

## STEROIDNÍ FYTOHORMONY: FUNKCE, MECHANISMUS ÚČINKU A VÝZNAM

MAREK KAMLAR<sup>a,b</sup>, ONDŘEJ UHLÍK<sup>a,b</sup>,  
LADISLAV KOHOUT<sup>a</sup>, JURAJ HARMATHA<sup>a</sup>  
a TOMÁŠ MACEK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6  
tom.macek@uochb.cas.cz

Došlo 21.1.09, přepracováno 8.7.09, přijato 25.8.09.

Klíčová slova: brassinosteroidy, ekdysteroidy, fytohormony, fytosteroly, RuBisCO, steroidní receptory, vazebné bílkoviny

### Obsah

1. Úvod
2. Steroidní fytohormony a mechanismus jejich účinku
  - 2.1. Brassinosteroidy
  - 2.2. Ekdysteroidy
3. Způsoby studia působení steroidních hormonů u rostlin
  - 3.1. Knock-out a knock-down genu
  - 3.2. Identifikace a izolace vazebných bílkovin
    - 3.2.1. Molekulárně-biologické metody
    - 3.2.2. Afinitní chromatografie
4. Bílkoviny s afinitou ke steroidním fytohormonům
  - 4.1. Vazebné bílkoviny brassinosteroidů
  - 4.2. Vazebné bílkoviny ekdysteroidů
5. Závěr

### 1. Úvod

Fytohormony neboli rostlinné hormony jsou obecně chápány jako endogenní signální molekuly zodpovědné za přenos informací mezi pletivou a orgány<sup>1</sup>. Steroidní fytohormony, jmenovitě brassinosteroidy (BRs) a ekdysteroidy (ES), pak tvoří jednu z podskupin těchto látek.

Význam BRs pro rostlinu spočívá jednak v pozitivní regulaci jejího růstu a jednak ve schopnosti ovlivnění její adaptace na stres vyvolaný biotickými či abiotickými faktory. Bylo prokázáno, že tyto látky jsou hormonálně aktivní<sup>2</sup>. Na rozdíl od živočišných steroidních hormonů jsou však v tomto případě přenos signálu do buňky a následná buněčná odpověď zprostředkovány systémem receptorů lokalizovaných na/v buněčné membráně<sup>3,4</sup>. Přesný mecha-

nismus působení ovšem stále není zcela jasný.

Funkce ekdysteroidů, další ze skupiny látek s povahou hormonů, je dobře prozkoumána u živočichů, zejména pak u hmyzu a korýšů, u nichž tyto látky ovlivňují fáze zakuklení a svlékání a zřejmě i syntézu některých pohlavních feromonů<sup>5</sup>, jejich význam pro rostliny však i přes značný obsah ES v rostlinné tkáni, bohužel, příliš objasněn není.

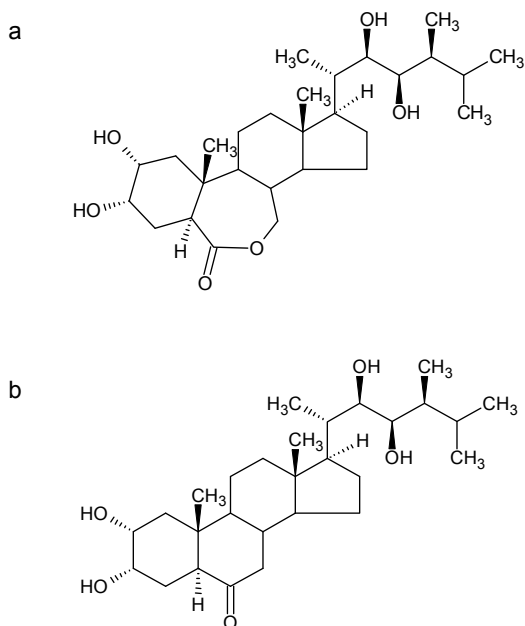
V souvislosti s bližším poznáním mechanismu působení obou výše zmiňovaných skupin hormonů u rostlin je výzkum v současné době orientován dvěma směry: první spočívá ve snaze o cílené odstranění (knock-out) či utlumení (knock-down) některého z genů ovlivňujících signální dráhu studovaných steroidů (vznikají tak např. mutanty necitlivé k působení BRs)<sup>6,7</sup>, druhý naproti tomu využívá přímé izolace vazebných bílkovin či samotných receptorů, a to buď pomocí molekulárně-biologických metod, nebo s využitím afinitní chromatografie.

### 2. Steroidní fytohormony a mechanismus jejich účinku

Mezi steroidní látky s povahou hormonů, které byly v rostlinách nalezeny, patří brassinosteroidy a ekdysteroidy. Jejich základní strukturu tvoří – podobně jako je tomu u živočišných hormonů – steranový skelet. V rostlinách se vyskytují buď volné, nebo vázané. Zatímco volnou formu představují všemožné steroly (steroidy s 3 $\beta$ -hydroxylovou skupinou a 17 $\beta$ -alifatickým postranním řetězcem) a oxysteroly (steroly, jež mají atomem kyslíku modifikován A- či B-kruh steranového skeletu, příp. i postranní řetězec), vázaná forma je zastoupena různými typy konjugátů, zvláště estery sterolů s nasycenými i nenasycenými kyselinami, méně často pak glykosidy<sup>8,9</sup>.

