

## **SUBKOMÓRKOWA RELOKACJA BIAŁEK PIN A REGULOWANY PRZEZ AUKSYNY WZROST I ROZWÓJ ROŚLIN**

SUBCELLULAR RELOCATION OF PIN PROTEINS, AND THE  
AUXIN DEPENDENT PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT

Ewelina STARZYŃSKA, Stanisław KOWALCZYK

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

*Streszczenie:* W transporcie auksyny pomiędzy komórkami uczestniczą białka należące do trzech rodzin, a mianowicie: białka z rodziny importerów AUX/LAX, transportery ABCB/PGP oraz białka rodziny eksporterów PIN. Poznane dotychczas białka, różniące się kierunkiem oraz mechanizmem transportu, współdziałają w transporcie auksyny przez błonę plazmatyczną. Jednakże w obrębie poszczególnych tkanek, kierunek przepływu auksyny wyznaczają zasadniczo polarnie rozmieszczone w błonie komórkowej nośniki PIN, których lokalizacja podlega ciągłym, dynamicznym zmianom. Subkomórkowa relokacja białek PIN pozostaje pod kontrolą różnorodnych sygnałów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, które wpływają na zmiany kierunku międzykomórkowego przepływu auksyny. Niezwykłą dynamikę błonowej relokacji transporterów PIN zapewniają: konstytutywny recykling, ukierunkowana relokacja i transcytoza białek – zmiany zachodzące dzięki powtarzającym się procesom endo- i egzocytozy. W regulacji subkomórkowej migracji pęcherzyków transportujących biorą udział monomeryczne białka G z rodziny ARF, RAB i ROP. Wyniki najnowszych badań wykazały, iż w regulacji endocytozy oraz w reorganizacji cytoszkieletu, oprócz białek ROP, uczestniczy także białko wiążące auksynę ABP1. Ponadto, wyniki szeregu doświadczeń dowodzą, iż odwracalna fosforylacja białek PIN odgrywa ważną rolę w wyznaczaniu apikalno-bazalnej polarności tych transporterów, natomiast w zachowaniu polarnego rozmieszczenia białek PIN w błonie komórkowej istotną rolę wydają się odgrywać nieznane jeszcze elementy ściany komórkowej. Szybkie zmiany lokalizacji białek PIN po raz pierwszy obserwowano w komórkach rozwijającego się zarodka. Wykazano, iż w kolejnych fazach rozwoju embrionu, w różnych komórkach ekspresji ulegają co najmniej cztery geny *PIN*. Bezpośrednio po podziale zygoty w większej komórce białko *PIN7* wbudowywane jest do błony po stronie apikalnej, by w stadium 32-komórkowym w komórkach wieszadełka zmienić lokalizację z apikalnej na bazalną. *PIN1* pojawia się w komórkach tworzących część środkową zarodka, początkowo jako białko zorientowane apolarnie, lecz w stadium 32-komórkowym, w komórkach wyznaczających położenie przyszłych wiązek przewodzących, jego lokalizacja zmienia się na bazalną. W komórce hypofizy oraz w szczytowej komórce potomnej, ekspresji ulega gen *PIN4*, którego produkt wbudowywany jest do błony po stronie bazalnej. W stadium sercowatym, w komórkach prekursorowych kolumelli

obserwuje się ekspresję genu *PIN3*. Zawiązki liści i kwiatów, powstające w regionie bocznym merystemu wierzchołkowego pędu, tworzą określony wzorzec filotaksyjny. Kąt  $137^\circ$ , zawarty pomiędzy kolejnymi zawiązkami liści w *Arabidopsis thaliana*, wyznaczany jest przez sekwencyjnie powstające maksima stężenia auksyny. Innymi słowy, wzorzec filotaksyjny określany jest przez „ogniska auksynowe” tworzące się w komórkach warstwy epidermalnej dzięki polarnie zlokalizowanym białkom PIN1. Auksyna, której stężenie w zawiązkach liści jest stosunkowo wysokie, odprowadzana jest do komórek warstw subepidermalnych, dzięki bazalnie zlokalizowanym tu białkom PIN1. Tak więc, w wyznaczaniu wzorca filotaksyjnego zawiązków liści kluczową rolę odgrywa zarówno polarna lokalizacja białek PIN1, jak również jej kompleksowa reorganizacja względem kolejnych maksimów auksyny tworzonych w warstwie epidermalnej merystemu. Polarny transport auksyny reguluje różnicowanie komórek prokambium zapewniające ciągłość powstającego wzorca wiązek przewodzących. W liściu, w komórkach budujących przyszłe wiązki przewodzące, białko PIN1 jest jedynym eksporterem wyznaczającym kierunek strumienia transportowanej auksyny. W trakcie różnicowania wiązek naczyniowych, w komórkach epidermy białka PIN1 kierują strumień auksyny do punktów konwergencyjnych. Fala auksynowa przemieszczająca się w kierunku wiązki środkowej liścia wyznacza pozycję wszystkich przyszłych wiązek przewodzących. W rozwoju poembrionalnym, wykształcenie specyficznych dla pędów i korzeni organów zachodzi dzięki aktywności merystemów wierzchołkowych pędu i korzenia. W pachwinie każdego liścia powstaje jeden lub kilka merystemów bocznych inicjujących zawiązki pąków spoczynkowych. Aktywacja pąków bocznych pozostaje pod kontrolą polarnego transportu auksyny w pędzie. Kluczową rolę w aktywacji pąka spoczynkowego odgrywa eksport auksyny z zawiązka do pędu, uruchamiany na skutek stopniowej polaryzacji białek PIN1. Strigolaktyny hamują aktywację pąków spoczynkowych poprzez obniżenie w komórkach parenchymatycznych towarzyszących ksylemowi poziom bazalnie zorientowanych białek PIN1. Polarny transport auksyny odgrywa także kluczową rolę w inicjowaniu korzeni bocznych. W komórkach perycyklu, maksima stężenia auksyny wyznaczają pozycję komórek założycielskich inicjujących zawiązki korzeni bocznych. W fazie inicjacji, białka PIN1 są zlokalizowane polarnie w błonie antyklinalnej, natomiast po zmianie kierunku podziałów komórek założycielskich, białka PIN1 ulegają relokacji i są wbudowywane do błony od strony wierzchołka przyszłego korzenia.

*Słowa kluczowe:* auksyny, relokacja białek PIN, auksyna a rozwój roślin

*Summary:* Auxin movement between cells depends on AUX1/LAX, ABCB/PGP and PIN protein families that mediate auxin transport across the plasma membrane. The directionality of auxin flow within tissues is largely determined by polar, subcellular localization of PIN auxin efflux carriers that undergo rapid subcellular dynamics. At the cellular level, various internal and external signals are translated into specific changes in the polar, subcellular localization of PIN proteins thereby directing and redirecting the intercellular fluxes of auxin. These dynamic, rapid switches of PIN polarity are presumably enabled by permanently, repeating cycles of endocytosis and exocytosis of PIN proteins. The experimental data strongly suggest that phosphorylation and dephosphorylation of PIN transporters play an important role in determining the apical-basal polarity. The subcellular trafficking of PIN proteins appears to be regulated by ARF, RAB and ROP monomeric G proteins. Very recently, Auxin Binding Protein1 (ABP1) has been ascribed a role in regulation of endocytosis and ROP-mediated cytoskeletal rearrangements. Moreover, it has been revealed that the extracellular matrix is essential to maintain polar distribution of PIN proteins at the plasma membrane. Rapid PIN protein relocations have been observed during embryonic development. At least four *PIN* genes are dynamically expressed during embryogenesis. Immediately after the division of the zygote, PIN7 protein is localized to the apical side of the basal cell. At the 32-cell stage, PIN7 reverses to the basal membrane of the suspensor cells. PIN1 protein is expressed without any polarity in the embryo, however at the 32-cell stage, PIN1 transporter becomes polarly localized to the basal membranes in the provascular cells. The PIN4 protein is expressed in hyphophysis cell, and after division, in its uppermost daughter cell. The expression of *PIN3* gene starts relatively late at the heart stage in the

