

UKIERUNKOWANA RELOKALIZACJA BIAŁEK TRANSPORTUJĄCYCH AUKSYNY A ODPOWIEDZI TROPOWE ROŚLIN

DIRECTIONAL RELOCALIZATION OF THE AUXIN TRANSPORT
PROTEINS, AND PLANT TROPIC RESPONSES

Stanisław KOWALCZYK, Ewelina STARZYŃSKA

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Polarny transport auksyn, odbywający się z udziałem białek nośnikowych, jest unikalnym sposobem rozprowadzania auksyny w roślinie umożliwiającym powstawanie w określonych komórkach lub tkankach gradientu stężenia fitohormonu. W transporcie auksyny uczestniczą białka należące do trzech rodzin: nośniki PIN (*PIN-formed*), pompy PGP/ABCB (*P-glycoprotein/ATP binding cassette*) i permeazy AUX1/LAX (*AUXIN RESISTANT/LIKE-AUX1*). Wyniki dotychczasowych badań potwierdziły, iż pięć, spośród ośmiu białek PIN *A. thaliana*, funkcjonuje jako nośniki transportujące auksynę z komórki. Białka PGP/ABCB, należące do nadrodziny transporterów z kasetą wiążącą ATP, stanowią drugą grupę transporterów pompujących auksynę z komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Z tej rodziny białek najlepiej w *A. thaliana* scharakteryzowano transportery PGP1/ABCB1, PGP19/ABCB19 i PGP4/ABCB4. Wyniki najnowszych badań sugerują, że białka PIN i PGP, funkcjonujące jako niezależne transportery eksportujące auksynę samodzielnie, *in vivo* współdziałają w transporcie fitohormonu. W transporcie auksyny z apoplastu do wnętrza komórki uczestniczy symporter AUX1 oraz trzy jego funkcjonalne analogi LIKE-AUX1. Problemem skupiającym obecnie uwagę wielu badaczy jest niezwykła elastyczność mechanizmów redystrybucji w obrębie komórki białek transportujących auksynę, jawiących się jako kluczowe elementy regulujące polarny transport fitohormonu. Wewnątrzkomórkowa relokalizacja transporterów auksyn, możliwa dzięki konstytutywnemu recyklingowi białek, obejmuje endocytarną internalizację i przeniesienie białek w transporcie pęcherzykowym do endosomu, a następnie ich powrót do błony komórkowej dzięki transportowi egzocytarnemu. Ostatnie badania pokazały, że internalizacja białek PIN odbywa się za pośrednictwem transportu pęcherzykowego zależnego od klatryny. Powrót transporterów z różnych kompartmentów endosomów do błony plazmatycznej lub ich transport do wakuoli litycznych podlega skomplikowanej regulacji, w której pośredniczą małe białka G, kompleksy retromerowe i kinazy białkowe podrodziny AGCVIII. Zmiany błonowej lokalizacji białek PIN obserwowano w embriogenezie, inicjowaniu korzeni bocznych, filotaksji, a także w niektórych odpowiedziach tropowych. Wykazano, że grawistymulacja korzenia, odbierana przez komórki kolumelli, zmienia lokalizację PIN3 z apolarnej na polarną, prowadząc do asymetrycznego rozkładu auksyny w części elongacyjnej korzenia. Podobnie, odpowiedź fototropowa w postaci wygięcia hypokotyla, pozostająca w ścisłym związku z nierównomiernym rozmieszczeniem auksyny, zależna jest od polarnej lokalizacji PIN3 w komórkach endodermy.

Słowa kluczowe: auksyna, polarny transport auksyn, relokalizacja transporterów auksyn.

Summary: Polar transport of auxin, mediated by carrier proteins, is a unique mechanism resulting in a controlled distribution of phytohormone that generates higher auxin concentration in specific cells or tissues. Three families of cellular transport proteins, PIN-formed (PIN), P-glycoprotein (PGP/ABCB), and AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) coordinately transport auxin in plants. Among the eight members of the PIN family in *Arabidopsis thaliana*, five have been experimentally shown to function as auxin efflux carrier. PGP/ABCB proteins, that belong to the ATP-Binding-Cassette transporter superfamily, are the second class of auxin efflux pumps. The best characterized members of *A. thaliana* PGP/ABCB proteins are the auxin transporters PGP1/ABCB1, PGP19/ABCB19 and PGP4/ABCB4. Multiple lines of evidence suggest that both PIN and PGP proteins function as independent efflux transporters that can interact in coordinated export of hormone. AUX1 uptake symporter, and three members of the LIKE-AUX1 (LAX) – the functional analogues of AUX1 – participate in auxin influx. The dynamic subcellular trafficking of auxin transport proteins, as an important factor in regulation of auxin polar transport, now focuses much attention. The distribution of transporters in the plasma membrane is crucial for the directional nature of the auxin fluxes and requires a certain degree of flexibility. The constitutive cycling of auxin transporters consists of two repeated steps: internalization of the protein from the plasma membrane into an endosome (endocytosis) and its recycling back to the plasma membrane (exocytosis). Recent studies directly demonstrated that PINs internalization occurs via clathrin-dependent endocytic mechanism. Transfer of auxin transporters from the distinct endosomal compartments back to the plasma membrane or to vacuole is controlled by small G-proteins, retromers and protein kinases from AGCVIII subfamily. As yet, rapid PINs relocations were observed during embryonic development, lateral root formation, phyllotaxis and during tropic growth. Gravistimulation causes relocalization of PIN3, that exhibits an apolar orientation in root columella cells, but relocates in the direction of auxin movement upon root reorientation into a horizontal position. Similarly, phototropic bending in hypocotyls is thought to result from asymmetric accumulation of auxin in cells distal to the site illumination. It is likely, that PIN3 protein, localized predominantly at the inner lateral sides of endodermal cells of shoot is required for phototropic growth.

Key words: auxin, polar auxin transport, relocalization of auxin transporters.

Wykaz skrótów: **ABCB** – białko transportujące auksynę przez błonę na koszt hydrolizy ATP; **ARF7/NPH4** – czynnik transkrypcyjny; **AtPIN** – białko PIN *Arabidopsis thaliana*; **DRM** – mikrodomena błonowa, „tratwa lipidowa”; **ESCRT** – kompleks pośredniczący w tworzeniu ciał wielopęcherzykowych MVB; **FMN** – mononukleotyd flawinowy; **GAP** – białko aktywujące hydrolizę GTP na małych białkach G; **GDI** – białko hamujące aktywność małych białek G; **GEF** – białko wymieniające GDP na GTP na małych białkach G; **GNOM** – wrażliwe na brefeldynę A białko wymieniające GDP na GTP na białku ARF; **IAA** – kwas indolilo-3-octowy; **MVB** – ciało wielopęcherzykowe; **NPH3** – białko oddziałujące z fototropinami, przypuszczalny składnik kulinowej ligazy ubikwitynowej; **PBA** – 2-(1-pyrenoylo) benzoesan; **PGP/MDR** – białko transportujące auksynę przez błonę na koszt hydrolizy ATP, zgodnie z nową nomenklaturą białko ABCB; **PINOID (PID)** – jedna z kinaz białkowych podrodziny AGCVIII fosforylująca PIN; **PtdIns-3-P** – fosfatydyloinizytolo-3-fosforan; **RPT2** – białko oddziałujące z fototropinami, przypuszczalny składnik kulinowej ligazy ubikwitynowej; **SAC** – kanał wapniowy bramkowany naprężeniami; **SNX** – białko tworzące kompleks retromerowy; **TIBA** – kwas 2,3,5-trijodobenzoowy; **TWD1/FKBP42** – białko oddziałujące z PGP; **VPS** – białko tworzące kompleks retromerowy.

WPROWADZENIE

Rozpoczęte w 70 latach ub. wieku poszukiwania mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie w roślinach lokalnych gradientów stężenia auksyny zakładały, że forma zdysocjowana (IAA^-) transportowana jest przez polarnie zlokalizowane w błonie komórkowej nośniki białkowe, podczas gdy niezdisocjowany (lipofilowy) IAA biernie dyfunduje przez błonę komórkową. Koncepcja polarnego transportu auksyny,

sformułowana na podstawie wyników uzyskanych w doświadczeniach wykorzystujących inhibitory transportu oraz syntetyczne auksyny, została ostatecznie eksperymentalnie zweryfikowana w latach 90 ub. wieku, po sklonowaniu genów kodujących białka transportujące ten fitohormon. Obserwacje zmian fenotypowych towarzyszących mutacji *aux1*, poparte doświadczeniami prowadzonymi na oocytach *Xenopus laevis* transformowanych *AUX1*, w pełni potwierdziły udział permeazy *AUX1* w dokomórkowym transporcie auksyny [7,83,84,96], a wyniki najnowszych badań dowiodły, że również trzy paralogi *AUX1*, a mianowicie *LAX1*, 2 i 3 (ang. *Like AUX1*) pełnią identyczną funkcję [4,84].

Nośnikami eksportującymi auksyny z komórki są białka PIN oraz białka z rodziny transporterów ABC. Białka PIN poznano u mutantów *Arabidopsis thaliana* z defektami w odpowiedziach grawitropowych korzenia oraz u mutantu *pin-formed* ze szpilkowato wydłużonym pędem kwiatostanowym pozbawionym kwiatów [70,83,98]. Z czasem okazało się, że genom *A. thaliana* zawiera w sumie osiem genów *PIN* (*AtPIN1–AtPIN8*), spośród których sześć koduje białka zawierające dziesięć odcinków transbłonowych oraz stosunkowo długą, położoną pomiędzy piątym a szóstym fragmentem hydrofobowym, pętlę hydrofilową skierowaną do cytoplazmy. W sekwencji aminokwasowej tego fragmentu wyróżnia się trzy ewolucyjnie zachowawcze odcinki oraz dwa krótkie fragmenty o dużej zmienności [98]. W jednym z trzech konserwatywnych odcinków występują dwa motywy zawierające sekwencje umożliwiające glikozylację oraz fosforylację, a w odcinku sąsiadującym z szóstym fragmentem transbłonowym położony jest motyw NPXXY, który przypuszczalnie oddziałuje z białkiem kompleksu adaptorowego zaangażowanym w opłaszczanie pęcherzyków klatryną. Swoiste oddziaływanie PIN z μ -adaptyną kompleksu adaptorowego stwarza możliwość sortowania białek PIN internalizowanych za pośrednictwem pęcherzyków opłaszczonych klatryną [20,98]. Przez wiele lat PIN nazywano „białkami ułatwiającymi wypływ auksyn” (ang. *auxin efflux facilitators*), dopiero wyniki doświadczeń prowadzonych na ludzkich komórkach HeLa oraz drożdżach transformowanych genem *PIN2* i *PIN7*, a także szczegółowe analizy zmian towarzyszących relokalizacji PIN w obrębie błony komórkowej, jednoznacznie pokazały, że białka PIN samodzielnie, bez udziału innych białek, transportują auksynę z komórki [74,94]. Należy jednakże podkreślić, że nadal niewyjaśniona pozostaje rola lokalizowanych w siateczce śródplazmatycznej *AtPIN5* i *AtPIN8* – białek różniących się budową od pozostałych sześciu PIN [70,98].