#### 2.1. Brassinosteroidy

BRs (obr. 1) hrají v životě rostliny nezastupitelnou roli. Ovlivňují tvorbu biomasy, růst a diferenciaci orgánů, regulují počet a velikost semen i plodů a v neposlední řadě oddalují senescenci, tedy stárnutí rostliny. Kromě toho se též podílejí na přizpůsobivosti rostliny nepříznivým životním podmínkám, jimiž jsou např. nedostatek živin či vody, přítomnost herbicidů, nadbytek solí, chlad, popř. napadení rostliny škůdci. Bylo zjištěno, že BRs působí podobně jako peptidové hormony u živočichů, tj. prostřednictvím přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. Někteří autoři vědeckých prací<sup>4</sup> předpokládají nutnost vazby samotného steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakci vzniklého aduktu s membránovým receptorem, jímž<sup>3,10</sup> zase usuzují na přímou vazbu steroidu na membránový receptor.



Obr. 1. a) Brassinolid, první objevený brassinosteroid, b) kastasteron, biosyntetický prekurzor brassinolidu

## 2.2. Ekdysteroidy

Ekdysteroidy (obr. 2) byly nalezeny jak u živočichů (např. u hmyzu a některých dalších členovců), tak u rostlin (nejhojněji jsou zastoupeny zejména ve špenátu a některých kapradinách)<sup>11,12</sup>. ES jsou rovněž označovány jako svlékáací hormony, a to díky vlivu na ekdysy hmyzu<sup>5</sup>. U něj také ovlivňují tvorbu pohlavních feromonů a mnohé jiné funkce<sup>5</sup>. Zatímco význam ES pro živočichy je znám, jejich funkce v rostlinách objasněna není. Byla sice navržena hypotéza o jejich možném zapojení se do obrany rostliny proti býložravým škůdcům a tedy funkci jakýchsi přírodních pesticidů<sup>5,13</sup>, ale zda je tomu tak i ve skutečnosti, bude nutné podložit ještě dalšími studii.

## 3. Způsoby studia působení steroidních hormonů u rostlin

### 3.1. Knock-out a knock-down genu

Pro studium mechanismu působení steroidních hormonů u rostlin se nejčastěji využívají metody založené na knock-outu, resp. knock-downu některého z genů signálních drah studovaných steroidů. Zatímco knock-outem genu míníme jeho úplné odstranění, příp. inaktivaci (např. vložením jednoho nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence)<sup>14</sup>, knock-down genu naproti tomu spočívá pouze v utlumení jeho exprese pomocí mechanismu RNA interference („rušení“ RNA, RNAi)<sup>15,16</sup>.

### 3.2. Identifikace a izolace vazebných bílkovin

#### 3.2.1. Molekulárně-biologické metody

Molekulárně-biologické metody identifikace vazebných bílkovin rostlinných sterolů (SBPs, z angl. sterol-binding proteins) jsou, podobně jako je tomu v případě izolace živočišných SBPs<sup>17,18</sup>, založeny na přípravě knihoven cDNA (z angl. complementary DNA) určitého rostlinného organismu a následném vyhledávání konkrétních genů či sekvencí DNA v těchto knihovnách<sup>19</sup>.

#### 3.2.2. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je chromatografická metoda založená na specifické a současně vratné interakci mezi dvěma molekulami dvou různých látek. Těmi mohou být např. antigen a protilátka, enzym a kofaktor, inhibitor nebo substrát, lektin a sacharid nebo případně i hormon či léčivo a jeho příslušný bílkovinný receptor či přenašeč<sup>20</sup>.

V případě studia mechanismu působení steroidních fytohormonů se využívá afinity vazebné bílkoviny ke steroidnímu ligandu navázanému na inertním polymerním nosiči. Samotné navázání pak vychází z klasické Merrifieldovy syntézy na pevné fázi<sup>21</sup>, která však byla v průběhu let pro potřeby steroidních látek<sup>22,23</sup>, resp. přímo brassinosteroidů a ekdysteroidů<sup>24</sup>, různě modifikována.

## 4. Bílkoviny s afinitou ke steroidním fytohormonům

### 4.1. Vazebné bílkoviny brassinosteroidů

Jak bylo uvedeno výše, mechanismus působení BRs je založen na přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. K tomu může teoreticky docházet buď přímou vazbou steroidu na receptor, nebo nepřímo navázáním steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakcí vzniklého aduktu s receptorem<sup>4</sup>. Výsledky z poslední doby<sup>3,10</sup> sice ukazují spíše na platnost první z teorií, nicméně ani druhá možnost není ještě zcela vyloučena.

#### BRII kinasy

Na základě genetických studií s některými mutanty huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) byl identifikován první gen pro receptory rostlinných brassinosteroidů, *BRII* (z angl. brassinosteroid-insensitive), dle původu označovaný též jako *AtBRII* (cit.<sup>25</sup>). Tento gen byl poté v různých obdobích a s různým stupněm ortologie nalezen také u rýže (*Oryza sativa*; *OsBRII*)<sup>4,26</sup>, rajčete (*Lycopersicon esculentum*; *LeBRII*, resp. *tBRII*)<sup>27</sup>, hrachu (*Pisum sativum*; *PsBRII*)<sup>28</sup>, ječmene (*Hordeum vulgare*; *HvBRII*)<sup>29</sup>, bavlníku (*Gossypium hirsutum*; *GhBRII*)<sup>30</sup> a révy (*Vitis vinifera*, *VvBRII*)<sup>31</sup>.