columella precursors. Shoot lateral organs (leaves and flowers) are generated from the apical meristem in a highly periodic phyllotactic pattern. In *Arabidopsis thaliana*, the 137° angle between developing primordial is marked by auxin maxima at the position of incipient primordial. Auxin arrives at the organ initiation sites through the epidermis layer and is canalized through the interior of developing primordial into the basipetal stream. PIN1 proteins polarity in the epidermis layer, as well as their complex rearrangements relative to auxin maxima appear to be responsible for generating the phyllotactic pattern of auxin distribution. A number of studies have shown that polar auxin transport is required for continuous vascular pattern formation and establishment of procambial strands. PIN1 transporter plays a major role in leaf vascular patterning because it is the only protein of the PIN family to be expressed in future vein cells. During the formation of vascular veins in leaves, PIN1 proteins direct auxin towards a convergence point in the leaf epidermis, from where veins are being initiated, and where PIN1 polar localization marks the position of all future veins. During postembryonic development, the activity of shoot and root apical meristems lead to the formation of shoot- and root-specific organs. In the axil of each leaf, one or more secondary axillary meristems are formed. The axillary meristem often initiates a few leaves before arresting their growth to form a dormant axillary bud. Polar auxin transport in stems is necessary for the control of bud outgrowth. Very recently, the experimental data strongly suggest that establishment of auxin export from the bud is crucial for the bud to be activated. This increased auxin export is accompanied by gradual PIN1 polarization in the activated buds. In addition, strigolactones reduce the accumulation of PIN1 proteins on the basal membrane of xylem parenchyma cells. Auxin transport is also crucial for lateral root initiation. In pericycle cells, auxin maxima specify the founder cells for lateral root initiation. During the initiation phase, PIN1 proteins are localized at the anticlinal membranes, and after the switch of the pericycle cell division plan, they redistributed to the outer lateral plasma membrane.

*Key words:* Auxins, PIN proteins relocation, auxin and plant development

*Wykaz stosowanych skrótów:* **ABCB/PGP** – białka transportujące auksynę przez błonę plazmatyczną na koszt hydrolizy ATP; **AUX1/LAX** – permeazy transportujące auksynę z apoplastu do wnętrza komórki; **GEF** – białko uwalniające GDP z małych białek G; **GNOM** – białko GEF wrażliwe na brefeldynę A; **PIN** – nośnik (ang. *PIN-formed*) eksportujący auksynę z cytoplazmy; **PtdIns-4,5-P<sub>2</sub>** – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan

## WSTĘP

W poprzednich dwóch pracach opublikowanych w Postęпах Biologii Komórki przedstawiono ogólną budowę białek AUX/LAX importujących auksyny do komórki, nośników PIN eksportujących auksyny z komórki oraz białek z rodziny transporterów ABCB/PGP [48, 87]. W obu pracach zwracano również uwagę na niezwykle interesujące badania poświęcone subkomórkowej, ukierunkowanej migracji tych białek. Asymetryczne (polarne) rozmieszczenie białek PIN i AUX/LAX w odpowiednich obszarach błony komórkowej, jak również regulowana przez czynniki wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe relokacja białek PIN, odgrywają kluczową rolę w odpowiedziach roślin na auksyny [48]. Zmiany stężenia auksyny w obrębie poszczególnych przedziałów wewnątrzkomórkowych, szczególnie zaś zmiany poziomu wolnej auksyny w kompartmentach wokół- i wewnątrzjądrowym, mają istotne znaczenie, bowiem, jak już dzisiaj wiadomo, jądrowe receptory auksyn (w *A. thaliana* TIR1, AFB1–5) wiążą fitohormon, a następnie jedno z białek represorowych AUX/IAA w stosunku

1:1:1, współtworząc w ten sposób aktywne kompleksy ligazy ubikwitynowej [64]. Innymi słowy, zmiany stężenia aktywnej auksyny w jądrze komórkowym przekładają się bezpośrednio na zmiany poziomu wolnych czynników transkrypcyjnych ARF regulujących ekspresję genów związanych z odpowiedziami na fitohormon. Zatem auksyny spełniają kryteria, jakie przed ponad dwudziestu laty zostały określone w odniesieniu do białka Hunchback *Drosophila melanogaster*, a w następnych latach także w przypadku innych substancji nazywanych ogólnie morfogenami.

Niezwykle szybki rozwój badań poświęconych poznawaniu mechanizmów regulujących wewnątrzkomórkową relokację białek transportujących auksyny obliguje do uważnego śledzenia postępów badań w tym zakresie, gdyż to w dużym stopniu od ich wyników zależy dalsze poznawanie roli auksyn w roślinie. Kierując się powyższym przekonaniem, pierwszą część niniejszej pracy poświęcono podsumowaniu osiągnięć z ostatnich trzech lat, ze szczególnym zwróceniem uwagi na badania, w których poszukiwano odpowiedzi na pytanie o mechanizmy umożliwiające zachowywanie w błonie plazmatycznej polarnej lokalizacji białek PIN. Niektóre z omawianych zagadnień są także prezentowane w pracach przeglądowych opublikowanych w ostatnich trzech latach w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym [36, 49, 66, 68, 91, 97].

Drugą część pracy poświęcono badaniom, których celem było wyjaśnienie roli ukierunkowanej migracji białek PIN w niektórych procesach wzrostu i rozwoju rośliny. W kolejnych pięciu rozdziałach przedstawiono wyniki badań poświęcone zmianom lokalizacji białek PIN jakie towarzyszą: embriogenezie, ustalaniu filotaksji zawiązków liści, różnicowaniu i ustalaniu wzorca wiązek przewodzących w liściu, aktywacji pąków bocznych oraz inicjowaniu zawiązków korzeni bocznych. Skupiając głównie uwagę na pokazaniu niezwyklej dynamiki zmian wewnątrzkomórkowej lokalizacji eksporterów PIN, celowo pominięto szereg interesujących zagadnień z zakresu sygnalizacji auksynowej, a także zagadnień dotyczących udziału w omawianych procesach innych fitohormonów. Pełniejsze omówienie wyników tych badań zainteresowany Czytelnik może znaleźć w pracach przeglądowych opublikowanych w czasopiśmie ogólnosiwiatowym [5, 8, 11, 16, 18, 23, 32, 42, 50, 53, 58, 62, 67, 71, 76, 80, 81, 84].

## **UKIERUNKOWANA RELOKACJA ORAZ SWOISTE ODDZIAŁYWANIA BIAŁEK PIN Z ELEMENTAMI ŚCIANY KOMÓRKOWEJ**

Wyniki badań prezentowane w poprzedniej pracy przeglądowej [48] dowodzą, iż syntetyzowane *de novo* białka PIN, po odpowiednim sortowaniu i wbudowaniu do pęcherzyków transportujących opłaszczanych COPII, przenoszone są z siateczki śródplazmatycznej do błony cis Golgiego, a następnie w siateczce trans Golgiego (TGN/EE), u roślin tożsamej z wczesnymi endosomami, zostają ponownie

