

PROTEASOMALNA DEGRADACJA SPECYFICZNYCH BIAŁEK JAKO KLUCZOWY MECHANIZM REGULACJI PROCESÓW ŻYCIOWYCH W NASIONACH

PROTEASOMAL DEGRADATION OF SPECIFIC PROTEINS AS A KEY REGULATORY MECHANISM OF LIFE PROCESSES IN SEEDS

Marlena STAWSKA, Krystyna ORACZ

Katedra Fizjologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie: Utrzymanie homeostazy w komórkach żywych organizmów eukariotycznych zależy od ilości oraz aktywności wielu różnych białek, które są regulowane na poziomie transkrypcji, translacji, modyfikacji potranslacyjnych, a także od efektywności ich proteolizy. Istotną rolę w degradacji specyficznych białek uczestniczących w regulacji wielu procesów życiowych roślin, odgrywają katalityczne kompleksy proteaz, zwane proteasomami 26S i 20S. Proteoliza z udziałem tego pierwszego, wymaga zaangażowania różnego rodzaju enzymów, tworzących wspólnie szlak ubikwitynowo-proteasomalny (ang. *Ubiquitin-Proteasome Pathway*, UPP). Białka enzymatyczne uczestniczące w UPP odpowiadają za rozpoznawanie protein przeznaczonych do degradacji oraz przyłączanie do nich cząsteczek ubikwityny (peptyd złożony z 76 reszt aminokwasowych, Ub), umożliwiając tym samym ich proteolizę. Natomiast, rozkład białek przez 20S jest ubikwitynowo niezależny. Na drodze proteasomalnej usuwane są białka uszkodzone, ale również te o właściwej budowie, jak np.: enzymy szlaków biosyntetycznych regulujące funkcjonowanie komórek, białka modulujące przebieg cyklu komórkowego, czynniki transkrypcyjne, itp. W niniejszej pracy omówiono najnowsze odkrycia dotyczące roli i mechanizmu działania proteasomów w biologii nasion. Podano przykłady wybranych, niedawno poznanych, białkowych elementów hormonalnych szlaków sygnałowych, które ulegają degradacji proteasomalnej i pełnią istotne funkcje w biologii nasion. Zaprezentowano dowody potwierdzające, iż wśród specyficznych białek rozkładanych przez proteasom 26S, o istotnym znaczeniu w biologii nasion, występują między innymi: czynniki transkrypcyjne regulujące odpowiedź na kwas absycynowy (ABA), takie jak ABI; białka DELLA biorące udział w regulacji sygnału indukowanego przez gibereliny (GA); a także czynniki regulatorowe Aux/IAA uczestniczące w szlaku sygnałowym auksyn (IAA) oraz wiele innych. Ponadto, przedstawiono prekursorskie wyniki badań wskazujące, iż mechanizm regulacji procesów przebiegających w nasionach, jest również związany ze zmianami w metabolizmie reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS) oraz degradacją specyficznych, karbonylowanych białek przez kompleks 20S. Dane zawarte w tej pracy przeglądowej podkreślają rolę proteasomów, jako kluczowych elementów wpływających na zależne od sygnałów hormonalnych i ROS procesy zachodzące w nasionach.

Słowa kluczowe: hormony roślinne, kiełkowanie, nasiona, proteasomalna degradacja białek, reaktywne formy tlenu

Summary: The maintenance of homeostasis in living eukaryotic cells depends on the amount and activity of many different proteins, which are regulated at the level of transcription, translation, post-translational modifications and also depends on the efficiency of their proteolysis. A crucial role in degradation of specific proteins involved in regulation of many life processes in plants, play catalytic complexes of proteases defined as 26S and 20S proteasomes. Proteolysis performed by the first one requires the involvement of various types of enzymes, which together form ubiquitin-proteasome pathway (UPP). The enzymatic proteins of UPP are responsible for identification of proteins assigned to degradation and for their conjugation with ubiquitin molecules (peptide consisting of 76 amino acid residues, Ub), thus allowing proteolysis. Whereas, the degradation of proteins by 20S is Ub independent. Proteasomes degrade damaged proteins, but also these of the proper construction, i.e.: enzymes of biosynthetic pathways involved in regulation of cells functioning, proteins modulating cell cycle, transcription factors, etc. In this particular paper, the latest findings about the role and mechanism of action of the proteasome in seeds biology are discussed. The examples of recently identified, specific protein components of hormonal signaling pathways, which are degraded *via* proteasome 26S and play important roles in seeds, are described. It is presented that among specific proteins cleaved by the 26S proteasome, important for biology of seeds are: transcription factors regulating response to abscisic acid (ABA), such as ABI; DELLA proteins involved in the regulation of signal induced by gibberellin (GA); as well as Aux/IAA regulatory factors involved in signaling pathway of auxin (IAA) and many others. In addition, the pioneering data presented herein indicate that regulatory mechanisms of seed related events are also associated with changes in the metabolism of reactive oxygen 61 species (ROS) and degradation of specific, carbonylated proteins by 20S complex. Data described in this review emphasize the role of proteasomes, as key elements modulating hormonal and ROS dependent processes occurring in seeds.

Key words: germination, plant hormones, proteasomal protein degradation, reactive oxygen species, seeds

WSTĘP

Życie organizmów roślinnych zależy od wielu skoordynowanych procesów fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych, prowadzących do biosyntezy i/ lub degradacji różnych składników komórkowych, specyficznych dla określonych struktur. Poszczególne fazy rozwojowe roślin charakteryzują się swoistym profilem białkowym, kluczowym dla prawidłowego przebiegu poszczególnych procesów życiowych i zachowania homeostazy komórkowej [30, 42, 66]. W komórkach roślinnych występuje szereg różnego rodzaju enzymów proteolitycznych, które działając w odpowiednich kompartmentach komórkowych, przeprowadzają reakcje całkowitej hydrolizy białek, regulując tym samym skład i ilość proteomu [25, 43]. Szczególnymi formami proteaz są proteasomy 26S i 20S – wielkocząsteczkowe, katalityczne kompleksy białkowe, zidentyfikowane na przełomie lat 70/80-tych [67, 75]. Wykazano, iż proteasom 20S jest zdolny działać samodzielnie, jak również może stanowić rdzeń proteasomu 26S, a elementem różnicującym te dwie struktury jest tzw. proteasom 19S, pełniący funkcję regulatorową w kompleksie 26S (ryc. 1). Ponadto, proteasom 26S współdziała z różnego rodzaju enzymami, tworząc tzw. szlak ubikwitynowo-proteasomalny (ang. *Ubiquitin-Proteasome Pathway*, UPP) [67].

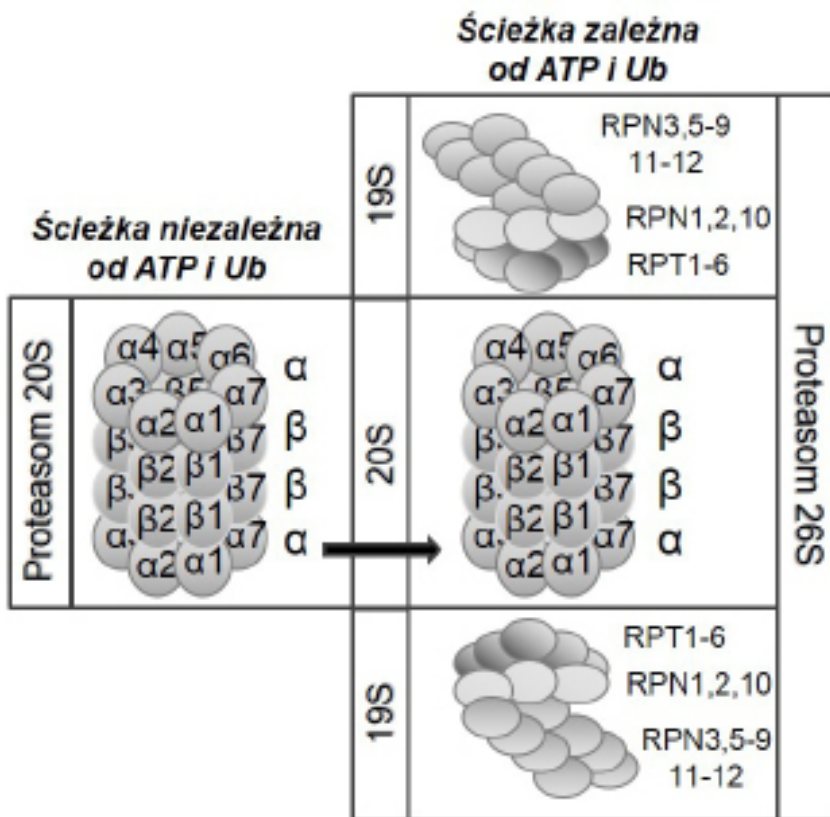
Coraz większa liczba danych literaturowych potwierdza niezwykle istotne znaczenie utrzymania odpowiednich proporcji pomiędzy syntezą a degradacją specyficznych białek w życiu organizmów roślinnych [23, 64, 74]. W komórkach intensywnie rosnących, więcej białek jest syntetyzowanych niż degradowanych. Z kolei odwrotna sytuacja ma miejsce np. w komórkach starzejących się, gdzie reakcje kataboliczne przeważają nad anabolicznymi [45]. Stosunkowo niedawno pojawiły się dowody na to, że w procesie kiełkowania nasion, na który składa się szereg skomplikowanych przemian metabolicznych, prowadzących do aktywacji zarodka i wzrostu elongacyjnego jego komórek, UPP pełni ważną regulatorową rolę. Sugeruje się również, iż spoczynek nasion, który definiuje się jako stan czasowej niezdolności do kiełkowania, nawet w odpowiednich warunkach środowiska, jest najprawdopodobniej regulowany przez proteasom 20S [11, 48].

