

## PERMEAZY AUX/LAX, TRANSPORTERY ABC I BIAŁKA PIN W POLARNYM TRANSPORCIE AUKSYN

AUX/LAX PERMEASES, ABC TRANSPORTERS  
AND PIN PROTEINS IN AUXIN POLAR TRANSPORT

Ewelina STARZYŃSKA<sup>1</sup>, Jacek KEŚY<sup>2</sup>, Stanisław KOWALCZYK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii oraz <sup>2</sup>Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin,  
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu

*Streszczenie:* Transport auksyn odgrywa kluczową rolę w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin. Tylko niewielka część auksyn jest transportowana między komórkami w drodze dyfuzji przez błonę komórkową, natomiast występująca w przewodzie forma anionowa transportowana jest za pośrednictwem specyficznych nośników. W ostatnich latach udało się zidentyfikować kilka grup białek pośredniczących w polarnym transporcie auksyn. Poznano także w ogólnym zarysie rolę układu transportu pęcherzykowego w asymetrycznej lokalizacji tych białek w błonie komórkowej. Ukierunkowana relokacja nośników w komórce regulowana jest przez kinazy i fosfatazy białkowe, a przypuszczalnie także przez zmieniający się w błonie profil fosfolipidów i steroli.

*Słowa kluczowe:* auksyny, białka PIN, transportery ABC, permeazy AUX1/LAX.

*Summary:* Polar auxin transport is essential for normal plant growth and development. Auxin moves between plant cells through a combination of membrane diffusion and carrier-mediated transport. Recent studies have identified several classes of membrane proteins involved in auxin transport, and have started to uncover a system that regulates auxin flux through plant tissues via the subcellular asymmetric localization of these proteins. Localization of auxin transporters is controlled by vesicle-trafficking system, by interactions with protein kinases and phosphatases and by the profile of phospholipids and sterols in cell membrane.

*Key words:* auxins, PIN proteins, ABC transporters, permeases AUX1/LAX.

*Wykaz skrótów:* **1-NAA** – kwas naftylo-1-octowy; **1-NOA** – kwas 1-naftoksyoctowy; **2,4-D** – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; **CHPAA** – kwas 3-chloro-4-hydroksyfenylooctowy; **IAA** – kwas indolilo-3-octowy; **IBA** – kwas indolilo-3-masłowy; **NPA** – kwas 1-N-naftyloftalamowy; **TIBA** – kwas 2,3,5-trijodobenzoowy.

## WSTĘP

W ostatnich latach dokonał się znaczący przełom w prowadzonych od dziesięcioleci badaniach związanych z auksynami, który obejmuje poszukiwania w dwóch głównych obszarach tematycznych. Pierwszy z nich koncentruje się na szukaniu odpowiedzi na pytanie o to, jak lokalne zmiany w stężeniu auksyn przekładają się na zmiany w ekspresji genów, natomiast badania w drugim obszarze ukierunkowane są na poznanie mechanizmu odpowiedzialnego za powstawanie lokalnych różnic w stężeniu auksyn, które wydają się regulować niemal wszystkie procesy zachodzące w roślinie.

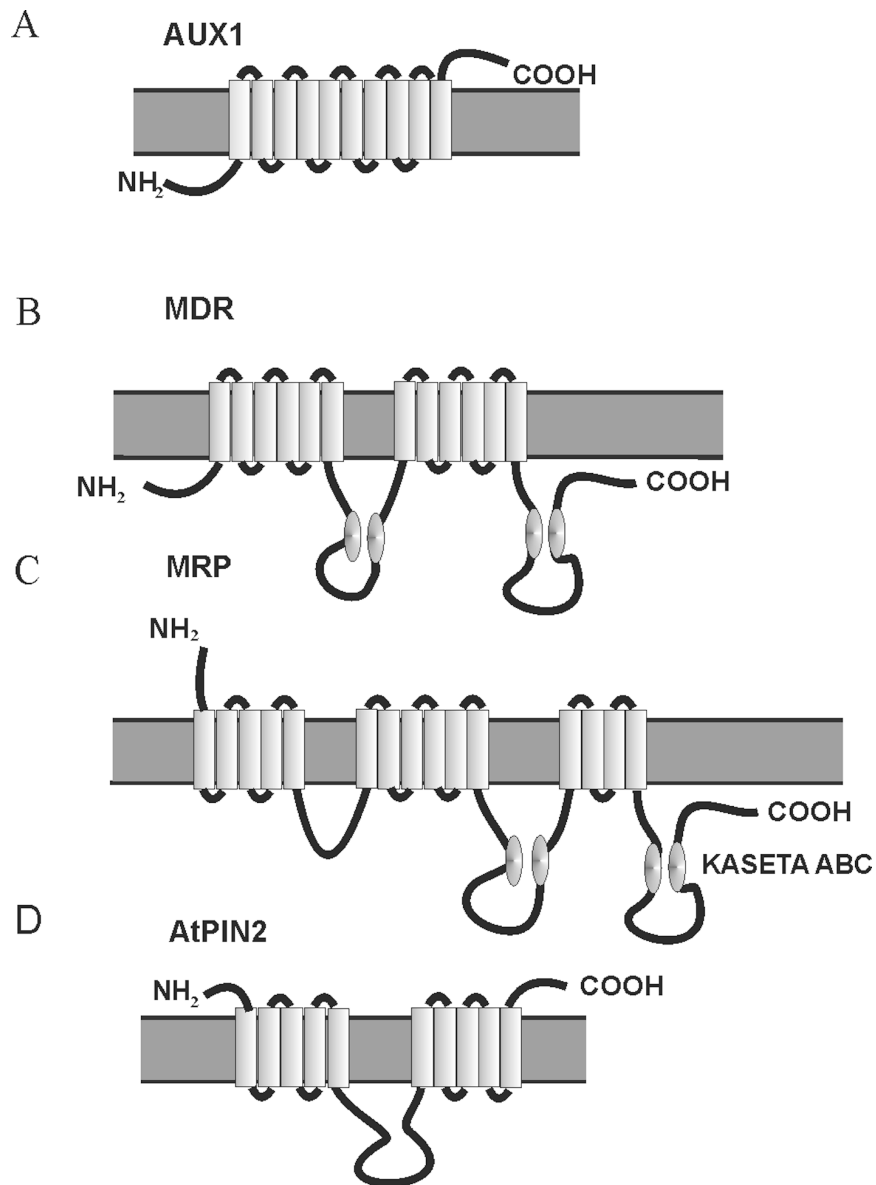
Postęp w poznawaniu auksynowych szlaków sygnałowych regulujących ekspresję określonych genów zawdzięczamy poznaniu sekwencji promotorowych motywów AuxRE znalezionych w genach pierwotnych odpowiedzi na auksynę oraz zidentyfikowaniu czynników transkrypcyjnych ARF oddziałujących z tymi motywami. Jedną z rodzin genów wczesnych odpowiedzi na auksynę tworzą geny *AUX/IAA* kodujące białka represorowe oddziałujące z czynnikami transkrypcyjnymi ARF [100]. Regulacja ekspresji genów przez auksynę polega na aktywowaniu układu ubikwitynującego białka AUX/IAA, które po wyznakowaniu ulegają proteolitycznej degradacji w proteasomach [46]. Auksynowy szlak sygnałowy kontrolujący ekspresję genów okazał się zaskakująco krótki, bowiem receptorami fitohormonu są białka TIR1/AFB wchodzące w skład wielobiałkowych kompleksów ligaz ubikwitynowych typu SCF [67]. Wiązanie auksyny przez te białka zmienia powinowactwo ligazy SCF względem określonych białek AUX/IAA, co w efekcie prowadzi do ich ubikwitynacji i degradacji. Proteoliza danego białka AUX/IAA umożliwia wiązanie jednego z 23 białek ARF do motywów AuxRE, co w efekcie prowadzi do aktywacji bądź hamowania określonego genu. Osiągnięcia dotyczące tego obszaru poszukiwań były prezentowane w pracach przeglądowych publikowanych w polskich czasopismach monograficznych [46,100], a także w pracach drukowanych w czasopismach o zasięgu ogólnosiwiatowym [50,67].