wbudowane do pęcherzyków klatrynowych, które dzięki odpowiednim białkom RAB, białkom SNARE oraz białkom kompleksu egzocysty zostają wstępnie zakotwiczone, a następnie ulegają fuzji z błoną plazmatyczną (ryc. 1.) [47]. Jednakże okazało się, że nie wszystkie białka PIN przebywają taką drogę, bowiem białko PIN5, a przypuszczalnie także podobne do niego białka PIN6 i PIN8, pozostają w błonach siateczki śródplazmatycznej, gdzie, jak się obecnie sądzi, transportują auksynę z cytoplazmy do wnętrza siateczki [49, 61]. Wszystkie pozostałe białka PIN (PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 i PIN7) w transporcie egzocytarnym trafiają do błony plazmatycznej, gdzie początkowo rozmieszczone są symetrycznie (apolarnie), by po pewnym czasie zmienić lokalizację na asymetryczną (polarną) [22, 36, 49, 74]. Udział transportu pęcherzykowego w migracji białek PIN potwierdzono w pełni również w najnowszych doświadczeniach, w których do śledzenia relokacji białek PIN wykorzystano m.in. nowe białko reporterowe EosFP koralowca *Lobophyllia hemprichii*. Białko EosFP, w zależności od długości fali światła wzbudzenia emituje światło zielone bądź czerwone [94]. Ta nietypowa właściwość białka okazała się niezwykle przydatna w śledzeniu wewnątrzkomórkowej relokacji białka hybrydowego PIN-EosFP [19]. Dzięki m.in. tym doświadczeniom dowiedziono, że relokalizacja białek PIN w dwuwarstwie lipidowej nie zachodzi na drodze bocznej dyfuzji, lecz jest rezultatem aktywnego sortowania białek w trakcie formowania pęcherzyków klatrynowych, a dalej endocytarnej internalizacji oraz migracji pęcherzyków transportujących do wczesnych endosomów (TGN/EE). W siateczce trans Golgiego, białka PIN są ponownie sortowane do pęcherzyków klatrynowych, a następnie w transporcie egzocytarnym trafiają z powrotem do błony plazmatycznej (ryc. 1.) [19]. Powrót białek PIN do błony komórkowej może się odbywać w drodze konstytutywnego, nieukierunkowanego recyklingu bądź ukierunkowanej relokacji, w tym także transcytozy, polegającej na przeniesieniu białek PIN z jednego końca komórki na jej przeciwny koniec [44]. W wyniku takiej wewnątrzkomórkowej migracji pęcherzyków transportujących ustala się wyraźnie polarne zagęszczenie białek PIN na apikalnym bądź bazalnym końcu komórki, zgodnie z kierunkiem polarnego transportu auksyny w danej tkance [48, 68, 87, 97]. W licznych doświadczeniach, w których wykorzystywano mutantą *gnom* *A. thaliana* oraz brefeldynę A, potwierdzono udział pewnej puli pęcherzyków TGN/EE w recyklingu białek PIN [36,68]. Brefeldyna A blokuje aktywność białek ARF-GEF, w tym również białka GNOM, funkcjonujących w uwalnianiu guanozynodifosforanu (GDP) z małych białek G rodziny ARF, umożliwiając tym samym ich aktywację poprzez związanie GTP [47]. Endocytną internalizację białek PIN hamuje tyrfostyna 23 – inhibitor blokujący wiązanie białek transportowanych do podjednostki  $\mu$  kompleksu adaptorowego AP-2 (ryc. 1.). Relokację białek PIN zakłóca również mutacja w jednym z białek RAB (Rab5/Ara6) funkcjonującym w kierowaniu odpączkowanych z błony plazmatycznej pęcherzyków klatrynowych do TGN/EE [19, 22]. Ponadto okazało się, iż związki powszechnie używane w doświadczeniach jako inhibitory transportu

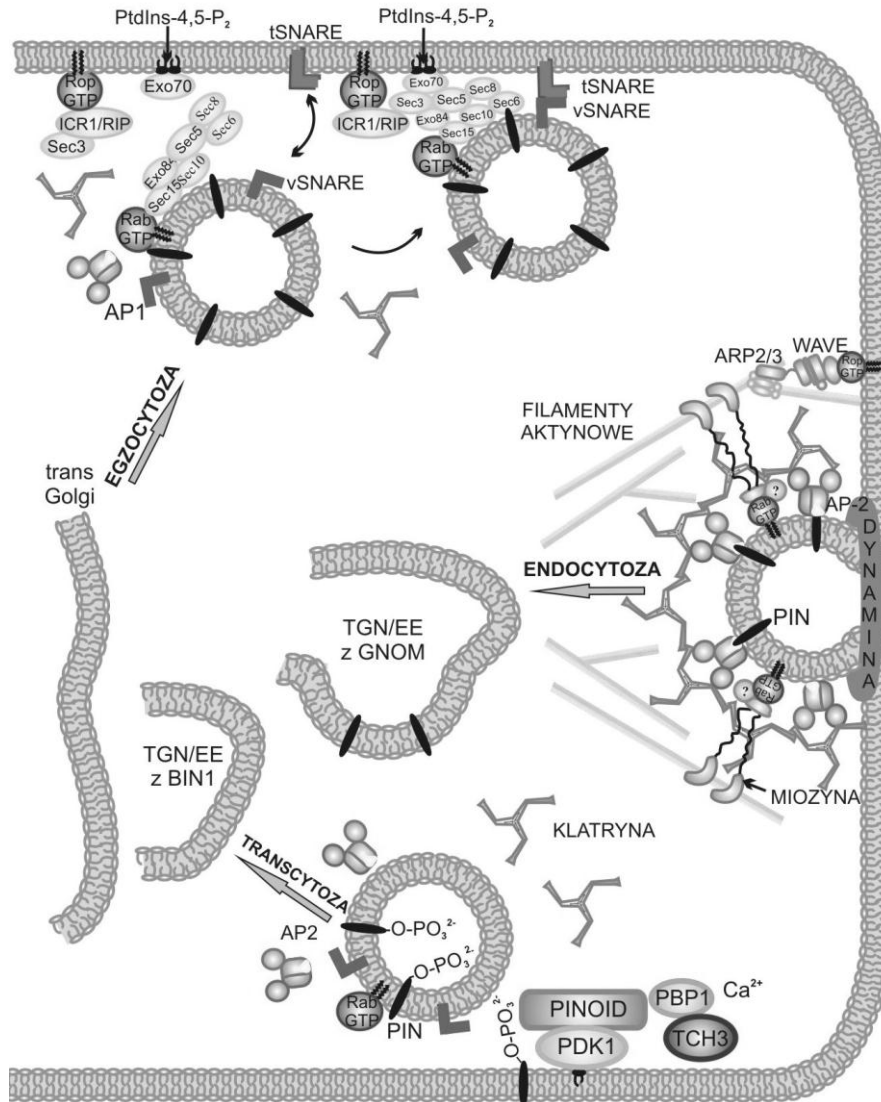
auksyny blokują reorganizację F aktyny, która odgrywa istotną rolę zarówno na etapie formowania pęcherzyków transportujących, jak również później, pełniąc ważną funkcję w transporcie pęcherzyków pomiędzy różnymi przedziałami komórkowymi (ryc. 1.) [20, 46, 63]. Z mikrofilamentami aktynowymi oddziałuje również produkowany przez fosfolipazę D (PLD $\zeta$ 2) kwas fosfatydowy, który wg autorów, w ten sposób uczestniczy w regulacji transportu pęcherzykowego [54, 56]. Podkreśla się także rolę lokalizowanej w aparacie Golgiego izoformy fosfolipazy A (PLA $_2\alpha$ ), której aktywność jest niezbędna w transporcie białek PIN do błony plazmatycznej [52]. Ponadto, w najnowszych doświadczeniach wykazano, iż nadekspresja fragmentu C-końcowego dużej podjednostki klatryny (HUB) zaburza relokację białek PIN. Obserwowane zakłócenia wynikają z podwyższonego poziomu C-końcowego polipeptydu HUB wiążącego małą podjednostkę klatryny. Innymi słowy, zaburzenia w migracji białek PIN wynikają z nieprawidłowości w opłaszczaniu formujących się pęcherzyków klatrynowych [19, 43]. Podobnie interpretowane są również wyniki doświadczeń, w których wykorzystywano mutantą *chc2* z defektem w genie kodującym dużą podjednostkę klatryny [43]. W endocytarnej internalizacji białek PIN bierze udział białko podobne do dynaminy DRP1A (*ang. Dynamin-Related Protein1A*), które przypuszczalnie uczestniczy w odcinaniu pączkującego z błony plazmatycznej pęcherzyka endocytarne (ryc. 1) [60].

W konkluzji dotychczasowych wyników można zatem jednoznacznie stwierdzić, iż zmiana lokalizacji białek PIN w błonie plazmatycznej zachodzi na drodze nieukierunkowanego konstytutywnego recyklingu oraz ukierunkowanej relokacji pęcherzyków transportujących, w tym także transcytozy. W obu przypadkach pęcherzyki transportujące zawierające białka PIN miałyby trafiać do dwóch odrębnych puli wczesnych endosomów, w których funkcję białek ARF-GEF pełni białko GNOM bądź białko BEN1 [90]. Udział dwóch odrębnych puli pęcherzyków TGN/EE z dwoma różnymi białkami aktywującymi białka ARF potwierdzono także w badaniach kinazy białkowej PINOID [36]. Zainteresowanie kinazą PINOID zaczęło się od doniesienia w 2004 roku, w którym autorzy sugerują, iż badana kinaza białkowa pełni funkcję przełącznika kierującego białka PIN do apikalnej bądź bazalnej części komórki [36]. W doświadczeniach prowadzonych w ostatnich latach uwaga badaczy koncentrowała się na próbach wyjaśnienia roli katalizowanej przez kinazę PINOID fosforylacji białek PIN [21, 41, 45, 98]. Uzyskane wyniki można w zasadzie podsumować w dwóch punktach. Po pierwsze, białka PIN z dłuższą pętlą cytoplazmatyczną (PIN1, 2, 3, 4 i 7) zawierają w jej obrębie szereg potencjalnych miejsc fosforylacji, spośród których co najmniej trzy motywy z resztami seryny i treoniny są fosforylowane przez kinazę PINOID oraz jej homologi WAG1 i WAG2 [21,41]. Po drugie, ufosforylowane białka PIN sortowane są do pęcherzyków transportujących kierowanych do TGN/EE, gdzie w puli wczesnych endosomów niezwiązanych z białkami GNOM sortowane są do pęcherzyków migrujących do błony plazmatycznej w apikalnej części komórki (ryc. 1.) [21, 41, 45, 98].