Rola i mechanizm działania hormonów i innych, niehormonalnych regulatorów wzrostu w cyklu życiowym roślin i nasion, zostały już dość dobrze poznane i opisane [9, 41, 48, 50, 51, 52, 65, 71]. Pojawiają się także kolejne dowody potwierdzające, że proteasomy mogą być ważnymi elementami łączącymi i modulującymi nadal niezrozumiałą sieć interakcji ścieżek metabolicznych i sygnałowych, warunkującymi zachowanie homeostazy żywych organizmów. Istnieje jednak potrzeba przedstawienia aktualnych informacji dotyczących znaczenia proteasomalnej degradacji specyficznych białek, wpływającej na zależne od sygnałów hormonalnych i ROS procesy zachodzące w nasionach.

BUDOWA PROTEASOMÓW 26S I 20S ORAZ MECHANIZM ICH DZIAŁANIA W PROCESIE DEGRADACJI BIAŁEK

Wielkocząsteczkowe kompleksy białkowe, zwane proteasomami 26S i 20S, występujące we wszystkich komórkach eukariotycznych, hydrolizują wiązania peptydowe w wielu rodzajach białek regulatorowych, enzymatycznych i strukturalnych. W kompleksie 26S, z jednej lub po obydwu skrajnych stronach baryłkowatego korpusu 20S, znajduje się tzw. proteasom 19S, określane też mianem kompleksu regulatorowego [26] (ryc. 1).

Podkompleks 19S składa się z co najmniej 17 podjednostek, które formują struktury tzw. pokrywy oraz podstawy. Podstawa 19S zbudowana jest z 6 podjednostek wykazujących właściwości ATP-az1-6 (ang. *Regulatory Particle Triple-A ATPases1-6*, RPT1-6), tworzących pierścień oraz z podjednostek RPN1, RPN2 i RPN10 (ang. *Regulatory Particle Non-triple-A ATPases1, 2 i 10*), niebędących ATP-azami [8]. Pokrywa elementu regulatorowego łączy się z podstawą za pomocą podjednostki RPN10 i składa się z kilku-kilkunastu dodatkowych podjednostek RPN, takich jak: RPN3, RPN 5-9, RPN11-12 i innych [8]. Pierścień złożony z podjednostek RPT, dzięki aktywności ATP-azowej umożliwia otwarcie bramki



RYCINA 1. Schemat przedstawiający budowę proteasomów 20S i 26S. Proteasom 20S, struktura przypominający pustą w środku beczkę, składa się z 4 pierścieni: dwóch zbudowanych z 7 podjednostek α (znajdujących się po zewnętrznej stronie) i dwóch składających się z 7 elementów β (ułożonych wewnątrz). Proteasom 20S może funkcjonować samodzielnie, niezależnie od ubiquityny (Ub) i nie wymaga nakładu energii w postaci ATP. Może on również wchodzić w skład proteasomu 26S, w którym z jednej lub po obydwu skrajnych częściach baryłkowatego, centralnie zlokalizowanego korpusu 20S, znajduje się tzw. proteasom 19S. Natomiast, proteasom 19S składa się z podstawy zbudowanej z 6 podjednostek RPT1-6 tworzących pierścien i trzech dodatkowych podjednostek RPN1, 2, 10 oraz z pokrywy zbudowanej z kilku-kilkunastu podjednostek tj.: RPN3, RPN 5-9, RPN 11-12 i innych. W odróżnieniu od proteasomu 20S, kompleks 26S funkcjonuje w sposób zależny od Ub i ATP

FIGURE 1. The scheme presenting structures of 20S and 26S proteasomes. The 20S proteasome, a structure resembling a hollow barrel, consist of four rings: two composed of 7 α subunits (located on the outer side) and two consisting of 7 β elements (arranged internally). The 20S proteasome can function independently from the ubiquitin (Ub) and does not require energy input in the form of ATP. It may also be part of the 26S proteasome, wherein one or both opposite ends of the central complex 20S is located also 19S proteasome. Whereas, the 19S proteasome consists of a base built of six subunits RPT1-6 forming the ring and three additional subunits RPN1, 2, 10 and a cover constructed of several-dozen subunits such as: RPN3, RPN 5-9, RPN 11-12 and others. In contrast to the 20S proteasome, the 26S complex functions in Ub- and ATP-dependent manner

kompleksu 20S, rozwinięcie cząsteczki białka przeznaczonego do degradacji oraz skierowanie go do części proteolitycznej proteasomu. Wszystkie w/w elementy pełnią ściśle określone funkcje: 1) podjednostki RPN10 oraz RPN13 są receptorami cząsteczek Ub, 2) RPN11 uczestniczy w usuwaniu Ub z degradowanych białek, zaś 3) pozostałe podjednostki służą utrzymaniu wewnętrznej struktury, ułatwiają przemieszczanie się białka ku części centralnej kompleksu 20S oraz umożliwiają rozładunek pociętych peptydów [8].

Proteasom 20S składa się z 28 podjednostek uformowanych w 4 przylegające do siebie pierścienie, tworzące razem strukturę pustej w środku beczki. Każdy z tych pierścieni zbudowany jest z 7 elementów, w taki sposób, że dwa wewnętrzne uformowane są z podjednostek β , tworzących miejsca (komory) proteolityczne proteasomu 20S, zaś dwa zewnętrzne składają się z podjednostek α , regulujących przemieszczanie się białek do wnętrza części korowej [35] (ryc. 1). Spośród wszystkich podjednostek tego rodzaju tylko 3 posiadają właściwości proteolityczne: $\beta 1$ – posiada aktywność kaspazopodobną, $\beta 2$ – ma aktywność trypsynopodobną, natomiast $\beta 5$ – charakteryzuje się aktywnością chymotrypsynopodobną. Połączenie tych trzech aktywności umożliwia cięcie i całkowitą degradację szerokiego spektrum białek [76].

Proteoliza z udziałem UPP wymaga nakładu energii w postaci ATP (adenozyno-5'-trifosforan), aby przyłączyć przynajmniej cztery cząsteczki Ub do białka-substratu, natomiast funkcjonowanie proteasomu 20S jest niezależne od ATP i Ub [57]. W cząsteczce Ub występują cztery reszty lizyny, dzięki którym mogą formować się łańcuchy poliubikwitynowe. Wiadomo, że tylko utworzenie łańcucha w połączeniu z lizyną w pozycji 48 Ub kieruje białko do degradacji, zaś monoubikwitynacja białka lub tworzenie łańcuchów poliubikwitynowych, poprzez przyłączenie cząsteczki Ub głównie w pozycji 63 lizyny, stanowi mechanizm regulacyjny [17]. Przyłączenie pojedynczych cząsteczek Ub może wpływać na funkcjonowanie białka [4, 18].

Początkowy etap degradacji białka przez UPP polega na rozpoznaniu białka-substratu i ATP-zależnym przyłączeniu do niego kilku cząsteczek Ub przez trzy współpracujące enzymy: E1 (enzym aktywujący Ub), E2 (enzym koniugujący i przenoszący zaktywowaną Ub) i E3 (ligazę Ub), a następnie na ATP-niezależnej degradacji białek przez proteasom 26S [57]. Liczne analizy genomu *A. thaliana* sugerują, że spośród E1, E2 i E3, ten ostatni jest odpowiedzialny za specyficzność i wydajność działania UPP. W zależności od posiadanego typu domeny rozpoznawczej enzym E2, enzymy E3 dzielą się na dwie podstawowe rodziny: HECT (ang. *Homology to E6-AP Carboxyl-Terminus*) i RING (ang. *Really Interesting New Gene*). W wielopodjednostkowych kompleksach ligaz E3 można wyróżnić kilka białek pełniących określoną funkcję, np.: 1) białka tworzące rusztowanie: CUL1-4 (ang. *Cullin1-4*) lub APC2 (ang. *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome2*), 2) białka zawierające domenę wiążącą dla E2: RBX1 (ang. *Ring Box1*) lub APC11 (ang. *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome11*) oraz 3) cały szereg białek specyficz-

nie rozpoznających substrat: DDB1 (ang. *Damaged DNA Binding Protein1*) zawierające domenę F-box (złożoną z około 50 aminokwasów formujących 3 helisy) lub LRB1 (ang. *Light Response BTB1*) z domeną BTB (ang. *Bric-a-brac/Tramtrack/Broad complex*), APC10 (ang. *Anaphase Promoting Complex10*), CDC20 (ang. *Cell Division Cycle20*) i 4) inne czynniki, takie jak białka łączące CUL1-4 z receptorami substratu, np. ASK (ang. *SKP1-like*). W roślinach najpowszechniej występującym typem kompleksu ligazy jest kompleks SCF składający się z ASK, CUL1, białka z domeną F-box i RBX1. Ze względu na wielką różnorodność substratów ulegających degradacji, rośliny wykształciły liczne specyficzne receptory umożliwiające precyzyjne usuwanie białek przez proteasom 26S, w zależności od etapu rozwojowego czy też warunków środowiska. Natomiast proteasom 20S odpowiada za usuwanie np. białek karbonylowanych, które na drodze oksydacji zmieniają swoją konformację, zwiększając tym samym powinowactwo do proteolitycznego kompleksu 20S [16].