Produkty *BRII* genů – *BRII* bílkoviny – řadíme k tzv. LRR-RLKs kinasám (z angl. leucine-rich repeats-receptor-like kinases)<sup>32–34</sup>. Základem jejich struktury je extracelulární část, která je transmembránovou doménou spojena s částí intracelulární. U *AtBRII* tvoří extracelu-

lární část celkem 25 (cit.<sup>35–37</sup>), podle některých prací<sup>10</sup> 24 tandemových LRRs, před a za ohraničených 2 cysteinovými páry a mezi LRR21 a LRR22 přerušených 70aminokyselinovým ostrůvkem. Dále je zde přítomen tzv. signální peptid a také motiv tzv. leucinového zipu<sup>35</sup>, jehož existenci Vert a spol.<sup>10</sup> naopak vylučují. Intracelulární část je mj. tvořena Ser/Thr kinasovou doménou a CTE (z angl. carboxy-terminal extension) oblastí<sup>4,10,37</sup>.

Další ze skupiny BR receptorů, OsBRI1 rýže, je velmi podobný výše popisovanému AtBRI1. Místo 25 zde však nalezneme pouze 22 LRRs párů. Aminokyselinový ostrůvek je tvořen opět 70 aminokyselinami a je umístěn mezi LRR18 a LRR19. Bez výraznějších strukturních změn zůstávají jak Ser/Thr kinasová, tak i transmembránová doména. Přítomnost leucinového zipu zde ale prokázána nebyla<sup>33,38</sup>.

U rajčete (*Lycopersicon esculentum*) je BRI1 ortologem tBRI1. Montoya a spol.<sup>27</sup> klonováním a následnou sekvenční analýzou *tBRI1* zjistili, že tento gen zde kóduje bílkovinu obdobnou kinase SR160, identifikované u rajčete *L. peruvianum*<sup>39</sup> jako receptor pro systemin (angl. systemin receptor 160kDa), peptidový hormon – novější studie se přiklánějí spíše k označení endogenního elicitoru<sup>40</sup> – uvolňovaný při mechanickém poškození rostliny či jejím napadením býložravým hmyzem<sup>41</sup>.

Systemin – typický pro většinu zástupců čeledi *Solanaceae* vyjma tabáku<sup>42</sup> – vyvolává systémovou odpověď organismu<sup>43</sup>. Ta spočívá zejména v syntéze jasmonátu, signální molekuly zodpovědné u rostlin za indukci tvorby obranných látek, např. inhibitorů proteas, peroxidas či polyfenoloxidas<sup>41,44–46</sup> a PR proteinů<sup>47</sup>.

Sekvenčním porovnáním bylo zjištěno, že tBRI1 a SR160 jsou jedna a tatáž bílkovina. Výsledky poukazují na necelý 1% rozdíl, který je přisuzován mezidruhové proměnlivosti (tBRI1 byl nalezen u *L. esculentum*, zatímco SR160 u *L. peruvianum*)<sup>39,48</sup>. tBRI1/SR160 je tedy receptorem duálním, tj. pro brassinosteroidy i systemin současně<sup>49,50</sup>. Podobně jako je tomu v případě AtBRI1, i tBRI1/SR160 obsahuje 25 LRRs dvojic a 70aminokyselinový ostrůvek mezi LRR21 a LRR22. Výraznou podobnost nalezneme také u jednotlivých domén<sup>39</sup>.

U hrachu (*Pisum sativum*) je BRI1 ortologem PsBRI1. Nomura a spol.<sup>28</sup> předpokládají totožnost *PsBRI1* genu s genem *Lka*, ekvivalentem *AtBRI1*, což naopak Bishop a Koncz<sup>51</sup> vyvracejí. PsBRI1 obsahuje opět 25 LRRs párů, aminokyselinový ostrůvek však tvoří jen 68 aminokyselin, vnořených mezi LRR21 a LRR22 (cit.<sup>28</sup>).

Struktura HvBRI1, BRI1 ortologu u ječmene (*Hordeum vulgare*), vykazuje prvky podobnosti s jinými BRI1 ortology. Opět je přítomna LRR-doména se 70aminokyselinovým ostrůvkem, transmembránové i kinasové domény a dva páry Cys zbytků. Rozdíl je pouze v počtu párů LRRs – má jich pouze 22 – a v absenci motivu leucinového zipu. Tím se podobá spíše OsBRI1 než ostatním doposud zmiňovaným BRI1 ortologům. Vysvětlení rozdílnosti v počtu LRRs kopií a (ne)přítomnosti Leuzipu lze hledat v evoluční rozmanitosti. Huseníček,

rajče, hrách, bavlník i vinná réva totiž patří mezi rostliny dvouděložné, zatímco rýže i ječmen mezi rostliny jednoděložné<sup>29</sup>.