Białka z rodziny transporterów ABC (ang. *ATP Binding Cassette*) o charakterystycznej modularnej budowie, z dwiema domenami transbłonowymi (TMD) i dwiema cytoplazmatycznymi domenami wiążącymi nukleotydy (NBD), transportują przez błonę różne substancje na koszt hydrolizy ATP [31,83,91]. Genom *A. thaliana* koduje 54 jednopoliptydowe transportery ABC, spośród których, co najmniej kilka białek z podrodziny PGP/MDR (ang. *P-Glycoprotein/Multidrug Resistance*), obejmującej w rzodkiewniku 22, a w ryżu 24 geny, bierze udział w transporcie auksyny. Zgodnie z zalecaną obecnie nomenklaturą, wszystkie białka ABC dzielone są na osiem lub dziewięć podrodzin opisywanych kolejnymi literami od A do H lub do I [91]. Trzy białka z podrodziny PGP/MDR, których funkcjonowanie w transporcie auksyny zo-

stało niedawno eksperymentalnie potwierdzone [31,83] zaklasyfikowano do podrodziny B z zalecanym akronimem ABCB i odpowiednią numeracją [91]. Tak więc, udział białek At-PGP19/AtMDR1/ABCB19 i AtPGP1/ABCB1 w eksporcie IAA⁻ do apoplastu nie budzi już dzisiaj wątpliwości [83,90]. Inaczej jest w przypadku AtPGP4/ABCB4, które w drożdżowym układzie ekspresyjnym oraz w komórkach HeLa transportuje auksynę do wnętrza komórki podobnie jak AUX1, natomiast w kulturach komórkowych tytoniu oraz włośnikach korzeniowych pompuje IAA⁻ do apoplastu, tak jak pozostałe dwa białka AtPGP [18]. Przyczyna powyższych rozbieżności nie jest znana, chociaż, jak można przypuszczać, określony kierunek transportu IAA w przypadku AtPGP4 może zależeć od aktualnego gradientu stężeń fitohormonu po obu stronach błony, tak jak to jest w przypadku ludzkiego transportera MDR1 [90], bądź że dokomórkowy transport auksyny, obserwowany w warunkach ekspresji *AtPGP4* w układach heterologicznych, spowodowany jest niewłaściwą orientacją białka w błonie komórkowej. Wyniki niektórych najnowszych doniesień wyraźnie sugerują, że poprawna topologia AtPGP w błonie może w jakiś sposób zależeć od obecności w błonie TWD1/FKBP42 (ang. *Twisted Dwarf1*) lub jednego z PIN – białek swoiście oddziałujących z PGP [90].

W opublikowanym przed dwoma laty w *Postęпах Biologii Komórki* artykule przeglądowym przedstawiono ogólną budowę białek transportujących auksyny [83]. Celem niniejszej pracy, opartej w większości na publikacjach z ostatnich trzech lat, było podsumowanie wyników badań dotyczących ukierunkowanej relokalizacji transporterów auksyn za pośrednictwem transportu pęcherzykowego. Zmiana lokalizacji białek transportujących auksyny, pozostająca pod ścisłą kontrolą czynników wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, odgrywa kluczową rolę w przebiegu wielu procesów wzrostowych i rozwojowych, takich jak: embriogeneza, filotaksja, inicjowanie korzeni bocznych czy różnicowanie wiązek przewodzących [7,19,46,57,87]. Zmianą kierunku transportu auksyny tłumaczone są także niektóre odpowiedzi tropowe roślin inicjowane nierównomiernym rozmieszczeniem fitohormonu w odpowiednich odcinkach korzenia lub pędu [12,36,73,86,92]. O doniosłości badań dotyczących wewnątrzkomórkowej relokalizacji transporterów auksyn może świadczyć liczba prac przeglądowych opublikowanych w ostatnich trzech latach w literaturze ogólnoswiatowej [7,15,19,25,29,32,42,46,57,87,90,98].

WSPÓLDZIAŁANIE TRANSPORTERÓW PGP/ABCB Z BIAŁKAMI PIN I TWD1/FKBP42 W POLARNYM TRANSPORCIE AUKSYN

Potwierdzony niedawno udział PGP w polarnym transporcie auksyn nasuwa pytanie o możliwość funkcjonalnych zależności oraz strukturalnych powiązań pomiędzy poznanymi wcześniej uniporterami PIN transportującymi IAA⁻ zgodnie z istniejącą różnicą potencjału elektrochemicznego błony, a pompami PGP pompującymi auksynę z komórki na koszt ATP. Szczegółowe analizy bazypetalnego transportu

¹⁴C-IAA, prowadzone w siewkach i pędach kwiatowych mutantu *Atpgp19* oraz podwójnego mutantu *Atpgp19/Atpgp1* *A. thaliana*, wyraźnie pokazały, że w polarnym transporcie IAA na większe odległości kluczową rolę odgrywają transportery PGP, szczególnie AtPGP19. Szybkość transportu IAA u dwóch allelicznych mutantów *Atpgp19* jest niższa o około 80%, a u podwójnego mutantu ulega niemal całkowitemu zahamowaniu [65]. Transport akropetalny ³H-IAA w korzeniu mutantu *Atpgp19* jest wolniejszy o około 80%, natomiast bazypetalny pozostaje bez zmian. Inaczej jest w przypadku mutantu *Atpgp4*, u którego transport akropetalny w korzeniu nie ulega zmianie, natomiast szybkość transportu bazypetalnego hamowana jest w około 50% [52,95]. Także wpływ ³H-IAA z protoplastów uzyskanych z komórek mezofilowych mutantów *Atpgp1* i *Atpgp19* jest wyraźnie wolniejszy, a u podwójnego mutantu *Atpgp1/Atpgp19* szybkość transportu jest o połowę wolniejsza w porównaniu z szybkością wypływu auksyny z protoplastów uzyskiwanych z roślin linii dzikiej [30]. Dla porównania, warto zauważyć, że szybkość polarnego transportu IAA w pędzie mutantu *Atpin1* jest wolniejsza o około 30% [9]. Wyniki powyższych analiz skłaniają do pytań o faktyczny udział PGP w polarnym transporcie fitohormonu, bowiem apolarne rozmieszczenie tych białek w błonie powinno sprzyjać równomiernemu, we wszystkich kierunkach, pompowaniu auksyny z cytoplazmy do apoplastu. W polarnym transporcie IAA powinny głównie uczestniczyć polarnie zlokalizowane PIN, a także permeazy AUX1/LAX, których polarna lokalizacja decyduje o tym, które komórki są zaangażowane w intensywniejszy transport zdysocjowanej formy fitohormonu.

Wyniki przytoczonych analiz, poparte wynikami doświadczeń prowadzonych w układach heterologicznych, sugerują, że pompy PGP, podobnie jak nośniki PIN, transportują auksyny samodzielnie i niezależnie od innych białek. Jednakże, wyniki najnowszych doniesień wyraźnie pokazują, że mutacje w *PGP* wpływają na lokalizację PIN [64], a w tkankach, w których ma miejsce koekspresja *PGP* i *PIN*, występują wyraźne strukturalne i funkcjonalne zależności pomiędzy badanymi białkami [9,62,89]. Powiązania te, jak się obecnie wydaje, pozostają w ścisłym związku z odkrytymi niedawno, dzięki technikom koimmunoprecypitacji oraz drożdżowego systemu dwuhybrydowego, fizycznymi oddziaływaniami pomiędzy niektórymi AtPGP i PIN [9]. To dzięki tym technikom wykazano, że PIN1 i PIN2 oddziałują z transporterami AtPGP19 i AtPGP1, ale nie z AtPGP4, oraz że AUX1 fizycznie nie wiąże się z żadnym z badanych białek. Analizy szybkości wypływu IAA prowadzone w układach heterologicznych (komórki HeLa, drożdże) dodatkowo potwierdziły istnienie funkcjonalnych zależności pomiędzy poszczególnymi białkami PGP i PIN. W warunkach koekspresji PIN1 z PGP1 lub PGP19 zmiany te mają charakter typu synergistycznego, natomiast w przypadku koekspresji PIN2 z PGP1 lub PGP19 stwierdzono wyraźne obniżenie szybkości wypływu auksyny [9]. Jednakże koekspresja obu typów transporterów zawsze pozytywnie wpływa na swoistość transportu względem IAA i obniżenie nieswoistego transportu np. kwasu benzoowego [9]. Zmiany fenotypowe towarzyszące mutacjom podwójnym *Atpin1/pgp1* i potrójnym *Atpin1/pgp1/pgp19* mogą mieć charakter typu synergistycznego lub addytywnego [9], a w przypadku nadekspresji obu typów transporterów, zmiany mają charakter typu synergistycznego bądź antagonistycznego [62].

Istota oddziaływań pomiędzy badanymi transporterami pozostaje na razie niejasna, jednakże wydaje się, że w ich wyjaśnieniu pomocne będą badania oddziaływań pomiędzy białkami zlokalizowanymi w mikrodomenach lipidowych błon określanych jako tzw. „tratwy lipidowe” (ang. *lipid rafts*). Dzisiaj już wiemy, że w błonach komórkowych roślin, podobnie jak u drożdży i zwierząt, występują mikrodomeny DRM (ang. *Detergent-Resistant Membrane*) bogate w sterole i sfingolipidy [34]. Wyniki wstępnych badań pokazują, że z mikrodomenami DRM powiązane jest AtPGP19, które w obrębie tych mikrostruktur błonowych oddziałuje z PIN1, bowiem mutacja *Atpgp19* wyraźnie obniża w DRM poziom białka PIN1 [89].