Niefosforylowane, a także defosforylowane przez fosfatazę białkową PP2A, białka PIN trafiają do puli endosomów zawierających białka GNOM, gdzie są wbudowywane do pęcherzyków transportujących kierowanych do części bazalnej komórki [36]. Aktywność kinazy PINOID jest przypuszczalnie regulowana przez inną, związaną z błoną plazmatyczną kinazę białkową PDK1, a także przez dwa białka wiążące jony wapnia (TCH3, PBP1) [4, 48]. Udział jonów wapnia w regulacji transportu białek PIN wydają się również potwierdzać wyniki najnowszych badań, w których ujawniono istnienie pewnych zależności pomiędzy zmianami poziomu inozytolo-1,4,5-trifosforanu oraz jonów wapnia a kierunkiem relokacji białek PIN [99].

W kontekście prowadzonych obecnie poszukiwań należy także zwrócić uwagę na prace, których wyniki nie potwierdzają proponowanej funkcji PINOID. Co prawda, w doświadczeniach prowadzonych w konkurencyjnych laboratoriach potwierdzono udział kinazy PINOID oraz jej czterech homologów D6PK w regulacji transportu auksyny, lecz nie dowiedziono by badane kinazy pełniły funkcję molekularnego przełącznika kierującego białka PIN do odpowiedniej części komórki [88, 100].

Pomijając szczegóły toczącej się obecnie dyskusji, nie można nie zauważyć faktu, iż dotychczasowe badania nie wyjaśniają przyczyn polarnego nagromadzenia eksporterów PIN w błonie plazmatycznej na jednym bądź drugim końcu komórki. Wydaje się oczywiste, iż w zachowaniu asymetrycznej lokalizacji tych białek powinien uczestniczyć dodatkowy mechanizm ograniczający boczną dyfuzję i przeciwdziałający w ten sposób „odpływowi” białek PIN z miejsca ich nagromadzenia, bądź mechanizm, który w odpowiednich regionach błony plazmatycznej mógłby hamować endocytarną internalizację eksporterów PIN. W tym miejscu należy zauważyć, iż w doświadczeniach prowadzonych przed kilku laty na kulturach komórkowych BY-2 tytoniu oraz na uzyskiwanych z tych komórek protoplastach, wykazano, iż polarna lokalizacja AtPIN-GFP, wyraźnie widoczna w taśmowato połączonych ze sobą komórkach BY-2, całkowicie zanika po usunięciu z komórek ściany komórkowej [9]. Można zatem założyć, iż pozbawienie komórek ściany komórkowej sprzyja „odpływowi” białek PIN z miejsca ich polarnego zagęszczenia bądź ogranicza ukierunkowany (polarny) „napływ” białek PIN w określony region błony. Nie można więc wykluczyć możliwości, iż w trakcie usuwania ściany komórkowej zostaje usunięty także jakiś element błony lub ściany komórkowej, który poprzez swoje oddziaływanie z białkami PIN powoduje ich unieruchomienie w błonie komórkowej.



RYCINA 1. Szlaki subkomórkowej relokacji białek PIN. Syntetyzowane *de novo* transportery PIN docierają do błony plazmatycznej za pośrednictwem pęcherzyków transportujących opłaszczanych klatryną. W błonie komórkowej białka PIN są początkowo rozmieszczone symetrycznie, by po pewnym czasie zmienić lokalizację na polarną. Relokacja PIN odbywa się w drodze endocytarnej internalizacji, transportu do endosomów w szlaku zależnym od GNOM (wrażliwym na BFA) i w szlaku niewrażliwym na hamujące działanie BFA oraz w drodze transportu egzocytnego. Odrębne szlaki transportu pęcherzykowego białek PIN regulowane są przez różne białka ARF-GEF. Białko GNOM funkcjonuje w szlaku kierującym białka PIN do błony komórkowej w bazalnej części komórki. Ufosforylowane białka PIN kierowane są w szlaku niewrażliwym na BFA do odrębnego przedziału endosomów zawierającego BIN1, skąd w transporcie egzocytnym przenoszone są do błony plazmatycznej w apikalnej części komórki. W fosforylacji białek PIN bierze udział kinaza



białkowa PINOID, natomiast w ich defosforylacji uczestniczy fosfataza białkowa PP2A. Miejsce dokowania pęcherzyka transportującego w błonie komórkowej wyznaczają: białko ROP-GTP i fosfatydyloinozytolo-4,5-P<sub>2</sub> pośredniczące w wiązaniu do błony kompleksu egzocysty. Kompleks ROP-WAVE-ARP2/3 reguluje polimeryzację aktyny (na podstawie [4, 19, 22, 36, 38, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 60, 63, 90, 91, 95])

FIGURE 1. Subcellular relocation pathways of PIN proteins. *De novo* synthesized PIN transporters are delivered symmetrically to the plasma membrane via clatrin-coated vesicles, and recycle between endosome and the plasma membrane via GNOM-dependent (GFA-sensitive) and BFA-insensitive recycling compartments. Polar distribution of PIN proteins is controlled by the distinct ARF-GEF-dependent plasma membrane targeting pathways. GNOM ARF-GEF is the component of the basal targeting pathway. Another ARF-GEF-dependent, BFA-resistant pathway, mediates phosphorylated PIN proteins relocation to the endosome. PIN proteins are targets of phosphorylation by PINOID kinase and dephosphorylation by protein phosphatase 2A, and their phosphorylation state might be crucial for determining PIN recruitment into the apical or basal targeting pathways. The multisubunit protein complex known as the exocyst complex plays an important role in spatial regulation of exocytosis. Actin dynamics is regulated by the large multiprotein complexes ROP-WAVE-ARP2/3 (based on [4, 19, 22, 36, 38, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 60, 63, 90, 91, 95])

Biorąc pod uwagę strukturalne zróżnicowanie dwuwarstwy lipidowej jako ewentualną podstawę mechanizmu pozwalającego zachować polarną lokalizację białek PIN w błonie, należy niewątpliwie zwrócić uwagę na rozproszone mikrodomeny tzw. tratwy lipidowe. Struktury te wyróżniają się zwiększoną zawartością sfingolipidów, roślinnych steroli, długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych oraz charakteryzują się odmiennym składem zlokalizowanych tu białek [10, 59]. Skądinąd wiadomo, że zarówno sterole, jak również długołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe odgrywają ważną rolę w polarnej lokalizacji transporterów auksyn [10, 57, 77]. Ponadto z tratwami lipidowymi powiązane są m.in. kinazy fosforylujące fosfatydyloinozytyle. Obecność tych enzymów w mikrodomenach błonowych jest o tyle ważna, że fosfatydyloinozytyle o różnym stopniu ufosforylowania pełnią kluczowe funkcje w regulacji transportu pęcherzykowego [47]. Na przykład, PtdIns-4,5-P<sub>2</sub> wiąże do błony plazmatycznej podjednostkę Exo70 kompleksu egzocysty funkcjonującego w cumowaniu do błony plazmatycznej pęcherzyków egzocytarnych (ryc. 1.). Kinaza białkowa PDK1, której funkcja wiązana jest z regulacją aktywności kinazy białkowej PINOID, oddziałuje z błoną plazmatyczną poprzez PtdIns-3-P [48]. W tratwach lipidowych kotwiczą również, co najmniej niektóre, małe białka G z rodziny ROP/RAC [86]. Z drugiej strony wiadomo, że zakotwiczone w błonie plazmatycznej ROP1-GTP oddziałuje z białkiem adaptorowym ICR1/RIP1 pośredniczącym w wiązaniu podjednostki Sec3 kompleksu egzocysty cumującego pęcherzyk egzocytarny do błony komórkowej (ryc. 1.) [38, 47].

W tym miejscu warto zwrócić uwagę, iż badania białek ROP/RAC w kontekście ich udziału w polarnej lokalizacji transporterów PIN, podobnie jak doświadczenia poświęcone roli tych białek w sygnalizacji auksynowej, otwierają nowy, interesujący rozdział w badaniach auksyn [47, 65, 95]. Wyniki dotychczasowych badań związanych z poznawaniem roli białek ROP/RAC, a także

małych białek G z pozostałych rodzin, podsumowano w pracy przeglądowej opublikowanej w ubiegłym roku w *Postęпах Biochemii* [47].