Badania z drugiego obszaru tematycznego koncentrują się głównie na poznawaniu białkowych elementów układu transportującego auksynę odpowiedzialnego za tworzenie lokalnych gradientów stężenia aktywnego fitohormonu. Sformułowana w połowie lat siedemdziesiątych XX w. koncepcja polarnego transportu auksyn oparta na założeniach teorii chemiosmotycznej zakłada, że anionowa forma IAA jest transportowana przez polarnie zlokalizowane w błonie komórkowej nośniki białkowe [73,75]. Forma niezdysoncjowana (lipofilowa) IAA, stanowiąca w apoplacie (pH 5,5) około 16% całkowitej puli IAA, może biernie dyfundować przez błonę komórkową, natomiast obdarzona ładunkiem pozostała część IAA wnika do komórki za pośrednictwem swoistego nośnika na zasadzie symportu z protonami. W cytoplazmie, w pH zbliżonym do obojętnego IAA występuje głównie w formie anionowej i dlatego jego transport do apoplastu wymaga innego nośnika transportującego IAA<sup>-</sup> na zasadzie uniportu, którego kierunek jest zgodny z istniejącą różnicą potencjału elektrochemicznego błony. Koncepcja polarnego transportu IAA powstała na podstawie doświadczeń wykorzystujących TIBA (inhibitor wpływu auksyny z komórki) oraz syntetyczną auksynę 2,4-D, konkurującą z IAA o miejsce wiązania

na hipotetycznym białku nośnikowym. Doświadczenia prowadzone w kolejnych latach, zwłaszcza te, w których używano inhibitorów transportu (NPA, TIBA) oraz syntetycznych auksyn (1-NAA i 2,4-D), pośrednio potwierdziły główne założenia proponowanej teorii, jakkolwiek zasadniczy przełom w badaniach nastąpił dopiero w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych XX w. po sklonowaniu genów kodujących białka nośnikowe. Postęp w badaniach stał się możliwy także dzięki nowym technikom badawczym biologii molekularnej, a szczególnie technice wykorzystującej motyw AuxRE, określane skrótowo *DR5*, z promotora genu *GH3* pierwotnych odpowiedzi na auksynę. Zmodyfikowany motyw *DR5* służy do konstruowania chimer z genami reporterowymi *GUS* lub *GFP*, których ekspresja jest skorelowana ze zmianami stężenia aktywnej auksyny wewnątrz komórki. Dzięki tej technice można dzisiaj śledzić zmiany w stężeniu auksyny na poziomie pojedynczych komórek [88]. Wyniki obserwacji mikroskopowych w połączeniu z analizą zmian lokalizacji białek nośnikowych w błonie komórkowej przyczyniły się do zrozumienia istoty mechanizmu ukierunkowanego transportu auksyny, a co szczególnie ważne dały pewne wyobrażenie o niezwyklej dynamice zmian leżących u podstaw niemal wszystkich procesów wzrostu i rozwoju roślin. O kluczowym znaczeniu tych badań w biologii roślin świadczy liczba prac przeglądowych publikowanych każdego roku w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym [4,10,22,23,25,47,49,50]. Również na łamach *Postępów Biologii Komórki* opublikowano w ostatnich latach trzy prace poświęcone zagadnieniom związanym z transportem auksyn [3,94,96].

## PERMEAZY AUX1/LAX – NOŚNIKAMI DOKOMÓRKOWEGO TRANSPORTU AUKSYN

Na początku lat osiemdziesiątych XX w. wyselekcjonowano mutantą *aux1 A. thaliana*, u którego 2,4-D tylko nieznacznie hamuje wzrost korzenia [68]. Oprócz obniżonej wrażliwości na hamujące działanie auksyny w reakcji wzrostowej, mutant *aux1* wykazuje także brak reakcji grawitropicznej korzenia. Agrawitropizm korzenia ułatwił wyselekcjonowanie mutantą *aux1-100*, allelicznego z *aux1* oraz sklonowanie zmutowanego genu [7]. Polipeptyd AUX1 zbudowany z 485 reszt aminokwasowych o wyliczonej masie cząsteczkowej 54,1 kD jest podobny do roślinnych i grzybowych permeaz transportujących aminokwasy [7]. Białko AUX1, w 21% identyczne i w 48% podobne do permeazy AAP1 *A. thaliana* transportującej aminokwasy, zawiera 11 hydrofobowych domen transbłonowych, fragment N-końcowy skierowany do wnętrza komórki oraz fragment C-końcowy zwrócony do apoplastu (ryc. 1A) [85]. Późniejsza analiza sekwencji aminokwasowej roślinnych permeaz umożliwiła zaklasyfikowanie AUX1 do jednej z pięciu podrodzin permeaz AAP transportujących aminokwasy i auksyny [98]. Wyodrębnioną podrodzinę oprócz AUX1 tworzą trzy inne białka LAX od 1 do 3 (ang. *like AUX1*), których poziom identyczności z AUX1 wynosi od 73 do 82% [68]. Białka AUX1/LAX są filogenetycznie najbliższe podrodzinie białek ORF *Caenorhabditis elegans* o niepoznanej jeszcze funkcji [98].



RYCINA 1. Schemat budowy białek transportujących auksyny, szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [31,59,85])

W tym miejscu warto zwrócić uwagę na fakt, iż co najmniej niektóre permeazy AAAP cechuje raczej niewielka swoistość substratowa. Wyniki doświadczeń prowadzonych na drożdżach transformowanych genem *ANT1* z innej podrodziny permeaz AAAP transportujących aminokwasy aromatyczne i obojętne pokazały, że badana permeaza transportuje do wnętrza komórek także 2,4-D i IAA [15].

Mimo że dotychczas nie opublikowano żadnej pracy eksperymentalnej na temat roli białek LAX, to jednak wyraźne podobieństwo struktury pierwszorzędowej pozwala sądzić, że również te białka biorą udział w transporcie auksyny. Wątpliwości związane z problemem funkcjonalnej redundancji genów *AUX1/LAX* można tłumaczyć zróżnicowaną tkankowo ekspresją poszczególnych genów. W przypadku odmiennej lokalizacji tkankowej białek AUX1 i LAX, uniemożliwiającej ich wzajemną komplementację wyraźne zmiany fenotypowe mogą wystąpić nawet w przypadku pojedynczej mutacji, tak jak w przypadku mutacji *aux1*.

Udział AUX1 w transporcie auksyn do wnętrza komórki pośrednio potwierdzają wyniki doświadczeń, w których wykazano, że fenotyp *aux1* jest bardzo podobny do fenotypu rośliny linii dzikiej traktowanej inhibitorami dokomórkowego transportu auksyn (1-NOA czy CHPAA) [66]. Zmiany wywołane działaniem 1-NOA, podobnie jak zmiany fenotypowe mutantu *aux1*, można cofnąć aplikując do tkanki 1-NAA, tj. auksynę swobodnie dyfundującą do wnętrza komórki [56,66]. Komórki korzenia mutantu *aux1* pobierają dwukrotnie wolniej 2,4-D w porównaniu z rośliną dziką, podczas gdy szybkość wnikania 1-NAA czy tryptofanu jest podobna [55]. Z białkiem AUX1 oddziałuje chromosaponina I izolowana z grochu i innych roślin motylkowatych, hamująca import IAA do apikalnych skrawków korzeni. Efektem hamowania transportu jest agrawitropiczny fenotyp korzenia [71].

Oprócz obserwacji pośrednio potwierdzających udział AUX1 w dokomórkowym transporcie auksyn, od niedawna dysponujemy także wynikami badań, które potwierdzają zakładaną funkcję AUX1 w sposób bardziej bezpośredni. W doświadczeniach prowadzonych na oocytach *Xenopus laevis* transformowanych genem *AUX1* wykazano ścisłą zależność między szybkością pobierania IAA a obecnością AUX1 w błonie komórkowej [97]. Ponadto wyniki przeprowadzonych doświadczeń pokazują, że 2,4-D i 1-NOA konkurują z [<sup>3</sup>H]-IAA przenoszonym do wnętrza komórki, natomiast 1-NAA i IBA nie są transportowane przez AUX1. W tych samych doświadczeniach potwierdzono także brak hamowania transportu [<sup>3</sup>H]-IAA przez NPA i TIBA [97].

Dzięki wykorzystaniu w badaniach technik biologii molekularnej potwierdzono błonową lokalizację AUX1 oraz wykazano, że usytuowanie nośnika w błonie komórkowej może być zróżnicowane. W komórkach kolumelli i komórkach bocznych czapeczki korzeniowej, a więc w miejscu, gdzie bierze początek bazypetalny strumień auksyny (od wierzchołka do podstawy korzenia), AUX1 jest rozmieszczone w błonie komórkowej równomiernie (apolarnie) [84,85,86]. W komórkach protofloemu korzenia AUX1 jest usytuowane polarnie, co wskazuje na jego udział w rozładunku floemu i transporcie auksyny do wierzchołka korzenia (transport akropetalny). Tak więc, przyczyną braku reakcji grawitropicznej korzenia u mutantu *aux1* jest zaburzenie polarnego transportu auksyny w komórkach protofloemu, kolumelli oraz w komórkach bocznych czapeczki [84,86].