Oprócz niejasności dotyczących charakteru oddziaływań pomiędzy PGP a białkami PIN, zagadkowa pozostaje także rola zakotwiczonego w błonie białka TWD1/FKBP42 wiążącego się z AtPGP1 i AtPGP19 [3,14]. TWD1/FKBP42 jest białkiem podobnym do immunofiliny – izomerazy peptydyloprolinowej katalizującej przekształcenie wiązania peptydowego z *cis* do *trans* – pozbawionym aktywności enzymatycznej. Zmieniona domena katalityczna TWD1/FKBP42 oddziałuje z regionem C-końcowym AtPGP1 i AtPGP19 zawierającym domenę NBF2 wiążącą ATP. Białko TWD1 zakotwiczone jest w błonie plazmatycznej, a także w błonie wakuolarniej, gdzie oddziałuje z dwoma innymi transporterami ABC, a mianowicie AtMRP1 i AtMRP2 [3]. Można zatem przypuszczać, że TWD1 pełni określoną funkcję regulacyjną i to zarówno w stosunku do białek transportujących auksyny, jak również względem innych transporterów ABC. Co ciekawe, mutacja w TWD1 znosi hamujące działanie grawacyny, związku hamującego reakcję grawitropową korzenia i pędu [3,79]. Mutantem niewrażliwym na grawacynę jest także mutant *Atpgp19-4*, u którego reszta glutaminianu-1174 została zastąpiona lizyną.

Podsumowując wyniki dotychczasowych badań, zwłaszcza analiz transportu IAA u mutantów pozbawionych funkcjonalnych PGP, popartych także obserwacjami tkankowej lokalizacji poszczególnych transporterów oraz ujawnionym równomiernym (niepolarnym) rozmieszczeniem i ograniczoną ruchliwością PGP w obrębie komórki, można wnioskować, że w rosnących siewkach lub korzeniach polarny transport auksyny na większe odległości odbywa się z udziałem pomp PGP, podczas gdy rozmieszczone polarnie i ulegające konstytutywnemu recyklingowi i relokalizacji nośniki PIN i AUX1/LAX funkcjonują głównie w tworzeniu lokalnych gradientów stężenia fitohormonu.

KONSTYTUTYWNY RECYKLING, UKIERUNKOWANA RELOKALIZACJA I TRANSCYTOZA BIAŁEK TRANSPORTUJĄCYCH AUKSYNY

Zmiany wewnątrzkomórkowej lokalizacji transporterów auksyny, wyznaczające kierunek przepływu oraz czasowo-przestrzenny rozkład gradientów stężenia fitohormonu, znalazły się od jakiegoś czasu w centrum uwagi wielu zespołów badawczych zajmujących się biologią molekularną roślin. Mimo że skala dotych-

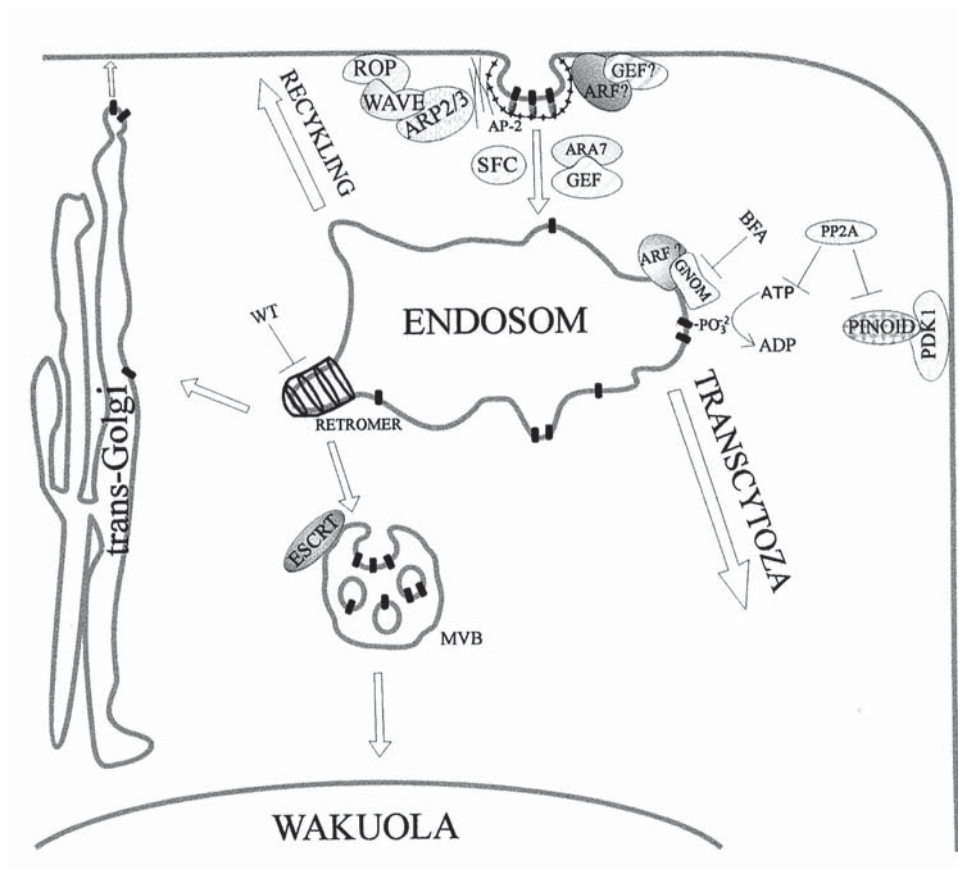
czasowych osiągnięć na tym polu nie jest jeszcze imponująca, głównie z powodu ograniczonej wiedzy na temat mechanizmów regulujących w roślinach transport pęcherzykowy, to jednakże dokonania odnotowane w ostatnich latach zasadniczo zmieniają nasze wyobrażenia o polarnym transporcie auksyn. Co prawda, nadal nie znamy istoty mechanizmów sortowania białek przeznaczonych do relokalizacji i tylko w bardzo ograniczonym zakresie rozumiemy mechanizmy regulujące transport pęcherzyków pomiędzy wewnątrzkomórkowymi kompartmentami błonowymi, tym nie mniej, wiemy już, że w roślinach, podobnie jak w komórkach drożdży i ssaków, kluczową rolę w transporcie pęcherzykowym odgrywają małe białka G z trzech rodzin: Arf, Rab i Rop [5,55]. Białka Arf, kodowane w *A. thaliana* przez 21 genów, funkcjonują w przyłączaniu do pączkującego pęcherzyka białek oplaszczających (białek adaptorowych i klatrynowych, białek COPI i COPII). Białka z rodziny Rab, liczącej w *A. thaliana* 57 genów, uczestniczą razem z białkami SNARE w zakotwiczeniu oraz fuzji pęcherzyków z odpowiednimi błonami docelowymi [5,54]. Białka Rop/Rac, kodowane w *A. thaliana* przez 11 genów, regulują polimeryzację i rozgałęzianie filamentów aktyny oraz odgrywają kluczową rolę w ustalaniu i utrzymywaniu określonej polarności komórki [5,15,32,46,55]. Aktywność małych białek G regulowana jest przez białka z rodzin: GEF, GAP i GDI. Białka GEF (ang. *Guanine Nucleotide Exchange Factor*), w wyniku swoistego oddziaływania z określonymi białkami G, wymuszają oddysocjowanie związanego z nimi GDP umożliwiając tym samym wiązanie występującego w cytoplazmie w większym stężeniu GTP. Zmiany konformacyjne towarzyszące wymianie GDP na GTP umożliwiają oddziaływanie zaktywowanego białka G z odpowiednim białkiem efektorowym. Interakcję pomiędzy białkiem G a białkiem efektorowym przerywa hydroliza GTP do GDP i ortofosforanu pozostająca w ścisłym związku z przyłączeniem do białka G jednego z białek GAP (ang. *GTPase-Activating Protein*). Białka GDI (ang. *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*), tworzące trzecią rodzinę białek regulatorowych, działają na zasadzie specyficznego wyłącznika likwidującego połączenie niektórych białek G z błoną [55].

Dzięki wyselekcjonowaniu szeregu mutantów *A. thaliana* z defektami w genach małych białek G oraz genach kodujących niektóre białka regulatorowe, szczególnie białka regulujące Arf i Rab, możliwy okazał się wyraźny postęp w poznawaniu szlaków wewnątrzkomórkowej relokalizacji transporterów auksyn. Nie bez znaczenia są również obserwacje zmian towarzyszących działaniu niektórych substancji zakłócających transport pęcherzykowy (brefeldyna A, wortmanina, tyrfostyna A23), a dzięki nowym technikom, także możliwość śledzenia lokalizacji konstruowanych chimer badanego transportera z odpowiednim białkiem reporterowym oraz możliwość analizowania zmian poziomu auksyny w pojedynczych, sąsiadujących ze sobą komórkach [83]. To dzięki tym technikom ustalono, że białka PIN, syntetyzowane *de novo* i przypuszczalnie glikozylowane w siateczce śródplazmatycznej i aparacie Golgiego, kierowane są za pośrednictwem egzocytarnego transportu pęcherzykowego do błony plazmatycznej, gdzie są rozmieszczane równomiernie (apolarnie) w obrębie całej błony komórkowej [22]. W regulacji egzocytarnego transportu PIN uczestniczy GNL1 (ang. *GNOM*-

Like1), jedno z trzech białek GEF aktywujących ARF, pośredniczące w opłaszczaniu pęcherzyków białkami COPI [76,88]. Zmiana lokalizacji z apolarnej na polarną, w przypadku nośników PIN wyraźnie zauważalna po upływie godziny, dokonuje się za pośrednictwem endocytarnego transportu pęcherzyków opłaszczonych klatryną [20,22]. Udział pęcherzyków klatrynowych w internalizacji PIN potwierdzono technikami immunochemicznymi oraz technikami biologii molekularnej, popartymi dodatkowo obserwacjami zmian wywołanych tyrfostyną A23 [20]. Tyrfostyna A23 – analog tyrozyny zaburzający wiązanie białka internalizowanego z μ -adaptyną kompleksu adaptorowego AP-2 – przeciwdziała internalizacji białka PIN2, natomiast nie wpływa na endocytarne pochłanianie lipidowego markera fluorescencyjnego FM4-64. Jak już wcześniej wspomniano, białka PIN w pętli hydrofilowej zwróconej do cytoplazmy mają motyw NPXXY, który przypuszczalnie swoiście oddziałuje z kompleksem adaptorowym AP-2, umożliwiając w ten sposób sortowanie PIN przeznaczonych do internalizacji. W pozbywaniu się otoczki klatrynowej z migrującego do endosomu pęcherzyka endocytarnego uczestniczy przypuszczalnie białko SCARFACE (SFC). SFC jest białkiem z rodziny GAP, stymulującym aktywność GTPazową ARF, a więc działającym antagonistycznie w stosunku do białek GEF [81].

