

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY  
V PRAZE  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Brassinosteroidy jako regulátory buněčných dějů u rostlin**

Radka Kuklíková

Školitel: RNDr. Olga Rothová

**2007/2008**

Děkuji Dr. Olze Rothové za pomoc, rady a opravy této práce, za laskavý přístup a trpělivost.

Dr. Daně Holé děkuji za opravu anglického abstraktu.

Lence Fridrichové děkuji za všeobecnou pomoc, rady a podporu.

Své matce děkuji za opravu překlepů a otci za zapůjčení notebooku, tiskárny a svázání práce.

## **Abstrakt**

Brassinosteroidy jsou relativně novou skupinou rostlinných hormonů. Jedná se o steroidní látky, které se účastní regulace růstu a vývoje rostlin a také reakcí na stresové faktory. Působí na mnoho buněčných dějů jako je buněčné dělení, elongace a diferenciaci buněk, růst pylové láčky, udržení apikální dominance a další. Vyskytují se ve všech rostlinných orgánech, nejvíce v pylu, semenech a mladých částech rostliny.

Brassinosteroidy fungují jako ligandy pro transmembránové receptorové kinázy. Aktivací těchto kináz spouštějí signalizační kaskádu uvnitř buňky. Dochází k přenosu signálu do jádra a regulaci genové exprese. Takto regulují i vlastní biosyntézu.

Studium jejich syntézy i působení probíhá na mutantních rostlinách, u nichž je poškozen určitý gen a tím přerušena biosyntéza či signální dráha v kroku, na který má tento gen vliv.

Cílem této práce je podat stručný souhrn současných znalostí o mechanismu biosyntézy a působení brassinosteroidů, genech a proteinech, které se účastní biosyntézy brassinosteroidů a jejich funkce.

## **Abstract**

Brassinosteroids are a relatively new group of plant hormones. These steroids control many aspects of plant growth and development and they also regulate plant response to stress. They regulate cell division, expansion and differentiation, growth of pollen tube, apical dominance, *etc.* They are found throughout whole plant kingdom, particularly in pollen, seeds and young vegetative tissues.

Brassinosteroids are ligands for transmembrane receptor kinases. Activation of these kinases leads to the initiation of signaling cascade inside the cell. The signal is transferred to nucleus where it regulates gene expression. They also regulate their biosynthesis in this way.

Study of their biosynthesis and functions is made on mutants with defect in a particular gene. Their biosynthesis or signaling cascade are blocked in the step influenced by this gene.

The aim of this review is to present the recent knowledge about the mechanism of biosynthesis and activity of brassinosteroids, genes and proteins participating in their biosynthesis and function.

**Klíčová slova:** brassinosteroidy, biosyntéza, signalizace, regulace genové exprese, mutanty, geny

**Key words:** brassinosteroids, biosynthesis, signaling, regulation of the gene expression, mutants, genes

## Obsah:

Seznam zkratek .....	5
1. Úvod .....	7
2. Chemická struktura přírodních brassinosteroidů .....	7
3. Výskyt přírodních brassinosteroidů .....	10
4. Biosyntéza brassinosteroidů .....	10
4.1. Biosyntéza campesterolu .....	10
4.2. Konverze campesterolu na campestanol .....	10
4.3. C6-oxidace .....	11
4.3.1. Časná C6-oxidace .....	11
4.3.2. Pozdní C6-oxidace .....	12
4.4. Syntéza brassinolidu z castasteronu .....	12
5. Biosyntéza – geny a mutanty .....	15
5.1. Geny <i>deetiolated2 (det2)</i> a <i>lk</i> .....	15
5.2. Geny <i>constitutive photomorphogenesis and dwarfism (cpd)</i> a <i>dwarf (dwf)</i> .....	16
5.3. <i>Dwarf1 (dwf1)</i> , <i>diminuto (dim)</i> a <i>lkb</i> .....	16
6. Signalizace .....	17
6.1. Základní proteiny signální dráhy .....	17
6.1.1. BR-insensitive 1 receptor (BRI1) .....	17
6.1.2. BRI1-associated receptor kinase 1 (BAK1) .....	18
6.1.3. BAK1-like1 (BKK1) .....	19
6.1.4. BR-insensitive 2 (BIN2) .....	19
6.1.5. BRI1-EMS-suppressor 1 (BES1) a brassinazole-resistant 1 (BZR1) .....	19
6.2. Regulační proteiny .....	20
6.2.1. transthyretin like protein (TTL) .....	20
6.2.2. BRI1-suppressor 1 (BRS1) .....	21
6.2.3. BRI1 kinase inhibitor (BKI1) .....	21
6.2.4. BRI1 suppressor 1 fosfatáza (BSU1) .....	22
6.2.5. <i>Bri1-5 enhanced (BEN1)</i> .....	22
6.3. Přenos signálu .....	22
6.3.1. BRI1-BAK1 dimerizace .....	23
6.3.2. Recyklace BRI1 a BAK1 .....	24
6.3.3. Fosforylační místa a ligandy BRI1 .....	25
6.3.4. Regulace genové exprese pomocí BES1 a BZR1 .....	25
6.4. Regulace přenosu signálu .....	27
7. Signalizace - geny a mutanty .....	27
7.1. Geny brassinosteroid insensitive 1 ( <i>bri1</i> ), <i>curl (cu)</i> a <i>lka</i> .....	27
7.2. Gen BRI1-associated receptor kinase 1 ( <i>bak1</i> ) .....	28
7.3. Gen BAK1-like1 ( <i>bkk1</i> ) .....	28
7.4. Gen brassinosteroid-insensitive2 ( <i>bin2</i> ) .....	28
7.5. Brassinazole-resistant 1 ( <i>bzr1</i> ) .....	29
7.6. Gen BRI1-EMS-suppressor 1 ( <i>bes1</i> ) .....	28
7.7. Gen transthyretin like protein ( <i>tll</i> ) .....	29
7.8. Gen BRI1-suppressor 1 ( <i>brs1</i> ) .....	29
7.9. Gen BRI1 suppressor 1 ( <i>bsu1</i> ) .....	30
7.10. Gen <i>bri1-5 enhanced (ben1)</i> .....	30
8. Závěr .....	31
9. Seznam použité literatury .....	32

## Seznam zkratek

3-dehydro-6-deoxoTE .....	3-dehydro-6-deoxoteasteron
3-dehydroTE.....	3-dehydroteasteron
3-epiCS.....	3-epicastasteron
6 $\alpha$ -hydroxyCS .....	6 $\alpha$ -hydroxycastasteron
6-deoxoCT.....	cathasteron
6-deoxoTE.....	6-deoxoteasteron
6-deoxoTY .....	6-deoxotyphasterol
6-oxoCN.....	6-oxocampestanol
abs1.....	altered brassinolide sensitivity1
AMK.....	aminokyseliny
Arg.....	arginin
BAK1 .....	BRI1-associated receptor kinase 1
BEH.....	BES1/BZR1 homolog
BEN1 .....	bri1-5 enhanced
BES1.....	BRI1-EMS-suppressor 1
bHLH.....	basic helix-loop-helix
BIM .....	BES1-interacting Myc-like
BIN2 .....	brassinosteroid-insensitive 2
BKI1 .....	BRI1 kinase inhibitor
BKK1 .....	BAK1-like1
BR.....	brassinosteroid
brd1.....	brassinosteroid-dependent 1
bri1 .....	brassinosteroid insensitive 1
BRS1 .....	BRI1-suppressor 1
BSU1 fosfatáza.....	BRI1 suppressor 1
BZR1 .....	brassinazole-resistant 1
cbb1 .....	cabbage1
cGMP .....	cyklický guanosin monofosfát
cpd.....	constitutive photomorphogenesis and dwarfism
CS.....	castasteron
CT.....	cathasteron
cu.....	curl

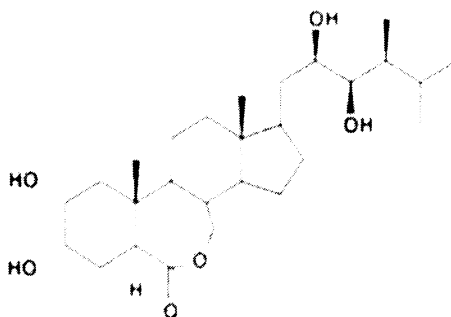
det.....	deetiolated
DFR.....	dihydroflavonol-4-reduktázu
dim.....	diminuto
DNA.....	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dwf.....	dwarf
FAD.....	flavin adenine dinucleotide
Gly.....	glycin
GSK3.....	glykogen synthase kinase-3
LRR.....	leucine-rich repeat
NADPH.....	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
RLK.....	receptor-like kinase
rot3.....	rotundifolia3
Ser.....	serin
SERK.....	somatic embryogenesis receptor-like kinase
TE.....	teasteron
Thr.....	threonin
TRP.....	transthyretin-related proteins
TRIP1.....	TGF $\beta$ -receptor-interacting protein 1
TTL.....	transthyretin like protein
TY.....	typhasterol
Tyr.....	tyrosin

## 1. Úvod

Brassinosteroidy jsou novou skupinou rostlinných hormonů. Brassinolid a castasteron byly nejdříve zařazeny mezi růstové regulátory, kam patří také kyselina jasmonová, fenolické látky a další. Díky dalším studiím byly zjištěny jejich regulační funkce, a proto byly v roce 1998 na konferenci v Japonsku zařazeny mezi fytohormony.

První brassinosteroid byl izolován v roce 1979 z pylu řepky (*Brassica napus*) a nazván brassinolid. Tomuto objevu předcházelo zjištění, že extrakt z pylu stimuluje růst rostlin. Když v roce 1970 Mitchell se svými kolegy sesbírali pyl z asi 60 druhů rostlin, zjistili, že asi polovina z nich stimuluje růst druhého fazolového internodia ve fyziologickém testu. Látka, která tento jev způsobila, byla nazvána brassin. Brassinolid je aktivní složkou brassinu. Chemická struktura brassinolidu byla stanovena pomocí nukleární magnetické rezonance, hmotnostní spektrometrie a rentgenové krystalografie jako (22R,23R,24S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-B-homo-7-oxa-5 $\alpha$ -cholestan-6-on (Mitchell *et al.*, 1970, Grove *et al.*, 1979). Brassinolid má steroidní kostru z 5 $\alpha$ -cholestanu, obsahuje 7-oxalaktonický B-kruh a 2 hydroxyly v A-kruhu (C-2 $\alpha$  a C-3 $\alpha$ ) a postranní řetězec (C-22R a C-23R) (Obr. 1).

Další brassinosteroid byl izolován z hmyzích hálek kaštanovníku (*Castanea crenata*) a byl nazván castasteron (Yokota *et al.*, 1982). Struktura castasteronu byla určena jako (22R,23R,24S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-6-on (Yokota, 1999).



Obr. 1.: Strukturní vzorec brassinolidu. Podle Sakurai *et al.* (1999).

## 2. Chemická struktura přírodních brassinosteroidů

Brassinosteroidy jsou skupinou rostlinných steroidů, které vyvolávají růstové odpovědi (Mandava, 1988).

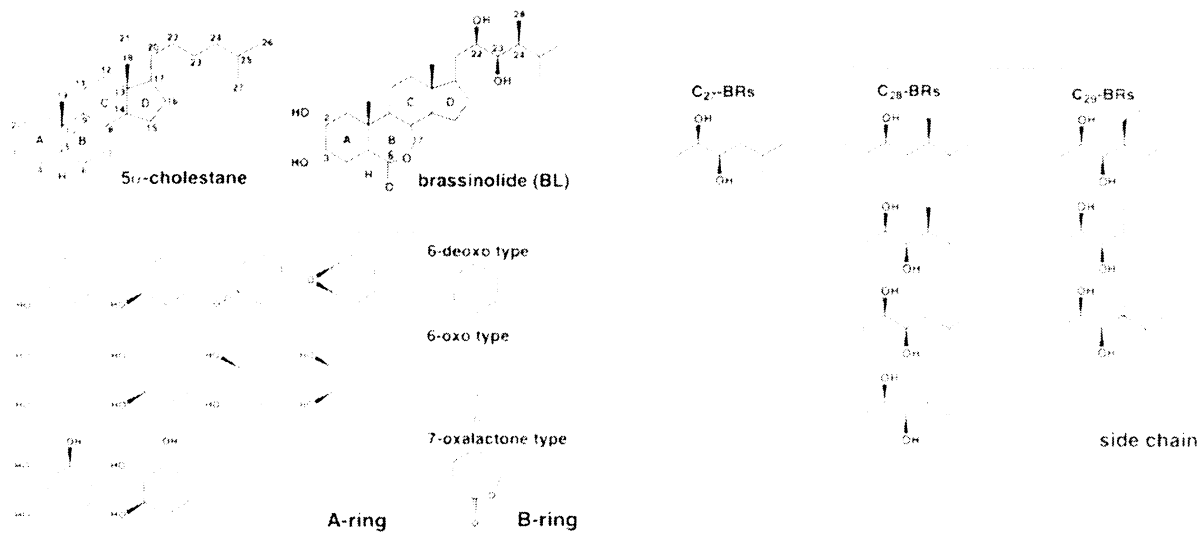
Jsou odvozeny z 5 $\alpha$ -cholestanu a strukturální variace jsou způsobeny typem a pozicí funkční skupiny v A/B kruhu a postranním řetězcí. Tyto modifikace jsou způsobeny oxidací a redukcí během biosyntézy.