Białko AUX1 zlokalizowane w komórkach epidermalnych merystemu wierzchołkowego pędu współuczestniczy z innymi nośnikami w generowaniu strumienia auksyny, którego rola jest wiązana z inicjowaniem zawiązków liści i kwiatów oraz z filotaksją [74,83]. Ponadto AUX1 bierze udział w załadunku IAA do wiązek naczyniowych w

liściach, rozładunku floemu i dostarczaniu odpowiedniej ilości auksyny koniecznej do inicjowania zawiązków korzeni bocznych [55]. Przytoczone wyniki badań pokazują, że transport formy jonowej  $IAA^-$  za pośrednictwem permeazy AUX1 wydaje się mieć kluczowe znaczenie w miejscach wzmożonego transportu auksyny. Staje się to zrozumiałe, gdy sobie uświadomimy, że forma niezdisocjowana IAA swobodnie dyfundująca przez błonę stanowi zaledwie niewielką część całkowitej puli wolnej auksyny obecnej w apoplaście.

W ostatnim czasie u mutantu *axr4 A. thaliana* zidentyfikowano i sklonowano gen kodujący białko zlokalizowane w siateczce śródplazmatycznej, które przypuszczalnie uczestniczy w prawidłowym wbudowywaniu AUX1 do błony plazmatycznej [20].

### **TRANSPORTERY Z KASETĄ ABC ORAZ BIAŁKA Z RODZINY TRANSPORTERÓW $K^+$ W KOMÓRKOWYM IMPORCIE I EKSPORCIE AUKSYN**

W ostatnich latach opublikowano kilka prac, których przedmiotem badań były białka z rodziny transporterów ABC (ang. *ATP binding cassette*) mogące pompować auksynę przez błonę komórkową na koszt hydrolizy ATP [11,34]. Genom *A. thaliana*, podobnie jak genom ryżu, zawiera ponad 120 genów kodujących białka o charakterystycznej budowie modularnej z dwiema domenami transbłonowymi (TMD) i dwiema domenami wiążącymi nukleotydy (NBD) [31,44,78]. Prawie połowa białek z tej rodziny (w *A. thaliana* 54 białka) zbudowana jest z pojedynczego polipeptydu, który w zależności od podrodziny zawiera 12 bądź 14 fragmentów transbłonowych tworzących dwie domeny transbłonowe. Domeny wiążące nukleotydy, które hydrolizują ATP, położone są w obrębie pętli cytoplazmatycznych. Na rycinie 1B i 1C przedstawiono schemat budowy jedno-polipeptydowych transporterów ABC należących do dwóch podrodzin, z których co najmniej niektóre biorą udział w transporcie auksyn. Podrodzina transporterów PGP/MDR (ang. *P-glycoprotein/multidrug resistance*) kodowana w *A. thaliana* przez 22, a w ryżu 24 geny nawiązuje budową do ssaczych transporterów MDR (ang. *multidrug resistance protein*) [31]. Podrodzina MRP (ang. *multidrug resistance-associated protein*) obejmuje w *A. thaliana* 16, a w ryżu 17 białek [31].

Pierwsze sugestie dotyczące udziału transporterów ABC w transporcie auksyn pochodzą z badań prowadzonych na *A. thaliana*, w których technikami biologii molekularnej manipulowano poziomem białka AtPGP1. Obserwowane zmiany fenotypowe wskazywały na nieprawidłowości w polarnym transporcie auksyny [11]. Podobne zakłócenia w transporcie auksyny są przypuszczalnie przyczyną zmian fenotypowych u karłowatych mutantów *br2* (ang. *brachytic 2*) kukurydzy i *dw3* (ang. *dwarf 3*) sorgo z mutacjami w genach z rodziny PGP [11].

Białka z rodziny PGP/MDR w *A. thaliana* dzielą się na trzy podrodziny. Pierwsza podrodzina obejmuje AtPGP1, AtPGP19 oraz cztery inne transportery (AtPGP2,10,13 i 14). Na podstawie dotychczasowych badań wiemy, że co najmniej dwa białka z tej podrodziny, a mianowicie AtPGP19/AtMDR1 i AtPGP1 biorą udział w transporcie

auksyny z komórki [33,51,62]. Mutacjom *Atpgp19* i *Atpgp1* towarzyszy wiele zmian fenotypowych pojawiających się w warunkach zaburzonego transportu auksyny. Szczegółowe analizy potwierdziły, że bazypetalny transport [<sup>14</sup>C]-IAA w siewkach i pędach kwiatowych mutantu *Atpgp19* i podwójnego mutantu *Atpgp19/Atpgp1* *A. thaliana* jest wyraźnie wolniejszy [62]. Również wypływ IAA z protoplastów uzyskanych z komórek mezofilowych mutantów *Atpgp1* i *Atpgp19* jest ograniczony, a u podwójnego mutantu *Atpgp19/Atpgp1* jest hamowany w około 50% [32]. W innych badaniach wykazano, że komórki tytoniu transformowane *AtPGP19* znacznie wydajniej transportują NAA na zewnątrz [70]. Także wypływ IAA z komórek drożdży i ludzkich komórek HeLa transformowanych *AtPGP1* jest wielokrotnie szybszy w porównaniu z wpływem z komórek kontrolnych [32]. Ponadto, transport auksyny z komórek drożdży jest wyraźnie hamowany przez cyklosporynę A i verapamil, inhibitory ssaczych transporterów MDR. O udziale *AtPGP1* w transporcie auksyny z komórki może również świadczyć jego lokalizacja w komórce. W części apikalnej korzenia i pędu *AtPGP1* jest równomiernie rozmieszczone w błonie komórkowej, natomiast powyżej strefy elongacyjnej występuje w bazalnym końcu komórek [32].

Białka *AtPGP1* i *AtPGP19* wiążą NPA oraz podobne do immunofiliny błonowe białko TWD1 [33,62]. Mutacja w genie *TWD1* prowadzi do drastycznego zahamowania wypływu auksyny z komórki, co – wg autorów – świadczy o regulatorowej funkcji TWD1 w stosunku do *AtPGP1* i *AtPGP19* [33].

Jedynym białkiem z drugiej podrodziny transporterów PGP/MDR, którego funkcja jest obecnie wiązana z polarnym transportem IAA, jest *AtPGP4* [87]. *AtPGP4* ma 10 bądź 11 fragmentów transbłonowych i jest w 60% identyczne z *AtPGP1*. Jedyne bardziej znaczące różnice między obu białkami występują w regionie wiążącym nukleotydy oraz w części N-końcowej, w której *AtPGP4* ma 20-aminokwasowe przedłużenie tworzące domenę superhelisy (ang. *coiled-coil*) [87]. Wyniki doświadczeń prowadzonych na komórkach HeLa i drożdżach transformowanych genem *AtPGP4* dowodzą, że *AtPGP4* transportuje auksynę do wnętrza komórki podobnie jak *AUX1* [76,87]. Ekspresja genu *AtPGP4* zachodzi głównie w korzeniu. W regionie czapeczki korzeniowej białko *AtPGP4* wykazuje lokalizację niepolarną, natomiast w komórkach epidermalnych powyżej czapeczki jest zlokalizowane polarnie [76,87]. Polarna lokalizacja *AtPGP4* jest zgodna z kierunkiem transportu auksyny w tej części korzenia.

Na razie brakuje jakichkolwiek danych na temat roli transporterów trzeciej, liczącej sześć białek podrodziny *AtPGP/MDR* [34], natomiast pojedyncze doniesienie sugeruje, że białko *AtMRP5* z rodziny transporterów MRP, obejmującej w *A. thaliana* 16 genów, może uczestniczyć w transporcie auksyny. Mutacji w genie *AtMRP5* towarzyszy dwukrotny wzrost stężenia IAA w korzeniu, którego efektem jest zahamowanie wzrostu korzenia i zwiększona liczba zawiązków korzeni bocznych [29].

Warty podkreślenia jest fakt, że ekspresja wszystkich badanych genów kodujących transportery ABC, których produkty uczestniczą w polarnym transporcie auksyn, jest aktywowana przez auksynę [11].