W endocytarnej internalizacji PIN ważną rolę odgrywają sterole zawarte w błonie komórkowej. W doświadczeniach prowadzonych na mutantach *smt1* i *cpil*, o zmienionym profilu syntetyzowanych steroli, stwierdzono drastyczne zmiany, zarówno w transporcie endocytarnym, jak również w błonowej lokalizacji białek PIN [56,69,93]. Wydaje się, że obserwowane anomalie mogą być w jakiejś części następstwem zmian we wspomnianych wcześniej mikrodomenach błonowych DRM, bogatych w sterole i sfingolipidy [89]. Znaczenie steroli potwierdzają także wyniki badań dotyczących hamującego wpływu auksyny na endocytarną internalizację PIN [67,69]. Otóż okazuje się, że transport PIN do endosomów jest regulowany przez kompleks ligazy ubikwitynowej SCF^{TIR1/AFB}, pełniący względem auksyny funkcję receptorową, który jest odpowiedzialny za ekspresję nieznanego jeszcze białka błonowego mogącego funkcjonować w metabolizmie bądź wiązaniu steroli [69,80]. Niejasną rolę w hamowaniu internalizacji PIN przez auksynę odgrywa także białko BIG, które jest homologiem białka CALOSSIN/PUSHOVER *D. melanogaster* uczestniczącego w recyklingu pęcherzyków synaptycznych [67]. W kontekście powyższych badań pojawiły się nowe koncepcje wiążące relokalizację transporterów auksyny ze zmianami stężenia samego hormonu na zewnątrz i wewnątrz komórki [48]. Może się więc okazać, że auksyna nie tylko aktywuje ekspresję genów kodujących transportery auksyn, ale jest także kluczowym czynnikiem regulującym ich błonową lokalizację.

Innym składnikiem błony komórkowej regulującym transport pęcherzykowy jest kwas fosfatydowy aktywujący polimeryzację G aktyny [53]. W polimeryzacji i rozgałęzianiu filamentów aktynowych uczestniczą forminy oraz regulowane przez białka Rop/Rac kompleksy ARP2/3, aktywowane za pośrednictwem kompleksów białkowych WAVE (ryc. 1) [17]. Udział filamentów aktynowych w transporcie pęcherzyków zawierających transportery auksyn potwierdzają także wyniki doświad-



RYCINA 1. Szlaki subkomórkowej relokalizacji białek transportujących auksynę. Białka PIN, internalizowane za pośrednictwem pęcherzyków oplaszczonych klatryną, podlegają konstytutywnemu recyklingowi i powracają do błony plazmatycznej z różnych kompartmentów endosomalnych w szlaku zależnym od białka GNOM (wrażliwym na BFA i niewrażliwym na BFA). Właściwa dla określonej komórki polarna lokalizacja transporterów auksyn ustala się dzięki odrębnym szlakom transportu pęcherzykowego regulowanym przez różne białka ARF-GEF. Degradację białek PIN regulują odpowiednie mechanizmy sortowania powiązane z błoną plazmatyczną, kompartmentem endosomalnym i kompartmentem prewakuolarnym (MVB). Kompleksy retromerowe i kompleksy ESCRT kierują transportery auksyn do wakuoli lub do *trans*-Golgiego. Na schemacie pokazano także regulowany przez białko Rop kompleks WAVE-ARP2/3 funkcjonujący w rozgałęzianiu filamentów aktyny, a także miejsca działania brefeldyny A (BFA) i wortmaniny (WT) (na podstawie [2,5,17,20,22,33,39,44,47,58,81,82]).

FIGURE 1. Subcellular relocalization pathways of auxin transport proteins. PIN proteins are endocytosed via clathrin-coated vesicles, and recycle between endosome and the plasma membrane via GNOM-dependent (BFA-sensitive), and BFA-insensitive recycling compartments. Polar distribution of the auxin transporters is controlled by the distinct ARF GEF-dependent plasma membrane targeting pathways. Degradation of auxin transporters is controlled by multiple sorting mechanisms at the plasma membrane, endosomes, and prevacuolar compartments (MVB). The putative retromer and ESCRT complexes appear to have a gating functions for endocytic targeting to the vacuole or to *trans*-Golgi. Actin dynamics is regulated by the large multiprotein complexes Rop-WAVE-ARP2/3 (based on [2,5,17,20,22,33,39,44,47,58,81,82]).

czeń, w których badano wpływ inhibitorów transportu auksyn (TIBA, PBA) na relokalizację PIN. Okazuje się, że obydwa inhibitory zaburzając endocytozę i transport pęcherzykowy poprzez stabilizowanie filamentów aktynowych [21].

W kotwiczeniu pęcherzyków endocytarnych do błony wczesnych endosomów oraz ich fuzji z błoną endosomu pośredniczy przypuszczalnie białko ARA7, homologiczne z badanym u ssaków Rab5, aktywowane przez AtVps9a z rodziny białek GEF (ryc. 1) [22]. Mutacja w *AtVps9a* hamuje endocytarne pochłanianie FM4-64, a także zaburza polarną lokalizację PIN1 i PIN2. Można zatem przypuszczać, że mutacja *AtVps9a*, zakłócająca wymianę GDP na GTP na białku ARA7, zaburza prawidłowe oddziaływanie pomiędzy v-SNARE i t-SNARE uniemożliwiając tym samym kotwiczenie i fuzję pęcherzyka z błoną endosomu [54].

Jednakże w badaniach prowadzonych do tego czasu, najwięcej uwagi poświęcono poszukiwaniom odpowiedzi na pytanie, jak pączkujące z endosomów pęcherzyki, zawierające odpowiednie transportery auksyn, kierowane są do określonego regionu błony plazmatycznej. W próbach znalezienia odpowiedzi na to pytanie niezwykle pomocne okazały się obserwacje nieprawidłowości pojawiających się u mutantu *gnom* *A. thaliana* z defektem w jednym z genów kodujących białko GEF oddziałujące z białkiem G z rodziny ARF. Zmienione na skutek mutacji GNOM nie wiąże się z błoną endosomu, a w efekcie nie może aktywować niezidentyfikowanego jeszcze białka ARF uczestniczącego w opłaszczaniu pęcherzyków pączkujących z endosomu [2]. Podobne anomalie wywołuje także brefeldyna A (BFA), toksyna pozyskiwana z grzyba *Eupenicillium brefeldianum*, hamująca aktywność białek GEF mających charakterystyczną domenę Sec7, w tym również białka GNOM. Tak więc, zahamowanie, w wyniku mutacji *gnom* lub na skutek traktowania BFA, powrotnego transportu pęcherzyków endosomalnych do błony plazmatycznej prowadzi do ubywania PIN w błonie komórkowej oraz gromadzenia się białek nośnikowych w odpowiednim kompartmentie endosomalnym zawierającym GNOM [33]. Jednakże, wnikliwsze obserwacje, prowadzone w warunkach wydłużonego działania brefeldyny A, wykazały, że nośniki PIN zanikają tylko z błony położonej w podstawowej części komórek, natomiast w błonie od strony górnej, białka PIN, w wyniku konstytutywnego recyklingu, wracają do błony plazmatycznej [44]. Powyższe wyniki wskazują, że w powrocie pęcherzyków do błony komórkowej, oprócz białka GNOM, uczestniczy jeszcze inne, niewrażliwe na BFA białko GEF, a przypuszczalnie także inne białko ARF zaangażowane w sortowanie i opłaszczanie pęcherzyków w oddzielnym kompartmentie endosomalnym. Ponadto, wyniki tych doświadczeń dowodzą, iż transportery auksyny, które w wyniku odpowiedniego sortowania i recyklingu znajdują się w kompartmentie endosomalnym zawierającym GNOM, kierowane są do błony komórkowej leżącej po dolnej stronie komórki. Zmiana lokalizacji komórkowej nośników, polegająca na ich transporcie pęcherzykowym pomiędzy błonami leżącymi na dwóch przeciwległych końcach komórki, została nazwana transcytozą, w nawiązaniu do poznanej wcześniej u zwierząt relokalizacji receptorów transferyny [44].

Funkcjonowanie mechanizmów sortujących, odpowiedzialnych za kierowanie poszczególnych białek PIN oraz białek AUX do błony komórkowej za pośrednictwem różnych szlaków transportu pęcherzyków endosomalnych potwierdzono także w innych badaniach [11,33,45,90]. W doświadczeniach wykorzystujących endosydynę 1 (ES1) obserwowano hamowanie transportu z endosomów tylko PIN2 i AUX1, podczas gdy transport PIN1 i PIN7 pozostawał niezakłócony [77]. Nieliczne jeszcze wyniki badań sugerują, że w odrębnym szlaku transportu pęcherzyków endosomalnych uczestniczy, poznawany dopiero u roślin, układ retromerowy. Retromery są kompleksami utworzonymi z białek SNX (ang. *Sorting Nexin*) i VPS (ang. *Vacuolar Protein Sorting*) powiązanych z cytozolową powierzchnią tubularnych struktur endosomów [13]. W komórkach drożdży retromery pośredniczą w transporcie białek z endosomów do układu *trans*-Golgiego bądź do późnych endosomów, tzw. ciał wielopęcherzykowych (MVB), a następnie do wakuoli litycznych [13]. W badaniach retromerowego szlaku transportu pęcherzykowego pomocna okazała się wortmanina, hamująca aktywność kinazy fosforylującej resztę inozytolu przy trzecim węglu w fosfatydyloinozytolu. Brak PtdIns-3-P na cytozolowej powierzchni tubularnych struktur endosomów uniemożliwia wiązanie białka SNX, kotwiczącego cały kompleks retromerowy do błony endosomu. W doświadczeniach prowadzonych na mutantach *vps29* i *snx1* *A. thaliana*, a także doświadczeniach wykorzystujących wortmaninę, obserwowano gromadzenie się transporterów auksyn w przedziale endosomalnym odrębnym od kompartmentu zawierającego GNOM [39,40,47]. Można zatem przypuszczać, że kompleks retromerowy pośredniczy w relokalizacji transporterów do kompartmentu *trans*-Golgiego, a następnie szlakiem egzocytarnym do błony plazmatycznej [39,40] lub że transportery, za pośrednictwem układu retromerowego, kierowane są do późnych endosomów (MVB), a dalej do wakuoli [47]. Ten kierunek transportu potwierdzają wyniki najnowszych badań pokazujące, iż białka PIN1, PIN2 i AUX1 kierowane są za pośrednictwem skomplikowanego systemu kompleksów ESCRT (ang. *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) do wnętrza ciał wielopęcherzykowych (MVB) [82]. W tym miejscu warto zwrócić uwagę, że transport PIN2 do wakuoli obserwowano już wcześniej w doświadczeniach badających relokalizację transporterów auksyn w różnych warunkach oświetlenia [50].

