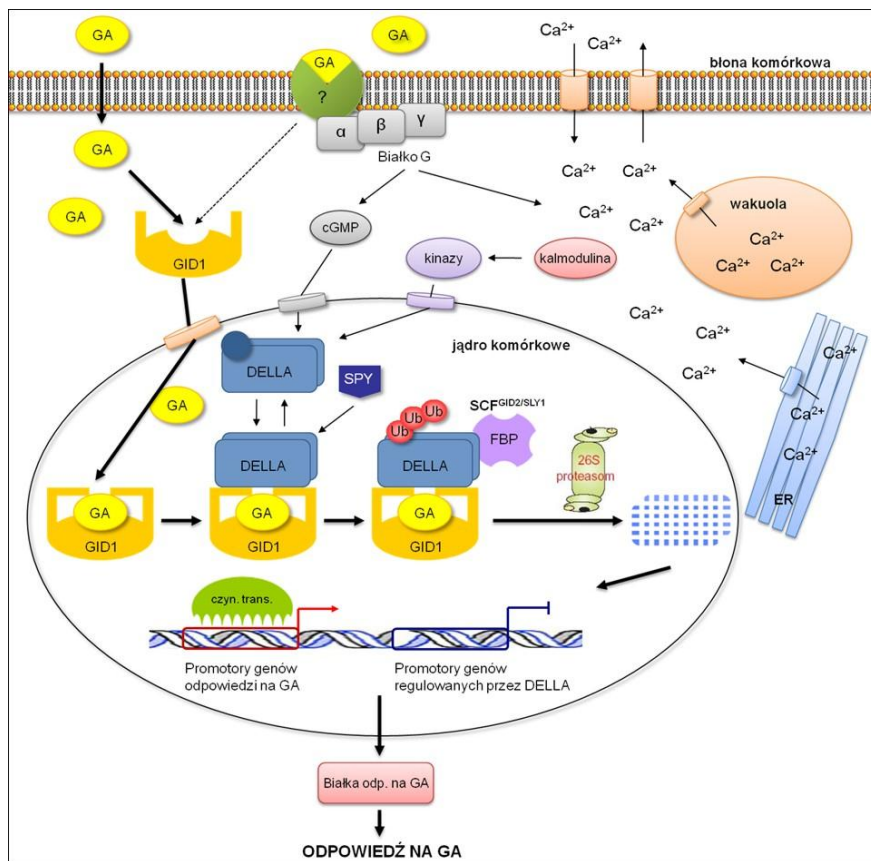
Do tej pory nie zidentyfikowano w białkach DELLA typowej domeny bogatej w aminokwasy zasadowe (bZIP) za pomocą której mogłyby bezpośrednio oddziaływać z DNA. Wydaje się jednak, że białka te mogą regulować transkrypcję genów, tak jak inne białka z rodziny GRAS, np. SHR lub SCR. W przypadku braku GA białka DELLA są stabilne i zachowują się jak aktywatory transkrypcji (ryc. 5B). Wśród genów aktywowanych przez białka DELLA można wyróżnić geny *XERICO*, których białkowe produkty związane są z akumulacją kwasu abscysynowego (ABA, ang. *abscisic acid*) [16, 47]. Do zahamowania ich aktywności prowadzi aktywowana GA proteolityczna degradacja białek DELLA. Wśród pierwotnych genów bezpośrednio regulowanych przez białka DELLA znajdują się także geny kodujące wewnątrzkomórkowy receptor GA – *GID1*, natomiast wśród wtórnych genów regulowanych pośrednio można wymienić geny kodujące enzymy metabolizmu GA – *GA20ox*, *GA3ox* i *GA2ox*. Aktywacja i inaktywacja tych genów z udziałem białek DELLA jest elementem mechanizmu kontrolującego homeostazę GA [47].