Inną rodziną białek, która w związku z badaniami polarnego transportu auksyn budzi coraz większe zainteresowanie, są transportery jonów potasowych kodowane w *A. thaliana* przez 13 genów *KT/KUP/HAK* [91]. Dotychczasowe, pojedyncze jeszcze

wyniki sugerują, że niektóre białka z tej rodziny nie transportują jonów  $K^+$ , lecz funkcjonują jako transportery auksyn. Fenotyp mutantu *trh1* z zahamowanym wzrostem włośników korzeniowych czy ograniczony wzrost wydłużeniowy hypokotylu u mutantu *shy* (*Atkup2*) mogą nasuwać przypuszczenie, że przyczyną tych zmian są zakłócenia w transporcie auksyn [21,91]. Przypuszczenie to potwierdzają doświadczenia prowadzone na drożdżach transformowanych genem *TRH1*, których wyniki dowodzą, że białko TRH1 transportuje IAA z komórki [91]. Ekspresja *TRH1* zachodzi w czapeczce korzeniowej, głównie w komórkach kolumelli, gdzie stężenie auksyny jest wysokie. Obserwowany wzrost stężenia auksyny w protoksylemie korzenia u mutantu *trh1* świadczy o zahamowaniu transportu w obrębie czapeczki korzeniowej, co potwierdza udział białka TRH1 w polarnym transporcie auksyn [91]. Na obecnym etapie badań możemy więc przypuszczać, że TRH1 jest samodzielnym białkiem transportującym auksynę bądź nośnikiem kotransportu  $K^+$ /auksyna [91].

## BIĄŁKA PIN – NOŚNIKAMI WYPŁYWU AUKSYN Z KOMÓRKI

W najnowszych badaniach dotyczących polarnego transportu auksyn najwięcej uwagi poświęca się białkom transportującym auksynę z komórki, kodowanym przez geny z rodziny *PIN* (ang. *pin-formed*). Osiągnięcia na tym polu prezentowane są w pracach przeglądowych opublikowanych w ostatnich trzech latach w czasopiśmie o zasięgu ogólnosięciowym [4,23,49,50,65].

Obecne, szeroko zakrojone badania związane z białkami PIN rozpoczęły się w drugiej połowie lat 90 od wyselekcjonowania mutantów *agr1*, *eir1* i *pin2* *A. thaliana* z defektem w reakcji grawitropicznej korzenia [16,54,59]. Fenotyp agrawitropiczny każdego z tych mutantów okazał się być wynikiem mutacji w tym samym genie *PIN2/AGR1/EIR1*, allelicznym z poznanym wcześniej genem *WAV6* [59]. W tym samym czasie u mutantu *A. thaliana* – *pin-formed* ze szpilkowato wydłużonym pędem kwiatostanowym pozbawionym kwiatów – sklonowano gen *PIN1* [30]. W miarę postępu badań w genomie *A. thaliana* zidentyfikowano w sumie osiem genów *PIN* (*AtPIN1-AtPIN8*) i siedem genów *PIN-like* [65]. Białka PIN różnią się wielkością. Najmniejsze *AtPIN5* składa się z 351 aminokwasów, a największe *AtPIN2* jest zbudowane z 647 reszt aminokwasowych [65]. Sześć, spośród ośmiu białek *AtPIN*, ma 10 lub 11 fragmentów transbłonowych oraz stosunkowo długą pętlę hydrofilową skierowaną do cytoplazmy (ryc. 1D), a jedynie białka *AtPIN5* i *AtPIN8* mają bardzo krótką pętlę w regionie centralnym i zaledwie 6 do 8 hydrofobowych fragmentów transbłonowych [65]. Najbardziej są do siebie podobne białka *PIN3*, *PIN4* i *PIN7*, białka *PIN2* i *PIN6* stanowią odrębną podgrupę, a *PIN1* tworzy oddzielną gałąź filogenetyczną.

Przez wiele lat w literaturze naukowej unikano jednoznacznych określeń wiążących funkcję białek PIN z transportem auksyn, używając zwykle określenia „białka ułatwiające wypływ auksyn” (ang. *auxin efflux facilitators*). Dopiero wyniki badań opublikowane w bieżącym roku jednoznacznie dowodzą, że to białka PIN, bez udziału



innych białek, transportują auksyny z komórki [70]. Autorzy badali m.in. szybkość wypływu [<sup>3</sup>H]-IAA z ludzkich komórek HeLa oraz komórek drożdży transformowanych genem *PIN2* bądź *PIN7*. Wyniki tych doświadczeń są na tyle przekonujące, że nazywanie białek PIN nośnikami wypływu nie powinno już dzisiaj budzić zastrzeżeń. Nie wyklucza to oczywiście możliwości współtworzenia z innymi białkami kompleksów transportujących auksynę, w których pewne białka mogą pełnić funkcje regulatorowe.

Ekspresja genów *PIN2*, *PIN5*, *PIN6*, *PIN7* i *PIN8* zachodzi na niskim poziomie niemal w każdej tkance, chociaż w określonych tkankach może wzrastać w pewnych warunkach nawet 10–50-krotnie, np. *PIN2* w korzeniu, *PIN7* w płatkach kwiatu, a *PIN8* w dojrzałych ziarnach pyłku [65]. Pojedyncze doniesienia sugerują, że ekspresja przynajmniej niektórych genów *PIN* jest aktywowana przez auksynę [77,92]. W auksynowym szlaku sygnałowym aktywującym niektóre geny *PIN* uczestniczą białka represorowe AUX/IAA (IAA14, IAA17) oraz czynniki transkrypcyjne ARF [89]. W innych badaniach wykazano, że auksyna może mieć także wpływ destabilizujący na niektóre białka PIN, np. degradacja *PIN2* jest wyraźnie aktywowana przez auksynę [80,92]. W warunkach indukcji grawitropicznej korzenia, polegającej na zmianie położenia rośliny względem wektora siły grawitacyjnej, dochodzi do nierównomiernego rozmieszczenia *PIN2* w błonie komórek epidermalnych na przeciwległych stronach korzenia. Wyniki najnowszych badań pokazują, że w komórkach epidermalnych po górnej stronie korzenia białka *PIN2* ulegające internalizacji są ubikwitynowane i degradowane w proteasomach [1].

W doświadczeniach wykorzystujących inhibitory polarnego transportu zaburzające homeostazę auksynową stwierdzono obecność białek PIN w komórkach, w których w warunkach normalnych są obecne w śladowych ilościach bądź w ogóle nie występują [65]. Na aktywność określonych genów *PIN* ma także wpływ funkcjonalna sprawność innych białek PIN. Wykazano, że ekspresja genu *PIN7* w komórkach wierzchołkowych korzenia obejmuje większą liczbę komórek u podwójnego mutantu *pin2/pin3* niż u osobnika z linii dzikiej [65]. Podobnie jest w przypadku genu *PIN4*, którego ekspresja była badana u mutantów *pin3/pin7* [12]. Redundancja funkcjonalna i zastępowanie jednego białka PIN przez inne wydaje się dotyczyć zwłaszcza genów z tej samej podrodziny [12,92]. W kontekście powyższych wyników niejasna jest przyczyna drastycznych zaburzeń lokalizacji PIN1 w bazalnej części błon komórkowych w hypokotylu mutantów *pgp1* i *pgp19/mdr1*, a zwłaszcza u podwójnego mutantu *pgp1/pgp19* [61]. Na razie możemy jedynie przypuszczać, że obserwowane zmiany są następstwem zakłóceń w polarnym transporcie auksyny bądź, co bardziej prawdopodobne, wynikają z fizycznego oddziaływania między obu typami nośników mogących tworzyć w błonie kompleksy transportujące auksyny.

Na ekspresję genów *PIN*, oprócz samej auksyny, wpływają także inne czynniki. Wykazano, że ekspresja *PIN4* i *PIN7* jest hamowana przez brasinosteroidy, aktywność *PIN3* i *PIN7* jest regulowana przez fitochromy A i B, a mutant *ifl1-2* z defektem w genie kodującym białko z domeną homeotyczną HD-ZIP ma niemal całkowicie zablokowaną ekspresję *PIN3* i *PIN4* [65].

W warunkach wymuszonej ekspresji określonego genu *PIN*, np. u wielokrotnych mutantów *pin*, białko pojawiające się w komórce jako „nowe” wbudowywane jest do błony w tej części komórki, jaką zajmuje białko *PIN* występujące w tej komórce konstytutywnie [92]. Wykazano m.in., że białko *PIN1*, które w komórkach wiązek naczyniowych korzenia występuje w części dolnej (transport akropetalny), u podwójnego mutantu *pin2/pin3* czy mutantu *pin2/pin3/pin4* pojawia się w miejsce *PIN2* w dolnej części komórek kory (transport akropetalny) oraz w górnej części komórek epidermalnych (transport bazypetalny) [65,92]. Obserwacje te prowadzą do wniosku, że o lokalizacji nośnika decyduje komórka, a właściwie swoisty dla danej komórki mechanizm sortowania białek. Z drugiej jednak strony wyniki ostatnich doświadczeń pokazały, że w kierowaniu białek *PIN* w określone miejsce błony komórkowej gra również rolę swoista dla danego białka sekwencja aminokwasowa [95]. Wykazano to w doświadczeniach, w których w komórkach epidermalnych korzenia badano lokalizację chimery *PIN1-GFP*, której ekspresja była wymuszana przez dołączony promotor genu *PIN2*. Okazało się, że syntetyzowane białko *PIN1-GFP* może trafiać do błony apikalnej bądź bazalnej w zależności od tego, w jakim miejscu polipeptydu *PIN1* dołączone jest białko *GFP*. Zmieniona w wyniku takiej manipulacji lokalizacja *PIN1-GFP* wyraźnie zmienia reakcję grawitropiczną korzenia [95].