W regulacji ukierunkowanego transportu PIN z przedziałów endosomalnych do błony plazmatycznej mogą uczestniczyć serynowo/treoninowe kinazy białkowe podrodziny AGCVIII liczącej w *A. thaliana* 23 geny [78]. Sugestie wiążące funkcję kinazy PINOID (PID), należącej do tej podrodziny, z kierowaniem pęcherzyków zawierających białka PIN do określonego regionu błony plazmatycznej pojawiły się już przed pięciu laty w badaniach związanych z nadekspresją *PINOID* [28], jednakże dopiero niedawno udało się wykazać, iż białkami substratowymi fosforylowanymi przez tę kinazę są rzeczywiście same nośniki PIN [58]. Co więcej, wyniki najnowszych badań dowodzą, że cztery inne kinazy białkowe D6PK, a przypuszczalnie także kinazy białkowe WAG1 i WAG2 z tej samej podrodziny, również uczestniczą w regulacji transportu auksyn poprzez fosforylowanie białek transportujących ten

fitohormon [78,100]. Na razie nie wiemy jaką rolę odgrywa fosforylacja nośników PIN, chociaż pewne obserwacje sugerują, że fosforylowane białko kierowane jest do błony plazmatycznej w górnej części komórki, natomiast defosforylowane do części podstawowej [28,58]. W kontekście powyższych badań, większego znaczenia nabierają wyniki sugerujące, że fosfataza białkowa typu PP2A defosforyluje białka PIN lub kinazę PINOD [58]. W tym miejscu należy podkreślić, że sugestie dotyczące regulacji kinazy PINOID przez odwracalną fosforylację pojawiły się już wcześniej, szczególnie w badaniach powiązanej z błoną komórkową za pośrednictwem PtdIns-3-P kinazy białkowej PDK1 [99]. Kinaza PINOID może być także regulowana przez oddziałujące z nią białko TCH3 podobne do kalmoduliny, a także białko PBP1 zawierające motyw EF wiążący jony wapnia [6], co sugeruje, że zmieniające się w cytoplazmie stężenie Ca^{2+} może pośrednio regulować fosforylowanie PIN.

Powiązane z błoną komórkową kinazy PINOID i D6PK, wykazujące częściową kolokalizację z polarnie rozmieszczonymi białkami PIN [58,100], są niewątpliwie kluczowymi elementami regulującymi polarny transport IAA, mimo że wyniki badań prowadzonych na mutantach *d6pk* nie potwierdzają sugerowanej dla PINOID roli molekularnego przełącznika kierującego transportery do części apikalnej bądź bazalnej komórki [100].

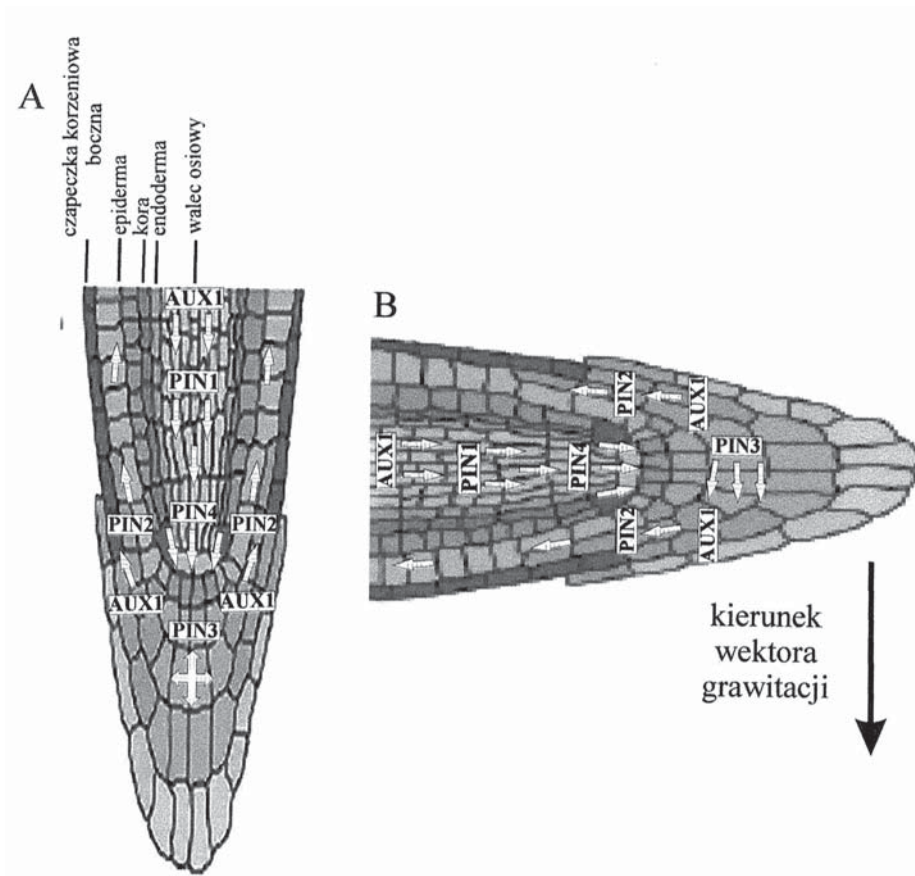
Na marginesie prezentowanych tu wyników, należy wyraźnie podkreślić, iż badania dotyczące relokalizacji transporterów auksyn są w przypadku roślin jedynymi, podejmowanymi na szerszą skalę, badaniami dotyczącymi polarności komórki [15,29,32,87]. Dotychczasowe, pojedyncze doniesienia na temat polarnej lokalizacji transporterów boru (BOR1, BOR4) i krzemu (LSI1 i LSI2) w ryżu [25,46] oraz bardziej zaawansowane badania dotyczące wzrostu łagiewki pyłkowej lub komórek włosnikowych pokazują, że zagadnienia dotyczące problemów ustalania i utrzymania określonej polarności komórek będą w najbliższych latach wiodącymi tematami badawczymi biologii molekularnej roślin.

UKIERUNKOWANA RELOKALIZACJA BIAŁEK PIN W REAKCJACH TROPOWYCH ROŚLIN

Szczegółowe analizy błonowej lokalizacji białek transportujących auksyny, poparte badaniami ich wewnątrzkomórkowej relokalizacji oraz analizami zmian stężenia znakowanej izotopowo auksyny w odpowiednich odcinkach korzenia i pędu, a obecnie także analizami zmian stężenia fitohormonu w pojedynczych, sąsiadujących ze sobą komórkach, zapoczątkowały nowy rozdział w badaniach odpowiedzi grawi- i fototropowych oraz ukierunkowały poszukiwania mechanizmów odpowiedzialnych za reakcje hydrotropowe i tigmomorfogenetyczne. Nierównomierny wzrost korzenia i pędu, będący odpowiedzią rośliny na zmianę wektora grawitacji lub kierunku oświetlenia, od ponad 80 lat wiązany jest z asymetrycznym rozmieszczeniem hipotetycznego czynnika wzrostu (z grec. auksyny) w naprzeciwległych częściach korzenia

lub pędu. Poznanie genów PIN2/EIR1/AGR1 i AUX1, zidentyfikowanych u mutantów *A. thaliana* z zaburzonymi reakcjami grawitropowymi oraz ujawnienie polarnej lokalizacji PIN2 w komórkach warstwy korowej i epidermalnej korzenia, zapoczątkowało nowy etap w badaniach odpowiedzi tropowych roślin [12,70,83,98]. Ustalenie, w następnych latach, tkankowej i komórkowej lokalizacji pozostałych transporterów auksyn oraz ujawnienie ich ukierunkowanej relokalizacji w obrębie określonych, pojedynczych komórek, dało podstawy do formułowania ogólniejszych koncepcji dotyczących molekularnych podstaw reakcji tropowych. Szerszemu omówieniu tych zagadnień poświęcono kilka prac przeglądowych opublikowanych w ostatnich czasach w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym [12,61,68,73].

Niesymetryczny, w wyniku grawistymulacji, wzrost korzenia, uwarunkowany jest polarnym rozmieszczeniem białek PIN1 i AUX1, pozwalającym kierować auksynę z floemu do protofloemu, a dalej, dzięki polarnie zlokalizowanym PIN4, do komórek kolumelli [26,85]. W korzeniu rosnącym pionowo, równomiernie (apolarnie) rozmieszczone w komórkach kolumelli białka PIN3 i PIN7 [8,27,35] oraz polarnie zlokalizowane w komórkach bocznych czapeczki AUX1 [85] kierują strumień auksyny symetrycznie do boku, a dalej dzięki polarnie zlokalizowanym w komórkach epidermy białkom AUX1 i PIN2, bazypetalnie do strefy elongacyjnej korzenia (ryc. 2A) [1,8,27,35,85]. Asymetrycznie (polarnie) rozmieszczone w błonach komórek perycyklu nośniki PIN3, bocznie od strony wiązek naczyniowych, kierują strumień auksyny z powrotem do wierzchołka korzenia (akropetalnie), zgodnie z zaproponowanym przed 10 laty tzw. modelem transportu fontannowego [8,25,46,57]. Stymulacja grawitropowa, polegająca na zmianie położenia korzenia względem wektora grawitacji, niemal natychmiast zapoczątkowuje w komórkach kolumelli relokalizację PIN3 z apolarnej na polarną. Tak więc, zmiana orientacji korzenia wymusza ukierunkowaną relokalizację PIN3, które są przenoszone na aktualnie dolną stronę komórek kolumelli (ryc. 2B) [27,35]. Nowa lokalizacja nośników umożliwia kierowanie większego strumienia auksyny do bocznych komórek czapeczki leżących na dolnej stronie korzenia, a dalej poprzez komórki warstwy epidermalnej do strefy elongacyjnej (ryc. 2B), gdzie w wyniku rosnącego stężenia fitohormonu następuje jednostronne zahamowanie wzrostu elongacyjnego [1]. Zróżnicowane stężenie auksyny wpływa także na poziom PIN2 w błonach komórek epidermy, gdyż większe stężenie fitohormonu w dolnej części korzenia hamuje endocytarną internalizację nośnika, natomiast zanikający strumień fitohormonu w komórkach epidermy na górnej stronie korzenia prowadzi do proteolitycznej degradacji PIN2 [1]. Asymetryczne rozmieszczenie [³H] IAA w korzeniu poddanym grawistymulacji, obserwowane na wiele lat przed poznaniem transporterów auksyn [97], zostało w ostatnich latach w pełni potwierdzone także na poziomie pojedynczych, sąsiadujących ze sobą komórek [66]. Podobne analizy, wykonywane na stymulowanych grawitropowo koleoptylach kukurydzy i hypokotylach grochu, pokazały, że również tutaj grawistymulacja różnicuje strumień przepływającej auksyny [75], a w przypadku epikotyli grochu aktywuje na ich dolnej stronie ekspresję PIN1 [37]. Peryklinalna lokalizacja PIN3 w komórkach endodermi i pochwy okołowiązkowej, umożliwiająca boczny transport auksyny, sugeruje udział