W doświadczeniach prowadzonych na komórkach epidermalnych liści *A. thaliana* wykazano, iż białka ROP2 i ROP6 aktywowane przez auksynę za pośrednictwem białka receptorowego ABP1 (ang. *Auxin Binding Protein1*) odgrywają kluczową rolę w ustalaniu geometrii tych komórek [96]. Aktywne białka ROP-GTP oddziałują poprzez białka RIC4 i RIC1 z filamentami F aktyny i mikrotubulami funkcjonującymi w formowaniu płatów i wcięć, za pośrednictwem których rosnące komórki epidermalne łączą się z sąsiednimi komórkami na wzór puzzli. Wzrost płatów odbywa się w miejscu zagęszczenia białek PIN1, w którym aktywne białka ROP2-GTP wpływają za pośrednictwem białka RIC4 na reorganizację filamentów aktynowych [96]. Powstawanie wcięć inicjowanych w miejscu reorganizacji mikrotubul regulowane jest przez białko RIC1 oddziałujące z ROP6-GTP. W obu przypadkach aktywacja białek ROP, polegająca na wymianie GDP na GTP, pozostaje w ścisłym związku z białkiem receptorowym ABP1 [79, 95]. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na pracę sprzed pięciu lat, w której wykazano, iż rozpuszczalne białko ABP1, lokalizowane głównie wewnątrz siateczki śródplazmatycznej, wiąże się także z białkiem CBP1 przymocowanym za pośrednictwem kotwicy glikozylofosfatydiloinozytolowej (GPI) do błony plazmatycznej [85]. Funkcjonalnych powiązań ABP1 z polarnym transportem auksyny dowodzą również wyniki dwóch innych prac opublikowanych w ostatnim czasie [26,75]. W pierwszej z nich, autorzy wykazali, iż w obserwowanym we wcześniejszych doświadczeniach hamowaniu przez auksyny endocytarnej internalizacji białek PIN uczestniczy również ABP1 [75]. Okazało się, iż w warunkach braku auksyny, ABP1 bierze udział w przyłączaniu do błony plazmatycznej białek klatrynowych, natomiast w obecności auksyny, rekrutacja klatryny ulega zahamowaniu, co w konsekwencji prowadzi do ograniczenia endocytarnej internalizacji białek PIN. Wyniki kolejnej pracy dotyczą doświadczeń prowadzonych na heterozygotycznych mutantach *abp1/ABP1*. Również wyniki tych badań potwierdzają udział ABP1 w regulacji bazypetalnego transportu auksyny w korzeniu, chociaż nie wyjaśniają mechanizmu działania tego receptora [26].

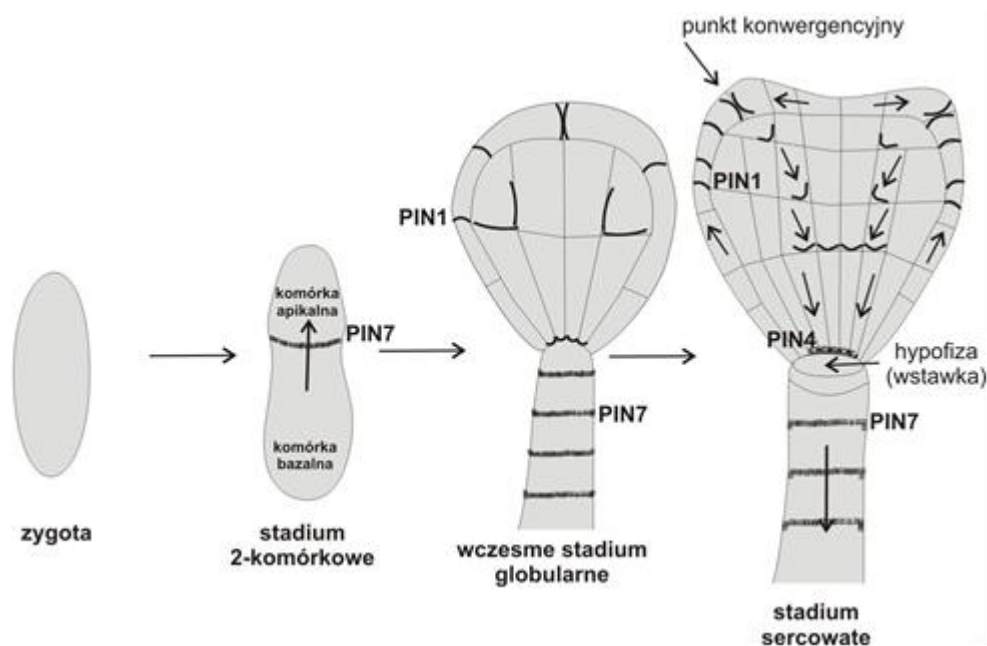
W konkluzji wyników dotychczasowych doświadczeń można założyć, iż białka ROP/RAC i ABP1 biorą udział w ustalaniu oraz ewentualnej zmianie polarności komórki, natomiast w zachowaniu określonej asymetrycznej lokalizacji transporterów wydają się funkcjonować pewne elementy ściany komórkowej. Dowodzą tego wspomniane już wyniki badań sprzed pięciu lat [9], jak również wyniki najnowszych doświadczeń [28]. Badania prowadzone na mutancie *repp3 A. thaliana* z niewłaściwą lokalizacją białka PIN1 ujawniły, iż mutant ma zmieniony gen *CESA3* kodujący jedną z trzech podjednostek syntazy celulozy [28]. Skądinąd wiadomo, że kompleks syntazy celulozy zbudowany jest z trzech podjednostek katalitycznych CESA1, CESA3 i CESA6, które razem z syntazą

sacharozy są powiązane z błoną plazmatyczną [14, 27]. Wykorzystując w doświadczeniach inhibitory syntezy celulozy (izoksaben, floroglucynol) oraz enzymy degradujące ściany komórkowe, a także izolując z komórek korzeni protoplasty, autorzy ujawnili, iż kluczową rolę w zachowaniu polarnej lokalizacji białek PIN odgrywa ściana komórkowa [28]. Plazmoliza komórek wywołana wyższym stężeniem mannitolu, podobnie jak enzymatyczne uszkodzenia ścian przez macerazę lub celulazę, wyraźnie dowodzą udziału w wiązaniu białek PIN pewnych składników ściany komórkowej [28]. Polarnie zlokalizowane w komórkach korzenia białka PIN1-GFP i PIN2-GFP, w izolowanych protoplastach zmieniają swoją lokalizację na apolarną, a w komórkach poddanych plazmolizie, oba białka (PIN1-GFP i PIN2-GFP) pozostają częściowo związane ze ścianą komórkową [28]. Pytanie, dlaczego takie oddziaływania występują tylko w apikalnej i bazalnej części komórki, a w innych regionach błony nie powodują unieruchamiania białek PIN, pozostaje na razie bez odpowiedzi. Szukając odpowiedzi na to pytanie, warto zauważyć, iż największe stężenie polarnie przemieszczającej się auksyny występuje wokół jądra komórkowego oraz w ścianie, w miejscu jej wypływu z komórki [83]. Wiadomo również, iż auksyny, podobnie jak gibereliny, brasinosteroidy oraz etylen, zmieniają strukturę ściany komórkowej [78], co może nasuwać przypuszczenie, iż w zachowaniu polarnej lokalizacji białek PIN może uczestniczyć sama auksyna bądź też w połączeniu z innymi fitohormonami.