W dotychczasowych badaniach poświęconych roli poszczególnych białek *PIN* wykazano ich udział w embriogenezie (*AtPIN1*, *AtPIN4* i *AtPIN7*) [24,26,82], organogenezie (*AtPIN1* i *AtPIN4*) [6,24,90], filotaksji (*AtPIN1*) [42,74], grawitropizmie (*AtPIN2* i *AtPIN3*) [27,59,63] oraz w fototropizmie (*AtPIN1* i *AtPIN3*) [9,27].

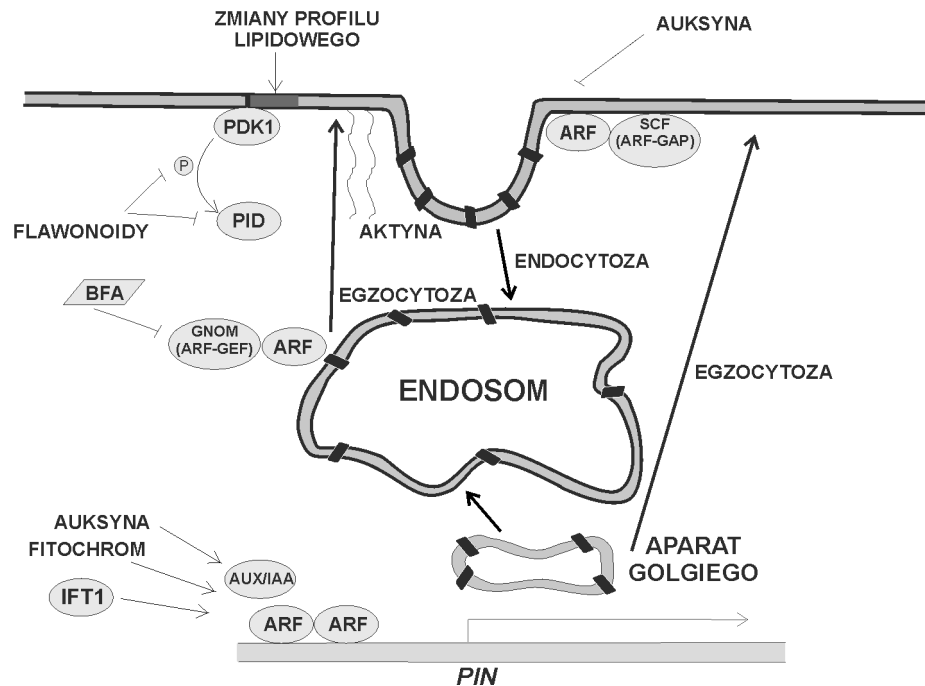
## RELOKACJA BIAŁEK *PIN* ZA POŚREDNICTWEM TRANSPORTU PĘCHERZYKOWEGO

Zmiana lokalizacji białek *PIN* i towarzysząca temu zmiana kierunku strumienia auksyny ma kluczowe znaczenie w inicjowaniu takich procesów, jak: ustalanie osi apikalno-bazalnej zarodka, różnicowanie wiązek naczyniowych, filotaksja, odpowiedzi tropiczne czy inicjowanie korzeni bocznych [4,10,49,50]. Badania związane z problemem relokacji białek transportujących auksyny rozpoczęły się od sklonowania genu *GNOM* u mutantu *A. thaliana*, wykazującego wiele anomalii rozwojowych w okresie embriogenezy i rozwoju poembrionalnym [58]. Przyczyną tych anomalii okazały się nieprawidłowości w polarnej lokalizacji *PIN1* spowodowane wadliwym funkcjonowaniem układu transportu pęcherzykowego [36,37,38,82]. Białko *GNOM* (*ARF-GEF*) wymienia *GDP* na *GTP* na małym białku *G* z rodziny *ARF*, które funkcjonuje w opłaszczaniu pęcherzyków poprzedzającym ich odpączkowanie [38,58]. Z białkiem *ARF-GEF* oddziałuje brefeldyna A (*BFA*), toksyna izolowana z grzybów, która zakłóca jego interakcję z białkiem *ARF*, hamując w ten sposób przyłączanie elementów opłaszczania do błony pęcherzyka. W obecności brefeldyny A (*BFA*) następuje agregacja endosomów, które są otaczane przez cysterny aparatu Golgiego, tworząc tzw.

„kompartymnt BFA” (ryc. 2). Efektem działania BFA, podobnie jak mutacji *gnom*, jest zahamowanie egzocytarnego transportu pęcherzyków z endosomów do plazmolemy [37,38]. W obu przypadkach ubywa w błonie białka PIN na skutek jego internalizacji, a także w wyniku zablokowania powrotu do błony, co w efekcie prowadzi do zmian w transporcie polarnym, podobnych do tych, jakie mają miejsce w obecności inhibitorów wypływu auksyny [37].

W ostatnim czasie wyselekcjonowano mutantą *scarface (sfc)* *A. thaliana*, który ma zmieniony gen *ARF-GAP* kodujący białko aktywujące ARF [81]. ARF-GAP jest więc negatywnym regulatorem ARF, a mutacja w jego genie prowadzi do zahamowania internalizacji PIN1 oraz zmian w różnicowaniu wiązek naczyniowych w liście [81].

W badaniach internalizacji białek PIN wykazano, że aktywne auksyny hamują endocytozę powodując wzrost poziomu PIN1 w błonie [64]. Oszacowano, że w roślinach kontrolnych około 62% PIN2 jest zlokalizowane w błonie, natomiast w obecności auksyny puła ta rośnie do około 85%. W próbach wyselekcjonowania mutantów, które byłyby niewrażliwe na hamujące działanie auksyny na endocytozę, zidentyfikowano mutantą *tir3* znanego już wcześniej jako niewrażliwego na inhibitory transportu [39]. Zmutowany gen *TIR3*, zidentyfikowany także u mutantów *doc1*, *asal* i *umb1*, koduje białko, którego nazwa ze względu na wielkość (560 kDa) została ostatnio zmieniona na BIG [39]. Brak hamowania internalizacji białek PIN przez auksynę u mutantą *big* sugeruje, że białko BIG może funkcjonować w transporcie pęcherzykowym, tym bardziej że wykazuje pewne podobieństwo do białka kallozyny, zidentyfikowanego u *D. melanogaster*, którego funkcja



RYCINA 2. Schemat relokacji białek PIN, szczegóły opisano w tekście

jest wiązana z transportem pęcherzykowym w zakończeniach synaptycznych [39]. Funkcja BIG w roślinach wiązana jest także z sygnalizacją etylenową, cytokininową i brasinosteroidową, a także z sygnalizacją świetlną [19,45,53].

W recyklingu białek PIN za pośrednictwem transportu pęcherzykowego uczestniczy aktyna. Świadczy o tym hamujący wpływ cytochalazyny D i latrunkuliny B, związków depolimeryzujących włókna aktynowe, na relokację PIN1 [37]. Jednak wyniki najnowszych badań pokazują, że włókna aktynowe są potrzebne w powrocie białek PIN do błony komórkowej, natomiast ich internalizacja z błony do „kompartymentu BFA” wydaje się być niezależna od aktyny [13]. Udział cytoszkieletu aktynowego w relokacji białek transportujących auksyny potwierdzono także w badaniach prowadzonych na mutancie z usuniętym genem *MYA2*, kodującym miozynę XI [43]. Zmiany fenotypowe powstałe w wyniku mutacji *mya2* sugerowały, że brak miozyny XI prowadzi do daleko idących nieprawidłowości w polarnym transporcie auksyny. Zakładane zaburzenia zostały potwierdzone w doświadczeniach z użyciem [<sup>14</sup>C]IAA, podawanego apikalnie na pęd kwiatowy, które ujawniły, że mutacja *mya2* drastycznie ogranicza bazypetalny transport auksyny [43]. Z cytoszkieletem aktynowym oddziałuje także białko wiążące NPA, inhibitor wypływu auksyny z komórki, które, jak się uważa, tworzy kompleksy z białkami PIN [57].