V A-kruhu mají hydroxylované uhlíky na pozicích C2 $\alpha$  a C3 $\alpha$ .. Brassinosteroidy s  $\alpha$ -

hydroxylem,  $\beta$ -hydroxylem nebo ketonem na pozici C3 jsou prekurzory brassinosteroidů s  $2\alpha,3\alpha$ -hydroxyly, naopak brassinosteroidy s  $2\alpha,3\beta$ -,  $2\beta,3\alpha$ - nebo  $2\beta,3\beta$ -hydroxyly mohou být metabolizovány na  $2\alpha,3\alpha$ -hydroxyly. Hydroxyly na  $2\alpha,3\alpha$  jsou rysem určujícím neaktivnější brassinosteroidy, jako brassinolid a castasteron. Aktivita klesá při hydroxylacích jednotlivých uhlíků takto:  $2\alpha,3\alpha > 2\alpha,3\beta > 2\beta,3\alpha > 2\beta,3\beta$ . Z toho vyplývá, že pro vysokou biologickou aktivitu je základní  $2\alpha$  hydroxyl (Yokota, 1997).

Některé brassinosteroidy mají v A-kruhu pouze jeden hydroxyl. Jako první z nich byl objeven cathasteron (Fujioka *et al.*, 1995). Později byly objeveny 6-deoxocathasteron a 3-epi-6-deoxocathasteron (Fujioka *et al.*, 2000). Další v přírodě nalezené jsou brassinosteroidy s 2,3-epoxidovou skupinou (secasteron), 3-oxo skupinou (3-dehydroteasteron) nebo 3-keto skupinou (3-dehydroteasteron a 3-dehydro-6-deoxoteasteron), ale také brassinosteroidy s hydroxylem na pozici C1 $\alpha$  nebo C1 $\beta$  (3-epi-1 $\alpha$ -hydroxycastasteron a 1 $\beta$ -hydroxycastasteron). Existují i brassinosteroidy s dvojnou vazbou v A nebo B kruhu (Mandava, 1988; Kim, 1991; Bishop *et al.*, 1999, Fujioka, 1999, Antonchick *et al.*, 2003) (Obr. 2).

Podle B-kruhu jsou brassinosteroidy děleny na typ 6-deoxo (21 sloučenin), 6-oxo (keton, 34 sloučenin) a 7-oxalacton (lakton, 12 sloučenin) (Yokota, 1997). V tomto pořadí stoupá jejich biologická aktivita. Čtvrtou skupinu tvoří  $6\alpha$ -hydroxycastasteron, který má 6-hydroxylovou skupinu (Kim, 1991, Bishop *et al.*, 1999, Fujioka, 1999) (Obr.2).



Obr. 2.: Strukturální variace v A-kruhu, B-kruhu a postranním řetězci u brassinosteroidů. Převzato z Sakurai, Yokota and Clouse (1999).



Podle složení postranního řetězce rozlišujeme 11 skupin: 23-oxo, 24 $\alpha$ -methyl, 24 $\beta$ -methyl, 24-methylen, 24 $\alpha$ -ethyl, 24-ethyliden, 24-methylen-25-methyl, 24-methyl-25-methyl, bez substituentu na C23, bez substituentu na C24 a bez substituentu na C23 a C24 (Sakurai and Fujioka, 1993, Fujioka, 1999, Watanabe *et al.*, 2000, Antonchick *et al.*, 2003).

Brassinosteroidy jsou tříděny na C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> a C<sub>29</sub> podle počtu uhlíků ve struktuře (Yokota, 1997). Klasifikace je založena na různých alkylových substituentech na postranním řetězci. Přítomnost nasyceného alkyly na pozici C24 a methylu na C25 dělá brassinosteroidy aktivnějšími. Většina brassinosteroidů má  $\alpha$ -alkyl na C24 (Fujioka, 1999).

Brassinosteroidy se odvozují od sterolů se stejným postranním řetězcem. C<sub>27</sub> brassinosteroidy (13 sloučenin) nemají substituent na C24, jsou odvozené od cholesterolu. C<sub>28</sub> (39 sloučenin) mají  $\alpha$ -methyl,  $\beta$ -methyl nebo methylen na C24, jsou odvozené od campasterolu, 24-epicampasterolu nebo 24-methylencholesterolu. C<sub>29</sub> s  $\alpha$ -ethylem nebo ethylidenem mohou být odvozené od isofucosterolu nebo sitosterolu. Ostatní C<sub>29</sub> brassinosteroidy mají methylen na C24 a methyl na C25 a jsou odvozené od 24-methylen-25-methylcholesterolu (Yokota, 1997). 22-hydroxysteroidy jsou podobné jiným brassinosteroidům, C<sub>28</sub>22-hydroxysteroidy jsou dominantní, následovány C<sub>27</sub>-hydroxysteroidy, zatímco C<sub>29</sub>22-hydroxysteroidy se vyskytují pouze ve stopovém množství. Relativní rozšíření 22-hydroxysteroidů je regulováno C22 hydroxylací. (Fujioka *et al.*, 2002)

### 3. Výskyt přírodních brassinosteroidů

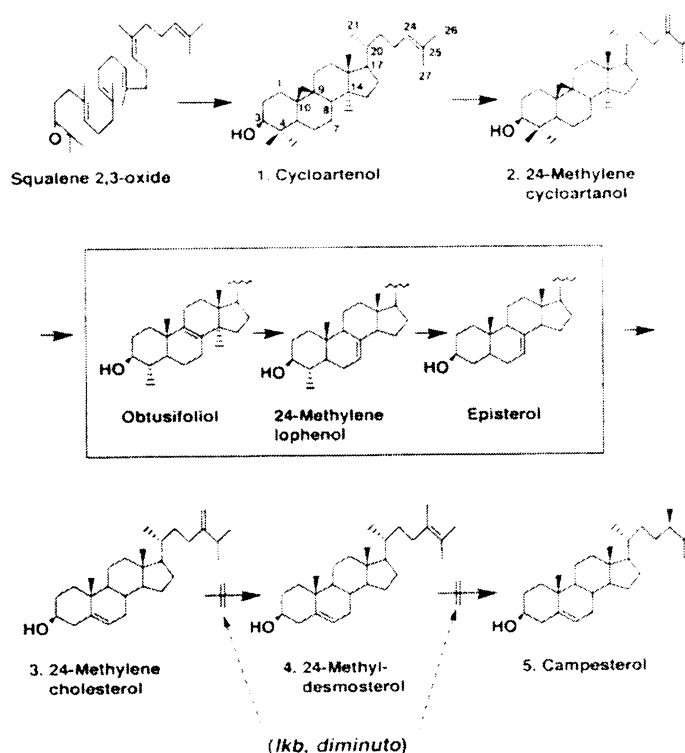
Od prvního objevu brassinolidu bylo nalezeno kromě 65 volných brassinosteroidů také 5 konjugátů s cukry nebo mastnými kyselinami (Bajguz, 2007). Byly izolovány z 60 rostlin (51 krytosemenných, 6 nahosemenných, 1 mechorost, 1 řasa). Detekovány byly ve všech rostlinných orgánech – pyl, prašníky, semena, listy, stonky, kořeny, květy, dokonce i v hmyzích hálkách. Háčky obsahují více brassinosteroidů než zdravé tkáně, mladá rostoucí pletiva obsahují více než dospělá. Nejvyšší koncentrace je v pylu *Cupressus arizonica*. Koncentrace brassinosteroidů ve vegetativních částech rostliny je malá. Pyl a nematurovaná semena obsahují 1-100 ng/g živé váhy, zatímco kořeny a listy obvykle obsahují pouze 0,01-0,1 ng/g živé váhy (Griffiths *et al.*, 1995, Clouse and Sasse, 1998, Fujioka, 1999).

Nejrozšířenější je castasteron (50 druhů) a brassinolid (34 druhů). Následuje tyfasterol (25 druhů), 6-deoxocastasteron (19 druhů), teasteron (19 druhů) a 28-norcastasteron (12 druhů). Brassinosteroidy jsou důležité kvůli svému širokému rozšíření i biologické aktivitě (Kim, 1991, Fujioka, 1999)

## 4. Biosyntéza brassinosteroidů

### 4.1. Biosyntéza campesterolu

Biosyntetická dráha campesterolu je popsána u cévnatých rostlin. Prvním cyklickým triterpenoidem v dráze je cykloartenol, který je odvozen od skvalen-2,3-oxidu. Metylací cykloartenolu vzniká 24-metylcykloartenol, který podstupuje 4 $\beta$ -demetylaci otevírající cyklopropanový kruh. Z 24-metylcykloartenolu vzniká po 14 a 4 $\alpha$ -demetylaci a migraci dvojné vazby z C7 na C5 24-methylencholesterol. Přes 24-metyldesmosterol a redukcí dvojné vazby vzniká campesterol (Yamada *et al.*, 1997) (Obr. 3).



Obr. 3.: Biosyntetická dráha campesterolu a kroky blokové u mutant. Převzato ze Sakurai *et al.* (1999).

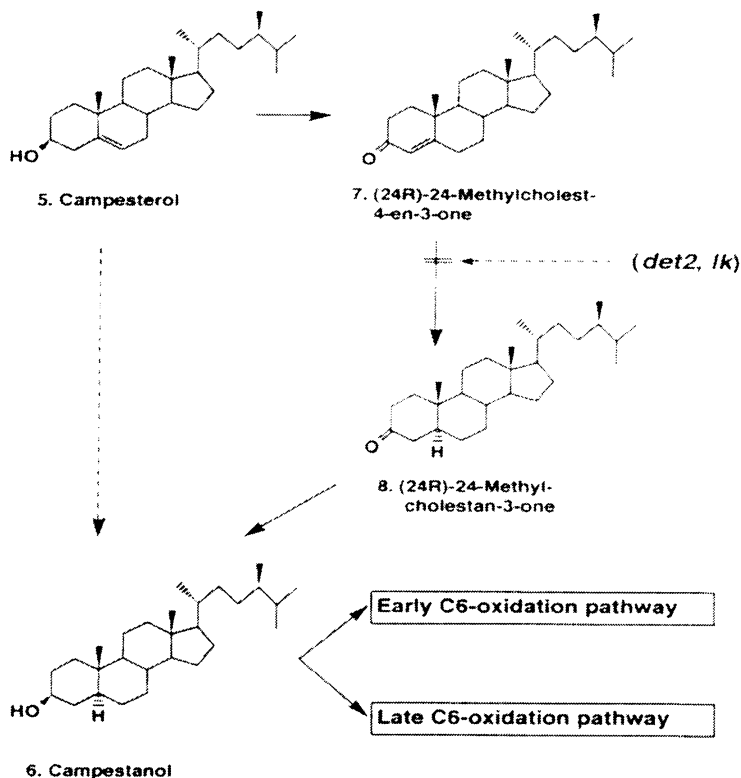
### 4.2. Konverze campesterolu (CR) na campestanol (CN)

Konverze campesterolu na možné intermediáty biosyntézy brassinosteroidů byla prozkoumána v explantátové kultuře *Catharanthus roseus* (Suzuki *et al.*, 1995).

U *Arabidopsis* probíhá přeměna campesterolu na campestanol přes 4-en-3-on a 3-on (Obr. 4). Prokázána byla i koexistence campesterolu, 4-en-3-onu, 3-onu a campestanolu u *Cannabis sativa* a pšenice (Takatsuto *et al.*, 1997, 1999, Takatsuto and Kawashima, 1998).

Alternativní dráha probíhá přes 4-en-3 $\beta$ -ol a 4-en-3-on. Objevena byla v *deetiolated2*

(*det2*) mutantě, kde je konverze 4-en-3-on na 3-on defektní (Obr. 4). Tedy DET2 katalyzuje 5 $\alpha$ -redukcí 4-en-3-on (Noguchi *et al.*, 1999). Reakce tedy probíhá následovně: campesterol  $\rightarrow$  (24R)-metylcholest-4-en-3 $\beta$ -ol (4-en-3 $\beta$ -ol)  $\rightarrow$  (24R)-metylcholest-4-en-3-on (4-en-3-on)  $\rightarrow$  (24R)-24-metyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-on (3-on)  $\rightarrow$  campestanol (Noguchi *et al.*, 1999).