ROLA UPP W REGULACJI TRANSDUKCJI SYGNAŁU INDUKOWANEGO PRZEZ GA I ABA W NASIONACH

Kowalencyjne przyłączenie Ub do specyficznych białek, a następnie ich rozkład przez proteasom 26S jest jednym z kluczowych mechanizmów regulujących transdukcję sygnałów indukowanych przez hormony roślinne, takie jak: gibereliny (GA) i kwas absycynowy (ABA) [58, 72] (ryc. 2). Degradacji proteasomalnej podlegają zarówno negatywne, jak i pozytywne czynniki modulujące szlaki sygnałowe indukowane przez te regulatory. Co więcej, modulowanie gospodarki hormonalnej przez UPP jest niezbędne dla właściwego przebiegu takich procesów, jak ustępowanie spoczynku i kiełkowanie nasion [28, 33, 44, 69].

Rolę stymulatorów kiełkowania nasion wielu gatunków, łącznie z *A. thaliana*, pełni GA. Hormony te zwiększają potencjał wzrostu zarodka i indukują zmiany prowadzące do rozluźnienia struktury bielma, umożliwiając w konsekwencji przerwanie osłon otaczających zarodek przez wydłużający się korzeń zarodkowy [22]. Natomiast ABA, jako antagonistą w działaniu w stosunku do GA, odgrywa ważną rolę w indukowaniu i utrzymywaniu spoczynku. Wiadomo, że stosunek stężeń pomiędzy tymi dwoma hormonami, a także aktywność białek uczestniczących w sieci ich szlaków sygnałowych, mają duży wpływ na procesy zachodzące w nasionach [65].

W genomie *A. thaliana* i *Lepidium sativum* występują trzy geny kodujące receptory sygnału giberelinowego (pozytywne regulatory) należące do rodziny GID (ang. *Gibberellin Insensitive Dwarf*), takie jak: *GID1a*, *GID1b* i *GID1c* [51, 70]. U pierwszego z w/w gatunków zidentyfikowano także geny kodujące białka z rodziny DELLA, jak np.: *RGL1*, 2 i 3 (ang. *RGA-Like1*, 2, 3), *RGA* (ang. *Repressor of GA*) i *GAI* (ang. *Gibberellic Acid Insensitive*) o działaniu hamującym transdukcję

sygnału odbieranego przez receptory GA [24]. Wykazano, że białka GID i DELLA mogą wchodzić w bezpośrednie interakcje w ten sposób, że GID w obecności bioaktywnych GA przyłącza DELLA, co przy współdziałaniu z kompleksem SCF prowadzi do ubikwitynacji DELLA [24] (ryc. 2). Przyłączenie łańcucha poliubikwityny skutkuje degradacją DELLA przez proteasom 26S, co w konsekwencji prowadzi do odblokowania określonych czynników transkrypcyjnych, które oddziałując z promotorami regulują geny docelowe, prowadząc do stymulacji procesu kiełkowania. Nowe dowody wskazują na to, iż w szlaku sygnałowym GA uczestniczą także dwa białka zawierające domenę F-box, takie jak: SLY1 (ang. *SLEEPY1*) i SNE (ang. *SNEEZY*). Obydwa białka biorą udział w regulacji usuwania DELLA na drodze proteasomalnej poprzez współdziałanie z CUL1 w kompleksie SCF [3].

Analizując rolę, jaką podczas kiełkowania nasion odgrywa proteasomalna degradacja białek szlaku sygnałowego indukowanego przez GA, nie należy zapominać o udziale światła – w pęczniejących nasionach reguluje ono metabolizm i transdukcję sygnału indukowanego przez GA. Złożoność i znaczenie interakcji świetlnych i hormonalnych szlaków sygnałowych w nasionach jest tematem niedawno opublikowanej pracy przeglądowej [65]. Liczne dowody potwierdzają, iż pod wpływem światła w zarodku dochodzi do wzrostu stężenia bioaktywnych GA, w obecności których receptory GID1, łączą się z białkami DELLA, umożliwiając tym samym ubikwitynację i degradację DELLA przez proteasom 26S [13, 40, 71]. System proteasomalnej degradacji odgrywa również znaczącą rolę w regulacji transdukcji sygnału świetlnego po jego percepcji przez fotoreceptory. Kiełkujące nasiona odbierają bodziec świetlny głównie za pomocą fitochromów (ang. *Phytochromes*, PHY) – receptorów światła czerwonego. Potwierdzono, że PHY w wyniku oddziaływania bodźca świetlnego mogą ulegać ubikwitynacji i degradacji przez UPP. W procesie degradacji PHY prawdopodobnie zaangażowane są, zlokalizowane w jądrze komórkowym, kompleksy enzymatyczne zawierające białka z domeną BTB (jako receptor substratu); należą do nich np. LRB1 i 2 (ang. *Light-Response BTB1 i 2*). Wskazują na to między innymi wyniki badań przeprowadzonych na podwójnych mutantach *lrb1lrb2 A. thaliana*, charakteryzujących się nadwrażliwością na światło czerwone [12].

Jednym z najważniejszych czynników regulujących zależny od światła i GA proces kiełkowania nasion *A. thaliana* jest białko PIF1 (ang. *Phytochrome Interacting Factor1*). Jest ono odpowiedzialne za hamowanie kiełkowania poprzez pośrednią lub bezpośrednią stymulację ekspresji genów *Ga2ox2* (ang. *Gibberellin 2-oxidase2*), *GAI* i *RGAI* zaangażowanych m.in. w degradację i transdukcję sygnału GA [47, 53, 65]. W kiełkujących nasionach, ilość i aktywność białka PIF1 jest regulowana przez kilka mechanizmów, opierających się na oddziaływaniach pomiędzy białkami i degradacji proteasomalnej. Przykładem białka oddziałującego z PIF1 jest HFR1 (ang. *long Hypocotyl under Far-Red1*), które poprzez tworzenie kompleksów HFR1-PIF1 hamuje aktywność PIF1, przyczyniając się tym samym

do stymulacji procesu kiełkowania [61]. Z kolei najnowsze badania dotyczące roli degradacji proteasomalnej w regulacji zależnego od światła kiełkowania nasion *A. thaliana* pokazują, że białko DET1 (ang. *Deetiolated1*) jest istotnym represorem tego procesu, wchodzącym w skład ligazy zawierającej między innymi COP10 (ang. *Constitutive Photomorphogenic10*). Działanie kompleksów ligazy E3 COP10-DET1-DDB1-CUL4 umożliwia ubikwitynację i degradację czynnika HFR1 przez proteasom 26S, jednocześnie stabilizując wysoką aktywność PIF1, co w efekcie prowadzi do hamowania procesu kiełkowania [62]. Podane przykłady świadczą o złożoności mechanizmów regulujących aktywność białka PIF1 podczas zależnego od światła kiełkowania nasion, wymagających zaangażowania wielu reakcji enzymatycznych, wśród których degradacja proteasomalna odgrywa kluczową rolę.

W trakcie kiełkowania, obecność światła wpływa nie tylko na regulację metabolizmu i transdukcji sygnału indukowanego przez GA, ale również ścieżek związanych z ABA. Przykładem białka uczestniczącego w regulacji odpowiedzi nasion na światło, zaangażowanego w modulowanie metabolicznych i/lub sygnałowych szlaków obydwu w/w hormonów jest MAX2 (ang. *More Axillary branches2*). Białko to zawiera domenę F-box i prawdopodobnie funkcjonuje w kompleksach SCF^{MAX2} przeprowadzających specyficzną ubikwitynację białek regulatorowych hormonalnych szlaków sygnałowych, aktywnie działających na różnych etapach rozwoju roślin (ryc. 2). Wyniki uzyskane przez Shen i wsp. [60] wskazują na istotną rolę MAX2 również w zależnym od światła procesie kiełkowania nasion *A. thaliana*. Mutanty *max2* tego gatunku charakteryzują się nadwrażliwością na ABA i obniżoną wrażliwością na GA. Co więcej, wyniki analizy ekspresji genów w kiełkujących nasionach *max2* wskazują, że białko to może pozytywnie wpływać na poziom ekspresji genów związanych z biosyntezą GA, takich jak np. *GA-3ox1* (ang. *Gibberelin 3 beta-hydroxylase1*) oraz genów związanych z degradacją ABA, np. *CYP707A2* (ang. *Cytochrome P450, family707, subfamilyA, polypeptide2*). Jednak dokładny mechanizm regulacji poziomu transkryptów tych genów przez MAX2 w kiełkujących nasionach nie został dotąd scharakteryzowany.

Ostatnie lata owocowały licznymi odkryciami dotyczącymi roli poszczególnych komponentów UPP w regulacji odpowiedzi na sygnał indukowany przez ABA. Zidentyfikowano również kolejne elementy ścieżki sygnałowej tego hormonu, degradowane na drodze proteasomalnej. W toku przeprowadzonych badań wykazano, iż zaburzenia transdukcji sygnału ABA występują u mutantów *A. thaliana* charakteryzujących się obniżeniem ekspresji genów kodujących: 1) regulatorowe podjednostki proteasomu 26S (np. RPN10), 2) różne ligazy, takie jak: AIP2 (ang. *ABI3 Interacting Protein2*), KEG (ang. *Keep on Going*), SDIR1 (ang. *Salt and Drought-Induced Really interesting new gene finger1*), lub 3) receptory substratu dla ligaz E3, jak np. DWA1 i 2 (ang. *DDB1-binding WD40 protein hypersensitive to ABA1 i 2*) [2, 36, 39].