W dotychczasowych badaniach wykazano, że ciągłemu recyklingowi pomiędzy błoną komórkową a kompartymentem endomembran podlegają białka PIN1, PIN2 i PIN3 oraz permeaza AUX1 [27,37,40], jednak w odróżnieniu od PIN1 relokacja białka PIN2 jest niemal całkowicie niewrażliwa na działanie BFA [36]. Próbuje się to tłumaczyć tym, że genom *A. thaliana* zawiera osiem genów kodujących białka ARF-GEF różniące się wielkością oraz wrażliwością na hamujące działanie BFA. Możliwe jest zatem, że w recyklingu PIN2, a być może także innych białek zaangażowane są inne, niewrażliwe na brefeldynę A czynniki ARF-GEF [35,58].

## REGULACJA UKIERUNKOWANEJ RELOKACJI BIAŁEK NOŚNIKOWYCH

Problem ukierunkowanej relokacji białek transportujących auksyny jest dzisiaj jednym z ciekawszych zagadnień w biologii komórki roślinnej. Dotychczasowe wyniki niezwykle pomysłowych doświadczeń pokazały, że zmiany w lokalizacji białek nośnikowych odgrywają kluczową rolę w embriogenezie [26], inicjowaniu zawiązków liści i kwiatów oraz filotaksji [42,74], jak również w indukowaniu reakcji tropicznych [27]. Wyniki tych badań zwracają uwagę na kluczową rolę mechanizmu regulującego strumień auksyny w odpowiednim kierunku, umożliwiającego powstawanie lokalnych gradientów stężenia fitohormonu.

W dotychczasowych próbach rozszyfrowania tego mechanizmu najwięcej uwagi poświęca się odwracalnej fosforylacji białek z udziałem serynowo/treoninowej kinazy białkowej PINOID (PID) [18]. Gen *PID* został sklonowany u mutanta wykazującego szereg zmian fenotypowych przypominających mutacje *pin* [5,17]. Nadekspresja genu

*PID* powoduje zahamowanie rozwoju włosników korzeniowych na skutek wzmożonego wypływu auksyn. Można więc założyć, że kinaza *PID* kieruje bądź ułatwia migrację nośników PIN do błony komórkowej pełniąc w ten sposób funkcję pozytywnego regulatora wypływu auksyny z komórki [48]. Do podobnych wniosków prowadzą wyniki doświadczeń, w których w komórkach merystemu korzeniowego śledzono zmiany lokalizacji białek PIN1, PIN2 i PIN4 w warunkach nadekspresji genu *PID* [28]. Okazało się, że nadekspresja niezmienionego genu *PID* wymusza kierowanie nośników do błony apikalnej zamiast do bazalnej, co w efekcie prowadzi do zaburzeń w polarnym transporcie i różnych anomalii rozwojowych korzenia [28]. Z kolei nadekspresja zmutowanego genu *PID* powoduje relokację PIN1 z górnej do dolnej części komórek. Tak więc, uzyskane wyniki sugerują, że kinaza PINOID odgrywa rolę „przełącznika” wpływającego na rozmieszczenie białek PIN w błonie. Na marginesie tych badań warto zauważyć, że ekspresja *PID* jest aktywowana przez auksynę, co dodatkowo potwierdza koncepcję, iż układ polarnego transportu auksyny jest systemem w dużym stopniu samoregulującym się.

Wyniki opublikowanego niedawno doniesienia dowodzą, że aktywność kinazy *PID* jest regulowana przez kinazę białkową PDK1 związaną z fosfolipidami [99]. Zainicjowane badania wiążą zatem regulację polarnego transportu auksyn z sygnalizacją fosfolipidową. Związek transportu auksyn z lipidowymi składnikami błony był już sugerowany wcześniej na podstawie badania mutantów, które mają zmienione geny kodujące enzymy funkcjonujące w biosyntezie steroli [8,52,93]. Mutant *orc/smt1 A. thaliana*, wyselekcjonowany na podstawie zmian rozwojowych korzenia, ma zmieniony gen kodujący metylotransferazę sterolową [93]. Mutacji w genie *SMT1* towarzyszą zmiany w lokalizacji PIN1 i PIN3, lecz nie AUX1. Tak więc, wyniki nielicznych jeszcze badań sugerują, że profil steroli w błonie komórkowej gra ważną rolę w określaniu polarności komórki, co wydaje się być równie ważne w kierowaniu pęcherzyków transportujących białka PIN do określonego regionu błony [41,52].

O związku polarnego transportu auksyn z odwracalną fosforylacją białek świadczą także badania mutantu *rcn1 A. thaliana* z defektem w genie kodującym podjednostkę fosfatazy białkowej PP2A aktywującą enzym [72]. Mutant z obniżoną aktywnością fosfatazową wykazuje intensywniejszy transport bazypetalny i opóźnioną reakcję grawitropową, chociaż mutacji *rcn1* nie towarzyszą zmiany w lokalizacji PIN2 [72,79].

Z regulacją fosforylacji nieznanymi jeszcze białkami substratowymi wiązana jest ostatnio także rola flawonoidów, które od wielu lat są traktowane jako endogenne substancje regulujące transport auksyn [60]. Wykazano na przykład, że transport auksyn u mutantu *tt4* (ang. *transparent testa*) z defektem w genie syntazy chalkonowej, niesyntetyzującym flawonoidów jest zdecydowanie sprawniejszy [14]. Hamujący wpływ tej grupy związków na transport auksyn potwierdzają także wyniki doświadczeń prowadzonych na mutantach *tt7* i *tt3* z nadprodukcją flawonoidów, u których stwierdzono wyraźne hamowanie transportu [69]. Analizując wyniki innych badań, dotyczących hamowania przez flawonoidy niektórych kinaz białkowych, można założyć, że hamowanie transportu auksyn przez te związki może się odbywać poprzez hamowanie kinazy *PID* lub PDK1.

W konkluzji wyników dotychczasowych badań należy stwierdzić, iż mimo spektakularnych osiągnięć, jakie odnotowano w ostatnich latach, nasza wiedza na temat polarnego

transportu auksyn jest nadal jeszcze bardzo fragmentaryczna. Wyrazem rodzących się ciągle wątpliwości i pytań jest proponowana ostatnio nowa koncepcja transportu auksyn nawiązująca do transportu neurotransmiterów w zakończeniach synaptycznych [2]. Tak więc poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy transport pęcherzykowy pośredniczy tylko w relokacji białek nośnikowych, czy bierze także udział w przenoszeniu auksyny, jest nowym wyzwaniem dla badaczy zajmujących się auksynami.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABAS L, BENJAMINS R, MALENICA N, PACIOREK T, WIŚNIEWSKA J, MOULINIER-ANZOLA JC, SIEBERER T, FRIML J, LUSCHNIG C. Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature Cell Biol* 2006; **8**: 249–256.
- [2] BALUŠKA F, VOLKMANN D, MENZEL D. Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell communication. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 106–111.
- [3] BANASIAK AS. Polarny transport auksyny – hipotezy i odkrycia. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 605–618.
- [4] BENJAMINS R, MALENICA N, LUSCHNIG C. Regulating the regulator: the control of auxin transport. *BioEssays* 2005; **27**: 1246–1255.
- [5] BENJAMINS R, QUINT A, WEIJERS D, HOOYKAAS P, OFFRINGA R. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development* 2001; **128**: 4057–4067.
- [6] BENKOVÁ E, MICHNIEWICZ M, SAUER M, TEICHMANN T, SEIFERTOVÁ D, JÜRGENS G, FRIML J. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 2003; **115**: 591–602.
- [7] BENNETT MJ, MARCHANT A, GREEN HG, MAY ST, WARD SP, MILLNER PA, WALKER AR, SCHULZ B, FELDMANN KA. *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 1996; **273**: 948–950.
- [8] BETTS H, MOORE I. Plant cell polarity: the ins-and-outs of sterol transport. *Curr Biol* 2003; **13**: R781–R783.
- [9] BLAKESLEE JJ, BANDYOPADHYAY A, PEER WA, MAKAM SN, MURPHY AS. Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol* 2004; **134**: 28–31.
- [10] BLAKESLEE JJ, PEER WA, MURPHY AS. Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 494–500.
- [11] BLAKESLEE JJ, PEER WA, MURPHY AS. MDR/PGP auxin transport proteins and endocytic cycling. *Plant Cell Monogr* 2005; **1**: 159–176.
- [12] BLILOU I, XU J, WILDWATER M, WILLEMSEN V, PAPONOV I, FRIML J, HEIDSTRA R, AIDA M, PALME K, SCHERES B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 2005; **433**: 39–44.
- [13] BOUTTÉ Y, CROSNIER M-T, CARRARO N, TRAAS J, SATIAT-JEUNEMAITRE B. The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. *J Cell Sci* 2005; **119**: 1255–1265.
- [14] BROWN DE, RASHOTTE AM, MURPHY AS, NORMANLY J, TAGUE BW, PEER WA, TAIZ L, MUDAY GK. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; **126**: 524–535.
- [15] CHEN L, ORTIZ-LOPEZ A, JUNG A, BUSH DR. *ANT1*, an aromatic and neutral amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1813–1820.
- [16] CHEN R, HILSON P, SEDBROOK J, ROSEN E, CASPAR T, MASSON PH. The *Arabidopsis thaliana AGRVITROPIC1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15112–15117.
- [17] CHRISTENSEN SK, DAGENAIS N, CHORY J, WEIGEL D. Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* 2000; **100**: 469–478.
- [18] DELONG A, MOCKAITIS K, CHRISTENSEN S. Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 285–303.
- [19] DESGAGNÉ-PENIX I, EAKANUNKUL S, COLES JP, PHILLIPS AL, HEDDEN P, SPONSEL VM. The auxin transport inhibitor response3 (*tir3*) allele of *BIG* and auxin transport inhibitors affect the gibberellin status of *Arabidopsis*. *Plant J* 2005; **41**: 231–242.