RYCINA 2. Schemat fontannowego modelu transportu auksyny w korzeniu oraz indukowana przez grawitację relokalizacja PIN3. (A) W korzeniu rosnącym pionowo, auksyna transportowana jest przez wiązki naczyniowe do komórek kolumelli, gdzie podlega równomiernemu rozdziałowi i transportem bocznym kierowana jest do komórek peryferyjnych stożka wzrostu, a stąd transportem bazypetalnym dociera do strefy elongacyjnej, gdzie hamuje wzrost komórek. Polarna lokalizacja AUX1 oraz PIN1, PIN2 i PIN4 i apolarna w komórkach kolumelli PIN3 umożliwia kierowanie strumienia auksyny zgodnie z tzw. modelem fontannowym (B). W następstwie grawitostymulacji, sedymentujące w komórkach kolumelli statolity wymuszają relokalizację białek PIN3, które na skutek nowej, aktualnie polarnej lokalizacji, kierują strumień auksyny na dolną stronę korzenia, powodując w ten sposób zahamowanie wzrostu elongacyjnego i zakrzywienie korzenia zgodnie z kierunkiem wektora grawitacji (na podstawie [1,12,26,34,35,66,73,85])

FIGURE 2. The fountain model of auxin transport in root, and PIN3s redistribution upon gravistimulation (A) In vertically grown roots, auxin is transported through the vasculature into the root tip, where it accumulates in columella cells, and then it is redistributed laterally to peripheral tissues and transported back to the elongation zone where it inhibits cellular elongation. Polar localization of PIN1, PIN2 and PIN4, and apolar localization of PIN3 in columella cells is shown (B). Following gravistimulation, gravity sensing statoliths sediment to the new bottom of columella cells, PIN3s relocates and mediate auxin flow downwards, causing asymmetric auxin accumulation at the lower side of the root (based on [1,12,26, 34,35,66, 73,85])

tych właśnie nośników w kierowaniu strumienia auksyny na dolną stronę pędu [27]. Co prawda, w dotychczasowych badaniach nie udało się potwierdzić zakładanej relokalizacji PIN3 jako efektu stymulacji grawitropowej [12,27].

Hipoteza statocytowo-statolitowa zakłada, że komórki kolumelli (statocyty) w korzeniu oraz komórki endodermi i pochwy okołowiązkowej w pędzie zawierające amyloplasty wypełnione ziarnami skrobi (statolitami) stanowią układ, w którym zmiana położenia statolitów informująca o zmianie położenia komórki względem wektora grawitacji, zostaje przetworzona na nieznany jeszcze sygnał, który następnie wymusza ukierunkowaną relokalizację transporterów auksyn [51,72]. W odbiorze sygnału mechanicznego (przemieszczanie się statolitów w komórkach kolumelli) uczestniczy, jak się obecnie przypuszcza, zmieniona i asymetrycznie rozmieszczona w komórce, siateczka śródplazmatyczna [72]. Proponuje się, że sedymentujące amyloplasty wywierają nacisk na powiązane z kanałami wapniowymi SAC (ang. *Stretch-Activated Ca²⁺*) filamenty aktynowe, powodując otwieranie kanałów i napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy [12,72,73]. Grawistymulacji korzenia towarzyszy także alkalizacja cytoplazmy komórek kolumelli i obniżenie pH w apoplazmie oraz wzrost stężenia 1,4,5-trifosfoinozytolu. Pewnych sugestii dostarczają także badania genetyczne, zwłaszcza doświadczenia prowadzone na mutantach *arg1-2* i *arl2*, u których po grawistymulacji białka PIN3 nie przemieszczają się na boczną stronę komórek kolumelli [35]. Sekwencja aminokwasowa ARG1 i ARL2 nie pozwala na razie przewidzieć funkcji tych białek, jednakże pewne przypuszczenia wiążą ich rolę z regulacją transportu pęcherzykowego [35].

W poszukiwaniach molekularnych podstaw odpowiedzi grawitropowych pędu uwaga badaczy ogniskuje się na dużej centralnej wakuoli komórek endodermi, która przypuszczalnie uczestniczy w percepcji bądź przetwarzaniu informacji o zmianie położenia statolitów [41]. Spośród licznej grupy mutantów *sgr* (ang. *shoot gravitropism*), w różnym stopniu upośledzonych w odpowiedziach grawitropowych pędu, najwięcej uwagi poświęca się mutantom *sgr4/zig*, *sgr3* i *sgr2* z defektami w genach kodujących białka funkcjonalnie powiązane z wakuolą. Mutant *sgr4/zig* ma w komórkach endodermalnych zmienioną wakuolę i inaczej rozmieszczone amyloplasty. W komórkach osobników linii dzikich statolity występują tylko na dolnej stronie komórek endodermalnych i są otoczone cytoplazmą, natomiast u mutantu *sgr4/zig* zlokalizowane są w bezpośrednim sąsiedztwie błony plazmatycznej na obu końcach komórek [41]. Mutant *sgr2*, charakteryzujący się zmienioną sedymentacją amyloplastów, ma defekt w genie kodującym powiązaną z błoną wakuolarną fosfolipazę A1. Przypuszcza się, że aktywność tego enzymu może zmieniać płynność błony tonoplastowej poprzez zmianę składu lipidowego błony, bądź że powstający produkt reakcji może pełnić funkcję cząsteczki sygnałowej [41]. Wyniki szczegółowych badań ujawniły, że *SGR4/ZIG* koduje jedno z białek typu t-SNARE, natomiast *SGR3* białko typu v-SNARE [54]. Genom *A. thaliana* zawiera 15 genów v-SNARE oraz 45 genów t-SNARE, których produkty tworzą kompleksy t-SNARE powiązane z określoną błoną docelową [54]. Ogromne zróżnicowanie strukturalne kompleksów t-SNARE umożliwia selektywne kotwiczenie i fuzję pęcherzyków zawierających

jedno z białek v-SNARE. Można więc założyć, że SGR4/ZIG i SGR3 funkcjonują w transporcie pęcherzykowym do wakuoli, uczestnicząc w ten sposób w tworzeniu prawidłowej centralnej wakuoli, bądź są bezpośrednio zaangażowane w transport samych nośników do wnętrza wakuoli.

Odkryte w latach 60 ub. wieku zależności pomiędzy stymulowanym przez ukierunkowane światło niebieskie wygięciem koleoptyla, a rosnącym stężeniem auksyny w jego zacienionej stronie, wyraźnie wskazywały na udział auksyn także w odpowiedziach fototropowych rośliny. Do podobnych wniosków prowadzą również wyniki późniejszych doświadczeń ujawniające, iż polarny transport auksyny w oświetlonej części siewki jest wyraźnie wolniejszy niż transport w części zacienionej [36,92]. Próby wyjaśnienia mechanizmów powstawania w wyniku fotostymulacji zróżnicowanego strumienia auksyny zostały ponownie podjęte po odkryciu białek PIN. Wyniki tych badań pokazują, że u mutantu *pin3* odpowiedź fototropowa jest wyraźnie słabsza [27], chociaż nie potwierdzono zakładanej relokalizacji PIN3 jako efektu kierunkowej fotostymulacji światłem niebieskim [10]. Należy jednakże podkreślić, iż w tej samej serii doświadczeń zwrócono uwagę na zanikanie w części zacienionej hypokotyła *A. thaliana*, w regionie ulegającym zakrzywieniu, białka PIN1, zlokalizowanego w błonie komórkowej na dolnej stronie komórek kory [10]. Na tej podstawie niektórzy autorzy uważają, iż percepcja światła niebieskiego w szczytowej części hypokotyła ma bezpośredni związek z obniżeniem poziomu PIN1 w błonie, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania bazypetalnego transportu w części ulegającej zakrzywieniu i intensyfikacji transportu bocznego auksyny. W kontekście powyższych badań, warte przypomnienia są także wspomniane wcześniej wyniki dowodzące, iż ciemność sprzyja endocytarnej internalizacji PIN2, PIN1 i PIN7, lecz nie AUX1, kierowanych następnie do degradacji w wakuoli [50]. Także najnowsze wyniki dotyczące funkcjonalnych powiązań pomiędzy PIN i PGP korygują nasze wyobrażenia o roli poszczególnych nośników w powstawaniu w dwóch naprzeciwległych częściach pędu gradientu stężenia auksyn. Otóż, wyniki pojedynczych jeszcze doświadczeń wyraźnie pokazują, że mutacja *pgp1* zmienia boczny transport auksyny [64], a czynniki obniżające w hypokotyli ekspresję *PGP19* hamują transport bazypetalny i intensyfikują transport boczny [63].

Receptorami światła niebieskiego, pośredniczącymi m.in. w reakcjach fototropowych, są fototropiny – w *A. thaliana* kodowane przez dwa geny *PHOT1* i *PHOT2* [36,43]. Fototropiny są serynowo/treoninowymi kinazami białkowymi zawierającymi pochłaniający światło niebieskie FMN, których aktywność jest pozytywnie regulowana przez światło [38]. Fototropiny oddziałują swoiście z NPH3 (ang. *Non-Phototropic Hypocotyl 3*) i RPT2 (ang. *Root Phototropism2*) rzodkiewnika, a u ryżu z ich ortologiem CPT1 [71] – białkami poznanymi u mutantów z upośredzonymi reakcjami fototropowymi. W ciemności, białko NPH3 występuje w formie ufosforylowanej, ulegając defosforylacji po fotostymulacji światłem niebieskim lub w ciemności w wyniku działania określonej fosfatazy białkowej [71]. Ponieważ u mutantu *phot1* nie obserwowano defosforylacji NPH3, dlatego autorzy zakładają, że *PHOT1* na świetle aktywuje fosfatazę białkową defosforylującą NPH3 [71].