Percepcja ABA w roślinach odbywa się poprzez wiązanie tej cząsteczki przez szereg receptorów typu PYR (ang. *Pyrabactin Resistance*), PYL (ang. *Pyrabactin resistance-Like*) i RCAR (ang. *Regulatory Components of ABA Receptor*) [21]. Po związaniu cząsteczki ABA, receptory wchodzi w interakcje z szeregiem enzymów, jak np. PP2C (ang. *type 2C Protein Phosphatase*) i SnRK2 (ang. *Snf1-Related protein Kinase2*). Przy braku ABA, fosfatazy PP2C dezaktywują kinazy SnRK2 na drodze bezpośredniej defosforylacji, natomiast w obecności ABA aktywowane receptory wiążą PP2C uniemożliwiając im hamowanie aktywności SnRK2, co w konsekwencji powoduje odblokowanie sygnału ABA [80]. Obecnie znamy wiele substratów kinaz SnRK2 zaangażowanych w odpowiedź roślin na ABA, należą do nich czynniki transkrypcyjne ABI3,4,5 (ang. *ABA-Insensitive3,4,5*) oraz białko ABF3 (ang. *ABA-responsive element Binding Factor3*) [78]. Regulacja percepcji sygnału indukowanego przez ABA może być modulowana poprzez kontrolę ilości białek receptorowych ABA na drodze degradacji proteasomalnej. Wykazano, iż białko DDA1 (ang. *DET1-DDB1-Associated1*) jest receptorem substratu, który może stanowić część kompleksu COP10-DET1-DDB1-CUL4, biorącym udział w regulacji szlaku sygnałowego ABA w kiełkujących nasionach. Udowodniono, że DDA1 decyduje o specyficzności wspomnianego kompleksu CUL4, łączy się z PYL8, jak również PYL4 i PYL9 (receptorami ABA), prowadząc tym samym do ubiquitynacji i degradacji proteasomalnej tych białek i pośrednio obniżając wrażliwość tkanek na ABA w czasie kiełkowania, wzrostu siewki oraz wzrostu korzeni [29].

W kiełkujących nasionach UPP odgrywa istotną rolę w regulacji wielu różnych elementów sieci transdukcji sygnału ABA. Nowo scharakteryzowanym białkiem, uczestniczącym podczas kiełkowania nasion w regulacji percepcji ABA, jest białko RIFP1 (ang. *RCAR3 Interacting F-box Protein1*), które w warunkach *in vitro* i *in vivo* wchodzi w interakcję z receptorem RCAR3 i podjednostkami ASK kompleksu ligazy E3 SCF. Białko RCAR3 podobnie jak i inni członkowie rodziny receptorów ABA – PYR/PYL/RCAR, akumuluje się w nasionach i uczestniczy w percepcji sygnału ABA prowadzącej do hamowania procesu kiełkowania [21]. Wykazano, że kiełkowanie mutantów *rifp1 A. thaliana* w obecności egzogenego ABA jest silniej hamowane niż w przypadku typu dzikiego, a nadekspresja *RIFP1* skutkuje niewrażliwością roślin na ABA [38]. Postuluje się więc, że w kiełkujących nasionach RIFP1 jest receptorem substratu funkcjonującym w kompleksie ligazy SCF, uczestniczącym w wiązaniu i pośrednio w degradacji receptora RCAR3 na drodze proteasomalnej [38].

Przełomowe w poznaniu regulacji szlaku sygnałowego ABA przez UPP okazały się badania charakteryzujące zależną od specyficznych ligaz E3 ścieżkę degradacji czynnika ABI5 (ang. *ABA Insensitive5*). Wykazano, iż w kiełkujących nasionach, ligaza E3 zawierająca białko CUL4, może współdziałać z różnymi białkami pomocniczymi rozpoznającymi substrat, w celu regulacji transdukcji sygnału ABA [36]. Przykładami takich wspomagających białek są: DWA1 oraz DWA2, które wiążąc

czynnik transkrypcyjny ABI5 prawdopodobnie umożliwia przylączenie do niego łańcucha poliubikwityny, prowadząc w konsekwencji do jego degradacji przez UPP we wczesnych etapach kiełkowania [36]. Potwierdzają to dodatkowo doświadczenia przeprowadzone na mutantach *dwa1* i *dwa2* *A. thaliana*, które charakteryzują się wolniejszą degradacją białka ABI5, skorelowaną ze zwiększoną wrażliwością kiełkujących nasion na podany egzogenne ABA [36].

Innym niż DWA, ciekawym przykładem białka odgrywającego istotną rolę w modulacji UPP-zależnej ilości czynnika transkrypcyjnego ABI5 podczas kiełkowania, jest niewątpliwie ABD1 (ang. *ABA-hypersensitive DCAF1*) [59]. Należy ono do rodziny białek DCAF (ang. *DDB1-CUL4-Associated Factors*) i może wchodzić w skład kompleksu CUL4 E3 ligazy. Mutanty *abd1* *A. thaliana* po aplikacji egzogenne ABA charakteryzują się znacznie opóźnionym kiełkowaniem, w porównaniu do typu dzikiego. Ponadto, w siewkach *abd1* tego gatunku, rosnących na podłożu zawierającym ABA znacznie wzrasta poziom białka ABI5 sugerując, że ABD1 bierze udział w procesie degradacji ABI5, umożliwiając przylączenie Ub przez kompleks ligazy CUL4 [59] (ryc. 2). Białko ABD1, razem z DWA stanowią receptory substratu dla czynnika ABI5, pełniąc tym samym ważną rolę w szlaku regulacji sygnału ABA w nasionach. Pomimo, iż dokładny mechanizm działania tych białek nie jest jeszcze szczegółowo poznany, to już dzisiaj śmiało można zaproponować, że są one istotnymi elementami uczestniczącymi w regulacji procesu kiełkowania.

Bardzo ważny wkład w zrozumienie skomplikowanej sieci sygnałowej ABA mają badania dotyczące funkcji białka ABI3. Jak wykazano ABI3, podobnie jak ABI5 odgrywa istotną rolę w regulacji wrażliwości nasion *A. thaliana* na ABA, a jego działanie zależy od aktywności UPP. W procesie poliubikwitynacji białka ABI3 bierze udział ligaza E3 współdziałająca z białkiem AIP2 (ang. *ABI3-Interacting Protein2*), prowadząc w efekcie do jego degradacji [79] (ryc. 2). Podobny mechanizm zaproponowano w przypadku ziarniaków pszenicy (*Triticum aestivum* L.), u których hamowanie transdukcji sygnału ABA spowodowane było wzrostem aktywności białek AIP2A i AIP2B i obniżeniem poziomu ekspresji genu *ABI3*, a przez to wrażliwości na ABA w mutantach charakteryzujących się nadekspresją *AIP2A* i *AIP2B* [19]. Badania te dowodzą, że regulacja transdukcji sygnału ABA na drodze poliubikwitynacji i proteasomalnej degradacji czynnika ABI3 biorącego udział w tym procesie, działa w podobny sposób zarówno u roślin jednoliściennych jak i dwuliściennych.

Proteasomalna degradacja białka Rop-GEF2 (ang. *RHO of plants-Guanine nucleotide Exchange Factor2*) stanowi kluczowy etap jednego z wielu możliwych mechanizmów regulujących transdukcję sygnału indukowanego przez ABA w kiełkujących nasionach. Białko to należy do rodziny białek Rho (ang. *Ras homologous*) będących aktywatorami roślinnych GTPaz, których rola w transdukcji sygnału ABA u *A. thaliana* została wielokrotnie potwierdzona. Białko Rop-GEF2

prawdopodobnie pełni funkcję negatywnego regulatora sygnału ABA podczas kiełkowania. Wykazano, iż zaburzenia w jego budowie prowadzą do zwiększonej wrażliwości nasion na egzogenny ABA [81]. Traktowanie nasion egzogennym ABA stymuluje degradację białka Rop-GEF2 w cytozolu przez proteasom 26S, natomiast wiązanie białek ROP2, ROP6 i/lub ROP10 przez Rop-GEF2 prowadzi do stabilizacji białka i znacznego spowolnienia procesu degradacji. W efekcie tych oddziaływań dochodzi do zmniejszenia wrażliwości nasion na ABA. Niemniej jednak dokładny mechanizm i potencjalni partnerzy oddziaływań dla białka Rop-GEF2 w czasie procesu kiełkowania, nie zostali dotychczas scharakteryzowani.

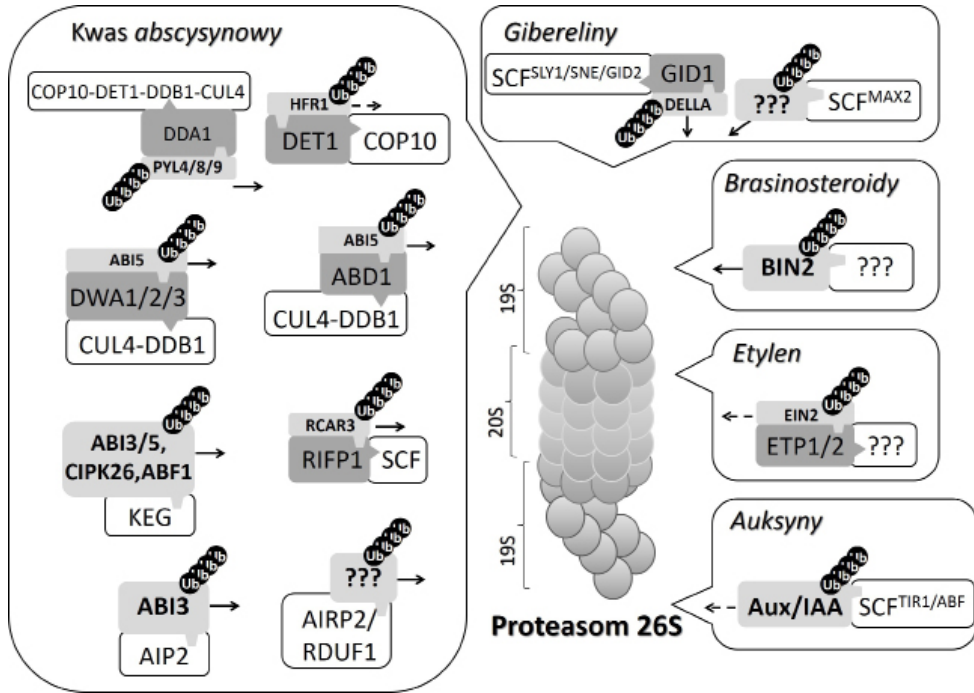
Rola proteasomu w zależnym od GA i ABA kiełkowaniu nasion jest coraz lepiej znana. Pojawiają się także liczne doniesienia dotyczące roli specyficznych elementów UPP odpowiedzialnych za degradację czynników odpowiedzialnych za transdukcję sygnału obydwu hormonów w nasionach. Problemy te nadal jednak kryją wiele niewiadomych, a uzyskane dotychczas wyniki powinny stanowić inspirację do kontynuacji badań.