## ROZWÓJ ZARODKA A ZMIANY LOKALIZACJI BIAŁEK PIN

W ustalaniu osi apikalno-bazalnej i osi radialnej (od zewnątrz-do wewnątrz) w dzielącej i rozwijającej się zygocie kluczową rolę odgrywa polarny transport auksyny, bowiem zapoczątkowuje rozwój rośliny zgodnie z określonym ogólnym wzorcem budowy [11, 16, 42, 58]. Niemal natychmiast po asymetrycznym podziale zygoty na dwie komórki potomne, w dolnej większej komórce dochodzi do ekspresji genu *PIN7*, którego produkt wbudowywany jest do błony plazmatycznej w części apikalnej komórki (ryc. 2). Również w komórkach wieszadełka, powstającego w wyniku poprzecznych podziałów dolnej komórki, białko PIN7 zlokalizowane jest apikalnie, kierując strumień auksyny do komórek przyszłego zarodka [31]. W prozarodku, powstającym w wyniku podziałów górnej mniejszej komórki, ekspresji ulega gen *PIN1*, którego produkt, aż do stadium 16-komórkowego, zlokalizowany jest w błonach apolarnie. W stadium wczesno-globularnym 32-komórkowego zarodka, białko PIN1 przemieszcza się na dolną stronę, kierując strumień auksyny do hypofizy (wstawki), a w stadium późno-globularnym, w komórkach protodermy, białko PIN1 wbudowywane jest do błony apikalnej, kierując w ten sposób auksynę do części szczytowej merystemu, zaś w komórkach wieszadełka białko PIN7 ulega transcytozie, zmieniając lokalizację

ze strony apikalnej na bazalną (ryc. 2). W stadium wczesno-sercowatym, w miejscach zbiegania się strumieni auksyny w protodermie określanych jako punkty konwergencyjne (ryc. 2), maksima stężenia fitohormonu wyznaczają miejsca inicjacji zawiązków liści. Stąd, dzięki bazalnie zlokalizowanym białkom PIN1, auksyna odprowadzana jest w dół, w kierunku hypofizy. Strumień auksyny kierowany w głąb zarodka stymuluje różnicowanie komórek prokambium dających przyszłe wiązki przewodzące (ryc. 2) [6]. Ekspresję genu *PIN3* obserwuje się dopiero w stadium sercowatym w komórkach położonych w dolnej części zarodka [31]. Białko PIN4 pojawia się w hypofizie oraz w komórkach potomnych w błonie położonej po dolnej stronie. Strumień auksyny kierowany do komórek hypofizy przez bazalnie zlokalizowane białka PIN1, PIN3 i PIN4 pozwala tutaj osiągnąć maksimum stężenia fitohormonu koniecznego do wykształcenia centralnej części merystemu korzeniowego i komórek czapeczki [11, 30].



RYCINA 2. Schematyczny obraz lokalizacji oraz subkomórkowej migracji białek PIN w rozwijającym się zarodku. W stadium wczesno-zarodkowym, białko PIN7, zlokalizowane po stronie apikalnej komórek wieszadełka, transportuje auksynę do komórek różnicujących się w proembrion. W tej fazie rozwoju zarodka, w komórkach tworzących część środkową prozarodka, białka PIN1 są zlokalizowane apolarnie. We wczesnej fazie globularnej, transportery PIN1 zmieniają lokalizację na polarną, migrując do błon położonych po bazalnej stronie komórek zarodka. W tym samym czasie w komórkach wieszadełka białka PIN7 ulegają transcytozie ze strony apikalnej na bazalną. W fazie późno-globularnej, w komórkach warstwy protodermalnej, transportery PIN1 wbudowywane są do błon po apikalnej stronie komórek, kierując w ten sposób strumień auksyny akropetalnie do miejsc, w których powstaną zawiązki liści (punkty konwergencyjne). W fazie zarodka trójkątnego i sercowatego, w komórkach, które będą się różnicować do wiązek

naczyniowych, białka PIN1 rozmieszczone są bazalnie, kierują w ten sposób strumień auksyny do komórek hypofizy. Białko PIN4 syntetyzowane jest w komórce wieszadełka sąsiadującej z prozarodkiem, gdzie jego bazalna lokalizacja wspomaga funkcjonowanie białek PIN1 i PIN3 (na podstawie [6, 11, 30, 31])

FIGURE 2. Schematic depiction of the localization and subcellular trafficking of PIN proteins during early plant embryo development. PIN7 proteins, localized at the apical sides of the suspensor cells, transport auxin towards the apical cell that forms the pro-embryo. At this stage, PIN1 proteins are localized at all inner cells sides without apparent polarity. At the early globular stage, PIN1 transporters start to be localized basally in the pro-embryonal cells, and PIN7 proteins are simultaneously shifted from apical to the basal plasma membrane of suspensor cells. At the late-globular stage, in the protodermal layer, PIN1 transporters becomes redistributed to direct auxin flux toward the emerging tops cells of incipient cotyledon primordium. In triangular and heart-stage embryo, PIN1 proteins localization is established in the prevascular cells, suggesting apical-to-basal auxin transport toward the region of the future root pole. PIN4 proteins are synthesized in uppermost suspensor cell supporting the action of both PIN1 and PIN3 proteins (based on [6, 11, 30, 31])

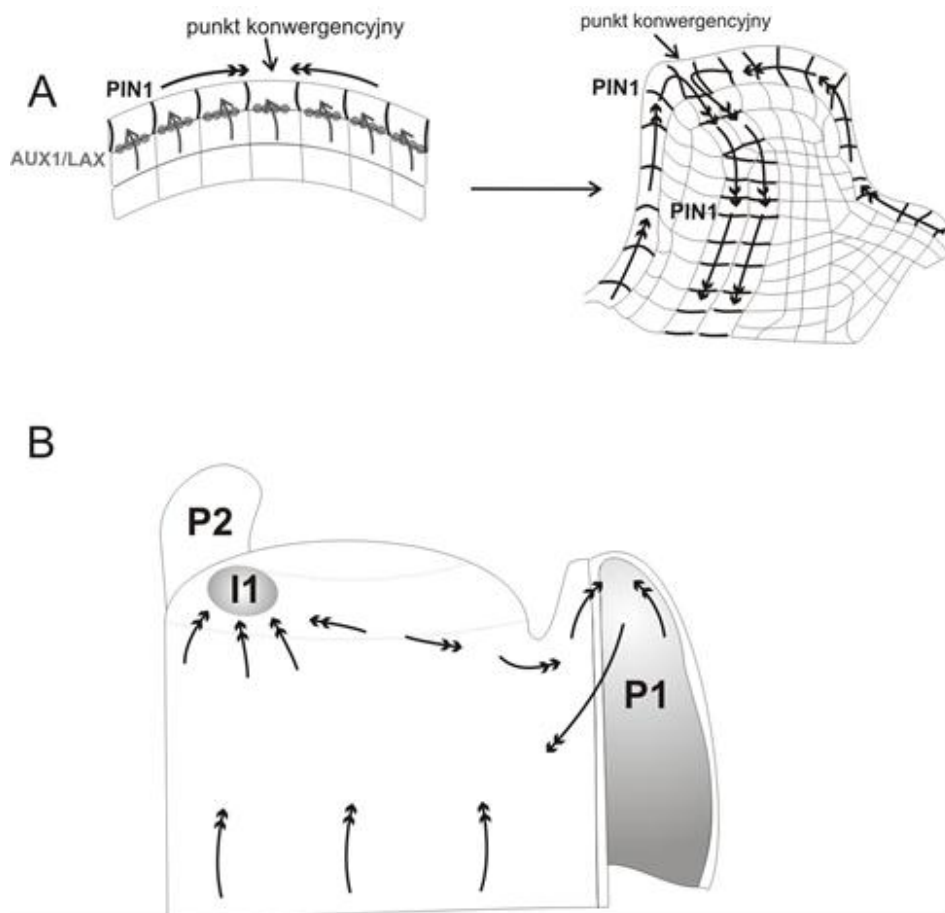
Dobrze udokumentowana lokalizacja i stosunkowo niezłe poznana dynamika relokacji poszczególnych białek PIN w trakcie rozwoju zarodka niewątpliwie zdecydowały o tym, iż w późniejszych poszukiwaniach mechanizmów regulacyjnych, zarodki były najczęściej wykorzystywanym materiałem badawczym. To dzięki tym badaniom potwierdzono udział małych białek G z rodziny ARF i RAB [22], jak również odpowiednich białek GEF i białek stymulujących hydrolizę GTP [12, 44] w relokacji białek PIN. W komórkach zarodka badano również udział białek klatrynowych, białka podobnego do dynaminy (DRP1A) [43, 60], długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [77] oraz kinazy PINOID [41, 45, 98] w transporcie białek PIN.