Funkcja białek NPH3/CPT1 i RPT2 nie jest znana, aczkolwiek pojedyncze doniesienia sugerują, że razem z innymi białkami z grupy NRL uczestniczą, jako elementy składowe ligaz ubikwitynowych obejmujących kulinę 3, w ubikwitylacji białek, m.in. kinaz AGC, w tym również kinazy PINOID [36,71]. Końcowym elementem łańcucha sygnałowego aktywowanego przez fototropiny jest m.in. czynnik transkrypcyjny ARF7/NPH4 (ang. *Auxin Response Factor7/Non-Phototropic Hypocotyl 4*) oddziałujący z białkami represorowymi MSG2/IAA19 i AXR5/IAA1 [24]. Tak więc, wzrost stężenia auksyny po stronie zacienionej sprzyja ubikwitylacji białek represorowych i aktywacji przez NPH4/ARF7 genów kodujących m.in. α -ekspansyny (EXPA1 i EXPA8) [24].

Odkrywanie molekularnych mechanizmów odpowiedzi grawi- i fototropowych nasuwa przypuszczenia, że zmiany w polarnym transporcie auksyn stanowią także podstawę asymetrycznego wzrostu korzenia obserwowanego w warunkach hydrostymulacji oraz są odpowiedzialne za zmiany morfogenetyczne indukowane bodźcami mechanicznymi. Nieliczne, jak na razie wyniki, faktycznie potwierdzają regulacyjną rolę auksyn w reakcjach hydrotropowych, o czym świadczą doświadczenia prowadzone na mutantach z defektami w genach związanych z sygnalizacją auksynową, jednakże nie wiążą bezpośrednio odpowiedzi hydrotropowych ze zmianami w polarnym transporcie fitohormonu [86]. Przemawiają za tym wyniki doświadczeń prowadzonych na mutantach z defektami w genach kodujących transportery fitohormonu, a także badania, w których wykorzystywano inhibitory transportu auksyn. Otóż, okazało się, że zarówno inhibitory dokomórkowego transportu, jak również inhibitory wypływu auksyn, nie hamują odpowiedzi hydrotropowych [86]. Jednakże w badaniach genetycznych udało się wyselekcjonować mutantą *miz2*, allelicznego z *gnom*, który objawia normalną odpowiedź grawitropową, natomiast nie wykazuje reakcji hydrotropowej, co sugeruje, że odpowiedzi hydrotropowe są także w jakiś sposób uzależnione od transportu pęcherzykowego [59].

Zmiany w polarnym transporcie auksyn mogą być także inicjowane stymulacją mechaniczną [16,49,60]. Indukowane w ten sposób zmiany morfogenetyczne, wolniejsze od szybkich reakcji tigmotropowych czy tigmotropowych, przejawiają się m.in. wolniejszym wzrostem oraz odpowiednimi zmianami morfologicznymi ułatwiającymi przetrwanie w warunkach stresu mechanicznego. Opublikowane ostatnio wyniki dowodzą, że zapoczątkowane na skutek stymulacji mechanicznej powstawanie korzeni bocznych jest bezpośrednio powiązane z relokacją w komórkach protoksylemu nośnika PIN1 [23]. Tak więc, wyniki powyższych obserwacji wyraźnie pokazują, że wachlarz bodźców regulujących mechanizmy sortowania i dystrybucji białek za pośrednictwem transportu pęcherzykowego jest niezwykle szeroki. Muszą zatem funkcjonować określone mechanizmy regulacyjne, które np. w warunkach stymulacji rośliny bodźcami indukującymi zmiany wzajemnie się wykluczające, będą preferować takie, a nie inne odpowiedzi tropowe.

LITERATURA

- [1] ABAS L, BENJAMINS R, MALENICAN, 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] ANDERS N, NIELSEN M, KEICHER J, STIERHOF Y-D, FURUTANI M, TASAKA M, SKRIVER K, JÜRGENS G. Membrane association of the *Arabidopsis* ARF exchange factor GNOM involves interaction of conserved domains. *Plant Cell* 2008; **20**: 142–151.
- [3] BAILLY A, SOVERO V, VINCENZETTI V, SANTELIAD, BARTNIK D, KOENIG BW, MANCUSO S, MARTINOIA E, GEISLER M. Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *J Biol Chem* 2008; **283**: 21817–21826.
- [4] BAINBRIDGE K, GUYOMARC'H S, BAYER E, SWARUP R, BENNETT M, MANDEL T KUHLEMEIER C. Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev* 2008; **22**: 810–823.
- [5] BASSHAM DC, BRANDIZZI F, OTEGUI MS, SANDERFOOT AA. The secretory system of *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 2008: 1–29.
- [6] BENJAMINS R, GALVÁN AMPUDIA CS, HOOYKAAS PJJ, OFFRINGAR. PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1623–1630.
- [7] BENJAMINS R, SCHERES B. Auxin: The looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 443–465.
- [8] BILLOU I, XU J, WILDWATER M, WILLEMSSEN 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.
- [9] BLAKESLEE JJ, BANDYOPADHYAY A, LEE OR, MRAVEC J, TITAPIWATANAKUN B, SAUER M, MAKAM SN, CHENG Y, BOUCHARD R, ADAMEC J, GEISLER M, NAGASHIMA A, SAKAI T, MARTINOIA E, FRIML J, PEER WA, MURPHY AS. Interactions among PIN-FORMED P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 131–147.
- [10] 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.
- [11] BLAKESLEE JJ, PEER WA, MURPHY AS. MDR/PGP auxin transport proteins and endocytic cycling. *Plant Cell Monogr* 2005; **1**: 159–176.
- [12] BLANCAFLOR EB, MASSON PH. Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1677–1690.
- [13] BONIFACINO JS, HURLEY JH. Retromer. *Curr Opin Cell Biol* 2008; **20**: 427–436.
- [14] BOUCHARD R, BAILLY A, BLAKESLEE JJ, OEHRING SC, VINCENZETTI V, LEE OR, PAPONOV I, PLAME K, MANCUSO S, MURPHY AS, SCHULZ B, GEISLER M. Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of *Arabidopsis* P-glycoproteins. *J Biol Chem* 2006; **281**: 30603–30612.
- [15] BOUTTÉ Y, IKEDA Y, GREBE M. Mechanisms of auxin-dependent cell and tissue polarity. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 616–623.
- [16] BRAAM J. In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol* 2005; **165**: 373–389.
- [17] BREMBU T, WINGE P, BONES AM. Catching the WAVES of plant actin regulation. *J Plant Growth Regul* 2005; **24**: 55–66.
- [18] CHO M, LEE SH, CHO H-T. P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and Tobacco cells. *Plant Cell* 2007; **19**: 3930–3943.
- [19] DELKER C, RASCHKE A, QUINT M. Auxin dynamics: the dazzling complexity of small molecule's message. *Planta* 2008; **227**: 929–941.
- [20] DHONUKSHE P, ANIENTO F, HWANG I, ROBINSON DG, MRAVEC J, STIERHOF Y-D, FRIML J. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2007; **17**: 520–527.
- [21] DHONUKSHE P, GRIGORIEV I, FISCHER R, TOMINAGAM, ROBINSON DG, HAŠEK J, PACIOREK T, PETRÁŠEK J, SEIFERTOVÁ D, TEJOS R, MEISEL LA, ZAŽIMALOVA E, GADELLA TWJ, STIERHOF Y-D, UEDA T, OIWA K, AKHMANOVA A, BROCK R, SPANG A, FRIML J. Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 4489–4494.

- [22] DHONUKSHE P, TANAKA H, GOHT T, EBINE K, MÄHÖNEN AP, PRASAD K, BLILOU I, GELDNER N, XU J, UEMURA T, CHORY J, UEDA T, NAKANO A, SCHERES B, FRIML J. Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 2008; **456**: 962–966.
- [23] DITENGOU FA, TEALE WD, KOCHERSPERGER P, FLITTNER KA, KNEUPER I, VAN DER GRAFF E, NZIENGUI H, PINOSA F, LI X, NITSCHKE R, LAUX T, PALME K. Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 18818–18823.
- [24] ESMON CA, TINSLEY AG, LJUNG K, SANDBERG G, HEARNE LB, LISCUM E. A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 236–241.
- [25] FERARU E, FRIML J. PIN polar targeting. *Plant Physiol* 2008; **147**: 1553–1559.
- [26] FRIML J, BENKOVÁ E, BLILOU I, WISNIEWSKA 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.
- [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] GAO X, NAGAWA S, WANG G, YANG Z. Cell polarity signaling: focus on polar auxin transport. *Mol Plant* 2008; **1**: 899–909.
- [30] 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, HRZYCYNA 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.
- [31] GEISLER M, MURPHY AS. The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett* 2006; **580**: 1094–1102.
- [32] GELDNER N. Cell polarity in plants – a PARspective on PINs. *Curr Opin Plant Biol* 2009; **12**: 42–48.
- [33] 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.
- [34] GRENNAN AK. Lipid rafts in plants. *Plant Physiol* 2007; **143**: 1083–1085.
- [35] HARRISON BR, MASSON PH. ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant J* 2008; **53**: 380–392.
- [36] HOLLAND JJ, ROBERTS D, LISCUM E. Understanding phototropism: from Darwin to today. *J Exp Bot* 2009; **60**: 1969–1978.
- [37] HOSHINO T, MIYAMOTO K, UEDA J. Gravity-controlled asymmetrical transport of auxin regulates a gravitropic response in the early growth stage of etiolated pea (*Pisum sativum*) epicotyls: studies using simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat and using an agravitropic mutant, ageotropum. *J Plant Res* 2007; **120**: 619–628.
- [38] INOUE S-I, KINOSHITA T, MATSUMOTO M, NAKAYAMA KI, DOI M, SHIMAZAKI K-I. Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 5626–5631.
- [39] JAILLAIS Y, FOBIS-LOISY I, MI?GE C, ROLLIN C, GAUDE T. AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature* 2006; **443**: 106–109.
- [40] JAILLAIS Y, SANTAMBROGIO M, ROZIER F, LOISY-FOBIS I, MI?GE C, GAUDE T. The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell* 2007; **130**: 1057–1070.
- [41] KATO T, MORITA MT, TASAKA M. Role of endodermal cell vacuoles in shoot gravitropism. *J Plant Growth Regul* 2002; **21**: 113–119.
- [42] KERR ID, BENNETT MJ. New insight into biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochem J* 2007; **401**: 613–622.
- [43] KIMURA M, KAGAWA T. Phototropin and light-signaling in phototropism. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 503–508.