ZNACZENIE PROTEASOMALNEJ DEGRADACJI BIAŁEK W SZLAKACH SYGNAŁOWYCH INDUKOWANYCH PRZEZ INNE NIŻ GA/ABA REGULATORY WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN W BIOLOGII NASION

Ustępowanie spoczynku i kiełkowanie nasion są złożonymi procesami regulowanymi także przez inne, niż GA i ABA regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Przykładem jest gazowy hormon roślinny – etylen (ET) – mający pozytywny wpływ na przełamywanie spoczynku i kiełkowanie nasion [14]. Traktowanie nasion czynnikami powodującymi ustępowanie spoczynku, np.: gazowym cyjanowodorem, ACC (kwasem 1-amino-cyklo-propano-karboksylovym, prekursorem etylenu), prowadzi do wzrostu produkcji ET i stymulacji kiełkowania [49]. U *A. thaliana* zidentyfikowano kilka różnych receptorów ET, takich jak: ETR1 i 2 (ang. *Ethylene Resistant1 i 2*), ERS1 i 2 (ang. *Ethylene Response Sensor1 i 2*) oraz EIN4 (ang. *Ethylene-Insensitive4*) [14]. Przyłączenie ET do receptora umożliwia połączenie z kinazą CTR1 (ang. *Constitutive Triple Response1*), co prowadzi do zahamowania jej aktywności i umożliwia działanie pozytywnych regulatorów odpowiedzi na ET, np.: EIN2 (ang. *Ethylene-Insensitive2*), EIN3 (ang. *Ethylene-Insensitive3*), EILs (ang. *EIN3-Like*), ERBPs (ang. *Ethylene Responsive element Binding Proteins*) i ERFs (ang. *Ethylene Response Factors*) [14]. Wykazano, iż poziom białek będących elementami ścieżki transdukcji sygnału ET jest regulowany poprzez UPP. Dzieje się tak między innymi w przypadku białek należących do rodziny EIN, np. EIN3, którego zależna od białek EBF1 i 2 (ang.

Ethylene Binding F-box1 i 2) proteasomalna degradacja ma istotne znaczenie dla regulacji kiełkowania nasion *A. thaliana* [1]. Udowodniono, że ET negatywnie reguluje akumulację EBF1/2, wykazując działanie antagonistyczne do inhibitora proteasomu, jakim jest MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al), co sugeruje istnienie korelacji pomiędzy mechanizmem działania ET, a degradacją specyficznych białek sygnałowych przez UPP [1]. Istotnym białkiem regulującym transdukcję sygnału indukowanego przez ET w roślinach jest także EIN2 – inny przedstawiciel rodziny EIN, pozytywnie regulujący odpowiedź na ET. Wykazano, iż nasiona mutantów *ein2* *A. thaliana* charakteryzują się głębszym spoczynkiem i większą wrażliwością na ABA w porównaniu z nasionami typu dzikiego [68]. W warunkach braku ET, C-koniec białka EIN2 zlokalizowany w cytozolu, ulega specyficznej fosforylacji przez CTR1 [32]. W niedawno przeprowadzonych badaniach wykazano, że poziom białka EIN2 zmniejsza się w wyniku oddziaływania domeny C-końca z dwoma białkami zawierającymi domenę F-box, takimi jak ETP1 i 2 (ang. *EIN2 Targeting Protein1 i 2*) [56]. W warunkach braku ET, interakcja pomiędzy tymi białkami prowadzi do degradacji receptora EIN2 przez proteasom 26S (ryc. 2). Taka kaskada reakcji wywołana obniżonym poziomem ET, wytwarzanego w komórkach lub znajdującego się w środowisku otaczającym nasiona, może przyczynić się do spowolnienia a nawet zahamowania procesu kiełkowania.

W ostatnim czasie wykazano także, że brasinosteroidy (BR) odgrywają istotną rolę w biologii nasion *A. thaliana*. W czasie rozwoju nasion tego gatunku BR mają wpływ na wielkość, kształt i ilość nasion powstających w łuszczyźnie [31]. Hormony te regulują także przemiany zachodzące w nasionach podczas procesu kiełkowania, działając antagonistycznie w stosunku do ABA [77]. Sygnał indukowany przez BR w roślinach odbierany jest na powierzchni komórek przez receptory o aktywności kinazy, których głównym przedstawicielem jest BR11 (ang. *Brassinosteroid Insensitive1*). Wiązanie BR przez receptor inicjuje kaskadę sygnału angażującą między innymi białko BIN2 (ang. *Brassinosteroid Insensitive2*) oraz, w dalszej kolejności, czynniki transkrypcyjne BZR1 (ang. *Brassinazole-Resistant1*) i BZR2 (ang. *Brassinazole-Resistant1*) [6]. Kinaza BIN2 jest negatywnym regulatorem transdukcji sygnału BR, której aktywność w obecności BR jest hamowana na drodze defosforylacji. Wykazano, że hamowanie aktywności BIN2 jest silnie związane z aktywnością UPP (ryc. 2) [55]. Zaobserwowano, iż po podaniu egzogenego inhibitora aktywności proteasomu (MG132) wraz z BR nie dochodzi do tak istotnego zmniejszenia aktywności BIN2 w komórkach, jak ma to miejsce w warunkach kontrolnych, w których podawano wyłącznie BR. Ponadto, najnowsze badania wskazują na możliwość interakcji sygnałów indukowanych przez BR i ABA w czasie kiełkowania nasion. Istnieją dowody, że kinaza BIN2 dokonując fosforylacji białka ABI5, stabilizuje je w obecności ABA, a tym samym wzmacnia sygnał ABA w komórkach roślinnych [27]. Te same badania wykaza-



RYCINA 2. Przykłady białkowych komponentów hormonalnych szlaków sygnałowych rozkładanych przez proteasom 26S w kiełkujących nasionach. Proteasom 26S współdziałając z szeregiem różnorodnych ligaz ubikwitynowych degraduje białka uczestniczące w transdukcji sygnału indukowanego przez kwas abscysynowy (np. ABI3, ABI5, PYL, RCAR3), gibereliny (np. DELLA), brasinosteroidy (BIN2), auksyny (Aux/IAA) i etylen (EIN2), regulując w ten sposób proces kiełkowania. Niezidentyfikowane dotychczas elementy ścieżki degradacji proteasomalnej, istotne dla proteolizy białek regulatorowych oznaczono znakiem zapytania. Figury geometryczne: białe – przedstawiają białka tworzące kompleks ligazy, ciemno szare – specyficzne białka wiążące substrat, jasno szare – białka substraty, czarne – ubikwitynę (Ub). Czarne strzałki – linia ciągła odchodzą od białek, których degradacja skutkuje stymulacją kiełkowania, natomiast strzałki czarne – linia przerywana znajdują się przy białkach, których proteoliza prowadzi do zahamowania tego procesu

FIGURE 2. The examples of protein components of hormonal signaling pathways degraded by the 26S proteasome in germinating seeds. The proteasome 26S interacting with a number of various ubiquitin ligases degrade proteins involved in transduction of signals induced by abscisic acid (eg. ABI3, ABI5, PYL, RCAR3), gibberellins (eg. DELLA), brassinosteroids (BIN2), auxin (Aux/IAA) and ethylene (EIN2), thus controlling the germination process. The unidentified elements of proteasomal degradation pathway, essential for proteolysis of regulatory proteins are marked with a question mark. The geometric shapes: white – represents the proteins forming ligase complex, dark gray – specific protein binding substrate, light gray – protein substrates, black – ubiquitin (Ub). Black arrow – continuous line extends from proteins whose degradation results in stimulation of germination, whereas arrows black – dotted line, are located next to proteins which proteolysis leads to the inhibition of this process

ły także, że zahamowanie aktywności proteasomu 26S przez MG132 znacząco hamuje zależną od BR degradację czynnika ABI5 sugerując, że sprawnie funkcjonujący kompleks 26S jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu degradacji ABI5. Mimo, iż nadal nie zidentyfikowano ligazy odpowiadającej za specyficzną ubikwitynację kinazy BIN2, to wyniki dotychczasowych doświadczeń wyraźnie wskazują na istotną rolę UPP w regulacji szlaku transdukcji BR, jak i możliwość interakcji ścieżek sygnałowych BR i ABA podczas kiełkowania nasion.