## **WYZNACZANIE WZORCA FILOTAKSYJNEGO POPRZEZ ZMIANY POLARNEJ LOKALIZACJI BIAŁKA PIN1 W KOMÓRKACH MERYSTEMU WIERZCHOŁKOWEGO PĘDU**

Przez wiele lat uważano, że miejsca inicjacji zawiązków liści bądź kwiatów w regionie bocznym merySTEMU wierzchołkowego pędu określa hipotetyczna substancja inhibitorowa, produkowana przez starsze zawiązki, która dyfundując wyznacza region, w obrębie którego powstawanie kolejnych zawiązków zostaje zahamowane. Koncepcja inhibitorowa, tłumacząca powstawanie określonego wzorca filotaksyjnego, opierała się na wynikach doświadczeń sprzed 60-ciu lat, w których z merySTEMU wierzchołkowego łubinu mechanicznie usuwano określone zawiązki liści [34]. Jednakże, z czasem okazało się, iż o miejscu inicjacji kolejnych zawiązków liści lub kwiatów decydują tworzone sekwencyjnie w komórkach epidermy „ogniska” podwyższonego stężenia auksyny [8, 50, 71, 72]. Lokalny wzrost stężenia auksyny aktywuje geny kodujące transportery auksyn, których polarna lokalizacja wzmacnia strumień auksyny pompowanej w kierunku centrum

„ogniska”. Warto w tym miejscu przypomnieć, iż już fenotyp mutantu *pin-formed1* rzodkiewnika z nagim szpilkowatym, nierozgałęzionym pędem, u którego po raz pierwszy zidentyfikowano gen *PIN1*, sugerował udział transporterów PIN1 w formowaniu zawiązków liści. W późniejszych badaniach rzeczywiście potwierdzono, iż ekspresja genu *PIN1* zachodzi w merystemie wierzchołkowym, a jego produkt zlokalizowany jest polarnie w komórkach warstwy epidermalnej (L1) oraz częściowo w warstwie podepidermalnej (L2) (ryc. 3A) [6, 73]. Innymi słowy, kierowany do wierzchołka merystemu akropetalny strumień auksyny, tworzony jest przez apikalnie zlokalizowane eksportery PIN1 oraz przez apolarnie rozmieszczone białka importujące auksynę AUX1/LAX (ryc. 3A). Udział tych ostatnich białek w generowaniu akropetalnego strumienia auksyny potwierdzają fenotypy poczwórnych mutantów *aux1/lax1/lax2/lax3* z zakłóconą lokalizacją białka PIN1 oraz zmienionym wzorcem filotaktyjnym liści [1].

W trakcie formowania zawiązka liścia, w komórkach, w których stężenie auksyny jest największe (punkt konwergencyjny), białko PIN1 zaczyna być wbudowywane do błony bazalnej, co umożliwia skierowanie strumienia auksyny w dół, do wewnątrz merystemu (ryc. 3A). W ten sposób strumień auksyny biorący początek w punkcie konwergencyjnym, wyznacza położenie przyszłej wiązki przewodzącej łączącej zawiązek liścia z wiązką przewodzącą pędu [6, 73]. Po osiągnięciu określonego stopnia rozwoju, zawiązek rozpoczyna samodzielną produkcję auksyny, co w efekcie prowadzi do zmiany lokalizacji białka PIN1 w komórkach warstwy epidermalnej L1. Relokacja PIN1 w komórkach położonych w bezpośrednim sąsiedztwie zawiązka powoduje przekierowanie strumienia auksyny w nowe „ognisko” dające początek kolejnemu zawiązkowi liścia [39, 40]. Strumień auksyny kierowany ze wszystkich stron do punktu konwergencyjnego, „osusza” z auksyny komórki położone w regionie przylegającym do „ogniska”, co w efekcie zapobiega inicjowaniu w tym regionie kolejnego zawiązka. Takie „wysysanie” auksyny z przylegających do „ogniska” regionów staje się możliwe dzięki bazalnie zorientowanym w punkcie konwergencyjnym eksporterom PIN1, odprowadzającym auksynę do wewnątrz merystemu. Tak więc, wzór filotaktyjny formujących się zawiązków liści wyznaczają generowane sekwencyjnie „ogniska” auksynowe, których położenie określają zmieniające swoją lokalizację białka PIN1. Słuszność powyższej konkluzji potwierdzono również w symulacjach komputerowych opartych na wynikach doświadczeń, w których wykazano, iż zarówno ekspresja genów *PIN*, jak również hamowanie endocytarnej internalizacji ich produktów, regulowane są przez zmieniające się stężenie auksyny [15].



RYCINA 3. Model regulowanej przez auksynę filotaksji zawiązków liści w merystemie wierzchołkowym pędu. (A) Miejsce inicjacji liścia w bocznej strefie merystemu wierzchołkowego wyznacza „ognisko” komórek z wyraźnie wyższym stężeniem auksyny. W transporcie auksyny do centrum „ogniska” uczestniczą importery AUX/LAX, rozmieszczone apolarnie w błonach komórek epidermy, oraz eksportery PIN1 polarnie zorientowane w kierunku centrum przyszłego zawiązka (punkt konwergencyjny). Formujący się zawiązek liścia, z bazalnie rozmieszczonymi białkami PIN1, funkcjonuje jako zlewnia, kierując auksynę z części powierzchniowej do wewnątrz merystemu. Strzałkami zaznaczono kierunek fali auksynowej tworzonej przez polarnie zorientowane w warstwie epidermalnej białka PIN1; (B) Bazypetalna polaryzacja białek PIN1, wewnątrz tworzącego się zawiązka (P1), pozwala odprowadzić auksynę do głębszych warstw merystemu. Przemieszczający się strumień auksyny „osusza” z auksyny komórki położone w bezpośrednim sąsiedztwie, co umożliwia powstanie kolejnego „ogniska” auksynowego (I1) w odpowiedniej odległości od zawiązka już istniejącego (P1) (na podstawie [1, 6, 15, 40, 71, 73])

FIGURE 3. Model of the regulation of leaf phyllotaxis by polar auxin transport in the shoot apical meristem. (A) Leaf initiation in the peripheral zone of the meristem involves accumulation of the

auxin. Auxin is transported in a polar way by influx (AUX1/LAX) and efflux (PIN1) carriers. AUX1 proteins are distributed in the cell membranes of epidermal cells, whereas PIN1 transporters are oriented toward a single central cell of the primordium (convergence point). Primordium acts as auxin sink because PIN1 proteins oriented downward, evacuate auxin from the meristem surface to deeper tissues; Arrows show PIN1 proteins orientation directs auxin fluxes in epidermal cells, leading to accumulation of auxin at the initial side. (B) Basipetal PIN1 polarization inside primordium (P1) drains auxin into inner layers, depleting the neighboring cells. As a consequence, another auxin maximum is created in the peripheral zone (I1) (based on [1, 6, 15, 40, 71, 73])

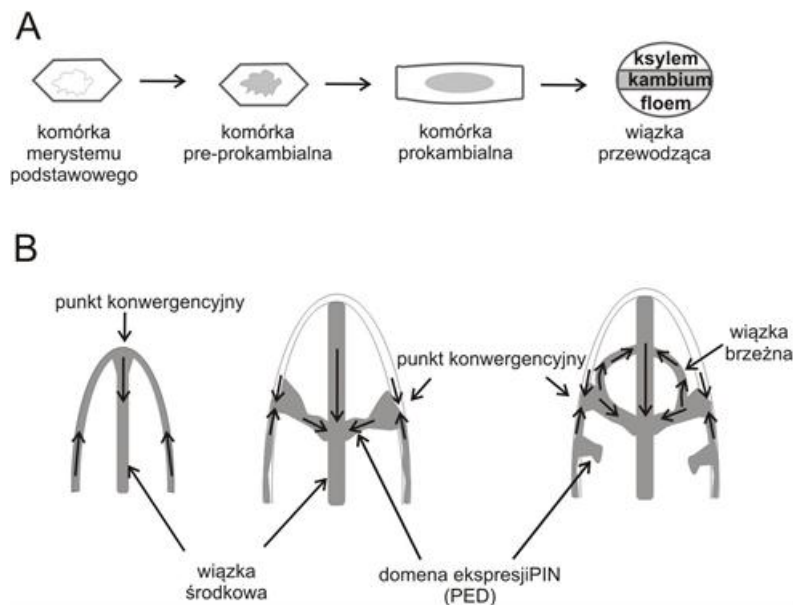
## RELOKACJA BIAŁKA PIN1 W RÓŻNICOWANIU ORAZ USTALANIU WZORCA WIĄZEK PRZEWODZĄCYCH