- [20] DHARMASIRI S, SWARUP R, MOCKAITIS K, DHARMASIRI N, SINGH SK, KOWALCZYK M, MARCHANT A, MILLS S, SANDBERG G, BENNETT MJ, ESTELLE M. AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* 2006; **312**: 1218–1220.
- [21] ELUMALAI RP, NAGPAL P, REED JW. A mutation in the *Arabidopsis* *KT2/KUP2* potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell* 2002; **14**: 119–131.
- [22] FLEMING AJ. Plant signalling: the inexorable rise of auxin. *Trends Cell Biol* 2006; **16**: 397–402.
- [23] FRIML J. Auxin transport – shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 7–12.
- [24] FRIML J, BENKOVÁ E, BLILOU I, WIŚNIEWSKA J, HAMANN T, LJUNG K, WOODY S, SANDBERG G, SCHERES B, JÜRGENS G, PALME K. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 2002; **108**: 661–673.
- [25] FRIML J, PALME K. Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 273–284.
- [26] FRIML J, VIETEN A, SAUER M, WEIJERS D, SCHWARZ H, HAMANN T, OFFRINGA R, JÜRGENS G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 2003; **426**: 147–153.
- [27] FRIML J, WIŚNIEWSKA J, BENKOVÁ E, MENDGEN K, PALME K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 2002; **415**: 806–809.
- [28] FRIML J, YANG X, MICHNIEWICZ M, WEIJERS D, QUINT A, TIETZ O, BENJAMINS R, OUWERKERK PBF, LJUNG K, SANDBERG G, HOOYKAAS PJJ, PALME K, OFFRINGA R. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 2004; **306**: 862–865.
- [29] GAEDEKE N, KLEIN M, KOLUKISA OGLU U, FORESTIER C, MÜLLER A, ANSORGE M, BECKER D, MAMNUN Y, KUCHLER K, SCHULZ B, MUELLER-ROEBER B, MARTINOIA E. The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter *AtMRP5* controls root development and stomata movement. *EMBO J* 2001; **20**: 1875–1887.
- [30] GÄLWEILER L, GUANC, MÜLLER A, WISMAN E, MENDGEN K, YEPHREMOV A, PALME K. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 1998; **282**: 2226–2230.
- [31] GARCIA O, BOUIGE P, FORESTIER C, DASSA E. Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding cassette (ABC) systems. *J Mol Biol* 2004; **343**: 249–265.
- [32] GEISLER M, BLAKESLEE JJ, BOUCHARD R, LEE OR, VINCENZETTI V, BANDYOPADHYAY A, TITAPIWATANAKUN B, PEER WA, BAILLY A, RICHARDS EL, EJENDAL KFK, SMITH AP, BAROUX C, GROSSNIKLAUS U, MÜLLER A, HRYCZYNA CA, DUDLER R, MURPHY AS, MARTINOIA E. Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* 2005; **44**: 179–194.
- [33] GEISLER M, KOLUKISA OGLU HÜ, BOUCHARD R, BILLION K, BERGER J, SAAL B, FRANGNE N, KONCZ-KÁLMÁN Z, KONCZ C, DUDLER R, BLAKESLEE JJ, MURPHY AS, MARTINOIA E, SCHULZ B. TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 4238–4249.
- [34] GEISLER M, MURPHY AS. The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett* 2006; **580**: 1094–1102.
- [35] GELDNER N. The plant endosomal system – its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta* 2004; **219**: 547–560.
- [36] GELDNER N, ANDERS N, WOLTERS H, KEICHER J, KORNBERGER W, MULLER P, DELBARRE A, UEDA T, NAKANO A, JÜRGENS G. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport and auxin-dependent plant growth. *Cell* 2003; **112**: 219–230.
- [37] GELDNER N, FRIML J, STIERHOF Y-D, JÜRGENS G, PALME K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 2001; **413**: 425–428.
- [38] GELDNER N, RICHTER S, VIETEN A, MARQUARDT S, TORRES-RUIZ RA, MAYER U, JÜRGENS G. Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* 2004; **131**: 389–400.
- [39] GIL P, DEWEY E, FRIML J, ZHAO Y, SNOWDEN KC, PUTTERILL J, PALME K, ESTELLE M, CHORY J. BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2001; **15**: 1985–1997.
- [40] GREBE M, FRIML J, SWARUP R, LJUNG K, SANBERG G, TERLOU M, PALME K, BENNETT MJ, SCHERES B. Cell polarity signaling in *Arabidopsis* involves a BFA-sensitive auxin influx pathway. *Curr Biol* 2002; **12**: 329–334.

- [41] GREBE M, XU J, MÖBIOUS W, UEDA T, NAKANO A, GEUZE HJ, ROOK MB, SCHERES B. *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* 2003; **13**: 1378–1387.
- [42] HEISLER MG, OHNO C, DAS P, SIEBER P, REDDY GV, LONG JA, MEYEROWITZ EM. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr Biol* 2005; **15**: 1899–1911.
- [43] HOLWEG C, NICK P. *Arabidopsis* myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 10488–10493.
- [44] JASINSKI M, DUCOS E, MARTINOIA E, BOUTRY M. The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **131**: 1169–1177.
- [45] KANYUKA K, PRAEKELT U, FRANKLIN KA, BILLINGHAM OE, HOOLEY R, WHITELAM GC, HALLIDAY KJ. Mutations in the huge *Arabidopsis* gene *BIG* affect range of hormone and light responses. *Plant J* 2003; **35**: 57–70.
- [46] KOWALCZYK S, HADOWSKA E, PIEKARSKA A. Roślinne układy ubikwitynacji i degradacji białek w proteasomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych. *Post Biochem* 2005; **51**: 171–187.
- [47] KRAMER EM, BENNETT MJ. Auxin transport: a field in flux. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 382–386.
- [48] LEE SH, CHO H-T. PINOID positively regulates auxin efflux in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* 2006; **18**: 1604–1616.
- [49] LEYSER O. Auxin distribution and plant pattern formation: How many angels can dance on the point of PIN? *Cell* 2005; **121**: 819–822.
- [50] LEYSER O. Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Curr Biol* 2006; **16**: R424–R433.
- [51] LIN R, WANG H. Two homologous ATP-binding cassette transporter proteins, AtMDR1 and AtPGP1, regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis and root development by mediating polar auxin transport. *Plant Physiol* 2005; **138**: 949–964.
- [52] LINDSEY K, PULLEN ML, TOPPING JF. Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 521–525.
- [53] LÓPEZ-BUCIO J, HERNÁNDEZ-ABREU E, SÁNCHEZ-CALDERÓN, PÉREZ-TORRES A, RAMPEY RA, BARTEL B, HERRERA-ESTRELLA L. An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of *BIG* as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol* 2005; **137**: 681–691.
- [54] LUSCHNIG C, GAXIOLA RA, GRISAFI P, FINK GR. *EIR1*, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Gen Dev* 1998; **12**: 2175–2187.
- [55] MARCHANT A, BHALERAO R, CASMIRO I, EKLÖF J, CASERO PJ, BENNETT M, SANDBERG G. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* 2002; **14**: 589–597.
- [56] MARCHANT A, KARGUL J, MAY ST, MÜLLER P, DELBARRE A, PERROT-RECHENMANN C, BENNETT MJ. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J* 1999; **18**: 2066–2073.
- [57] MUDAY GK, MURPHY AS. An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell* 2002; **14**: 293–299.
- [58] MUDAY GK, PEER WA, MURPHY AS. Vesicular cycling mechanisms that control auxin transport polarity. *Trend Plant Sci* 2003; **8**: 301–304.
- [59] MÜLLER A, GUAN C, GÄLWEILER L, TÄNZLER P, HUIJSER P, MARCHANT A, PARRY G, BENNETT M, WISMAN E, PALME K. *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* 1998; **23**: 6903–6911.
- [60] MURPHY A, PEER WA, TAIZ L. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 2000; **211**: 315–324.
- [61] NOH B, BANDYOPADHYAY A, PEER WA, SPALDING EP, MURPHY AS. Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 2003; **423**: 999–1002.
- [62] NOH B, MURPHY AS, SPALDING EP. *Multidrug resistance*-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* 2001; **13**: 2441–2454.
- [63] OTTENSCHLÄGER I, WOLFF P, WOLVERTON C, BHALERAO RP, SANDBERG G, ISHIKAWA H, EVANS M, PALME K. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 2987–2991.