Hormonem wykazującym hamujący wpływ na kiełkowanie są auksyny (IAA). Wykazano, iż aplikacja IAA podczas kiełkowania nasion *A. thaliana* narażonych na działanie stresu solnego, wykazuje synergistyczne działanie i dodatkowo hamuje ten proces [54, 63]. Sygnał indukowany przez IAA regulowany jest w podobny sposób, jak w przypadku kwasu jasmonowego (JA). Cztery białka zawierające w swej strukturze domenę F-box TIR1 (ang. *Transport Inhibitor Response1*) i AFB1, 2 i 3 (ang. *Auxin signaling F-Box protein1, 2 i 3*) stanowią elementy kompleksu ligazy E3 SCF^{TIR1/AFB} i mogą działać, jako receptory sygnału auksynowego. Podczas pojawienia się zależnego od IAA aktywatora, kompleks SCF^{TIR1/AFB} rozpoznaje i przeprowadza ubikwitynację negatywnych regulatorów sygnału auksynowego Aux/IAA (ang. *Auxin/Indole-3-Acetic Acid*) powodując ich degradację proteosomalną. Po usunięciu Aux/IAA specyficzne czynniki transkrypcyjne ARFs (ang. *Auxin Response Factors*) zostają odblokowane i następuje aktywacja sygnału auksynowego prowadząca do zmian w ekspresji poszczególnych genów [15]. W czasie kiełkowania może mieć miejsce interakcja (ang. „*cross-talk*”) między sygnałem IAA i ABA. Kluczową rolę w tej interakcji pełni gen *ARF2* (ang. *Auxin Response Factor2*), którego ekspresja jest stymulowana przez podanie egzogenego ABA. Ponadto, mutanty *arf2* *A. thaliana* charakteryzują się podwyższoną wrażliwością na ABA w czasie kiełkowania [73]. Co ciekawe, u roślin poznano bardzo niewiele białek, w których Ub może zostać przyłączona do aminokwasu innego niż lizyna. Ostatnio wykazano, że w procesie ubikwitynacji białka IAA1 (ang. *auxin-responsive protein IAA1*), należącego do grupy białek Aux/IAA regulujących odpowiedź roślin na IAA, Ub jest przyłączona do lizyny, ale może być także przyłączona do seryny bądź treoniny, co skutkuje zależną od proteasomu 26S proteolizą białka [20].

Informacje przedstawione w tym rozdziale potwierdzają, że degradacja proteosomalna specyficznych białek stanowi istotny mechanizm regulujący odpowiedź nasion na różne regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Opisane przykłady wyraźnie dowodzą, że UPP pełni kluczową rolę w modulacji sygnału indukowanego przez ET, BR i IAA w czasie kiełkowania nasion. Jednakże stosunkowo ograniczony zasób wiedzy nadal nie pozwala na pełne zrozumienie skomplikowanej sieci tych oddziaływań i kontynuacja badań w tym zakresie jest wielce pożądana.

ROZKŁAD KARBONYLOWANYCH BIAŁEK PRZEZ PROTEASOM 20S PODCZAS PROCESÓW ZACHODZĄCYCH W NASIONACH

Wszelkim procesom życiowym zachodzącym w komórkach roślinnych towarzyszą zmiany w metabolizmie ROS, do których należą np.: rodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}) i tlen singletowy (1O_2). W nasionach, ROS mogą powstawać na drodze przemian enzymatycznych (np. z udziałem NADPH oksydazy), jak i nieenzymatycznych (np. w obecności jonów metali należących do grup przejściowych, jak np. żelazo, Fe^{2+} ; miedź, Cu^{2+}). Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że ROS pełnią pozytywną rolę jako istotne regulatory wzrostu i rozwoju roślin, a kontrola ich metabolizmu jest warunkiem koniecznym dla prawidłowego przebiegu wielu życiowych procesów mających miejsce nie tylko w nasionach, ale całych organizmach roślinnych [52]. W ostatnich latach wykazano, że ustępowanie spoczynku i kiełkowanie skorelowane są ze zmianami poziomu ROS w nasionach wielu różnych gatunków roślin, np.: *Malus domestica*, *Helianthus annuus*, *A. thaliana*, *L. sativum* [7, 37, 48, 51, 71].

Z powodu braku wystarczających dowodów potwierdzających specyficzność oddziaływania ROS, które potencjalnie mogą reagować ze wszystkimi cząsteczkami wchodzącymi w skład żywych komórek, ich mechanizm działania nadal jest słabo poznany i trudny do wyjaśnienia. Prekursorskie wyniki badań zaprezentowane przez Oracz i wsp. [48, 50] wykazały, że ROS reagując ze składnikami komórkowymi, np. z białkami, powodują ich modyfikacje, wyzwalając tym samym kaskadę reakcji umożliwiających przebieg wielu procesów w nasionach. W zależności od rodzaju utlenionego aminokwasu, oksydacyjne modyfikacje białek mogą być: 1) odwracalne, jak to ma miejsce dzięki działaniu białek uczestniczących w utlenianiu cysteiny (np.: tioredoksyny, peroksyredoksyny lub glutaredoksyny) lub metioniny (np. reduktazy sulfotlenku metioniny), ale mogą też być 2) nieodwracalne, gdy podczas reakcji karbonylacji, w wyniku oddziaływań ROS lub produktów ubocznych reakcji utleniania lipidów, aminokwasów lub węglowodanów z resztami aminokwasów, takimi jak: lizyna, prolina, treonina czy arginina, dochodzi do utworzenia grupy karbonylowej [16].

Przemiany karbonylowanych białek w komórkach roślinnych mają ogromne znaczenie, a skuteczna proteoliza tych cząsteczek jest wymagana w celu uniknięcia szkodliwych skutków związanych z ich akumulacją. Niezdegradowane, karbonylowane białka są zdolne do tworzenia sieci połączeń kowalencyjnych i/lub wykazują zwiększoną hydrofobowość, dzięki czemu mają tendencję do tworzenia agregatów o dużej masie cząsteczkowej [34]. Gromadzące się takie nieaktywne formy białek mogą funkcjonalnie konkurować z odpowiadającymi im niezmodyfikowanymi for-

mami aktywnymi. W celu uniknięcia szkodliwego działania kompleksów białek karbonylowanych, komórki roślinne wykształciły specyficzny rodzaj proteolizy. Wykazano, że tego rodzaju modyfikacja białek występujących na terenie cytoplazmy skutkuje ich większą podatnością na degradację przez proteasom 20S, a nie przez kompleks 26S [34]. Zaproponowano, że karbonylacja może stanowić alternatywny sposób znakowania białek umożliwiający specyficzną degradację przez proteasom 20S. Takiej proteolizie ulegałyby białka uszkodzone i/lub o nieprawidłowej strukturze, jak również te, które na danym etapie rozwoju nie są już potrzebne organizmowi, co może mieć kluczowe znaczenie w komórkowej regulacji jakości białka i dynamiki proteomu [46]. Ten proteolityczny mechanizm może chronić zarówno komórki nasion jak i inne komórki w obrębie organów roślin, które w sytuacji wzrostu poziomu ROS (np. w warunkach stresowych lub podczas kiełkowania) są szczególnie narażone na oksydacyjne uszkodzenia białek. Co więcej, dzięki temu, że karbonylowane białka są następnie rozkładane przez proteasom 20S, możliwy jest recykling aminokwasów i ich ponowne wykorzystanie do syntezy kolejnych białek.

ROS i oksydacyjne modyfikacje pełnią szczególnie ważną rolę podczas ustępowania spoczynku nasion niewrażliwych na desykcję (tzw. nasion ortodoksyjnych). Pozostała w dojrzewających posprzecznie nasionach tego rodzaju stosunkowo niewielka ilość wody jest mocno związana (różnymi wiązaniami molekularnymi) z cząsteczkami budującymi nasiono, przez co nie może być ona wykorzystana w reakcjach enzymatycznych [5]. Dlatego też postuluje się, że w suchych nasionach reakcje wymagające aktywnie funkcjonujących enzymów raczej nie zachodzą lub przebiegają bardzo wolno, a najistotniejsze przemiany mają miejsce głównie w wyniku procesów nieenzymatycznych, takich jak np. utlenianie białek. Wykazano, że ilość karbonylowanych białek jest znacznie niższa w suchych nasionach spoczynkowych słonecznika, niż w nasionach nie obarczonych spoczynkiem i jest ona pozytywnie skorelowana z obserwowanym poziomem ROS [48]. W badaniach Oracz i wsp. [48] dowiedziono, że w dojrzałych posprzecznie nasionach słonecznika, w grupie białek wykazujących zwiększony, w stosunku do spoczynkowych nasion, poziom karbonylacji znajdują się m.in.: EF2 (ang. *Elongation Factor2*), PPK (ang. *Pyruvate Orthophosphate Dikinase*) i globulina 7S. Zasugerowano, że karbonylacja dwóch pierwszych białek, zachodząca podczas przechowywania suchych nasion, może wskazywać na ich prawdopodobne zaangażowanie w procesy rozwojowe nasion oraz brak istotnej roli podczas ustępowania spoczynku i kiełkowania [10]. Trzecie ze wskazanych wyżej białek – globulina 7S – jest przykładem białka zapasowego, którego karbonylacja może ułatwiać proteolizę przez proteasom 20S, a tym samym wykorzystanie go jako źródła energii niezbędnej dla przebiegu procesu kiełkowania. Ze względu na stosunkowo dużą ilość białek zapasowych występujących w nasionach można również uznać, iż ich karbonylacja stanowi doskonały mechanizm obronny ko-

mórek przed ROS, intensywnie powstającymi podczas procesów zachodzących w nasionach [52]. Natomiast interesującym przykładem białka, którego poziom karbonylacji spada podczas posprzętnego dojrzewania nasion słonecznika jest niewątpliwie podjednostka α proteasomu 20S [48]. Co ciekawe, podobną zależność pomiędzy profilem białek karbonylowanych a zwiększeniem poziomu ROS zaobserwowano także w pęczniejących nasionach spoczynkowych, których kiełkowanie było stymulowane przez aplikację donorów ROS [48]. Mając na uwadze te dane można zaproponować istnienie mechanizmu sprzężenia zwrotnego regulującego proces ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion przy udziale proteasomu. W takim ujęciu, proteasom 20S usuwałby białka wchodzące w skład jego korpusu, wpływając tym samym na aktywność i/lub specyficzność swojego działania w usuwaniu innych, nieproteasomalnych białek.