- [44] KLEINE-VEHN J, DHONUKSHE P, SAUER M, BREWER PB, WIŚNIEWSKA J, PACIOREK T, BENKOVÁ E, FRIML J. ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2008; **18**: 526–531.
- [45] KLEINE-VEHN J, DHONUKSHE P, SWARUP R, BENNETT M, FRIML J. Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* 2006; **18**: 3171–3181.
- [46] KLEINE-VEHN J, FRIML J. Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; **24**: 447–473.
- [47] KLEINE-VEHN J, LEITNER J, ZWIEWKA M, SAUER M, ABAS L, LUSCHNIG C. Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 17812–17817.
- [48] KRAMER EM. Auxin-regulated cell polarity: an inside job? *Trends Plant Sci* 2009; **14**: 242–247.
- [49] LASKOWSKI M, GRIENEISEN VA, HOFHUIS H, TEN HOVE CA, HOGEWEG P, MARÉE AFM, SCHERES B. Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology* 2008; **6**: 2721–2735.
- [50] LAXMIA, PAN J, MORSY M, CHEN R. Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 2008; **3**: 1–11.
- [51] LEITZ G, KANG B-H, SCHOENWAEELDER MEA, STAEHELIN LA. Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis* columella cells. *Plant Cell* 2009; **21**: 843–860.
- [52] LEWIS DR, MILLER ND, SPLITT BL, WU G, SPALDING EP. Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporter genes. *Plant Cell* 2007; **19**: 1838–1850.
- [53] LI G, XUE H-W. *Arabidopsis* PLD 2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *Plant Cell* 2007; **19**: 281–295.
- [54] LIPKA V, KWON C, PANSTRUGA R. SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**: 147–174.
- [55] MA Q-H. Small GTP-binding proteins and their functions in plants. *J Plant Growth Regul* 2007; **26**: 369–388.
- [56] MEN S, BOUTTÉ Y, IKEDA Y, LI X, PALME K, STIERHOF Y-D, HARTMANN M-A, MORITZ T, GREBE M. Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nature Cell Biol* 2008; **10**: 237–244.
- [57] MICHNIEWICZ M, BREWER PB, FRIML J. Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book* 2007: 1–28.
- [58] MICHNIEWICZ M, ZAGO MK, ABAS L, WEIJERS D, SCHWEIGHOFER A, MESKIENE I, HEISLER MG, OHNO C, ZHANG J, HUANG F, SCHWAB R, WEIGEL D, MEYEROWITZ EM, LUSCHNIG C, OFFRINGA R, FRIML J. Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 2007; **130**: 1044–1056.
- [59] MIYAZAWA Y, TAKAHASHI A, KOBAYASHI A, KANEYASU T, FUJII N, TAKAHASHI H. GNOM-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 2009; **149**: 835–840.
- [60] MONSHAUSEN GB, GILROY S. Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol* 2009; **19**: 228–235.
- [61] MOULIA B, FOURNIER M. The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view. *J Exp Bot* 2009; **60**: 461–486.
- [62] MRAVEC J, KUBEŠ M, BIELACHA, GAYKOVA V, PETRÁŠEK J, SKŮPA P, CHAND S, BENKOVÁ E, ZAŽIMLOVÁ E, FRIML J. Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 2008; **135**: 3345–3354.
- [63] NAGASHIMA A, SUZUKI G, UEHARA Y, SAJI K, FURUKAWA T, KOSHIBA T, SEKIMOTO M, FUJIOKA S, KUROHA T, KOJIMA M, SAKAKIBARA H, FUJISAWA N, OKADA K, SAKAI T. Phytochromes and cryptochromes regulate the differential growth of *Arabidopsis* hypocotyls in both a PGP19-dependent and PGP19-independent manner. *Plant J* 2008; **53**: 516–529.
- [64] 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.
- [65] 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.

- [66] 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.
- [67] PACIOREK T, ZAŽIMALOVÁ E, RUTHARDT N, PETRÁŠEK J, 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.
- [68] PALME K, DOVZHENKO A, DITENGOU FA. Auxin transport and gravitational research: perspectives. *Protoplasma* 2006; **229**: 175–181.
- [69] PAN J, FUJIOKA S, PENG J, CHEN J, LI G, CHEN R. The E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR/AFB} and membrane sterols play key roles in auxin regulation of endocytosis, recycling, and plasma membrane accumulation of the auxin efflux transporter PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2009; **21**: 568–580.
- [70] PAPANOV 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.
- [71] PEDMALE UV, LISCUM E. Regulation of phototropic signaling in *Arabidopsis* via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *J Biol Chem* 2007; **282**: 19992–20001.
- [72] PERBAL G, DRISS-ECOLE D. Mechanotransduction in gravisensing cells. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 498–504.
- [73] PERRIN RM, YOUNG L-S, NARAYANA MURTHY UM, HARRISON BR, WANG Y, WILL JL, MASSON PH. Gravity signal transduction in primary roots. *Ann Bot* 2005; **96**: 737–743.
- [74] PETRÁŠEK J, MRAVEC J, BOUCHARD R, BLAKESLEE JJ, ABAS M, SEIFERTO VÁ D, WIŚNIEWSKA J, TADELE Z, KUBEŠ M, ČOVANOVÁ M, DHONUKSHE P, SKŪPA P, BENKOVÁ E, PERRY L, KRĚČEK 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.
- [75] PHILLIPAR K, FUCHS I, LÜTHEN H, HOTH S, BAUER CS, HAGA K, THIEL G, LJUNG K, SANDBERG G, BÖTTGER M, BECKER D, HEDRICH R. Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12186–12191.
- [76] RICHTER S, GELDNER N, SCHRADER J, WOLTERS H, STIERHOF Y-D, RIOS G, KONCZ C, ROBINSON DG, JÜRGENS G. Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature* 2007; **448**: 488–492.
- [77] ROBERT S, CHARY SN, DRAKAKI G, LI S, YANG Z, RAIKHEL NV, HICKS GR. Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 8464–8469.
- [78] ROBERT SH, OFFRINGA R. Regulation of auxin transport polarity by AGC kinases. *Curr Opin Plant Biol* 2008; **11**: 495–502.
- [79] ROJAS-PIERCE M, TITAPIWATANAKUN B, SOHN EJ, FANG F, LARIVE CK, BLAKESLEE J, CHENG Y, CUTTLER S, PEER WA, MURPHY AS, RAIKHEL NV. *Arabidopsis* P-glycoprotein19 participates in the inhibition of gravitropism by gravacin. *Cell* 2007; **14**: 1366–1376.
- [80] SAUER M, BALLAJ, LUSCHNIG C, WIŚNIEWSKA J, REINÖHL V, FRIML J, BENKOVA E. Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev* 2006; **20**: 2902–2911.
- [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] SPITZER C, REYES FC, BUONO R, SLIWINSKI MK, HAAS TJ, OTEGUI MS. The ESCRT-related CHMP1A and B proteins mediate multivesicular body sorting of auxin carriers in *Arabidopsis* and are required for plant development. *Plant Cell* 2009; **21**: 749–766.
- [83] STARZYŃSKA E, KĘSY J, KOWALCZYK S. Permeazy AUX/LAX, transportery ABC i białka PIN w polarnym transporcie auksyn. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 123–140.
- [84] SWARUP K, BENKOVÁ E, SWARUP R, CASIMIRO I, PÉRET B, YANG Y, PARRY G, NIELSEN E, DE SMET I, VANNESTE S, LEVESQUE MP, CARRIER D, JAMES N, CALVO V, LJUNG K, KRAMER E, ROBERTS R, GRAHAM N, MARILLONNET S, PATEL K, JONES JDG, TAYLOR CG, SCHACHTMAN DP, MAY S, SANDBERG G, BENFEY P, FRIML J, KERR I, BEECKMAN T, LAPLAZE L, BENNETT MJ. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biol* 2008; **10**: 946–954.

- [85] 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.
- [86] TAKAHASHI H, MIYAZAWA Y, FUJII N. Hormonal interactions during root tropic growth: hydrotropism versus gravitropism. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 489–502.
- [87] TANAKA H, DHONUKSHE P, BREWER PB, FRIML J. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**: 2738–2754.
- [88] TEH O-K, MOORE I. An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* 2007; **448**: 493–496.
- [89] TITAPIWATANAKUN B, BLAKESLEE JJ, BANDYOPADHYAY A, YANG H, MRAVEC J, SAUER M, CHENG Y, ADAMEC J, NAGASHIMAA, GEISLER M, SAKAI T, FRIML J, PEER WA, MURPHY AS. ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J* 2009; **57**: 27–44.
- [90] TITAPIWATANAKUN B, MURPHY AS. Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J Exp Bot* 2009; **60**: 1093–1107.
- [91] VERRIER PJ, BIRD D, BURLA B, DASSA E, FORESTIER C, GEISLER M, KLEIN M, KOLUKISA OGLU U, LEE Y, MARTINOIA E, MURPHY A, REA PA, SAMUELS L, SCHULZ B, SPALDING EJ, YAZAKI K, THEODOULOU FL. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 151–159.
- [92] WHIPPO CW, HANGARTER RP. Phototropism: bending towards enlightenment. *Plant Cell* 2006; **18**: 1110–1119.
- [93] WILLEMSSEN V, FRIML J, GEBE M, VAN DEN TOORN A, PALME K, SCHERES B. Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require *STEROL METHYLTRANSFERASE1* function. *Plant Cell* 2003; **15**: 612–625.
- [94] WIŚNIEWSKA J, XU J, SEIFERTOVÁ D, BREWER PB, RŮŽIČKA K, BLILOUÉ I, ROUQUIE D, BENKOVÁ E, SCHERES B, FRIML J. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 2006; **312**: 883.
- [95] WU G, LEWIS DR, SPALDING EP. Mutations in *Arabidopsis multidrug resistance-like* ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 2007; **19**: 1826–1837.
- [96] 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.
- [97] YOUNG LM, EVANS ML, HERTEL R. Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiol* 1990; **92**: 792–796.
- [98] ZAŽIMALOVÁ E, KŘEČEK P, SKŮPA P, HOYEROVÁ K, PETRÁŠEK J. Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 1621–1637.
- [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] ZOURELIDOU M, MÜLLER I, WILLIGE BC, NILL C, JIKUMARU Y, LI H, SCHWECHHEIMER C. The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 2009; **136**: 627–636.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 03.06. 2009 r.

Przyjęto: 28.08. 2009 r.

Mgr Ewelina Starzyńska

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,

Uniwersytet M. Kopernika

ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

E-mail: e.starzynska@umk.pl