4. Časná fáze biosyntetické dráhy a místa blokace u mutant. Převzato ze Sakurai *et al.* (1999).

### 4.3. C6-oxidace

Všechny brassinosteroidy nalezené u *Arabidopsis* jsou součástí časně nebo pozdní C6-oxidace. Obě tedy u *Arabidopsis* probíhají. Pozdní oxidace je hlavním zdrojem brassinolidu u rostlin huseníčku (*Arabidopsis*) rostoucích na světle, časná oxidace je dominantní u rostlin rostoucích ve tmě (Noguchi *et al.*, 2000). Obě biosyntetické dráhy byly studovány na kultuře *Catharanthus roseus* (Choi *et al.*, 1996, 1997, Fujioka *et al.*, 2000).

#### 4.3.1. Časná C6-oxidace

Oxidace na C6 se odehrává před introdukcí hydroxylů na C22 a C23 (Choi *et al.*, 1997).

Campestanol je konvertován na 6 $\alpha$ -hydroxycampestanol a ten na 6-oxocampestanol (Suzuki, 1995). Intermediátem mezi 6-oxoCN a TE je cathasteron (22 $\alpha$ -hydroxy-6-oxocampestanol, CT) (Fujioka *et al.*, 2000). Hladina 6-oxocampestanolu se snižuje na polovinu

oproti 6 $\alpha$ -hydroxycampestanolu a hladina CT tvoří 1/500 množství 6-oxoCN. Tento krok limituje rychlost syntézy brassinolidu (Fujioka *et al.*, 1995).

Reakce mezi teasteronem a typhasterolem je epimerizace 3 $\beta$ -hydroxyly na 3 $\alpha$ -hydroxyl přes 3-dehydroTE. Redukcí 3-dehydroTE vzniká typhasterol, ale i malé množství teasteronu. Tato reverzibilní reakce hraje důležitou roli v regulaci endogenní hladiny brassinosteroidů. 3-dehydroTE byl indikován jako přirozený brassinosteroid v lilii (*Lilium*) a *Distylium racemosum* (Abe *et al.*, 1994).

Hydroxylací typhasterolu na C2 vzniká castasteron (Obr. 5).

Meziprodukty časně C6-oxidace teasteron, typhasterol a castasteron mohou být nalezeny spolu s brassinolidem v mnoha rostlinách. Biologické aktivity intermediátů ve fyziologických testech stoupají s jejich pořadím v biosyntetické dráze. Stejně tendence byly pozorovány v aktivitě růstu *cpd* (Szerekes *et al.*, 1996) a *det2* mutant (Fujioka *et al.*, 1997). Takové pozorování ukazuje, že se v biosyntetické dráze intermediáty přeměňují až na brassinolid, který je biologicky aktivním konečným produktem.

#### 4.3.2. Pozdní C6-oxidace

Oxidace na C6 probíhá po introdukci hydroxylů na postranním řetězci a C2 na A kruhu (Choi *et al.*, 1997).

Změna campestanolu na 6-deoxoTE probíhá přes 6-deoxoCT. 6-deoxoTE se mění na 6-deoxoTY přes 3-dehydro-6-deoxoTE. Reakce minoritně probíhá i opačně (Choi *et al.*, 1997, Noguchi *et al.*, 2000). 6-deoxoTE nebo 3-dehydro-6-deoxoTE může být konvertován na TE nebo 3-dehydroTE a pak na TY. Alternativně může být 6-deoxoTE nebo 6-deoxo-3-dehydroTE konvertován na 6-deoxoTY a ten na TY (Noguchi *et al.*, 2000).

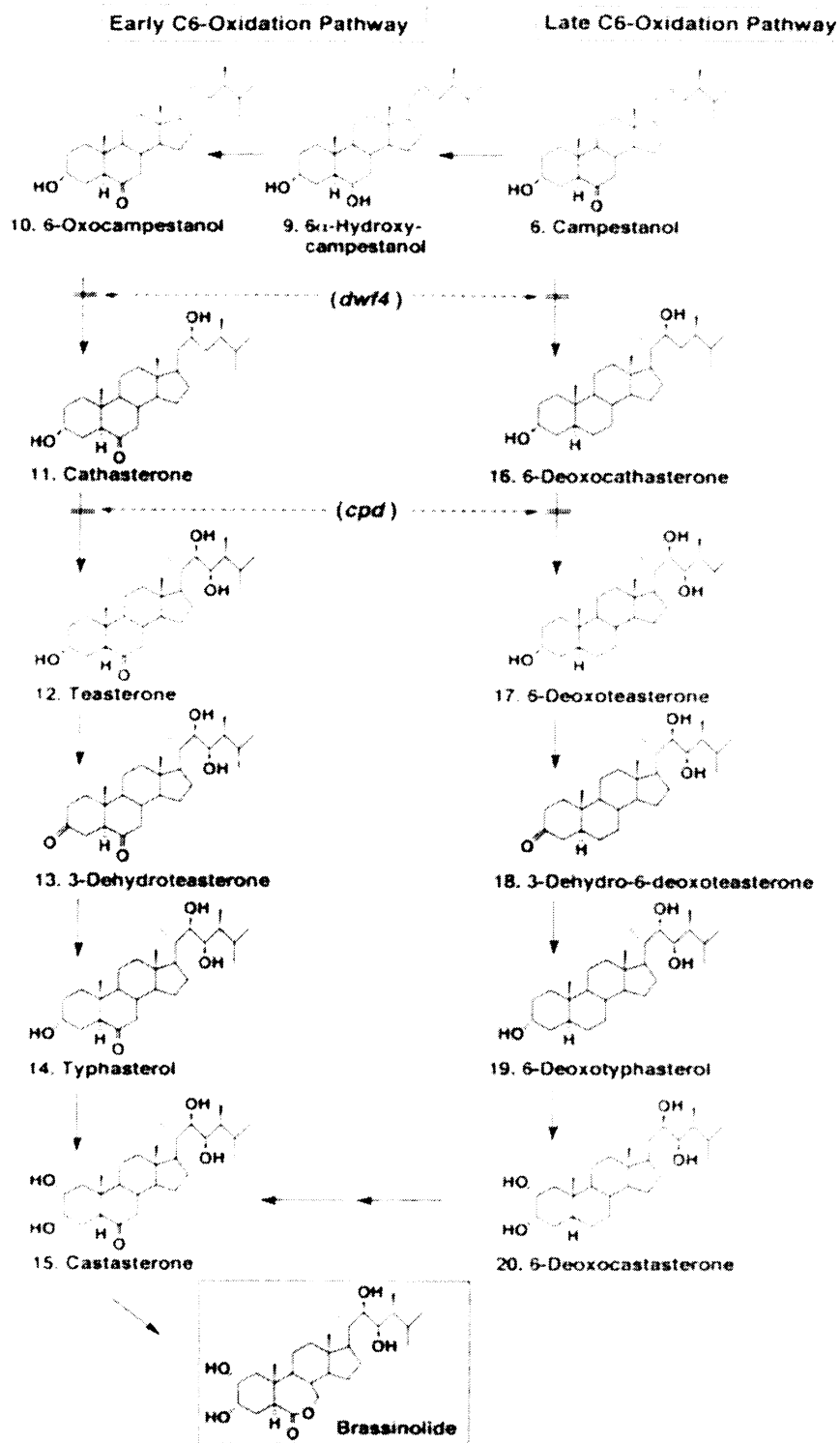
6-deoxoTY se mění na 6-deoxocasteron (Choi *et al.*, 1997), který je přes castasteron konvertován na brassinolid (Choi *et al.*, 1996). Je pravděpodobné, že pouze 6-deoxoCS podstupuje C6-oxidaci na castasteron (Choi *et al.*, 1997) (Obr. 5).

#### 4.4. Syntéza brassinolidu z castasteronu

Oxidace castasteronu na brassinolid pomocí CS oxygenázy byla popsána na buněčné kultuře *Catharanthus roseus* (Yokota *et al.*, 1990). V *C. roseus* byla pozorována změna castasteronu na 3-epicastasteron a brassinolid, v *Nicotiana tabacum* a *Oryza sativa* byl castasteron konvertován pouze na 3-epiCS. Vznik 3-epiCS z castasteronu může být inaktivační proces, protože 3-epiCS má velmi slabou biologickou aktivitu v nematurovaných semenech *Phaseolus vulgaris* (Kim, 1991).

Brassinolid je nejvíce aktivní brassinosteroid, předpokládá se, že je konečným produktem biosyntézy. U *Arabidopsis* byl detekován castasteron, 6-deoxocasteron, typhasterol a 6-deoxytyphasterol, nikoli však brassinolid. Ten se vyskytuje v příliš malých koncentracích, aby mohl být detekován (Fujioka *et al.*, 1996). Na druhou stranu metabolická konverze castasteronu na brassinolid byla studována u více druhů rostlin.

Vznik brassinolidu z castasteronu byl pozorován u mutanty brassinolide insensitive 1 (*bril*), ale ne u divokého typu *Arabidopsis*, stejně jako konverze typhasterolu na castasteron (Noguchi *et al.*, 2000).



Obr. 5.: Časná a pozdní C-oxidace. Převzato ze Sakurai *et al.* (1999)

## 5. Biosyntéza – geny a mutanty

Ke studiu biosyntézy brassinosteroidů jsou používány mutantní rostliny, u nichž je poškozen určitý gen, který je třeba pro správný průběh biosyntézy. Jde o tzv. BR-deficientní mutanty. Tyto mutanty vykazují malý vzrůst, tmavě zelené listy a omezenou plodnost při růstu na světle a deetioloovaný fenotyp při růstu ve tmě (vypadají jako kdyby rostly na světle).

Mezi nejdůležitější geny účastníci se biosyntézy brassinosteroidů patří *deetiolated2* (*det2*), který kóduje steroidní 5 $\alpha$ -reduktázu (Fujioka *et al.*, 1997), *constitutive photomorphogenesis and dwarfism* (*cpd*) (Szekeres *et al.*, 1996) a *dwarf* (*dwf*) (Choe *et al.*, 1998), které kódují cytochrom P450.

Geny *dwarf* se dělí na dvě skupiny: standartní a malé. Mezi standartní mutanty patří *dwf1* (*dim1*) a *dwf6* (*det2*), zatímco mezi malé *dwf3* (*cpd*) a *dwf4*. U standartních mutant je biosyntéza přerušena před krokem blokováným u *dwf4* (Fujioka *et al.*, 1995). Malé korespondují s tímto krokem a následujícími.

*Cpd* a *det2* mutace mají podobné fenotypové projevy. *Cpd* může být pokládán za nový typ *det* mutace. *Cpd* a *det2* mutace jen nepřímo ovlivňují expresi genů regulovaných světlem. Fenotypové projevy mutant *dim* jsou téměř identické s *det2* a *cpd* mutantami. *Dim* způsobuje zastavení biosyntézy před typhasterolem. *Det* a *cpd* geny jsou pozitivními regulátory buněčné elongace, jejich inaktivace způsobuje inhibici prodlužování hypokotylu (Szekeres *et al.*, 1996).

### 5.1. Geny *deetiolated2* (*det2*) a *lk*

*Det2* kóduje 5 $\alpha$ -reduktázu, která se uplatňuje v časně fázi biosyntézy, při vzniku campestanolu z campesterolu. Katalyzuje 5 $\alpha$ -redukcí u (24R)-metylcholest-4-en-3-on (Fujioka *et al.*, 1997).

*Det2* mutanta akumuluje campestanol v množství 8-15 % divokého typu a méně než 10 % u ostatních brassinosteroidů. To ukazuje na přítomnost další 5 $\alpha$ -reduktázy, která hraje minoritní roli v biosyntéze brassinosteroidů (Fujioka *et al.*, 1997).

V *det2* mutantě se uplatňuje alternativní cesta vzniku campestanolu, která probíhá přes (24R)-metylcholest-4-en-3 $\beta$ -ol. Reakce tedy probíhá následovně: campesterol  $\rightarrow$  (24R)-metylcholest-4-en-3 $\beta$ -ol (4-en-3 $\beta$ -ol)  $\rightarrow$  (24R)-metylcholest-4-en-3-on (4-en-3-on)  $\rightarrow$  (24R)-24-metyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-on (3-on)  $\rightarrow$  campestanol (Noguchi *et al.*, 1999).

Gen *lk* je ortologem *det2* u hrachu (Nomura *et al.*, 2004).