### PODSUMOWANIE

Wyniki badań prowadzonych na wielu gatunkach roślin pokazały, że szybka degradacja białek DELLA z udziałem ligaz ubikwitynowo-białkowych jest uniwersalnym sposobem funkcjonowania GA. Na rycinie 11 przedstawiono ogólny mechanizm działania cząsteczek hormonu. GA w formie niezdysocjowanej mogą wnikać do wnętrza komórki, bowiem błona komórkowa nie stanowi dla nich poważniejszej bariery ograniczającej dyfuzję. Doświadczenia prowadzone przede wszystkim na komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż w latach 90. ubiegłego stulecia potwierdzają istnienie receptora GA zlokalizowanego na powierzchni plazmolemy [13, 18]. Mimo że dotychczas nie udało się go zidentyfikować, to nie odrzuca się udziału w szlaku transdukcji sygnału giberelinowego takich przekaźników jak: heterotrimeryczne białka G, jony wapnia, kalmodulina, cGMP czy kinazy i fosfatazy białkowe. Przełomowym momentem okazało się jednak odkrycie w 2005 roku wewnątrzkomórkowego receptora *GID1* [38]. Wzrost stężenia bioaktywnych GA w komórkach powoduje powstanie kompleksu GA-*GID1*. Interakcje pomiędzy tymi białkami mające miejsce w specjalnej kieszeni receptora *GID1* zachodzą w wyniku oddziaływań hydrofilowych (bezpośrednie wiązania wodorowe lub pośrednie za pomocą cząsteczek wody), hydrofobowych i van der Waalsa. Skutkuje to swoistego rodzaju zamknięciem wieżka, co z kolei umożliwia przyłączenie jednego z białek DELLA za pomocą N-końcowych, silnie konserwowanych motywów DELLA i TVHYNP [9, 42]. Utworzenie kompleksu GA-*GID1*-DELLA powoduje zmianę konformacji ostatnio wymienionych białek, co ułatwia oddziaływanie z FBP

(AtSLY1/AtSNE/OsGID2) za pomocą C-końcowej domeny GRAS znajdującej się w białku DELLA oraz C-końcowej domeny LSL znajdującej się w białku FBP. Ostatecznie do białek DELLA zostaje dołączony łańcuch poliubikwitynowy, który jest sygnałem do ich degradacji w proteasomach 26S. Cały cykl zdarzeń prowadzi do uwolnienia określonych czynników transkrypcyjnych, które aktywują bądź hamują geny docelowe [10].

W ciągu ostatniego czasu dokonano znacznego postępu w zrozumieniu sposobu percepcji i transdukcji sygnału giberelinowego w komórkach roślinnych, do czego niewątpliwie przyczynił się rozwój technik biologii molekularnej. Mimo tak spektakularnych osiągnięć wydaje się, że kolejne lata będą nadal przynosić nowe informacje, nie tylko odnośnie gatunków modelowych, ale także innych roślin naczyniowych.



RYCINA 11. Ogólny model funkcjonowania GA w komórkach roślinnych. Szczegóły w tekście. Na podstawie [11, 18, 41], zmodyfikowane

FIGURE 11. A general model of GA function in plant cells. Details in the text. According to [11, 18, 41], modified