- [64] PACIOREK T, ZAŽIMALOVÁ E, RUTHARDT N, PETRÁŠEK, STIERHOF Y-D, KLEINE-VEHN J, MORRIS DA, EMANS N, JÜRGENS G, GELDNER N, FRIML J. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 2005; **435**: 1251–1256.
- [65] PAPONOV IA, TEALE WD, TREBAR M, BLILOU I, PALME K. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 170–177.
- [66] PARRY G, DELBARRE A, MARCHANT A, SWARUP R, NAPIER R, PERROT-RECHENMANN C, BENNETT MJ. Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J* 2001; **25**: 399–406.
- [67] PARRY G, ESTELLE M. Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2006; **18**: 152–156.
- [68] PARRY G, MARCHANT A, MAY S, SWARUP R, SWARUP K, JAMES N, GRAHAM N, ALLEN T, MARTUCCI T, YEMM A, NAPIER R, MANNING K, KING G, BENNETT M. Quick on the uptake: characterization of a family of plant auxin influx carriers. *J Plant Growth Reg* 2001; **20**: 217–225.
- [69] PEER WA, BANDYOPADHYAY A, BLAKESLEE JJ, MAKAM SN, CHEN RJ, MASSON PH, MURPHY AS. Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2004; **16**: 1898–1911.
- [70] PETRÁŠEK J, MRAVEC J, BOUCHARD R, BLAKESLEE JJ, ABAS M, SEIFERTOVÁ D, WIŚNIEWSKA J, TADELE Z, KUBEŠ M, ČOVANOVÁ M, DHONUKSHE P, SKŮPA P, BENKOVÁ E, PERRY L, KŘEČEK P, LEE OR, FINK GR, GEISLER M, MURPHY AS, LUSCHNIG C, ZAŽIMALOVÁ E, FRIML J. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 2006; **312**: 914–918.
- [71] RAHMAN A, AHAMED A, AMAKAWA T, GOTO N, TSURUMI S. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 2001; **125**: 990–1000.
- [72] RASHOTTE AM, DELONG A, MUDAY GK. Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *Plant Cell* 2001; **13**: 1683–1697.
- [73] RAVEN JA. Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol* 1975; **74**: 163–172.
- [74] REINHARDT D, PESCE E-R, STIEGER P, MANDEL T, BALTENSPERGER K, BENNETT M, TRAAS J, FRIML J, KUHLEMEIER C. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 2003; **426**: 255–260.
- [75] RUBERY PH, SHELDRAKE AR. Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 1974; **118**: 101–121.
- [76] SANTELIA D, VINCENZETTI V, AZZARELLO E, BOVET L, FUKAO Y, DÜCHTIG P, MANCUSO S, MARTINOIA E, GEISLER M. MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett* 2005; **579**: 5399–5406.
- [77] SCHRADER J, BABA K, MAY ST, PALME K, BENNETT M, BHALERAO RP, SANDBERG G. Polar auxin transport in the wood-forming tissues of hybrid aspen is under simultaneous control of developmental and environmental signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10096–10101.
- [78] SCHULZ B, KOLUKISA OGLU HÜ. Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Lett* 2006; **580**: 1010–1016.
- [79] SHIN H, SHIN H-S, GUO Z, BLANCAFLOR EB, MASSON PH, CHEN R. Complex regulation of *Arabidopsis* AGR1/PIN2-mediated root gravitropic response and basipetal auxin transport by cantharidin-sensitive protein phosphatases. *Plant J* 2005; **42**: 188–200.
- [80] SIEBERER T, SEIFERT GJ, HAUSER M-T, GRISAFI P, FINK GR, LUSCHNIG C. Post-transcriptional control of the *Arabidopsis* auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. *Curr Biol* 2000; **10**: 1595–1598.
- [81] SIEBURTH LE, MUDAY GK, KING EJ, BENTON G, KIM S, METCALF KE, MEYERS L, SEAMEN E, VAN NORMAN JM. *SCARFACE* encodes an ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; **18**: 1396–1411.
- [82] STEINMANN T, GELDNER N, GREBE M, MANGOLD S, JACKSON CL, PARIS S, GÄLWEILER L, PALME K, JÜRGENS G. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 1999; **286**: 316–318.
- [83] STIEGER PA, REINHARDT D, KUHLEMEIER C. The auxin carrier influx is essential for correct leaf positioning. *Plant J* 2002; **32**: 509–517.
- [84] SWARUP R, FRIML J, MARCHANT A, LJUNG K, SANDBERG G, PALME K, BENNETT M. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in *Arabidopsis* root apex. *Gen Dev* 2001; **15**: 2648–2653.

- [85] SWARUP R, KARGUL J, MARCHANT A, ZADIK D, RAHMAN A, MILLS R, YEMM A, MAY S, WILLIAMS L, MILLNER P, TSURUMI S, MOORE I, NAPIER R, KERR ID, BENNETT MJ. Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease *AUX1*. *Plant Cell* 2004; **16**: 3069–3083.
- [86] SWARUP R, KRAMER EM, PERRY P, KNOX K, LEYSER HMO, HASELOFF J, BEEMSTER GTS, BHALERAO R, BENNETT MJ. Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biol* 2005; **7**: 1057–1065.
- [87] TERASAKA K, BLAKESLEE JJ, TITAPIWATANAKUN B, PEER WA, BANDYOPADHYAY A, MAKAM SN, LEE OR, RICHARDS EL, MURPHY AS, SATO F, YAZAKI K. PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin-transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* 2005; **17**: 2922–2939.
- [88] ULMASOV T, MURFETT J, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 1997; **9**: 1963–1971.
- [89] VANNESTE S, DE RYBEL B, BEEMSTER GTS, LJUNG K, DE SMET I, ISTERDAEL GV, NAUDTS M, IIDA R, GRUISSEM W, TASAKA M, INZÉ D, FUKAKI H, BEECKMAN T. Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2005; **17**: 3035–3050.
- [90] VERNOUX T, KRONENBERGER J, GRANDJEAN O, LAUFS P, TRAAS J. *PIN-FORMED1* regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development* 2000; **127**: 5157–5165.
- [91] VICENTE-AGULLO F, RIGAS S, DESBROSSES G, DOLAN L, HATZOPOULOS P, GRABOV A. Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 2004; **40**: 523–535.
- [92] VIETEN A, VANNESTE S, WIŚNIEWSKA J, BENKOVÁ E, BENJAMINS R, BEECKMAN T, LUSCHNIG C, FRIML J. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 2005; **132**: 4521–4531.
- [93] WILLEMSSEN V, FRIML J, GREBE M, VAN DEN TOORN A, PALME K, SCHERES B. Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require *STEROL METHYLTRANSFERASE 1* function. *Plant Cell* 2003; **15**: 612–625.
- [94] WIŚNIEWSKA J, TYBURSKI J, TRETYN A. Polarny transport auksyny. Przełom w badaniach? *Post Biol Kom* 2004; **31**: 9–23.
- [95] WIŚNIEWSKA J, XU J, SEIFERTOVÁ D, BREWER PB, RŮŽIČKA K, BLILOU I, ROUQUIÉ D, BENKOVÁ E, SCHERES B, FRIML J. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 2006; **312**: 883.
- [96] WODZICKI TJ. Auksyna – czynnik komunikacji w procesach funkcjonalnego różnicowania układu ponadkomórkowego rośliny. *Post Biol Kom Supl.* 2004; **31**: 43–55.
- [97] YANG Y, HAMMES UZ, TAYLOR CG, SCHACHTMAN DP, NIELSEN E. High-affinity auxin transport by the *AUX1* influx carrier protein. *Curr Biol* 2006; **16**: 1123–1127.
- [98] YOUNG GB, JACK DL, SMITH DW, SAIER MH. The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1415**: 306–322.
- [99] ZEGZOUTI H, ANTHONY RG, JAHCHAN N, BÖGRE L, CHRISTENSEN SK. Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 6404–6409.
- [100] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 11.09. 2006 r.

Przyjęto: 24.11. 2006 r.

ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

e-mail: e.starzynska@umk.pl