## 5.2. Geny constitutive photomorphogenesis and dwarfism (*cpd*) a dwarf (*dwf*)

Gen *cpd* u *Arabidopsis* kóduje cytochrom P450 (CYP90A1), který katalyzuje konverzi cathasteronu na teasteron hydroxylací na C23 (Szekeres *et al.*, 1996). Gen je zpětnovazebně inhibován brassinolidem, stejně jako intermediáty časně a pozdní C6-oxidace, které nesou hydroxyl na C22 a C23 postranního řetězce. Prvním intermediátem způsobujícím inhibici je teasteron. Tato inhibice genu *cpd* reguluje syntézu brassinosteroidů (Mathur *et al.*, 1998).

*Cpd* mutanty mají krátký hypokotyl, otevřené kotyledony a protažená listová primordia při růstu ve tmě. Exprese genu *cpd* je ovlivněna i externími signály jako světlo, cytokininový růstový faktor a sacharóza (Szekeres *et al.*, 1996).

Velice podobným genem je *dwf4*. *Dwf4* a *cpd* jsou ze 43 % shodné a z 66 % podobné. Gen *dwf4* se také řadí do rodiny P450, kóduje CYP90B1. *Dwf4* katalyzuje hydroxylaci na C22. Jako substráty jsou rozeznávány campestanol i 6-oxocampestanol (Choe *et al.*, 1998).

Dalším genem této rodiny je *rotundifolia3* (*rot3*) kódující CYP90C1. Je vyžadován v konverzi typhasterolu na castasteron (Kim *et al.*, 2005).

Gen *dwarf* je homologem *cdp* u rajčete, kóduje CYP85 (Bishop *et al.*, 1996). DWARF je multifunkční P450 katalyzující dvě reakce (konverzi 6-deoxoCS na 6 $\alpha$ -hydroxyCS a jeho konverzi na CS). C6-oxo intermediáty obnovují fenotyp mutant, zatímco C6-deoxo mají malý efekt. To ukazuje na převahu pozdní C6-oxidace u rajčat (Bishop *et al.*, 1999).

Konverze 6-deoxoCS na CS zvyšuje aktivitu brassinosteroidů 200krát (Fujioka *et al.*, 1998). To je největší známé zvýšení bioaktivity způsobené jedním enzymem. Tento krok je tedy klíčovým v regulaci aktivních brassinosteroidů (Bishop *et al.*, 1999).

Ekvivalentem u rýže je gen brassinosteroid-dependent-1 (*brd1*) (Mori *et al.*, 2002).

## 5.3. Dwarf1 (*dwf1*), diminuto (*dim*) a *lkb*

*Dwf1* je blokován v konverzi 24-metylencholesterolu na campesterol. Rostliny *dwf1-1* jsou 4krát menší než u divokého typu. Pokles velikosti orgánů není uniformní. *Dwf1-1* produkují více listových růžic než divoký typ. Nejsou plně sterilní a mají delší vegetační dobu (Choe *et al.*, 1999).

Protein DWF1 je proteinem endomembránového systému. Jeho cílová sekvence ho směřuje na membránu především endoplazmatického retikula. K funkci potřebuje navázání FAD jako koenzymu.

Mezi osmi *dwf1* mutacemi se jich šest projevuje v nebo před FAD-vazebnou doménou. Čtyři mutace jsou lokalizovány ve vysoce konzervované oblasti (*dwf1-2*, *dwf1-8*, *dwf1-10*



a *dwf1-11*) a jedna, která tvoří stop kodón (*dwf1-3*) ničí FAD-vazebnou doménu (Choe *et al.*, 1999).

Alela *dwf1-1* obsahuje inzerci na FAD-vazebné doméně, *dwf1-4* obsahuje stop kodón uprostřed této domény (Choe *et al.*, 1999).

V roce 1995 Takahashi se svými kolegy izolovali morfologicky podobnou mutantu *diminuto* (*dim*). (Takahashi *et al.*, 1995) Zjistili, že gen *dim* kóduje protein se signální sekvencí pro jádro (Takahashi *et al.*, 1995), Klahre se svými kolegy však prokázali, že se v jádře nevyskytuje, ale je lokalizován ve váčcích v cytoplazmě (Klahre *et al.*, 1998). Gen *dim* je alelou *dwf1* (Feldmann, 1991).

DIM/DWF1 je membránový protein důležitý v kroku změny 24-metylencholesterolu na campesterol a isofucosterolu na sitosterol. Podílí se na izomeraci i redukci při vzniku campesterolu z 24-metylencholesterolu (izomerace 24-methylencholesterolu a redukce 24-methyl-desmosterolu na campesterol). Není limitujícím faktorem (Klahre *et al.*, 1998).

Třetí identifikovanou alelou *dwf1* je *cabbage1* (*cbb1*) (Kauschmann *et al.*, 1996)

Mutanta *lkb* je orthologem *dim/dwf1* u hrachu (Schulz *et al.*, 2001).

## 6. Signalizace

Brassinosteroidy regulují mnoho rostlinných růstových a vývojových procesů. Využívají transmembránových receptorových kináz k iniciaci fosforylační kaskády, která přenáší steroidní signál do jádra. U *Arabidopsis* je signalizace zprostředkována receptorovou kinázou brassinosteroid insensitive 1 (BRI1). Extracelulární doména BRI1 váže brassinosteroidy, které podporují dimerizaci BRI1 a BRI1-associated receptor kinase 1 (BAK1) a signál je zprostředkován intracelulární doménou, která autofosforyluje Ser a Thr a zřejmě má schopnost fosforylovat jiné substráty (Massagué, 1998).

### 6.1. Základní proteiny signální dráhy

#### 6.1.1. BR-insensitive 1 receptor (BRI1)

BRI1 je první RLK (receptor-like kinase), která je potřebná k přenosu signálu u rostlin a zároveň je zřejmě hlavním receptorem brasinosteroidů, ačkoli existují BRI1 homology s vysokou sekvenční podobností.

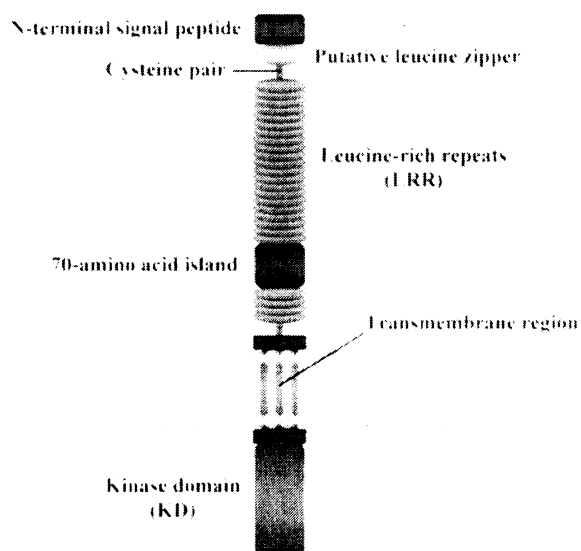
BRI1 je tvořena extracelulární, transcelulární a intracelulární doménou. Extracelulární doména obsahuje 25 kopií tandemových repetitivních leucinu (LRR) s 13 možnými N-glykozylačními

místy, které jsou obklopeny cysteinovými páry. Jedinečným rysem LRR domény je přítomnost 70 aminokyselin mezi LRR21 a 22. Tyto aminokyseliny jsou nepostradatelné pro správnou funkci BRI1. Transmembránová doména je obklopena dvěma sekvencemi bohatými na nabitě aminokyseliny. Intracelulární kinázová doména obsahuje 12 subdomén a je velmi konzervovaná (Li and Chory, 1997) (Obr. 6).

Kinoshita s kolegy ukázali, že BRI1 váže přímo fyziologicky aktivní brassinosteroidy. Brassinosteroidy se váží na 70aminokyselinovou doménu a LRR22. Pro vazbu je nutná celá sekvence 70AMK-LRR22, tedy celkem 94 aminokyselin (Kinoshita *et al.*, 2005).

BRI1 obsahuje i doménu, která funguje jako guanylyl cykláza *in vitro*. cGMP má tedy zřejmě funkci druhého posla (Kwezi *et al.*, 2007).

Ortolog u rajčete funguje jako receptor pro brassinosteroidy, ale i pro peptidický hormon systemin (Holton *et al.*, 2007).



Obr. 6.: Struktura BRI1 u *Arabidopsis*. Převzato z Bishop a Koncz (2002).

### 6.1.2. BRI1-associated receptor kinase 1(BAK1)

BAK1 je LRR-RLK odlišná od BRI1. BAK1 se skládá z extracelulární, transmembránové a intracelulární Ser/Thr proteinkinázové domény. V extracelulární doméně obsahuje oblast bohatou na prolin, pět LRR a čtyři leucinové zipy (Li *et al.*, 2002).

BAK1 patří do LRR rodiny typu II, která zahrnuje 14 členů, pět z nich je pojmenováno somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK1-5) (Hecht *et al.*, 2001).

BRI1 a BAK1 interagují *in vitro* i *in vivo*. Navzájem se fosforylují a autofosforylace BAK1

je stimulována BRI1. BAK1 může podporovat vznik homodimerů BRI1. Zvýšená exprese BAK1 může potlačit fenotyp *bril*. Je limitující složkou, je-li signalizace přes BRI1 redukována (Li *et al.*, 2002). BAK1 funguje jako transduktor po rozpoznání brassinosteroidů pomocí BRI1 (Kinoshita *et al.*, 2005).

BAK1 má také úlohu v obranných reakcích a programované buněčné smrti nezávisle na brassinosteroidech (He *et al.*, 2007). Účastní se i buněčné smrti indukované patogeny (Kemmerling *et al.*, 2007).

### 6.1.3. BAK1-like1 (BKK1)

BKK1 je novější název pro SERK4. Může se vázat s BRI1 *in vivo*. Interakce je zvýšena exogenními brassinosteroidy. BKK1 má podobné účinky jako BAK1.

BAK1 a BKK1 se neúčastní pouze signální dráhy závislé na brassinosteroidech, ale i dráhy na nich nezávislé. Regulují BR-dependentní a BR-independentní dráhu pomocí alternativní interakce s BRI1 nebo jinou příbuznou LRR-RLK (He *et al.*, 2007).

### 6.1.4. BR-insensitive 2 (BIN2)

BIN2 je glykogen synthase kinase-3 (GSK3), která podporuje fosforylaci BRI1-EMS-suppressor 1 (BES1) a brassinazole-resistant 1 (BZR1). Jiné GSK3 mezi deseti známými u *Arabidopsis* mohou fungovat redundantně s BIN2. BIN2 je nejlépe charakterizovanou GSK3 u rostlin, patří mezi hlavní složky signalizační dráhy brassinosteroidů (Vert and Chory, 2006).

BIN2 byl nalezen v jádře, cytosolu i plazmatické membráně, ačkoli nemá žádné obvyklé cílové sekvence pro jádro nebo membránu. V největším množství se vyskytuje v epidermis maturovaných částí rostliny (Vert and Chory, 2006, Ryu *et al.*, 2007). Jeho hladina není ovlivněna ani světlem, ani aplikací brassinosteroidy či brassinazolem. BIN2 působí na BES1/BZR1 v jádře a tím reguluje genomovou odpověď na brassinosteroidy (Vert and Chory, 2006).

### 6.1.5. BRI1-EMS-suppressor 1 (BES1) a brassinazole-resistant 1 (BZR1)

BES1, BZR1 a další čtyři jim příbuzné proteiny BES1/BZR1 homolog 1-4 (BEH1-4) u *Arabidopsis* jsou funkčně redundantní proteiny, které přenáší signál do jádra (Yin *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2002). BES1 i BZR1 se nacházejí především v jádře. Jedná se o pozitivní signální proteiny v brassinosteroidní dráze a regulace jejich stability je pro signalizaci zásadní (Zhao *et al.*, 2002).

Mají N-koncovou doménu, která obsahuje signální sekvenci pro jádro a vysoce konzervovanou oblast s neznámou funkcí. Centrální oblast obsahuje 22-24 možných fosforylačních míst pro GSK3 kinázy, PEST motiv účastnící se degradace a C-koncovou doménu (Yin *et al.*, 2005).

Po aplikaci brassinosteroidů jsou rychle defosforylovány. V nepřítomnosti brassinosteroidů jsou fosforylovány BIN2 kinázou a fosforylace směřuje proteiny k degradaci (He *et al.*, 2002, Yin *et al.*, 2002). Zvýšená exprese BRI1 vede ke zvýšené citlivosti těchto proteinů vůči brassinosteroidům a to pravděpodobně způsobuje vyšší hladinu defosforylované BES1 (Wang *et al.*, 2001).

Protein BES1 se neakumuluje v odpověď na brassinosteroidy. Ani stabilizace ani jaderná translokace není vyžadována k přenosu signálu. Důležitá je fosforylace BES1, po které BES1 ztrácí schopnost vázat se na DNA a ovlivňovat transkripci. Defosforylované monomery BES1 jsou schopny reagovat *in vitro*. Schopnost multimerizace se po fosforylaci snižuje (Vert and Chory, 2006).