#### BRL proteiny

Prohledáním genových databází (GenBank/EMBL/DDBJ) bylo u rostlin nalezeno několik dalších BRI1 homologů. Jedněmi z nich jsou tzv. BRL proteiny (z angl. BRI1-like proteins). U huseníčku se jedná o AtBRL1 (cit.<sup>52,53</sup>), AtBRL2 – identický s dříve nalezeným VH1 (z angl. vascular highway 1) proteinem<sup>52,54</sup> – a AtBRL3 (cit.<sup>52</sup>), u rýže o OsBRL1, OsBRL2 a OsBRL3 (cit.<sup>38</sup>). Z dalších lze jmenovat např. hypotetickou bílkovinu s označením LjBRI1 (cit.<sup>55</sup>), homolog BRI1 z luskoviny *Lotus japonicus*, resp. CrBRI1 (cit.<sup>56</sup>), BRI1 homolog z kokošky *Capsella rubella*.

Zatímco exprese *BRI1* genu je orgánově specifická<sup>26</sup>, *BRL* geny se exprimují převážně v cévních svazcích<sup>52</sup>. U huseníčku jsou BRL – podobně jako BRI1 – lokalizovány na plazmatické membráně. Na rozdíl od BRL2 jsou BRI1 a BRI3 schopny vázat brassinolid (obr. 1a)<sup>3,52,53</sup>. A právě schopnost vazby téhož ligandu jako u BRI1 i výrazná sekvenční homologie s BRI1 (43% jako celku, 90% mezi LRRs, resp. 93% mezi aminokyselinovými ostrůvky) vedly<sup>52</sup> k vyslovení hypotézy o nových BR receptorech – BRL1 a BRL3.

O BRL je známo, že podporují diferenciaci cévních a procévních buněk<sup>52</sup>. A protože i BRs ovlivňují diferenciaci cévních buněk<sup>57</sup>, lze předpokládat, že se tak děje právě díky interakci s BRL receptory a jimi zprostředkovanou buněčnou odezvou.

BRL proteiny huseníčku jsou strukturně velmi podobné BRI1. N-koncová signální sekvence je opět následována extracelulární doménou tvořenou 23 (u BRL1 a BRL3), resp. 22 (u BRL2) páry LRRs a 70aminokyselinovým ostrůvkem a spojenou transmembránovou doménou s doménou intracelulární<sup>52,53</sup>.

Podobně jako u huseníčku, tak i u rýže jsou BRL proteiny zastoupeny nejméně 3 druhy. Nakamura a spol.<sup>38</sup> našli *in silico* sekvenčním porovnáním ortologů BRI1 a BRL proteiny OsBRL1, OsBRL2 a OsBRL3. Z jejich výsledků taktéž vyplývá, že vazby brassinolidu jsou schopny opět pouze OsBRL1 a OsBRL3. Kinoshita a spol.<sup>3</sup> se domnívají, že vazebné schopnosti BR receptorů souvisí s částí sekvence (-Asp-Gly-Ser-Met-) LRR21 ostrůvkové domény.

Stejně jako *AtBRI1*, tak i *OsBRI1* může být exprimován ve všech orgánech<sup>26</sup>. Určitou podobnost lze nalézt také u *BRL* genů. Zatímco *AtBRL1* je exprimován zejména v kořenech, stoncích a cévních tkáních a *AtBRL3* převážně v cévních tkáních, *OsBRL1* a *OsBRL3* jsou exprimovány hlavně v kořenech a *OsBRL3* navíc i v embryích<sup>32,38</sup>.

#### BAK1 kinasy

Bylo prokázáno, že BRI1 je hlavní součástí brassinosteroidového receptoru<sup>58</sup>. Na přenosu signálu se však podílí i tzv. BAK1 kinasa (z angl. BRI1-associated kinase 1), u huseníčku označovaná též jako AtSERK3 (z angl.

*A. thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 3)<sup>59–61</sup>.

BAK1 je tvořena třemi částmi: mimobuněčnou, vnitrobuněčnou a transmembránovou, která obě tyto části propojuje. O jejich struktuře platí totéž, co bylo napsáno u BRI1, u mimobuněčné části jsou však zjevné rozdíly: Zatímco signální peptid a motiv leucinového zipu (u BAK1 je kratší, je tvořen pouze 4 páry Leu-zbytků) zůstávají zachovány, aminokyselinový ostrůvek zde chybí. Počet LRRs párů je také odlišný (pouze 5) a navíc je zde přítomna doména bohatá na prolin<sup>59</sup>. BAK1 se tak strukturou podobá spíše SERK kinasám než samotnému BRI1 (cit.<sup>59</sup>).

#### Mechanismus aktivace BR-receptoru

Jak BRI1, tak BAK1 jsou v nepřítomnosti brassinosteroidů v homodimerní – inaktivní – formě. Má-li však dojít k přenosu signálu a následné buněčné odpovědi, musí být obě kinyse nejprve aktivovány.

Společným rysem aktivace většiny receptorových kinas (RK) u živočichů je di(oligo)merizace indukovaná ligandem a následovaná transfosforylací tohoto di(oligo)meru<sup>62</sup>. Zda je tomu tak i u rostlin, nebylo dosud jednoznačně prokázáno.