Przedstawione tu dane pozwalają na lepsze zrozumienie przebiegających w nasionach procesów, które zależą od ROS oraz podkreślają znaczenie proteasomu 20S, w ich regulacji.

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Mechanizm regulacji procesów zachodzących w nasionach przez proteasomalny system degradacji białek jest obecnie zagadnieniem istotnym i budzącym zainteresowanie wielu naukowców. Przeprowadzone dotychczas badania umożliwiły poznanie wielu nowych elementów UPP, głównie ligaz E3, receptorów substratu i białek pomocniczych specyficznym rozpoznającym i znakującym białka przeznaczone do degradacji przez przyłączenie łańcucha poliubikwityny. Udowodniono, że w czasie kiełkowania nasion proteasom 26S pełni niezwykle istotną funkcję regulatorową, odpowiadając za usuwanie niektórych białkowych elementów szlaku percepcji i/lub transdukcji sygnałów generowanych przez hormony roślinne. Najlepiej poznane wydają się być zagadnienia związane z regulacją transdukcji sygnału GA i ABA, natomiast białka i mechanizmy uczestniczące w regulacji sygnałów ET, BR i IAA przez UPP nie zostały dotychczas wyczerpująco scharakteryzowane. Dalszych analiz wymagają także zagadnienia dotyczące usuwania utlenionych białek przez proteasom 20S. Dlatego też informacje, których dostarczyły dotychczasowe badania powinny stanowić inspirację do kontynuacji badań w tym zakresie.

PODZIĘKOWANIA

Praca naukowa finansowana ze środków grantu *SONATA2 Narodowego Centrum Nauki* (no. 2011/03/D/NZ9/04059)

LITERATURA

- [1] AN F, ZHAO Q, JI Y, LI W, JIANG Z, YU X, ZHANG C, HAN Y, HE W, LIU Y I WSP. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2010; **22**: 2384-2401.
- [2] ANTONI R, RODRIGUEZ L, GONZALEZ-GUZMAN M, PIZZIO GA, RODRIGUEZ PL. News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2011; **14**: 547-553.
- [3] ARIIZUMI T, LAWRENCE PK, STEBER CM. The role of two f-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in *Arabidopsis* gibberellin signaling. *Plant Physiol* 2011; **155**: 765-775.
- [4] BARBERON M, ZELAZNY E, ROBERT S, CONÉJÉRO G, CURIE C, FRIML J, VERT G. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: E450-E458.
- [5] BAZIN J, BATLLA D, DUSSERT S, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, BAILLY C. Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *J Exp Bot* 2011; **62**: 627-640.
- [6] BELKHADIR Y, JAILLAIS Y. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytol* 2015; **206**: 522-540.
- [7] BOGATEK R, GAWROŃSKA H, ORACZ K. Involvement of oxidative stress and ABA in CN-mediated elimination of embryonic dormancy in apple. In NICOLÁS G, BRADFORD KJ, CÔME D and PRITCHARD HW eds. *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. Wallingford: CABI, 2003; 211-216.
- [8] BOOK AJ, GLADMAN NP, LEE SS, SCALF M, SMITH LM, VIERSTRA RD. Affinity purification of the *Arabidopsis* 26 S proteasome reveals a diverse array of plant proteolytic complexes. *J Biol Chem* 2010; **285**: 25554-25569.
- [9] BOURDAIS G, BURDIAC P, GAUTHIER A, NITSCH L, SALOJÄRVI J, RAYAPURAM C, IDÄNHEIMO N, HUNTER K, KIMURA S, MERILO E I WSP. Large-Scale phenomics identifies primary and fine-tuning roles for CRKs in responses related to oxidative stress. *PLoS Genet* 2015; DOI: 10.1371/journal.pgen.1005373.
- [10] CHASTAIN CJ, HECK JW, COLQUHOUN TA, VOGUE DG, GU XY. Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (*Oryza sativa*) seeds. *Planta* 2006; **224**: 924-934.
- [11] CHITNIS VR, GAO F, YAO Z, JORDAN MC, PARK S, AYELE BT. After-ripening induced transcriptional changes of hormonal genes in wheat seeds: the cases of brassinosteroids, ethylene, cytokinin and salicylic acid. *PLoS One* 2014; DOI: 10.1371/journal.pone.0087543.
- [12] CHRISTIANS MJ, GINGERICH DJ, HUA Z, LAUER TD, VIERSTRA RD. The light-response BTB1 and BTB2 proteins assemble nuclear ubiquitin ligases that modify phytochrome B and D signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2012; **160**: 118-134.
- [13] CLAEYS H, DE BODT S, INZÉ D. Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci* 2014; **19**: 231-239.
- [14] CORBINEAU F, XIA Q, BAILLY C, EL-MAAROUF-BOUTEAU H. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front Plant Sci* 2014; **5**: 539.
- [15] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, WEJERS D, LECHNER E, YAMADA M, HOBBIIE L, EHRISMANN JS, JÜRGENS G, ESTELLE M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F Box proteins. *Dev Cell* 2005; **9**: 109-119.
- [16] EL-MAAROUF-BOUTEAU H, MEIMOUN P, JOB C, JOB D, BAILLY C. Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* 2013; **4**: 77.
- [17] EMMERICH CH, SCHMUKLE AC, WALCZAK H. The emerging role of linear ubiquitination in cell signaling. *Sci Signal* 2011; DOI: 10.1126/scisignal.2002187.
- [18] FENG J, SHEN WH. Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants. *Front Plant Sci* 2014; **5**: 83.
- [19] GAO DY, HU ZS, HE Y, SUN YW, MA YZ, XIA LQ. Functional analyses of an E3 ligase gene *AIP2* from wheat in *Arabidopsis* revealed its roles in seed germination and pre-harvest sprouting. *J Integr Plant Biol* 2014; **56**: 480-491.

- [20] GILKERSON J, KELLEY D, TAM R, ESTELLE M, CALLIS J. Lysine residues are not required for proteasome-mediated proteolysis of the Aux/IAA protein IAA1. *Plant Physiol* 2015; **168**: 708-720.
- [21] GONZALEZ-GUZMAN M, PIZZIO GA, ANTONI R, VERA-SIRERA F, MERILO E, BASSEL GW, FERNÁNDEZ MA, HOLDSWORTH MJ, PEREZ-AMADOR MA, KOLLIST H i wsp. *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* 2012; **24**: 2483-2496.
- [22] GRAEBER K, NAKABAYASHI K, MIATTON E, LEUBNER-METZGER G, SOPPE WJJ. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ* 2012; **35**: 1769-1786.
- [23] HAN C, YIN X, HE D, YANG P. Analysis of proteome profile in germinating soybean seed, and its comparison with rice showing the styles of reserves mobilization in different crops. *PLoS One* 2013; DOI: 10.1371/journal.pone.0056947.
- [24] HAUVERMALE AL, ARIIZUMI T, STEBER CM. Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol* 2012; **160**: 83-92.
- [25] HILDEBRANDT TM, NUNES NESI A, ARAÚJO WL, BRAUN HP. Amino acid catabolism in plants. *Mol Plant* 2015; **8**: 1563-1579.
- [26] HOFFMAN L, PRATT G, RECHSTEINER M. Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 1992; **267**: 22362-22368.
- [27] HU Y, YU D. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2014; **26**: 4394-4408.
- [28] HWANG JH, SEO DH, KANG BG, KWAK JM, KIM WT. Suppression of *Arabidopsis* AtPUB30 resulted in increased tolerance to salt stress during germination. *Plant Cell Rep* 2015; **34**: 277-289.
- [29] IRIGOYEN ML, INIESTO E, RODRIGUEZ L, PUGA MI, YANAGAWA Y, PICK E, STRICKLAND E, PAZ-ARES J, WEI N, DE JAEGER G i wsp. Targeted degradation of abscisic acid receptors is mediated by the ubiquitin ligase substrate adaptor DDA1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2014; **26**: 712-728.
- [30] JANMOHAMMADI M, ZOLLA L, RINALDUCCI S. Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *Phytochemistry* 2015; **117**: 76-89.
- [31] JIANG WB, LIN WH. Brassinosteroid functions in *Arabidopsis* seed development. *Plant Signal Behav* 2013; DOI: 10.4161/psb.25928.
- [32] JU C, YOON GM, SHEMANSKY JM, LIN DY, YING ZI, CHANG J, GARRETT WM, KESSENBRICK M, GROTH G, TUCKER ML i wsp. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 19486-19491.
- [33] KARMOUS I, CHAOUI A, JAOUANI K, SHEEHAN D, EL FERJANI E, SCOCCIANI V, CRINELLI R. Role of the ubiquitin-proteasome pathway and some peptidases during seed germination and copper stress in bean cotyledons. *Plant Physiol Biochem PPB Société Fr Physiol Végétale* 2014; **76**: 77-85.
- [34] KÄSTLE M, GRUNE T. Proteins bearing oxidation-induced carbonyl groups are not preferentially ubiquitinated. *Biochimie* 2011; **93**: 1076-1079.
- [35] KUNJAPPU, MJ, HOCHSTRASSER M. Assembly of the 20S proteasome. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1843**: 2-12.
- [36] LEE JH, YOON HJ, TERZAGHI W, MARTINEZ C, DAI M, LI J, BYUN MO, DENG XW. DWA1 and DWA2, two *Arabidopsis* DWD protein components of CUL4-based E3 ligases, act together as negative regulators in ABA signal transduction. *Plant Cell* 2010; **22**: 1716-1732.
- [37] LEYMARIE J, VITKAUSKAITĖ G, HOANG HH, GENDREAU E, CHAZOULE V, MEIMOUN P, CORBINEAU F, EL-MAAROUF-BOUTEAU H AND BAILLY C. Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant Cell Physiol* 2012; **53**: 96-106.
- [38] LI Y, ZHANG L, LI D, LIU Z, WANG J, LI X, YANG Y. The *Arabidopsis* F-box E3 ligase RIFP1 plays a negative role in abscisic acid signaling by facilitating ABA receptor RCAR3 degradation. *Plant Cell Environ* 2015; DOI: 10.1111/pce.12639.
- [39] LIU H, STONE SL. Abscisic acid increases *Arabidopsis* ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. *Plant Cell* 2010; **22**: 2630-2641.