Regulace hladin BES1 a BZR1 proteinů pomocí degradace proteázami není primární odpovědí na brassinosteroidy ani není vyžadována v přenosu signálu (Vert and Chory, 2006).

Lokalizace v jádře je pozitivně regulována brassinosteroidy. Pro export z jádra jsou u BZR1 nutné dvě fosforylační domény. První zahrnuje Ser-130 a Ser-134. Tato doména pravděpodobně určuje BZR1 pro export z jádra. Druhá zahrnuje Ser-173 a Thr-177. Je regulačním místem. Váží se sem 14-3-3 proteiny, které fungují jako chaperony a upravují distribuci BZR1 v buňce (Ryu *et al.*, 2007). 14-3-3 jsou vysoce konzervované proteiny. Funkce většiny z nich není u rostlin známá. BZR1 a BES1 mají vazebné místo pro 14-3-3 proteiny, které je fosforylováno prostřednictvím BIN2. Jejich hlavní role spočívá v inhibici fosforylovaného BZR1 udržení v cytoplazmě (Bai *et al.*, 2007, Gampala *et al.*, 2007).

Po fosforylaci jsou BES1 a BZR1 exportovány z jádra (Ryu *et al.*, 2007). Pro fosforylaci BES1/BZR1 není třeba ani dřívější fosforylace ani pomocné proteiny. Vyžadovány jsou pouze přímé fyzikální interakce (Zhao *et al.*, 2002).

## 6.2. Regulační proteiny

### 6.2.1. Transthyretin like protein (TTL)

TTL byl identifikován u *Arabidopsis* jako substrát pro BRI1. Je to cytozolický protein, který je asociován s membránou v místech, kde je lokalizován BRI1 (Nam and Li, 2004). Je členem rodiny transthyretin-related proteins (TRP), které mají velkou sekvenční identitu

s transthyretinem obratlovců (Benson and Uemichi, 1996). Téměř všechny proteiny této rodiny mají charakteristický motiv ze 4 aminokyselin Tyr-Arg-Gly-Ser na C-konci, který odlišuje TRP od transthyretinu a jiných příbuzných proteinů (Eneqvist *et al.*, 2003).

TTL obsahuje 320-340 aminokyselin a doménu z 200-210 aminokyselin na N-konci (Eneqvist *et al.*, 2003). Přítomnost této domény u mnoha nepříbuzných proteinů a fakt, že je tato doména zřejmě kritickou pro interakci s BRI1 ukazuje na to, že může regulovat aktivitu TTL.

Pro vazbu s BRI1 je důležitá N-koncová doména z 29 aminokyselin. Není však pro vazbu dostačující. Nutná je i přítomnost kinázové aktivity BRI1. Interakce mezi BRI1 a TTL jsou specifické. TTL je fosforylován pomocí BRI1 *in vitro* (Nam and Li, 2004).

TTL je negativním regulátorem růstu. Není hlavní složkou transdukce signálu do jádra, ale reguluje odpovědi na brassinosteroidy. V nepřítomnosti brassinosteroidů inhibuje růst dosud neznámým mechanismem.

Eliminace TTL může částečně nahradit redukovanou aktivitu BRI1 způsobenou inhibicí biosyntézy brassinosteroidů (Nam and Li, 2004).

### **6.2.2. BRI1-suppressor 1 (BRS1)**

BRS1 je regulátor BRI1 signalizace. Jedná se o sekretovanou serinkarboxypeptidázu typu II. BRS1 nefunguje jako obecný regulátor, regulace je selektivní. Pro funkci BRS1 je nutná přítomnost brassinosteroidů. BRS1 tedy reguluje časné události v signalizaci (Li *et al.*, 2001).

U *Arabidopsis* byly identifikovány přinejmenším dva steroid-vazebné proteiny, které mohou být sekretované a mohou být substráty BRS1. BRS1 je aktivuje a uvolňuje. Komplex BR/BR-vazebný protein (ligand komplex) se váže na extracelulární doménu BRI1 a spouští buněčnou odpověď. Aktivace BRI1 ligandem může být limitujícím faktorem (Li *et al.*, 2001).

### **6.2.3. BRI1 kinase inhibitor (BKI1)**

BKI1 je protein, který má velikost 337 aminokyselin a dvě oddělené domény bohaté na serin a oblast bohatou na asparagin. Je specifický pro krytosemenné rostliny. C-koncová doména je vysoce konzervovaná, je nezbytná a postačující k vazbě na kinázovou doménu BRI1. Interakce mezi BKI1 a BRI1 jsou vysoce specifické.

BKI1 funguje jako negativní regulátor přenosu signálu. V nepřítomnosti brassinosteroidů je BKI1 lokalizován na plazmatické membráně, kde se váže na kinázovou doménu BRI1 homodimeru a brání tak vazbě BRI1 na BAK1. Vazba brassinosteroidů na extracelulární doménu BRI1 způsobí fosforylaci a aktivaci BRI1 a tím disociaci od BKI1, což umožní navázání BAK1 (Wang and Chory, 2006).

#### 6.2.4. BRI1 suppressor 1 (BSU1 fosfatáza)

BSU1 je funkční Ser/Thr fosfatáza. Jedná se o pozitivní regulátor signalizace. Vyskytuje se především v meristemických a vodivých pletivech. V maturovaných listech a stoncích chybí. Nachází se téměř výhradně v jádře.

Na rozdíl od BIN2, která potřebuje pro fosforylaci BES1 přímou vazbu kináza-substrát, BSU1 neinteraguje s BES1 *in vitro*. BSU1 potřebuje pro defosforylaci adaptorový protein. Pro vysvětlení zda a jak je BSU1 regulována rostlinnými hormony je třeba další studium. Po ošetření brassinosteroidy se hladina BSU1 transkriptu, proteinu nebo buněčné lokalizace BSU1 nezmění. Katalytická doména je inhibována pouze vysokou koncentrací kyseliny okadaické (Mora-García *et al.*, 2004).

Rychle zvyšuje množství BZR1 v jádře i v přítomnosti BIN2. Působí proti BIN2 zprostředkovanému exportu BZR1 z jádra (Ryu *et al.*, 2007).

#### 6.2.5. BEN1 (bri1-5 enhanced)

BEN1 patří do malé rodiny, která zahrnuje např. dihydroflavonol-4-reduktázu (DFR) a antokyanidin reduktázu. Proteiny této rodiny obsahují NADPH-vazebnou doménu a doménu určující substrátovou specifitu (Devic *et al.*, 1999, Shimada *et al.*, 2004, Yuan *et al.*, 2007). Nejbližší homolog BEN1 je DFR.

Jedná se o cytoplazmatický protein, který funguje jako negativní regulátor. Snižuje hladinu brassinosteroidů. Větší význam má na světle než ve tmě. Vyskytuje se hlavně v kořenové čepičce a v prodlužujících se zónách. V dělivých zónách jako je apikální meristém a embryo je jeho množství malé (Yuan *et al.*, 2007). Pro buněčné dělení je totiž vyšší koncentrace brassinosteroidů příznivá, ale pro růst kořene nikoli (Clouse *et al.*, 1996).

### 6.3. Přenos signálu

BRI1 a BAK1 jsou přítomny v proteinovém komplexu, který obsahuje SERK1, blízký homolog BAK1 (Karlova *et al.*, 2006).

SERK1 je člen malé rodiny pěti příbuzných RLK, které mají membránovou doménu bohatou na serin a prolin (Hecht *et al.*, 2001). SERK1 se podílí na přenosu signálu pomocí BRI1 a potvrzuje roli BAK1 jako koreceptoru BRI1. Avšak většina BRI1 receptorů není se SERK1 asociovaná. SERK1/BRI1 interakce ovlivňují signalizaci zprostředkovanou BRI1, ale méně než interakce BRI1-BAK1 (Karlova *et al.*, 2006).

### 6.3.1. BRI1-BAK1 dimerizace

BRI1 a BAK1 existují hlavně jako neaktivní monomery, ale mohou tvořit ligand-nezávislé heterodimery na buněčném povrchu interakcemi mezi extra- a intracelulárními doménami. V extracelulární doméně obsahují leucinové zipy a alespoň jeden cysteinový pár, které jsou známy tvořením interakcí protein-protein, a které se tedy mohou účastnit vzniku komplexu BRI1/BAK1. Vnitřní afinitu k vytvoření ligand-nezávislých dimerů mají obzvláště při zvýšené expresi. Neaktivní monomery jsou v rovnováze s aktivními dimery (Nam and Li, 2002).

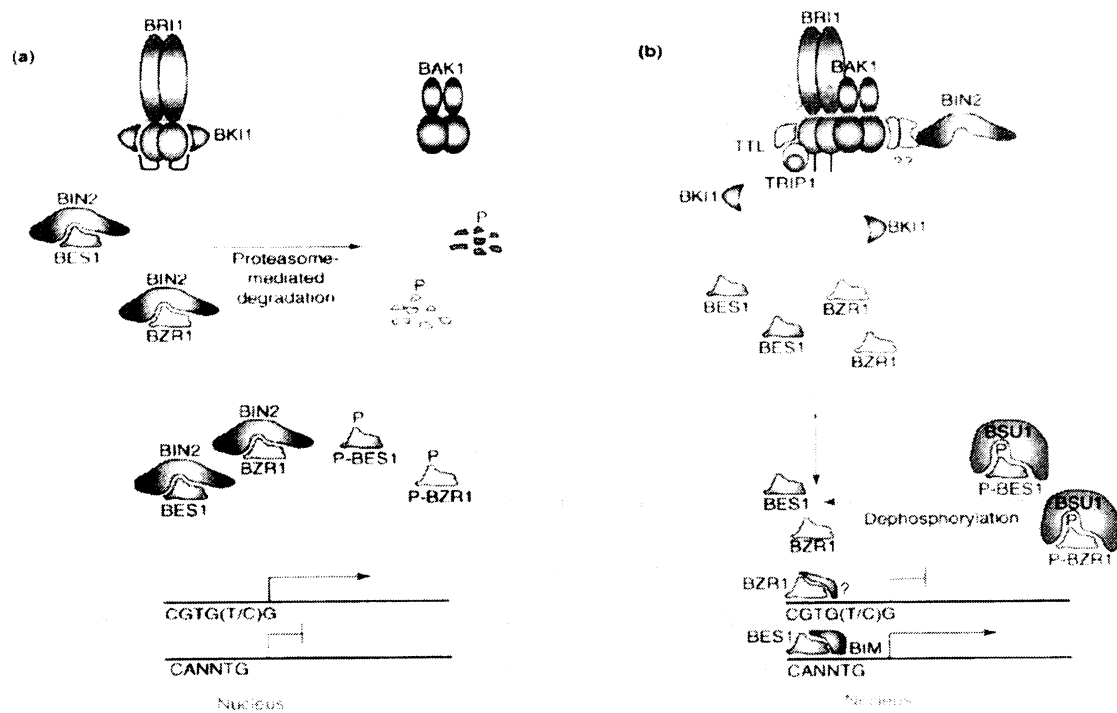
Aplikace brassinosteroidů zvyšuje množství BAK1 vázaného na BRI1 (Wang *et al.*, 2005). Navázání brassinosteroidů buď přímo (Li and Chory, 1997) nebo přes BR-vazebný protein (Schumacher and Chory, 2000) umožňuje vznik heterodimeru BRI1/BAK1, čímž se transfosforylují Ser/Thr místa. Transfosforylace nejen stimuluje vnitřní kinázovou aktivitu, ale také vytváří místa pro další složky signalizace (Nam and Li, 2002).

Stimulace fosforylace a vzniku heterodimeru byla prokázána Wangem a kolegy (Wang *et al.*, 2005), zatímco BR-independentní BRI1/BAK1 dimerizaci prokázala Russinova a kolegové, která také popsala přenos signálu pomocí BRI1/BRI1 homodimeru (Russinova *et al.*, 2004).

Jedna teorie říká, že navázání brassinosteroidů aktivuje BRI1, která fosforyluje BAK1 pro přenos signálu (Li *et al.*, 2002). Podle druhé teorie brassinosteroidy způsobí dimerizaci BRI1/BAK1, která aktivuje obě receptorové kinázy transfosforylací. BRI1 nebo BAK1 nejsou schopny samostatné fosforylace, jestliže druhá složka chybí nebo je poškozena (Nam and Li, 2002). Studie na protoplastech u vigny (*Vigna unguiculata*) ukázaly, že BAK1 stimuluje endocytózu BRI1 (Russinova *et al.*, 2004).