Na základě výsledků z poslední doby a možné podobnosti s výše zmiňovanou aktivací živočišných RK byly pro rostlinné BR-receptory navrženy dva modely mechanismu aktivace: První vychází z toho, že navázání BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 vyvolá vzájemnou interakci BRI1 s BAK1, tvorbu heterodimeru BRI1/BAK1 a následnou transfosforylací mezi BRI1 a BAK1 (cit.<sup>59</sup>), druhý naopak z toho, že vazba BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 vyvolá konformační změny mezi kinasovými doménami obou jednotek BRI1-homodimeru, a teprve pak může dojít k fosforylací a aktivaci BAK1 (cit.<sup>37,60</sup>).

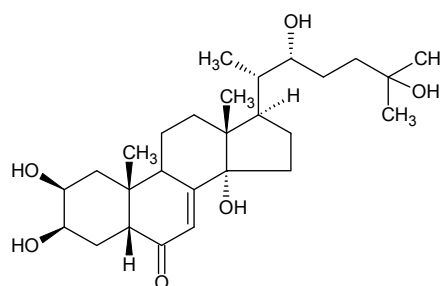
Dle Kinoshita a spol.<sup>3</sup> je pro vazbu BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 u *A. thaliana* nutný minimální vazebný motiv sestávající z 22. LRR repetice a 70aminokyselinového ostrůvku. Taktéž bylo zjištěno<sup>63</sup>, že BRI1 může přenášet signál i bez BAK1, a to pravděpodobně díky interakci s BKK1 proteiny (z angl. BAK1-like kinase), dříve označovanými jako SERK4. BAK1 i BKK1 pak podle studií z posledních let<sup>63,64</sup> patří mezi proteiny s dvojitou funkcí. Kromě již zmiňovaného významu pro BR-signalizaci je jim připisována také role regulátorů obranných mechanismů rostliny. Samotná regulace je pak míněna v negativním slova smyslu a jako nezávislá na přítomnosti BR-ligandu.

#### 4.2. Vazebné bílkoviny ekdysteroidů

Ekdysteroidy jsou látky polární a tedy poměrně dobře rozpustné ve vodě. Jejich afinita k bílkovinám – ve srovnání s jinými typy steroidů – je proto také mnohem nižší<sup>65</sup>.

#### Ekdysonový receptor

U obratlovců, resp. hmyzu, je nejlépe popsán receptor pro ekdysteroid označovaný jako ekdyson (obr. 2). Jeho



Obr. 2. Ekdyson, první objevený ekdysteroid

struktura je obdobou struktury receptorů pro thyroidní hormony, kdy jsou receptory vázány na specifické úseky jaderné DNA, které se v případě ES označují jako tzv. EcRE (z angl. ecysteroid response element)<sup>66</sup>.

Ekdysonový receptor (EcR) je charakterizován dvěma oblastmi homologie – centrálně umístěnou DNA-vazebnou doménou (DBD, z angl. DNA-binding domain) a blíže C-konci orientovanou doménou pro vazbu hormonu (HBD, z angl. hormone-binding domain)<sup>67</sup>. DBD obsahuje jako strukturální motiv dva tzv. Cys<sub>2</sub> – Cys<sub>2</sub> zinkové prsty, pomocí nichž se může receptor vnořit mezi specifické páry basí EcRE na DNA helixu<sup>68</sup>. HBD je oproti DBD oblastí, která kromě vazby hormonu zprostředkovává i heterodimerizaci receptoru (viz dále) a též na ligandu závislou transkripční aktivitu<sup>68,69</sup>.

Kromě již uvedených částí obsahuje EcR také několik proměnlivých, nehomologních úseků. K nim patří N-koncová část proteinu, která je cílem fosforylace a tím i samotné aktivace transkripce, dále tzv. pantová oblast, která slouží jako závěs mezi DBD a HBD a která navíc umožňuje rotaci DBD při vazbě receptoru na EcRE, a v neposlední řadě též proměnlivá oblast C-konce, o níž se zatím předpokládá, že není pro vazbu hormonu nikterak potřebná<sup>69,70</sup>.

Jaderné receptory mohou být plně aktivní pouze tehdy, pokud dimerizují s další molekulou receptoru<sup>68</sup>. V případě EcR ale není druhým partnerem tatáž molekula, nýbrž RXR, tedy receptor pro retinoid X (derivát kys. *cis*-9-retinové; oxidační produkt retinalu). Dimerizace je přitom umožněna hydrofóbními repetičemi v HBD doméně a usnadňována jednak interakcemi mezi DNA-vazebnými doménami obou partnerů a jednak přítomností samotného ekdysteroidového ligandu, který se váže na EcR. Teprve vzniklý heterodimer RXR:EcR je ale schopen vázat ES s dostatečnou afinitou<sup>67</sup>.

U hmyzu je obdobou RXR tzv. ultraspiracle (USP) protein<sup>71,72</sup>. Patří do skupiny receptorů označovaných jako sirotčí (angl. orphan)<sup>73</sup>. Toto pojmenování je ovšem notně zavádějící, protože vyvolává představu toho, že receptor kdysi ligand měl, ale postupem času jej ztratil. Přitom se ale může jednat o receptor, který teprve čeká na objevení svého ligandu. V případě USP totiž existují jakési náznaky toho, že by jeho vhodným ligandem mohl být některý zástupce tzv. juvenilních hormonů (JH), látek podílejících se

společně s ES na metamorfóze hmyzu<sup>74</sup>. Příkladem by mohl být methyl-epoxyfarnesoát (JH III), který při biotestech<sup>75,76</sup> skutečně vykazoval afinitu k USP. Ta ovšem byla mnohokrát nižší než je pro jaderné receptory typické.