## LITERATURA

- [1] ALEMAN L, KITAMURA J, ABDEL-MAGEED H, LEE J, SUN Y, NAKAJIMA M, UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M, ALLEN RD. Functional analysis of cotton orthologs of GA signal transduction factors GID1 and SLR1. *Plant Mol Biol* 2008; **68**: 1–16.
- [2] AL-SADY B, NI W, KIRCHER S, SCHAFER E, QUAIL PH. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 2006; **23**: 439–446.
- [3] ARIIZUMI T, STEBER C. Ubiquitin becomes ubiquitous in GA signaling. *Plant Physiol* 2006; Fourth Edition on Line Chapter 20: Essay 20.3.
- [4] CHANDLER PM, HARDING CA, ASHTON AR, MULCAIR MD, DIXON NE, MANDER LN. Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Plant* 2008; **1**: 285–294.
- [5] DAVIERE JM, DE LUCAS M, PRAT S. Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Curr Opin Genet Dev* 2008; **18**: 295–303.
- [6] de LUCAS M, DAVIERE JM, RODRIGUEZ-FALCON M, PONTIN M, IGLESIAS-PEDRAZ JM, LORRAIN S, FANKHAUSER C, BLAZQUEZ MA, TITARENKO E, PRAT S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 2008; **451**: 480–484.
- [7] FAN LM, FENG XY, WANG Y, DENG XW. Gibberellin signal transduction in rice. *J Integr Plant Biol* 2007; **49**: 731–741.
- [8] FENG S, MARTINEZ C, GUSMAROLI G, WANG Y, ZHOU J, WANG F, CHEN L, YU L, IGLESIAS-PEDRAZ JM, KIRCHER S, SCHÄFER E, FU X, FAN LM, DENG XW. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 2008; **451**: 475–479.
- [9] GRIFFITHS J, MURASE K, RIEU I, ZENTELLA R, ZHANG ZL, POWERS SJ, GONG F, PHILLIPS AL, HEDDEN P, SUN TP, THOMAS SG. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; **18**: 3399–3414.
- [10] HARTWECK LM. Gibberellin signaling. *Planta* 2008; **229**: 1–13.
- [11] HIRANO K, NAKAJIMA M, ASANO K, NISHIYAMA T, SAKAKIBARA H, KOJIMA M, KATO H, XIANG H, TANAHASHI T, HASEBE M, BANKS JA, ASHIKARI M, KITANO H, UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M. The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the Lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 2007; **19**: 3058–3079.
- [12] HO MS, OU C, CHAN Y, CHIEN C-T, PI H. The utility F-box for protein destruction. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 1977–2000.
- [13] HOOLEY R. Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1529–1555.
- [14] HOTTON SK, CALLIS J. Regulation of cullin RING ligases. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 467–489.
- [15] IUCHI S, SUZUKI H, KIM YC, IUCHI A, KUROMORI T, UEGUCHI-TANAKA M, ASAMI T, YAMAGUCHI I, MATSUOKA M, KOBAYASHI M, NAKAJIMA M. Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J* 2007; **50**: 958–966.
- [16] KO JH, YANG SH, HAN KH. Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, *XERICO*, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant J* 2006; **47**: 343–355.
- [17] KOWALCZYK S, HADOWSKA E, PIEKARSKA A. Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach, kluczowymi elementami hormonalnych szlaków sygnałowych. *Post Biochem* 2005; **51**: 171–187.
- [18] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Gibereliny – percepcja i transdukcja sygnału. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 397–423.
- [19] LAU OS, DENG XW. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol* 2010; **13**: 571–577.
- [20] LEE J, LEE I. Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *J Exp Bot* 2010; **61**: 2247–2254.
- [21] LUO A, QIAN Q, YIN H, LIU X, YIN C, LAN Y, TANG J, TANG Z, CAO S, WANG X, XIA K, FU X, LUO D, CHU C. EU11, encoding a putative cytochrome P450 monooxygenase, regulates internode elongation by modulating gibberellin responses in rice. *Plant Cell Physiol* 2006; **47**: 181–191.