Katalytická aktivita obou kináz není nutná pro interakci BRI1/BAK1, ale je nutná pro jejich plnou aktivaci. Endocytóza receptorů je pravděpodobně důležitým krokem v přenosu signálu, neboť umožňuje přístup k intracelulárním signalizačním komplexům (Sorkin *et al.*, 2002) (Obr. 7).

Rozmístění BRI1 na plazmatické membráně a v endozómech není určeno brassinosteroidy. BRI1 v endozómech je aktivní, není však jasné, zda stále nebo zda vyžaduje navázání brassinosteroidů. Nepřítomnost BKI1 v endozómech ukazuje na stálou aktivitu. Je také možné, že BRI1 protein je endocytován pro degradaci v pozdních endozómech a vakuolách (Gelgner *et al.*, 2007).



TRENDS in Plant Science

Obr. 7.: Model signální dráhy:

a: BRI1 se vyskytuje jako neaktivní dimer asociovaný s BKI1 v nepřítomnosti brassinosteroidů. BIN2 je aktivní kinázou, která fosforyluje BES1 a BZR1, čímž je určuje k degradaci v cytozolu a inhibuje jejich DNA-vazebnou aktivitu uvnitř jádra.

b: Navázání brassinosteroidu na extracelulární doménu BRI1 způsobí konformační změny kinázové domény a disociaci BKI1 z membrány. BRI1 asociuje s BAK1 a dalšími substráty jako TTL a TRIP1. Výsledkem je inhibice BIN2 kinázy, zřejmě pomocí dalších neznámých proteinů. Nefosforylované BES1 a BZR1 translokují do jádra, kde fungují jako DNA-vazebné transkripční faktory. Převzato z Li and Jin (2006).

### 6.3.2. Recyklace BRI1 a BAK1

BRI1 a BAK1 jsou recyklovány zpět na membránu přes endozómy. Endozómy mohou obsahovat buď BRI1 nebo BAK1 nebo oba. Jednotlivě probíhá recyklace pomaleji, než když jsou přítomny oba receptory. Přítomnost BAK1 mění lokalizaci BRI1 na membráně. Může to být způsobeno endocytózou nebo neefektivní recyklací zpět na membránu. Oblasti, kde se vyskytují BRI1 a BAK1 homodimery nejsou organizované, ale jsou četné. BRI1/BAK1 heterodimery jsou v membráně rozmístěné nepravidelně a zdá se, že korespondují s místy rozvíjejících se endocytických kompartmentů, které obsahují oba receptory. Většina endocytovaných BRI1 a BAK1 není recyklována, ale zřejmě směřuje k degradaci (Rusinova *et al.*, 2004).



### 6.3.3. Fosforylační místa a ligandy BRI1

Ligandem stimulovaná fosforylace receptorové kinázy nejen aktivuje vnitřní kinázovou aktivitu, ale také vytváří cílová místa pro intracelulární proteiny, vedoucí k vytvoření multiproteinového signálního komplexu, který vysílá extracelulární signály (Schlessinger, 2000).

Brassinosteroidy zvyšují fosforylaci BAK1 a BRI1. BRI1 má 11 Ser/Thr fosforylačních míst. Na aktivační smyčce jich je šest. Většina fosforylovaných threoninů je výsledkem aktivace BR-dependentní signální dráhy. Pro ligandem indukovanou kinázovou aktivitu je vyžadována fosforylace jednoho z těchto míst. Fosforylace membránové a C-koncové domény může ovlivnit fosforylaci cytoplazmatické domény, ale není nutná pro obecnou kinázovou aktivitu (Wang *et al.*, 2005).

Ligandy pro BRI1 jsou pravděpodobně TTL (Nam and Li, 2004) a TGFβ-receptor-interacting protein 1 (TRIP1), jehož gen byl u *Arabidopsis* identifikován jako indukovaný brassinosteroidy. BRI1 fosforyluje TRIP1 *in vitro* a ten interaguje s BRI1 *in vivo* (Ehsan *et al.*, 2005).

### 6.3.4. Regulace genové exprese pomocí BES1 a BZR1

Byly objeveny stovky genů, jejichž exprese je ovlivňována brassinosteroidy, jsou to geny pro syntézu a modifikaci buněčné stěny, tvorbu cytoskeletu a biosyntézu a transport fytohormonů, zvláště auxinu (Goda *et al.*, 2002, Mussig *et al.*, 2002, Yin *et al.*, 2002). Mnoho těchto genů kóduje transkripční faktory (Vert *et al.*, 2005).

BES1 je transkripční faktor, který je přímo nebo nepřímo vyžadován při aktivaci BR-cílových genů. Pro jeho funkci jsou třeba N- a C-koncová doména a BIN2 fosforylační doména. N- a C-koncová doména jsou potřebné pro správnou funkci BES1 při stimulaci buněčné elongace. N-doména je třeba pro vazbu na DNA, C-doména je nutná pro aktivaci transkripce (Yin *et al.*, 2005).

BES1 se váže na promotor pomocí DNA vazebné domény a aktivuje genovou expresi. Interaguje s bHLH (basic helix-loop-helix) transkripčního faktoru BES1-interacting Myc-like 1 (BIM1) a spolu se váží na E box (sekvence CANNTG častá u genů *Arabidopsis*, které jsou regulovány brassinosteroidy a auxinem). BIM1 usnadňuje vazbu BES1 na promotor (Yin *et al.*, 2005).

U *Arabidopsis* byly nalezeny dva homology BIM1, BIM2 a BIM3 (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Tyto proteiny zřejmě mají vysoce konzervované DNA-domény, které jsou si ze 76 %,

69 % a 77 % podobné u BIM1/BIM2, BIM2/BIM3 a BIM1/BIM3. BIM1 má N-koncovou doménu, která není přítomna u BIM2 ani BIM3. Interakce mezi BIM1 a BES1 je zprostředkována N- a C-koncovou doménou na BES1 a bHLH a C-koncovou doménou u BIM1 (Yin *et al.*, 2005).

Zvýšená exprese BIM1 způsobuje snížení citlivosti k brassinazolu. BIM1 hraje v signální dráze pozitivní roli (Yin *et al.*, 2005).

BES1 a BIM1 se mohou vázat na promotor v závislosti na koncentraci jako homodimery, ale mohou se vázat i společně. BES1 a BIM1 tvoří heterodimery. BES1 N-koncová doména obsahuje cílovou sekvenci pro vstup do jádra následovanou vysoce konzervovaným motivem, které společně mohou fungovat jako DNA-vazebná doména (Yin *et al.*, 2005).

BZR1 je pozitivní regulátor signální dráhy. Může mít i negativní vliv na růst buněk, zřejmě zpětnovazebnou inhibicí biosyntézy brassinosteroidů (Yin *et al.*, 2002). Regulace působení BZR1 je způsobena světlem. Světlo buď přepíná BZR1 z pozitivního regulátoru na negativní nebo mění jeho příspěvek do inhibice biosyntézy brassinosteroidů a růstových odpovědí (Wang *et al.*, 2002).

N-koncová doména funguje jako DNA-vazebná doména. BZR1 se jí váže na promotor genu na hexanukleotidovou sekvenci CGTG(T/C)G. Tato sekvence se proto nazývá BRRE (BR response element). Aplikace brassinosteroidů zvyšuje vazbu BZR1 na promotory BR-biosyntetických genů a zpětnovazebně inhibuje biosyntézu brassinosteroidů (He *et al.*, 2005).

Časně BR-reprimované geny jsou zřejmě přímým cílem BZR1 a pozdní BR-responzivní geny jsou BZR1 regulovány nepřímo. BZR1 může také fungovat jako transkripční aktivátor (He *et al.*, 2005).

BR-indukované geny jsou zřejmě ovlivňovány nepřímo, neboť BZR1-vazebná sekvence u nich není častá. Tyto geny odpovídají na aplikaci brassinosteroidů velice pomalu. BZR1 aktivuje jejich expresi pravděpodobně interakcí s jinými DNA vazebnými proteiny (He *et al.*, 2005).

Je-li koncentrace brassinosteroidů nízká, BZR1 je fosforylován BIN2 kinázou a degradován proteázami (He *et al.*, 2002). Nedostatek BZR1 umožní expresi biosyntetických genů a zvýší se hladina brassinosteroidů. Při vysoké hladině brassinosteroidů jsou BRI1 a BAK1 aktivovány, což vede k defosforylaci BZR1 inhibicí BIN2 kinázy nebo aktivací BSU1 fosfatázy nebo obojího (Li, 2003, Mora-Garcia *et al.*, 2004, Wang and He, 2004). BZR1 se váže na promotor a inhibuje expresi biosyntetických genů a redukuje tak hladinu brassinosteroidů (Obr. 7).

#### 6.4. Regulace přenosu signálu

Přenos signálu pomocí BRI1 je negativně regulován BKI1. V nepřítomnosti brassinosteroidů se váže na kinázovou doménu BRI1 homodimeru a brání dimerizaci BRI1 na BAK1. Po navázání brassinosteroidu na extracelulární doménu BRI1 se BRI1 aktivuje, odpoutá se od BKI1 a může se vázat s BAK1 (Wang and Chory, 2006) (Obr.7).

Na BRI1 se může také vázat BRS1, která aktivuje steroid-vazebné proteiny. Komplex BR/BR-vazebný protein vazbou na extracelulární doménu BRI1 spouští buněčnou odpověď. Aktivace BRI1 ligandem může být limitujícím faktorem (Li *et al.*, 2001).

Dalším negativním regulátorem je TTL. Mechanismus inhibice není znám. Eliminace TTL může částečně nahradit redukovanou aktivitu BRI1 způsobenou inhibicí biosyntézy brassinosteroidů (Nam and Li, 2004).

Intracelulární přenos signálu je také negativně regulován kinázou BIN2, jednou z deseti GSK3 kináz u *Arabidopsis* (Li and Nam, 2002), která fosforyluje BES1 a BZR1 pro proteazómem zprostředkovanou degradaci. Ošetření brassinosteroidy vede k rychlé akumulaci defosforylovaných forem BES1 a BZR1 se současným zmizením fosforylovaných forem (Yin *et al.*, 2002), díky inhibici BIN2. Fosfatáza BSU1 defosforyluje BES1 v jádře (Mora-Garcia *et al.*, 2004) (Obr. 7).

### 7. Signalizace - geny a mutanty

Jedním z přístupů ke studiu signální funkce brassinosteroidů je využití mutantních rostlin. Stejně jako biosyntetické mutanty i tyto vykazují malý vzrůst, tmavě zelené listy a omezenou plodnost při růstu na světle a deetioloovaný fenotyp při růstu ve tmě. Tyto mutanty mají hladinu brassinosteroidů stejnou jako divoký typ a na exogenní brassinosteroidy nereagují. Jsou to tzv. BR-insenzitivní mutanty (Clouse *et al.*, 1996, Kauschmann *et al.*, 1996).

#### 7.1. Geny brassinosteroid insensitive 1 (*bri1*), *curl (cu)* a *lka*

Gen *bri1* obsahuje jeden otevřený čtecí rámeček bez intronů. Tvoří jej 3 588 párů bází a kóduje transmembránovou receptorovou kinázu o tvořenou 1 196 aminokyselinami (Li and Chory, 1997).

Všechny *bri1* alely obsahují recesivní mutace ztráty funkce (Friedrichsen and Chory, 2001). Li a Chory popsali čtyři mutantní alely v kinázové doméně a jednu v extracelulární doméně (Li and Chory, 1997). *Bri1* mutanty defektní v kinázové doméně jsou schopny vázat brassinolid (Wang *et al.*, 2001).

Fenotyp *bril* mutant (Nam and Li, 2002) s mutací na extracelulární i kinázové doméně je obnovován zvýšenou expresí *bak1* (Clouse, 2002, Li, 2003), zvýšená exprese *brs1* potlačuje mutaci na extracelulární doméně, ale ne na intracelulární (Nam and Li, 2002). *Bril* mutanta je blokována také mutantou *bes1-D* (Yin *et al.*, 2002).

*Lka* je homologem u hrachu (Nomura *et al.*, 1997), u rajčete je homologem *curl* (*cu*) (Koka *et al.*, 2000). Alelou *cu* je altered brassinolide sensitivity1 (*abs1*). Montoya s kolegy zjistil, že *cu-3* je mutanta nonsense a *abs1* je mutanta missense (Montoya *et al.*, 2002).

### 7.2. Gen BRI1-associated receptor kinase 1 (*bak1*)

Gen *bak1* v 11 exonech kóduje LRR-RLK lišící se od proteinu BRI1 v 615 aminokyselinách.