Komplex RXR:EcR, resp. USP:EcR s navázaným ekdysteroidem se váže prostřednictvím DBD k EcRE (cit.<sup>67,71</sup>), načež je dále aktivován fosforylací. Takto aktivovaný poté urychluje tvorbu přediniciačního komplexu transkripčních jednotek faktorů TF2A a TF2D, a tím indukuje transkripci cílových genů<sup>68,77</sup>.

#### RuBisCO

Zatímco u živočichů je struktura EcR popsána poměrně podrobně, u rostlin je tomu naopak. Lze sice usuzovat na jistou konzervativnost a tedy možnou podobnost s výše uvedenou strukturou, není ovšem vyloučeno, že by mechanismus působení ES u rostlin nemohl být založen na zcela jiném principu. Stejně jako v případě živočišných ES-receptorů, kdy je např. DNA-vazebná doména RXR, resp. USP proteinů, vysoce konzervovaná, zatímco HBD vykazuje výrazné evoluční rozdíly<sup>76</sup>, tak i u rostlin na různých vývojových stupních se mohou receptory, resp. přímo jejich strukturální prvky, vzájemně odlišovat.

Macek a spol.<sup>78</sup> ve vztahu k vazebným bílkovinám ekdysteroidů u rostlin zmiňují ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasu (RuBisCO), jeden z klíčových enzymů Calvinova cyklu. Význam tohoto enzymu tkví hlavně ve schopnosti fixovat a poté zabudovávat vzdušný CO<sub>2</sub> do struktury organických molekul, tedy karboxylaci. Při ní dochází k přeměně ribulosa-1,5-bisfosfátu na 3-fosfoglycerát, jeho redukci na glyceraldehyd-3-fosfát a ten pak slouží jako výchozí látka pro tvorbu sacharosy, škrobu a dalších sloučenin<sup>79,80</sup>. Macek a spol.<sup>78</sup> dále poukazují na možnost pozitivní regulace enzymové aktivity RuBisCO pomocí některých druhů ekdysteroidních látek. Jak přesně k ovlivnění dochází a příp. na jaké místo na jeho molekule se tyto látky mohou vázat, je předmětem dalších experimentů.

Že má smysl se tímto problémem vůbec zabývat, je zřejmé již ze samotné podstaty temnostní fáze fotosyntézy, tj. spotřeby CO<sub>2</sub> a jeho využití k tvorbě sacharidů, mastných kyselin či aminokyselin, tedy základních složek rostlinného organismu. Jakékoliv výraznější zvýšení aktivity výše zmiňovaného enzymu či zvýšení jeho obsahu v rostlinách tak může vést jednak ke snižování přebytků CO<sub>2</sub> z ovzduší a jednak ke zvýšení tvorby biomasy pro energetické či potravinové účely. Problematika vazebných bílkovin fytoekdysteroidů tak díky možné spojitosti s fotosyntézou přechází z úrovně ryze teoretické na úroveň praktickou.

## 5. Závěr

Jak přesně funguje to či ono, k čemu to vlastně rostlina má, či jak to souvisí s tím a oním? I to jsou otázky, kterými se nyní musíme zabývat. Z výše uvedeného je zřejmé, že se na poli studia steroidních fytohormonů neza-

hálí, leč i přes intenzivní snahy je tato problematika stále zahalena mnoha nejasnostmi a domněnkami. První receptory pro brassinosteroidy, resp. první vazebné bílkoviny ekdysteroidů u rostlin tak nelze nazvat jinak než „střípky mozaiky, které bude nutné ještě nějak poskládat“. Zda se nám to podaří či nikoliv, ukáže až čas.