- [22] 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; **2**: 409–432.
- [23] MAURIAT M, MORITZ T. Analyses of GA20ox- and GID1-overexpressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *Plant J* 2009; **58**: 989–1003.
- [24] NAKAJIMA M, SHIMADA A, TAKASHI Y, KIM YC, PARK SH, UEGUCHI-TANAKA M, SUZUKI H, KATOH E, IUCHI S, KOBAYASHI M, MAEDA T, MATSUOKA M, YAMAGUCHI I. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* 2006; **46**: 880–889.
- [25] NANDI D, TAHILLANI P, KUMAR A, CHANDU D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 2006; **31**: 137–155.
- [26] NOZUE K, COVINGTON MF, DUEK PD, LORRAIN S, FRANKHAUSER C, HARMER SL, MALOOF JN. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 2007; **448**: 358–361.
- [27] OH E, YAMAGUCHI S, HU J, YUSUKE J, JUNG B, PAIK I, LEE HS, SUN TP, KAMIYA Y, CHOI G. PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GAI* and *RGA* promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 2007; **19**: 1192–1208.
- [28] RUSHTON PJ, SOMSSICH IE, RINGLER P, SHEN QJ. WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 2010; **15**: 247–258.
- [29] SCHWECHHEIMER C, WILLIGE BC. Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* 2009; **12**: 57–62.
- [30] SHEN Y, KHANNA R, CARLE CM, QUAIL PH. Phytochrome induces rapid PIF phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol* 2007; **145**: 1043–1051.
- [31] SHIMADA A, UEGUCHI-TANAKA M, NAKATSU T, NAKAJIMA M, NAOE Y, OHMIYA H, KATO H, MATSUOKA M. Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 2008; **456**: 520–523.
- [32] SHIMADA A, UEGUCHI-TANAKA M, SAKAMOTO T, FUJIOKA S, TAKATSUTO S, YOSHIDA S, SAZUKA T, ASHIKARI M, MATSUOKA M. The rice *SPINDLY* gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. *Plant J* 2006; **48**: 390–402.
- [33] SILVERSTONE AL, TSENG TS, SWAIN SM, DILL A, JEONG SY, OLSZEWSKI NE, SUN TP. Functional analysis of *SPINDLY* in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2007; **143**: 987–1000.
- [34] STONE SL, CALLIS J. Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 624–632.
- [35] SUN TP. Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in *Arabidopsis*. [W:] *The Arabidopsis Book* 2008. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- [36] SUZUKI H, PARK SH, OKUBO K, KITAMURA J, UEGUCHI-TANAKA M, IUCHI S, KATOH E, KOBAYASHI M, YAMAGUCHI I, MATSUOKA M, ASAMI T, NAKAJIMA M. Differential expression and affinities of *Arabidopsis* gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *Plant J* 2009; **60**: 48–55.
- [37] TSUJI H, AYA K, UEGUCHI-TANAKA M, SHIMADA Y, NAKAZONO M, WATANABE R, NISHIZAWA NK, GOMI K, SHIMADA A, KITANO H, ASHIKARI M, MATSUOKA M. GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J* 2006; **47**: 427–444.
- [38] UEGUCHI-TANAKA M, ASHIKARI M, NAKAJIMA M, ITOH H, KATOH E, KOBAYASHI M, CHOW TY, HSING YI, KITANO H, YAMAGUCHI I, MATSUOKA M. Gibberellin Insensitive Dwarf1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 2005; **437**: 693–698.
- [39] UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M. The perception of gibberellins: clues from receptor structure. *Curr Opin Plant Biol* 2010; **13**: 503–508.
- [40] UEGUCHI-TANAKA M, NAKAJIMA M, MOTOYUKI A, MATSUOKA M. Gibberellin receptor and its role in gibberellins signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007a; **58**: 183–198.
- [41] UEGUCHI-TANAKA M, NAKAJIMA M, KATOH E, OHMIYA H, ASANO K, SAJI S, HONGYU X, ASHIKARI M, KITANO H, YAMAGUCHI I, MATSUOKA M. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* 2007b; **19**: 2140–2155.

- [42] WILLIGE BC, GHOSH S, NILL C, ZOURELIDOU M, DOHMANN EMN, MAIER A, SCHWECHHEIMER C. The DELLA domain of GA Insensitive mediates the interaction with the GA Insensitive Dwarf1 a gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 1209–1220.
- [43] YAMAGUCHI S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 225–251.
- [44] YANHUI C, XIAOYUAN Y, KUN H, MEIHUA L, JIGANG L, ZHAOFENG G, ZHIQIANG L, YUNFEI Z, XIAOXIAO W, XIAOMING Q, YUNPING S, LI Z, XIAOHUI D, JINGCHU L, XINGWANG D, ZHANGLIANG C, HONGYA G, LI-JIA Q. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* 2006; **60**: 107–124.
- [45] YASUMURA Y, CRUMPTON-TAYLOR M, FUENTES S, HARBERD NP. Step by step acquisition of the gibberellin-DELLA growth regulatory mechanism during land-plant evolution. *Curr Biol* 2007; **17**: 1225–1230.
- [46] YU H, WU J, XU N, PENG M. Roles of F-box proteins in plant hormone responses. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007; **39**: 915–922.
- [47] ZENTELLA R, ZHANG ZL, PARK M, THOMAS SG, ENDO A, MURASE K, FLEET CM, JIKUMARU Y, NAMBARA E, KAMIYA Y, SUN TP. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellins signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 3037–3057.
- [48] ZOU X, NEUMAN D, SHEN Q. Interactions of two transcriptional repressors and two transcriptional activators in modulating gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant Physiol* 2008; **148**: 176–186.

*Redaktor prowadzący – Andrzej K. Kononowicz*

*Otrzymano: 31.07.2011*

*Przyjęto: 03.12.2011*

*Katarzyna Marciniak*

*Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii*

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika*

*ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń*

*tel.: (56) 611-44-56*

*e-mail:kasia\_swiniarska@o2.pl*