*Bak1* mutanty mají sníženou citlivost k brassinosteroidům. *Bak1* mutace vede k fenotypu *bril* (Nam and Li, 2002). Zvýšená exprese *bak1* potlačuje *bril*. Mutanty *bak1-1D* mají zvýšenou expresi genu *bak1* a jejich stonky, listy a řapíky jsou delší než u divokého typu (Li *et al.*, 2002).

### 7.3. Gen BAK1-like1 (*bkk1*)

Gen *bkk1* kóduje kinázu patřící do stejné rodiny jako BAK1 (Hecht *et al.*, 2001, He *et al.*, 2007). Ve tmě je méně exprimován než *bril* a *bak1*. Zvýšená exprese *bkk1* potlačuje fenotyp *bril-5* (He *et al.*, 2007).

### 7.4. Gen brassinosteroid-insensitive2 (*bin2*)

Gen *bin2* obsahuje 10 exonů. Kóduje GSK3 (Li a Nam, 2002).

*Bin2* alely jsou semidominantní, *bin2* tedy zřejmě ovlivňuje signalizaci negativně. Zvýšená exprese *bin2* inhibuje přenos signálu, zatímco redukovaná exprese potlačuje *bril* alelu (Vert and Chory, 2006).

Mutanty *bin2* mají mnoho fenotypů podobných *bril* mutantám. Jsou rezistentní vůči brassinazolu (Vert and Chory, 2006), insenzitivní k brassinolidu, ale hypersenzitivní ke kyselině abscisové. Bylo nalezeno 20 alel tohoto genu, pouze mutanta *bin2-1* je schopná produkovat semena, ostatních 19 alel způsobuje u mutant plnou sterilitu (Li and Chory, 1997).

Mutantní alela *bin2-1* kóduje hypersenzitivní kinázu, BZR1 a BES1 jsou hyperfosforylovány a akumulovány v nízké koncentraci (He *et al.*, 2002, Yin *et al.*, 2002).

Fenotyp *bin2* je potlačen mutantou *bes1-D* (Yin *et al.*, 2002).

### 7.5. Brassinazole-resistant 1 (*bzr1*)

Gen *bzr1* kóduje protein nutný pro přenos signálu do jádra (Wang *et al.*, 2002).

Dominantní *bzr1-1D* mutace zvyšuje akumulaci BZR1, potlačuje fenotypy mutant *bril* a *bin2* a zpřičiňuje necitlivost k brassinazolu a brassinopridu a hypersenzitivitu k brassinolidu. To vše ukazuje na pozitivní roli BZR1 v signalizaci. Studie na *bzr1-1D* mutantě ukázaly, že BZR1 je potřebný při regulaci růstu i zpětnovazebné regulaci biosyntézy brassinosteroidů (Wang *et al.*, 2002, He *et al.*, 2005, Ryu *et al.*, 2007, Gendron *et al.*, 2008).

Při růstu na světle mají *bzr1-1D* mutanty redukovanou expresi genu *cpd*. *Bzr1-1D* rostoucí na světle se jeví jako BR-deficientní a insenzitivní mutanty, naopak *bzr1-1D* rostoucí ve tmě mají zvýšenou elongaci buněk. To ukazuje na regulaci proteinu BZR1 světlem. Světlo mění BZR1 z pozitivního na negativní regulátor přenosu signálu nebo mění jeho účast na zpětnovazebné inhibici biosyntézy brassinosteroidů (Wang *et al.*, 2002).

Fenotyp *bzr1-D* je potlačen zvýšenou expresí *dwf4* (He *et al.*, 2005).

### 7.6. Gen BRI1-EMS-suppressor 1 (*bes1*)

Gen *bes1* kóduje protein příbuzný BZR1 nutný pro přenos signálu do jádra (Yin *et al.*, 2002).

U mutanty *bes1-1D* se akumuluje velké množství fosforylované i defosforylované BES1, ale po ošetření brassinolidem fosforylovaná forma mizí. *Bes1-1D* je resistentní vůči brassinazolu a brassinopridu (Yin *et al.*, 2002, Mora-Garcia *et al.*, 2004, Gendron *et al.*, 2008).

### 7.7. Gen transthyretin like protein (*ttl*)

Gen *ttl* kóduje cytosolický protein asociovaný s plazmatickou membránou, který je substrátem pro BRI1. Exprese *ttl* ale není regulována steroidy .

Transgenní rostliny se zvýšenou expresí *ttl* mají kulatější listové růžice s kratšími řapíky (Nam and Li, 2004), fenotyp podobný je mutantám *bak1* (Li *et al.*, 2002, Nam and Li., 2002).

### 7.8. Gen BRI1-suppressor 1 (*brs1*)

Gen *brs1* obsahuje 9 exonů. Kóduje sekretovanou serinkarboxypeptidázu (Li *et al.*, 2001).

Mutanta *brs1-1D* inhibuje dvě *bril* mutace (*bril-5* a *bril-9*) na extracelulární doméně, ale na mutace na kinázové doméně (*bril-1*) nemá vliv. V divokém typu zvýšená exprese nezpůsobuje žádné fenotypové změny. Je však nutná přítomnost brassinosteroidů a funkční BRI1 kinázové domény (Li *et al.*, 2001, Pereira-Netto, 2007).

### 7.9. Gen BRI1 suppressor 1 (*bsul*)

Gen *bsul* je tvořen 22 exony s více než 5290 pb. Kóduje funkční Ser/Thr fosfatázu (Mora-Garcia *et al.*, 2004).

*Bsul-1D* potlačuje účinky *bril* a *bin2* mutanty akumulací defosforylovaného BES1 proteinu. Má sníženou koncentraci *cpd* mRNA (Mora-Garcia *et al.*, 2004).

### 7.10. Gen *bril-5* enhanced (*ben1*)

Gen *ben1* se skládá ze 4 exonů. Kóduje protein o velikosti 365 aminokyselin. Zvýšená exprese *ben1* způsobuje redukci hladiny brassinosteroidů (Yuan *et al.*, 2007).

Zvýšená exprese *ben1* v *bril-5* mutantě zvyšuje defektní fenotyp. Listové čepele dvojitě mutanty *bril-5 ben1-1D* jsou menší a kudrnatější než u *bril-5*. Výška rostliny a šířka listové růžice dosahuje jen 50 % velikosti u mutanty *bril-5*. Produkce semen je také snížena na 50 %.

Mutanta *ben1-1D* má kratší květenství a redukovanou listovou růžici, kultaté listy s kratšími řapíky. Šířka listů je větší než u divokého typu. Redukovaný fenotyp může být způsoben redukcí hladiny endogenních brassinosteroidů.

*Ben1-1* mutanty mají delší květenství, listy a řapíky než divoký typ (Yuan *et al.*, 2007).

## 8. Závěr

V posledních letech se brassinosteroidy staly velmi oblíbeným námětem studia díky širokému spektru působení na rostliny. Hlavním aspektem, proč je výzkum brassinosteroidů tak aktuální, je jejich působení na zvýšení výnosu a obrana proti stresovým faktorům bez negativního vlivu na přírodu a tím možné praktické využití v zemědělství.

Pro plné pochopení důležitosti a uplatnění brassinosteroidů bude třeba doplnit mezery v našich znalostech. I přes intenzivní výzkum stále zůstává mnoho nevyjasněno. Další výzkum je důležitý v oblastech mechanismu přenosu signálu a regulace genové exprese.

Brassinosteroidy bych se dále chtěla zabývat v diplomové práci. Ta bude zaměřena na studium vlivu brassinosteroidů na stres suchem u kukuřice (*Zea mays*) a bobu (*Vicia faba*).

## 9. Seznam použité literatury

Abe, H., Honjo, C., Kyokawa, Y., Asakawa, S., Natsume, M., Narushima, M. (1994): 3-oxoteasterone and the epimerization of teasterone: Identification in lily anthers and *Distylium racemosum* leaves and its biotransformation into typhasterol, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58: 986-989.

Antonchick, A. P., Schneider, B., Zhabinskii, V. N., Konstantinova, O. V., Khripach, V. A. (2003): Biosynthesis of 2,3-epoxybrassinosteroids in seedlings of *Secale cereale*, *Phytochemistry* 63: 771-776.

Bai, M.-Y., Zhang, L.-Y., Gampala, S. S., Zhu, S.-W., Song, W.-Y., Chong, K., Wang, Z.-Y. (2007): Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 13839-13844.

Bajguz, A. (2007): Metabolism of brassinosteroids in plants, *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 95-107.

Benson, M. D., Uemichi, T. (1996): Transthyretin amyloidosis amyloid, *International Journal of Experimental & Clinical Investigation* 3: 44-58.

Bishop, G. J., Harrison, K., Jones, J. D. G. (1996): The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrom P450 family, *Plant cell* 8: 959-969.

Bishop, G. J., Koncz, C. (2002): Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling, *Plant Cell Supplement* 14: S97-S110.

Bishop, G. J., Nomura, T., Yokota, T., Harrison, K., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Jones, J. D. G., Kamiya, J. (1999): The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 1761-1766.

Clouse, S. D. (2002): Brassinosteroid signal transduction: Clarifying the pathway from ligand perception to gene expression, *Molecular Cell* 10: 973-982.

Clouse, S. D., Langford, M. E., McMorris, T. C. (1996): A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development, *Plant Physiology* 111: 671-678.

Clouse, S. D., Sasse, J. M. (1998): Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development, *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 427-451.

Devic, M., Guillemot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensuade, E., Koornneef, M., Pelletier, G., Delseny, M. (1999): The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development, *Plant Journal* 19: 387-398.

Ehsan, H., Ray, W. K., Phinney, B., Wang, X., Huber, S. C., Clouse, S. D. (2005): Interaction of *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF- $\beta$  receptor interacting protein, *Plant Journal* 43: 251-261.



- Eneqvist, T., Lundberg, E., Nilsson, L., Abagyan, R., Sauer-Eriksson, A. E. (2003): The transthyretin-related protein family, *European Journal of Biochemistry* 270: 518-532.
- Feldmann, K. A. (1991): T DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Mutational spectrum, *Plant Journal* 1: 71-82.
- Friedrichsen, D. M., Chory, J. (2001): Steroid signaling in plants: from the cell surface to the nucleus, *Bioessays* 23: 1028-1036.
- Fujioka, S., Noguchi, T., Watanabe, T., Takatsuto, S., Yoshida S. (2000): Biosynthesis of brassinosteroids in cultures cells of *Catharanthus roseus*, *Phytochemistry* 53: 549-553.
- Fujioka, S. (1999): Natural occurrence of brassinosteroids in the Plant Kingdom, In *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*, pp. 21-45. Eds Sakurai, A., Yokota T. and Clouse, S. D. Springer-Verlag, Tokyo.
- Fujioka, S., Choi, Y.-H., Takatsuto, S., Yokota, T., Li, J., Chory J., Sakurai, A. (1996): Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, typhasterol and 6-deoxytyphasterol from the shoots of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiology* 37: 1201-1203.
- Fujioka, S., Inoue, T., Takatsuto, S., Yanagisawa, T., Yokota, T., Sakurai, A. (1995): Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of *Catharanthus roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59: 1543-1547.
- Fujioka, S., Li, J., Choi, Y.-H., Seto, H., Takatsuto, S., Noguchi, T., Watanabe, T., Kuriyama, H., Yokota, T., Chory, J., Sakurai, A. (1997): The *Arabidopsis* *deetiolated2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Cell* 9: 1951-1962.
- Fujioka, S., Noguchi, T., Yokota, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. (1998): Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry* 48:595-599.
- Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S. (2002): An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway, *Plant Physiology* 130: 930-939.
- Gampala, S. S., Kim, T.-W., He, J.-X., Tang, W., Deng, Z., Bai, M.-Y., Guan, S., Lalonde, S., Sun, Y., Gendron, J. M., Chen, H., Shibagaki, N., Ferl, R. J., Ehrhardt, D., Chong, K., Burlingame, A. L., Wang, Z.-Y. (2007): An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*, *Development of Cell* 13: 177-189.
- Geldner, N., Hyman, D. L., Wang, X., Schumacher, K., Chory, J. (2007): Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1, *Genes Development* 21: 1598-1602.
- Gendron, J. M., Haque, A., Gendron, N., Chang, T., Asami, T., Wang, Z.-Y. (2008): Chemical genetic dissection of brassinosteroid-ethylene interaction, *Molecular Plant* 1: 368-379.
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., Yoshida, S. (2002): Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 130: 1319-1334.
- Griffiths, P. G., Sasse, J. M., Yokota, T., Cameron, D. W. (1995): 6-deoxytyphasterol and 3-