- [40] DE LUCAS M, DAVIÈRE JM, RODRÍGUEZ-FALCÓN M, PONTIN M, IGLESIAS-PEDRAZ JM, LORRAIN S, FANKHAUSER C, BLÁZQUEZ MA, TITARENKO E, PRAT S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 2008; **451**: 480-484.
- [41] MARCINIAK K, TUROWSKI T, WILMOWICZ E, FRANKOWSKI K, KĘSY J, KOPCEWICZ J. Ligazy ubikwitynowo-białkowe w szlakach sygnałowych auksyn, jasmonianów i giberelin. *Postępy Biol Komórki* 2010; **2**: 409-432.
- [42] MENDIONDO GM, GIBBS DJ, SZURMAN-ZUBRZYCKA M, KORN A, MARQUEZ J, SZAREJKO I, MALUSZYNSKI M, KING J, AXCELL B, SMART K i wsp. Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnol J* 2015; **14**: 40-50.
- [43] MICHAELI S, GALILI G, GENSHIK P, FERNIE AR, AVIN-WITTENBERG T. Autophagy in Plants – What’s New on the Menu? *Trends Plant Sci* 2015; **21**: 134-144.
- [44] MORRIS K, LINKIES A, MÜLLER K, ORACZ K, WANG X, LYNN JR, LEUBNER-METZGER G, FINCH-SAVAGE WE. Regulation of seed germination in the close *Arabidopsis* relative *Lepidium sativum*: a global tissue-specific transcript analysis. *Plant Physiol* 2011; **155**: 1851-1870.
- [45] NELSON CJ, LI L, MILLAR AH. Quantitative analysis of protein turnover in plants. *Proteomics* 2014; **14**: 579-592.
- [46] NYSTRÖM T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 2005; **24**: 1311-1317.
- [47] OH E, YAMAGUCHI S, HU J, YUSUKE J, JUNG B, PAIK I, LEE HS, SUN T, 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.
- [48] ORACZ K, EL-MAAROUF BOUTEAU H, FARRANT JM, COOPER K, BELGHAZI M, JOB C, JOB D, CORBINEAU F, BAILLY C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J Cell Mol Biol* 2007; **50**: 452-465.
- [49] ORACZ K, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, BOGATEK R, CORBINEAU F, BAILLY C. Release of sunflower seed dormancy by cyanide: cross-talk with ethylene signalling pathway. *J Exp Bot* 2008; **59**: 2241-2251.
- [50] ORACZ K, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, KRANNER I, BOGATEK R, CORBINEAU F, BAILLY C. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol* 2009; **150**: 494-505.
- [51] ORACZ K, VOEGELE A, TARKOWSKÁ D, JACQUEMOUD D, TURECKOVÁ V, ÚRBAŇOVÁ T, STRNAD M, ŚLIWIŃSKA E, LEUBNER-METZGER G. Myrigalone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant Cell Physiol* 2012; **53**: 81-95.
- [52] ORACZ K. Rodnik hydroksylowy – mała cząsteczka o dużym znaczeniu w biologii komórki roślinnej. *Postępy Biol Komórki* 2015; **42**: 707-726.
- [53] PARK J, LEE N, KIM W, LIM S, CHOI G. ABI3 and PIL5 collaboratively activate the expression of *SOMNUS* by directly binding to its promoter in imbibed *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 2011; **23**: 1404-1415.
- [54] PARK J, KIM YS, KIM SG, JUNG JH, WOO JC, PARK CM. Integration of auxin and salt signals by the NAC transcription factor NTM2 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2011; **156**: 537-549.
- [55] PENG P, YAN Z, ZHU Y, LI J. Regulation of the *Arabidopsis* GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation. *Mol Plant* 2008; **1**: 338-346.
- [56] QIAO H, CHANG KN, YAZAKI J, ECKER JR. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2009; **23**: 512-521.
- [57] SADANANDOM A, BAILEY M, EWAN R, LEE J, NELIS S. The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytol* 2012; **196**: 13-28.
- [58] SANTNER A, ESTELLE M. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J Cell Mol Biol* 2010; **61**: 1029-1040.
- [59] SEO KI, LEE JH, NEZAMES CD, ZHONG S, SONG E, BYUN MO, DENG XW. ABD1 is an *Arabidopsis* DCAF substrate receptor for CUL4-DDB1-based E3 ligases that acts as a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 2014; **26**: 695-711.

- [60] SHEN H, ZHU L, BU QY, HUQ E. MAX2 affects multiple hormones to promote photomorphogenesis. *Mol Plant* 2012; **5**: 750-762.
- [61] SHI H, ZHONG S, MO X, LIU N, NEZAMES CD, DENG XW. HFR1 sequesters PIF1 to govern the transcriptional network underlying light-initiated seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2013; **25**: 3770-3784.
- [62] SHI H, WANG X, MO X, TANG C, ZHONG S, DENG XW. *Arabidopsis* DET1 degrades HFR1 but stabilizes PIF1 to precisely regulate seed germination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: 3817-3822.
- [63] SHU K, LIU XD, XIE Q, HE ZH. Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Mol Plant* 2015; **9**: 34-45.
- [64] STASZAK AM, PAWŁOWSKI TA. Proteomic analysis of embryogenesis and the acquisition of seed dormancy in Norway maple (*Acer platanoides* L.). *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 10868-10891.
- [65] STAWSKA M, ORACZ K. Sieć powiązań szlaków fitochromowych, kryptochromowych oraz indukowanych przez regulatory wzrostu i rozwoju w biologii nasion. *Postępy Biol Komórki* 2015; **42**: 687-706.
- [66] STONE SL, WILLIAMS LA, FARMER LM, VIERSTRA RD, CALLIS J. KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for *Arabidopsis* growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 2006; **18**: 3415-3428.
- [67] STONE SL. Ubiquitination of Plant Transcription Factors. In GONZALEZ DH eds. *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*. Cambridge: Academic Press, 2016; 396-410.
- [68] SUBBIAH V, REDDY KJ. Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *J Biosci* 2010; **35**: 451-458.
- [69] TAN L, CHEN S, WANG T, DAI S. Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. *Proteomics* 2013; **13**: 1850-1870.
- [70] VOEGELE A, LINKIES A, MÜLLER K, LEUBNER-METZGER G. Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *J Exp Bot* 2011; **62**: 5131-5147.
- [71] VOEGELE A, GRAEBER K, ORACZ K, TARKOWSKÁ D, JACQUEMOUD D, TUREČKOVÁ V, URBANOVÁ T, STRNAD M, LEUBNER-METZGER G. Embryo growth, testa permeability, and endosperm weakening are major targets for the environmentally regulated inhibition of *Lepidium sativum* seed germination by myrigalone A. *J Exp Bot* 2012; **63**: 5337-5350.
- [72] WANG F, DENG XW. Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Res* 2011; **21**: 1286-1294.
- [73] WANG L, HUA D, HE J, DUAN Y, CHEN Z, HONG X, GONG Z. Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene *HB33* mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 2011; DOI: 10.1371/journal.pgen.1002172.
- [74] WANG WQ, SONG BY, DENG ZJ, WANG Y, LIU SJ, MØLLER IM, SONG SQ. Proteomic analysis of lettuce seed germination and thermoinhibition by sampling of individual seeds at germination and removal of storage proteins by polyethylene glycol fractionation. *Plant Physiol* 2015; **167**: 1332-1350.
- [75] WAXMAN L, FAGAN JM, GOLDBERG AL. Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 1987; **262**: 2451-2457.
- [76] WOLF DH, HILT W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1695**: 19-31.
- [77] XI W, YU H. MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination and fertility relevant to the brassinosteroid signaling pathway. *Plant Signal Behav* 2010; **5**: 1315-1317.
- [78] YU F, WU Y, XIE Q. Ubiquitin-Proteasome System in ABA signaling: from perception to action. *Mol Plant* 2015; **9**: 21-33.
- [79] ZHANG X, GARRETON V, CHUA NH. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* 2005; **19**: 1532-1543.
- [80] ZHANG XL, JIANG L, XIN Q, LIU Y, TAN JX, CHEN ZZ. Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Plant Biophys Model* 2015; DOI: 10.3389/fpls.2015.00088.

- [81] ZHAO S, WU Y, HE Y, WANG Y, XIAO J, LI L, WANG Y, CHEN X, XIONG W, WU Y. RopGEF2 is involved in ABA-suppression of seed germination and post-germination growth of *Arabidopsis*. *Plant J Cell Mol Biol* 2015; **84**: 886-899.

Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski

Otrzymano: 02.02.2016

Przyjęto: 01.04.2016

Krzyszyna Oracz

Katedra Fizjologii Roślin

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159, 02-776, Warszawa, Polska

email: krzyszyna_oracz@sggw.pl

tel.: +48 22 593 25 33

fax: +48 22 593 25 21