*Tato práce vznikla v rámci řešení projektů IM06030 a Z40550506.*

## LITERATURA

1. Pavlová L.: *Fyziologie rostlin* [online]. 2006, staženo 9. 1. 2009. Dostupné z: <[http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/pavlova/fyziologie\\_rostlin/](http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/pavlova/fyziologie_rostlin/)>.
2. Szekeres M., Nemeth K., Koncz-Kálman Z., Mathur J., Kauschmann A., Altmann T., Rédei G. P., Nagy F., Schell J., Koncz C.: *Cell* 85, 171 (1996).
3. Kinoshita T., Caño-Delgado A., Seto H., Hiranuma S., Fujioka S., Yoshida S., Chory J.: *Nature* 433, 167 (2005).
4. Müssig C., Altmann T.: *Trends Endocrin. Met.* 12, 398 (2001).
5. Harmatha J., Dinan L.: *Phytochem. Rev.* 2, 321 (2003).
6. Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Yoshida S., Yuan H., Feldmann K. A., Tax F. E.: *Plant Physiol.* 121, 743 (1999).
7. Yokota T.: *Trends Plant Sci.* 2, 137 (1997).
8. Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D.: *Ecdybase - The ecdysone handbook. 3rd edition* [online]. 2002, poslední revize v březnu 2008. Dostupné z: <<http://ecdybase.org>>.
9. Zullo M. A. T.: *The Brassinosteroids Page* [online]. 1997, poslední revize 29. října 2008. Dostupné z: <<http://members.tripod.com/~mzullo>>.
10. Vert G., Nemhauser J. L., Geldner N., Hong F., Chory J.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 177 (2005).
11. Jizba J., Herout V., Šorm F.: *Tetrahedron Lett.* 18, 1689 (1967).
12. Macek T., Vaněk T., v knize: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj Y., ed.). Springer, Berlin 1994.
13. Bergamasco R., Horn D. H. S., v knize: *Invertebrate Endocrinology, Vol. 1: Endocrinology of Insects* (Downer R. G. H., Laufer H., ed.). Liss, New York 1983.
14. Bouché N., Bouchez D.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 111 (2002).
15. Small I.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 148 (2007).
16. Kusaba M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 139 (2004).
17. Aniss A. M., Apostolopoulos J., Dworkin S., Purton L. E., Sparrow R. L.: *DNA Cell Biol.* 21, 571 (2002).
18. Dawson P. A., Ridgway N. D., Slaughter C. A., Brown M. S., Goldstein J. L.: *J. Biol. Chem.* 264, 16798 (1989).
19. Skirpan A. L., Dowd P. E., Sijacic P., Jaworski C. J., Gilroy S., Kao T. H.: *Plant Mol. Biol.* 61, 553 (2006).

20. Amersham Biosciences: *Affinity chromatography – principles and methods* [online]. Staženo 9. 1. 2009. Dostupné z: <[https://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/91D3DF5DE303E8B6C1256EB400417F34/\\$file/18102229AE.pdf](https://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/91D3DF5DE303E8B6C1256EB400417F34/$file/18102229AE.pdf)>.
21. Merrifield R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 (1963).
22. Routledge A., Abell C., Balasubramanian S.: *Synlett* 1, 61 (1997).
23. Bodanzsky M., Bodanzsky A.: *The Practice of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag, Berlin 1984.
24. Kamlar M., Macek T., Koncz C., Kohout L.: *Eur. J. Biochem.* 271(S1), 113 (2004).
25. Li J., Chory J.: *Cell* 90, 929 (1997).
26. Yamamuro C., Ihara Y., Wu X., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M.: *Plant Cell* 12, 1591 (2000).
27. Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T., Bishop G. J.: *Plant Cell* 14, 3163 (2002).
28. Nomura T., Bishop G. J., Kaneta T., Chory J., Yokota T.: *Plant J.* 36, 291 (2003).
29. Chono M., Honda I., Zeniya H., Yoneyama K., Saisho D., Takeda K., Takatsuto S., Hoshino T., Watanabe Y.: *Plant Physiol.* 133, 1209 (2003).
30. Sun Y., Fokar M., Asami T., Yoshida T., Yoshida S., Allen R. D.: *Plant Mol. Biol.* 54, 221 (2004).
31. Symons G. M., Davies C., Shavrukov Y., Dry I. B., Reid J. B., Thomas M. R.: *Plant Physiol.* 140, 150 (2006).
32. Morillo S. A., Tax F. E.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 460 (2006).
33. Friedrichsen D., Chory J.: *BioEssays* 23, 1028 (2001).
34. He Z., Wang Z. Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Chory J.: *Science* 288, 2360 (2000).
35. Clouse S. D.: *Mol. Cell* 10, 973 (2002).
36. Friedrichsen D. M., Joazeiro C. A., Li J., Hunter T., Chory J.: *Plant Physiol.* 123, 1247 (2000).
37. Wang X., Li X., Meisenhelder J., Hunter T., Yoshida S., Asami T., Chory J.: *Dev. Cell* 8, 855 (2005).
38. Nakamura A., Fujioka A., Fujioka S., Sunohara H., Kamiya N., Hong Z., Inukai Y., Miura K., Takatsuto S., Yoshida S., Ueguchi-Tanaka M., Hasegawa Y., Kitano H., Matsuoka M.: *Plant Physiol.* 140, 580 (2006).
39. Scheer J. M., Ryan C. A.: *PNAS* 99, 9585 (2002).
40. Narvaez-Vasquez J., Ryan C. A.: *Planta* 218, 360 (2004).
41. Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C. A.: *Science* 253 (5022), 895 (1991).
42. Scheer J. M., Pearce G., Ryan C. A.: *PNAS* 100, 10114 (2003).
43. Meindl T., Boller T., Felix G.: *Plant Cell* 10, 1561 (1998).
44. Lindsey K., Casson S., Chilley P.: *Trends Plant Sci.* 7, 78 (2002).
45. Ryan C. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 112 (2000).
46. Farmer E. E., Ryan C. A.: *PNAS* 87 (19), 7713 (1990).
47. Niki T., Mitsuhara I., Seo S., Ohashi Y.: *Plant Cell Physiol.* 39, 500 (1998).
48. Yin Y., Wang Z. Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T., Chory J.: *Cell* 109, 181 (2002).
49. Boller T.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 116 (2005).
50. Szekeres M.: *Trends Plant Sci.* 8, 102 (2003).
51. Bishop G. J., Koncz C.: *Plant Cell* 14(S1), S97 (2002).
52. Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.-C., Nam K. H., Li J., Chory J.: *Development* 131, 5341 (2004).
53. Zhou A., Huachun H., Walker J. C., Li J.: *Plant J.* 40, 399 (2004).
54. Clay N. K., Nelson T.: *Plant Cell* 14, 2707 (2001).
55. Sato S., Kaneko T., Nakamura Y., Kato T., Tabato S.: *DNA Res.* 8, 311 (2001).
56. Rossberg M., Theres K., Acarkan A., Herrero R., Schmitt T., Schumacher K., Schmitz G., Schmidt R.: *Plant Cell* 13, 979 (2001).
57. Iwasaki T., Shibaoka H.: *Plant Cell Physiol.* 32, 1007 (1991).
58. Wang Z. Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S., Chory J.: *Nature* 410, 380 (2001).
59. Nam K. H., Li J.: *J. Cell* 110, 203 (2002).
60. Li J., Wen J., Lease K. A., Doke J. T., Tax F. E., Walker J. C.: *Cell* 110, 213 (2002).
61. Hecht V., Vielle-Calzada J. P., Hartog M. V., Schmidt E. D., Boutilier K., Grossniklaus U., de Vries S. C.: *Plant Physiol.* 127, 803 (2001).
62. Schlessinger J.: *Cell* 103, 211 (2000).
63. He K., Gou X., Yuan T., Lin H., Asami T., Yoshida S., Russell S. D., Li J.: *Curr. Biol.* 17, 1109 (2007).
64. Zipfel C.: *Curr. Opin. Immunol.* 20, 10 (2008).
65. Westphal U. (ed.): *Steroid-Protein Interactions II*. Springer-Verlag, Berlin 1986.
66. Cherbas L., Lee K., Cherbas P.: *Genes Dev.* 5, 120 (1991).
67. Yao T. P., Forman B. M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J.-D., McKeown M., Cherbas P., Evans R. M.: *Nature* 336, 476 (1993).
68. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie*, str. 467 a 470. S. Rosypal, 3. vyd., Brno 1999.
69. Aranda A., Pascual A.: *Physiol. Rev.* 81, 1269 (2001).
70. Sluder A. E., Maina C. V.: *Trends Genet.* 17, 206 (2001).
71. Thomas H. E., Stunnenberg H. G., Stewart A. F.: *Nature* 362, 471 (1993).
72. Oro A. E., McKeown M., Evans E. M.: *Nature* 347, 298 (1990).
73. Giguere V.: *Endocr. Rev.* 20, 689 (1999).
74. Maki A., Sawatsubashi S., Ito S., Shirode Y., Suzuki E., Zhao Y., Yamagata K., Kouzmenko A., Kato S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 262 (2004).
75. Jones D., Jones G.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 771 (2007).
76. Hayward D. C., Dhadialla T. S., Zhou S., Kuiper M.