- dehydro-6-deoxocasterone, possible precursors to brassinosteroids in pollen of *Cupressus arizonica*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59: 956-959.
- Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen Jr, J. D., Steffens, G. L., Flippen-Anderson, J. L., Cook Jr, J. C. (1979): Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, *Nature* 281: 216-217.
- He, J. X., Gendron, J. M., Yang, Y., Li, J., Wang, Z. Y. (2002): The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 10185-90.
- He, J.-X., Gendron, J. M., Sun, Y., Gampala, S. S. L., Gendron, N., Sun, C. Q., Wang, Z.-Y (2005): BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses, *Science* 307: 1634-1938.
- He, K., Gou, X., Yuan, T., Lin, H., Asami, T., Yoshida, S., Russell, S. D., Li, J. (2007): BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways, *Current Biology* 17: 1109-1115.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U., de Vries, S. C. (2001): The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture, *Plant Physiology* 127: 803-816.
- Holton, N., Caño-Delago, A., Harrison, K., Montoya, T., Chory, J., Bishop, G. J. (2007): Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signaling, *Plant Cell* 19: 1709-1717.
- Choe, A., Dilkes, B. P., Gregory, B. D., Ross, A. S., Yuan, H., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F. E., Feldmann, K. A. (1999): The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Physiology* 119: 897-907.
- Choe, S., Dilkes, B. P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., Feldmann K. A. (1998): The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Cell* 10: 231-243.
- Choi, Y.-H., Fujioka, S., Harada, A., Yokota, T., Takatsuto, S., Sakurai, A. (1996): A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocasterone, *Phytochemistry* 44: 593-596.
- Choi, Y.-H., Fujioka, S., Nomura, T., Harada, A., Yokota, T., Takatsuto, S., Sakurai, A. (1997): An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation, *Phytochemistry* 44: 609-613.
- Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoort, J., de Vries, S. (2006): The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 Protein complex includes brassinosteroid-insensitive 1, *The Plant Cell* 18: 626-638.
- Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L., Altmann, T. (1996):

- Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development, *Plant Journal* 9: 701-713.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Omar, S. A., Mengiste, T., Betsuyaku, S., Parker, J. E., Mussig C., Thomma, B. P. H. J., Albrecht, C., de Vries, S. C., Hirt, H., Nürnberger, T. (2007): The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control, *Current Biology* 17: 1116-1122.
- Kim, G. Y., Fujioka, S., Kozuka, T., Tax, F. E., Takatsuto, S., Yoshida, S., Tsukaya, H. (2005): CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal* 41: 710-721.
- Kim, S.-K. (1991): Citováno podle Sakurai, A., Yokota, T., Clouse S. D. (Eds.) (1999): *Brassinosteroids: Steroidal plant hormones*, Springer-Verlag, Tokyo.
- Kinoshita, T., Caño-Delago, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J. (2005): Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1, *Nature* 433: 167-170.
- Klahre, U., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yokota, T., Nomura., T., Yoshida, S., Chua, N.-H. (1998): The *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis, *The Plant Cell* 10: 1677-1690.
- Koka, C. V., Cerny, R. E., Gardner, R. G., Noguchi, T., Fujioka S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Clouse, S. D. (2000): A putative role for the tomato genes, DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response, *Plant Physiology* 122: 85-98.
- Kwezi, L., Meier, S., Mungur, L., Ruzvidzo, O., Irving, H., Gehring, C. (2007): The *Arabidopsis thaliana* brassinosteroid receptor (AtBRI1) contains a domain that functions as a guanylyl cyclase in vitro, *PLoS One* 2: e449.
- Li, J. (2003): Brassinosteroids signal through two receptor-like kinases, *Current Opinion in Plant Biology* 6: 1494-499.
- Li, J., Chory, J. (1997): A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction, *Cell* 90: 929-938.
- Li, J., Jin, H. (2006): Regulation of brassinosteroid signaling, *Trends in Plant Science* 12: 37-41.
- Li, J., Lease, K. A., Tax, F. E., Walker, J. C. (2001) : BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 5916-5921.
- Li, J., Nam, K. H. (2002): Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase, *Science* 295: 1299-1301.
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., Walker, J. C. (2002): BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling, *Cell* 110: 213-222.

- Mandava, N. B. (1988): Plant growth-promoting brassinosteroids, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 23-52.
- Massagué, J. (1998): TGF-beta signal transduction, *Annual Review of Biochemistry* 67: 753-791.
- Mathur, J., Molnár, G., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., Yokota, T., Adam, G., Voigt, B., Nagy, F., Maas, C., Schell, J., Koncz, C., Szekeres, M. (1998): Transcription of Arabidopsis CPD gene, encoding a steroidogenic P450, is negatively controlled by brassinosteroids, *Plant Journal* 14: 593-60.
- Mitchell, J. W., Mandava, N., Worley, J. F., Plimmer, J. R., Smith, M. V. (1970): Brassins – a new family of plant hormones from rape pollen, *Nature* 225: 1065-1066.
- Montoya, T., Nomura, T., Farrar, K., Kaneta, T., Yokota, T., Bishop, G. J. (2002): Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling, *Plant Cell* 14: 3163-3176.
- Mora-García, S., Vert, G., Yin, Y., Caño-Delago, A., Cheong, H., Chory, J. (2004): Nuclear protein phosphatase with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis, *Genes Development* 18: 448-460.
- Mori, M., Nomura, T., Ooka, H., Ishizaka M., Yokota T., Sugimoto K., Okabe K., Kajiwara H., Satoh K., Yamamoto K., Hirochika H., Kikuchi S. (2002): Isolation and characterization of a rice dwarf mutant with defect in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Physiology* 130: 1152-1161.
- Mussig, C., Fischer, S., Altmann, T. (2002): Brassinosteroid-regulated gene expression, *Plant Physiology* 129: 1241-1251.
- Nam, K. H., Li, J. (2002): BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling, *Cell* 110: 203-212.
- Nam, K. H., Li, J. (2004): The Arabidopsis transthyretin-like protein is a potential substrate of brassinosteroid-insensitive 1, *The Plant Cell* 16: 2406-2417.
- Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Tax, F. E., Yoshida, S., Feldmann, K. A. (2000): Biosynthetic pathway of brassinolide in Arabidopsis, *Plant Physiology* 124: 201-209.
- Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., Yoshida, S., Li, J., Chory, J. (1999): Arabidopsis det2 is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-en-3-on to (24R)-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-on in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Physiology* 120: 833-839.
- Nomura, T., Jager, C. E., Kitasaka, Y., Takeuchi, K., Fukami, M., Yoneyama, K., Matsushita, Y., Nyunoya, H., Takatsuto, S., Fujioka, S., Smith, J. J., Kerckhoffs, L. H. J., Reid, J. B., Yokota, T. (2004): Brassinosteroid deficiency due to truncated steroid 5 $\alpha$ -reductase causes dwarfism in the *lk* mutant of pea, *Plant Physiology* 135: 2220-2229.
- Nomura, T., Nakayama, M., Reid, J. B., Takeuchi, Y., Yokota, T. (1997): Blockage of brassinosteroid biosynthesis and sensitivity causes dwarfism in garden pea, *Plant Physiology* 113: 31-37.

- Pereira-Netto, A. B. (2007): Genes involved in brassinosteroid's metabolism and signal transduction pathways, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 605-618.
- Russinova, E., Borst, J.-W., Kwaaitaal, M., Caño-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., de Vries, S. C. (2004): Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3(BAK1), *The Plant Cell* 16: 3216-3229.
- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S., Hwang, I. (2007): Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling, *The Plant Cell* 19: 2749-2762.
- Sakurai, A., Fujioka, S. (1993): The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids, *Plant Growth Regulation* 13: 147-159.
- Sakurai, A., Yokota, T., Clouse S. D. (Eds.) (1999): *Brassinosteroids: Steroidal plant hormones*, Springer-Verlag, Tokyo.
- Shimada, S., Takahashi, K., Sato, Y., Sakuta, M. (2004): Dihydroflavonol 4-reductase cDNA from non-anthocyanin-producing species in the Caryophyllales, *Plant Cell Physiology* 45: 1290-1298.
- Schlessinger, J. (2000): Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 103: 211-225.
- Schulz, L., Kerckhoffs, L. H., Klahre, U., Yokota, T., Reid, J. B. (2001): Molecular characterization of the brassinosteroid-deficient lkb mutant in pea, *Plant Molecular Biology* 47: 491-498.
- Schumacher, K., Chory, J. (2000): Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors, *Current Opinion in Plant Biology* 3: 79-84.
- Sorkin, A., von Zastrow, M. (2002): Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 600-614.
- Suzuki, H., Inoue, T., Fujioka, S., Saito, T., Takatsuto, S., Yokota, T., Murofushi, N., Yanagisawa, T., Sakurai, A. (1995): Conversion of 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholestanol, a putative intermediate of the biosynthesis of brassinosteroids, in cultured cells of *Catharanthus roseus*, *Phytochemistry* 40: 1391-1397.
- Szekerés, M., Németh, K., Koncz-Kálman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Redei, G. P., Nagy, F., Schell, J., Koncz, C. (1996): Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis, *Cell* 85: 171-182.
- Takahashi, T., Gasch, A., Nishizawa, N., Chua, N. H. (1995): The DIMINUTO gene in Arabidopsis is involved in regulating cell elongation, *Genes and Development* 9: 97-107.
- Takatsuto, S., Kuriama, H., Noguchi, T., Suganuma, H., Fujioka, S., Sakurai, A. (1997): Synthesis of castasterone and its related putative intermediates in brassinolide biosynthesis, *Journal of Chemical Research (S)*: 418-419.

Takatsuto, S., Kosuga, N., Abe, B., Noguchi, T., Fujioka, S., Yokota, T. (1999): Occurrence of potential brassinosteroid precursor steroids in seeds of wheat and foxtail millet, *Journal of Plant Research* 112: 27-33.

Takatsuto, S., Kawashima, T. (1998): Citováno podle Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., Yoshida, S., Li, J., Chory, J. (1999): *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-en-3-on to (24R)-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-on in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Physiology* 120: 833-839.

Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Quail, P. H. (2003): The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family, *Plant Cell* 15: 1749-1770.

Vert, G., Nemhauser, J. L., Geldner, N., Hong, F., Chory, J. (2005): Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 177-201.

Vert, G., Chory, J. (2006): Downstream nuclear events in brassinosteroid signaling, *Nature* 441: 96-100.

Wang, X., Goshe, M. B., Soderblom, E. J., Phinney B. S., Kuchar, J. A., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, S. C., Clouse, S. D. (2005): Identification and functional analysis of *in vivo* phosphorylation sites of the *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive 1 receptor kinase, *The Plant Cell* 17: 1685-1703.

Wang, Z.-Y., He, J. X. (2004): Brassinosteroid signal transduction – choices of signals and receptors, *Trends Plant Science* 9: 91-96.

Wang, X., Chory, J. (2006): Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane, *Science* 313: 1118-1122.

Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. (2002): Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis, *Development of Cell* 2: 505-513.

Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J. (2001): BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids, *Nature* 410: 380-383.

Watanabe, T., Yokota, T., Shibata, K., Nomura, T., Seto, H., Takatsuto, S. (2000): Cryptolide, a new brassinolide catabolite with 23-oxo group from Japanese cedar pollen/anther and its synthesis, *Journal of Chemical Research* 2000: 18-19.

Yamada, J., Morisaki, M., Iwai, K., *et al.* (1997): Citováno podle Sakurai, A., Yokota, T., Clouse S. D. (Eds.) (1999): *Brassinosteroids: Steroidal plant hormones*, Springer-Verlag, Tokyo.

Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. (2005): A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*, *Cell* 120: 249-259.

Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-García, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. (2002): BES1

accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation, *Cell* 109: 181-191.

Yokota, T. (1997): The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids, *Trends in Plant Science* 2: 137-143.

Yokota, T. (1999): The history of brassinosteroids: discovery to isolation of biosynthesis and signal transduction mutants. In: *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones* (Sakurai, A., Yokota, T. and Clouse, S. D., Eds.), Springer-Verlag, Tokyo: 1-20.

Yokota, T. Arima, M., Takahashi, N. (1982): Castasteron, a new phytosterol with plant-hormone potency from chestnut insect gall, *Tetrahedron Letters* 23: 1275-1278.

Yokota, T., Ogino, Y., Takahashi, N., Saimoto, H., Fujioka, S., Sakurai, A. (1990): Brassinolide is biosynthesized from castasterone in *Catharanthus roseus* crown gall cells, *Agricultural and Biological Chemistry* 54: 1107-1108.

Yuan, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Matsumoto, S., Gou, X., He, K., Russell, S. D., Li, J. (2007): BEN1, a gene encoding a dihydroflavonol 4-reductase (DFR)-like protein, regulates the levels of brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal* 51: 220-233.

Zhao, J., Peng, P., Schimtz, R. J., Decker, A. D., Tax, F. E., Li, J. (2002): Two putative BIN2 substrate are nuclear components of brassinosteroid signaling, *Plant Physiology* 130: 1221-1229.