- J., Ball E. E., Wyatt G. R., Walker V. K.: *J. Insect Physiol.* 49, 1135 (2003).
77. Weigel N. L.: *Biochem. J.* 319, 657 (1996).
78. Macek T., Uhlík O., Kamlar M., Harmatha J., Kohout L. (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.): CZ patent 299886 (A 01 H 1/00, C 12 N 15/82).
79. Raghavendra A. S., v knize: *Encyclopedia of Applied Plant Science* (Thomas B., Murphy D. J., Murray B. G., ed.). Elsevier, Oxford 2003.
80. Malkin R., Niyogi K., v knize: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L., ed.), kap. 12. American Society of Plant Physiologists, Rockville 2000.

**M. Kamlar<sup>a,b</sup>, O. Uhlík<sup>a,b</sup>, L. Kohout<sup>a</sup>, J. Harmatha<sup>a</sup>, and T. Macek<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup> *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>b</sup> *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*):  
**Steroid Phytohormones: Function, Mechanism of Action, Significance**

In plants, steroid hormones serve as endogenous signaling molecules. Brassinosteroids act as positive growth regulators or as compounds responsible for plant stress tolerance. Phytoecdysteroids probably show an antifeedant activity. It is assumed that the brassinosteroid signal transduction is mediated by the membrane receptor system whereas the ecdysteroid action is still unclear. This review summarizes possibilities of identifying plant proteins capable of binding to steroid hormones in order to get a better insight into their function. Methods of studying the mechanism of action of steroid phytohormones include gene knock-out or knock-down technologies or direct isolation of steroid-binding proteins. The approach is illustrated by the known mechanisms as well as by identification of the Rubisco enzyme as a steroid-binding protein.

## Děkan přírodovědecké fakulty UK

vypisuje konkurs na přijetí do doktorského studia v následujících oborech:

analytická chemie, anorganická chemie, biochemie, fyzikální chemie, makromolekulární chemie, modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, organická chemie a vzdělávání v chemii.

Studium bude zahájeno 1. 10. 2010. Podmínkou přijetí je absolvování VŠ ve shodném nebo blízkém studijním oboru. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PřF UK, oddělení doktorského studia, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel. 221 951 162, 221 951 163. Přihlášky se přijímají do 30. 4. 2010.