Badania prowadzone na kulturach komórkowych cynii oraz mutantach rzodkiewnika wykazały, iż w różnicowaniu komórek prokambialnych do wiązek przewodzących funkcjonują auksyny, cytokininy, brasinosteroidy i ksylogen [33], lecz tylko auksyny, oprócz udziału w różnicowaniu komórek, odgrywają kluczową rolę w ustalaniu określonego wzorca wiązek naczyniowych. Mechanizm selekcji komórek podlegających różnicowaniu próbują tłumaczyć dwie różne hipotezy: hipoteza kanalizowania przepływu auksyny Sachs'a oraz koncepcja dyfuzyjno-reakcyjna zaproponowana przez Meinhardt'a [18, 76, 80, 81]. Hipoteza kanalizowania przepływu auksyny, w pierwotnej wersji bazowała na wynikach doświadczeń, w których wykazano, iż aplikacja auksyny na tkankę indukuje powstanie nowej wiązki, łączącej miejsce aplikacji z istniejącą już wiązką. Formowanie nowej wiązki zależy od transportu auksyny, gdyż inhibitory hamujące transport przeciwdziałają jej różnicowaniu. Tak więc, transport auksyny od jej źródła do zlewni ulega stopniowemu kanalizowaniu, zawężając pole przepływu do sznura (kanału) w pełni spolaryzowanych komórek. Kluczową rolę w kanalizowaniu transportu auksyny odgrywa pętla pozytywnego sprzężenia, w której rosnące stężenie auksyny aktywuje ekspresję eksporterów auksyny oraz wpływa na ich polarną lokalizację. Warto w tym miejscu zauważyć, iż różnicowanie wiązki zachodzi zgodnie z kierunkiem strumienia auksyny (ang. *with-the-flux*), inaczej niż w przypadku filotaksji, gdzie transport auksyny w komórkach epidermalnych merystemu wierzchołkowego skierowany jest do miejsc, gdzie stężenie auksyny jest wyższe (ang. *up-the-gradient*) [3].

W konkluzji, można zatem stwierdzić, iż podstawowe założenia hipotezy Sachs'a z początku lat 80-tych ubiegłego wieku, niemal w całości zostały eksperymentalnie zweryfikowane dzięki badaniom białek transportujących auksyny. Na podstawie dotychczasowych badań można wysnuć wniosek, iż zarówno w różnicowaniu, jak również w ustalaniu wzorca naczyniowego liści kluczową rolę odgrywają transportery PIN1 [82, 93]. W doświadczeniach prowadzonych na rozwijających się liściach *A. thaliana* wykazano, iż w komórkach epidermalnych strefy bocznej merystemu wierzchołkowego, białka



PIN1 wbudowywane są do błon zwróconych w kierunku inicjacji zawiązka liścia (punkt konwergencyjny) (ryc. 4B.). Rosnące stężenie auksyny w apikalnej części zawiązka liścia kieruje białka PIN1 do błon po stronie bazalnej, umożliwiając w ten sposób odprowadzanie auksyny do komórek warstw subepidermalnych. Wytworzony strumień auksyny aktywuje różnicowanie komórek merystemu podstawowego do komórek pre-prokambialnych, które dalej różnicują do komórek kambialnych dających początek komórkom pierwotnego ksylemu i floemu, tworzącym środkową wiązkę naczyniową liścia (ryc. 4A i ryc. 4B). Różnicowanie bocznych, pierwszo- drugo- i trzeciorzędowych wiązek naczyniowych, rozpoczyna się od punktów konwergencyjnych zlokalizowanych w komórkach epidermalnych w brzeżnej części rozwijającego się liścia (Ryc. 4B). Zbiegające się w punktach konwergencyjnych dwa strumienie auksyny (akropetalny i basalny) odprowadzane są częściowo już polarnie w warstwie komórek subepidermalnych w kierunku wiązki środkowej liścia (ryc. 4B). Rosnące stężenie auksyny, inicjujące ekspresję genu *PINI*, wyznacza tzw. domenę ekspresji *PINI* (PED), w której zachodzi różnicowanie komórek merystemu podstawowego do komórek pre-prokambialnych. Białko PIN1 w komórkach pre-prokambialnych zlokalizowane jest częściowo w cytoplazmie, a częściowo apolarnie w błonie plazmatycznej, ale w zwężającym się obszarze PED (kanalizacja przepływu), transportery PIN1 rozmieszczone są już polarnie. Zwężająca się do „kanału” domena prokambialna pokrywa się z miejscem formowania komórek kambium dających początek komórkom ksylemu i floemu. Wiązki brzeżne oraz pętle łączące wiązki boczne powstają dzięki temu, iż niektóre komórki funkcjonują jako komórki bipolarne, z białkami PIN1 rozmieszczonymi w dwóch odrębnych regionach błony [82].



RYCINA 4. Różnicowanie wiązek naczyniowych w liściu. (A) Różnicowanie komórek merystemu podstawowego do komórek pre-prokambialnych, a dalej komórek prokambialnych i kambialnych dających komórki pierwotnego ksylemu i floemu (B) Wzrastające w punktach konwergencyjnych stężenie auksyny aktywuje w komórkach podepidermalnych ekspresję *PIN1* umożliwiając tym samym przemieszczanie auksyny w kierunku środkowej wiązki naczyniowej. Obszar ekspresji *PIN1* określany jest jako PED (ang. *PIN1 Expression Domain*). Szlaki transportu auksyny, wyznaczone przez białko *PIN1*, odpowiadają miejscom różnicowania komórek pre-prokambialnych (pokazane szarymi liniami). Czarnymi strzałkami pokazano kierunek transportu auksyny (na podstawie [80, 81, 82, 93])

FIGURE 4. Leaf vascular strands formation. (A) The transition from ground meristem to pre-procambial, and procambial cells that differentiate into vascular strands. Within the vascular vein, primary xylem and phloem differentiate from the procambium; (B) From *PIN1* convergence points, auxin is transported in internal tissue, where it gradually induces formation of a vascular strand. Domains of *PIN1* protein expression within the blade prefigure vein formation. *PIN1*-labeled auxin transport paths, corresponding to pre-procambial cells, are indicated as grey lines. Black arrows indicate the direction of auxin transport based on subcellular localization of *PIN1* transporters (based on [80, 81, 82, 93])

## ZMIANA LOKALIZACJI TRANSPORTERÓW *PIN1* W AKTYWACJI PĄKÓW SPOCZYNKOWYCH

W rozwoju poembrionalnym roślin, oprócz merystemów wierzchołkowych pędu i korzenia, funkcjonują jeszcze merystemy boczne pędu dające początek liściom, w których pachwinach powstają pozostające w stanie spoczynku pąki boczne. Pąki spoczynkowe nie rosną, ale są miejscem aktywnego metabolizmu i w odpowiednich warunkach mogą być aktywowane, dając boczne odgałęzienia pędu. Od ponad 75 lat, aktywację pąków bocznych zaczęto wiązać z transportem z części wierzchołkowej pędu nieznannej substancji, która w transporcie bazypetalnym miałaby hamować aktywność pąków bocznych [23,53]. Z czasem okazało się, że tą hipotetyczną substancją jest auksyna, której źródłem w części wierzchołkowej rośliny są młode pąki i liście. Mechanicznemu usunięciu wierzchołka rośliny towarzyszy zwykle aktywacja pąków spoczynkowych, której przeciwdziała auksyna naniesiona w miejscu odcięcia wierzchołka. Hamowanie rozwoju pąków bocznych przez bazypetalny strumień auksyny w pędzie nie jest, jak się okazało, efektem transportu auksyny do wnętrza pąków spoczynkowych, gdyż w przeprowadzonych doświadczeniach wykluczono możliwość transportu auksyny z pędu do pąków spoczynkowych [84]. Podejmowane w ostatnich latach próby wyjaśnienia molekularnych podstaw dominacji wierzchołkowej oraz ustalenia faktycznej roli auksyny w tym procesie doprowadziły do sformułowania dwóch odrębnych koncepcji. Według pierwszej hipotezy, hamowanie wzrostu pąków bocznych przez bazypetalny strumień auksyny w pędzie wiąże się z zablokowaniem odprowadzania auksyny z pąków przez intensywny strumień fitohormonu w pędzie. Druga koncepcja wiąże bazypetalny strumień auksyny w pędzie z regulacją syntezy substancji sygnałowych, które w transporcie

akropetalnym, po wnikięciu do pąków bocznych, miałyby hamować bądź aktywować ich wzrost [23, 62, 84].

Śledząc postępy badań związanych z dominacją wierzchołkową, zwłaszcza wyniki doświadczeń z ostatnich lat, można odnieść wrażenie, że obydwie koncepcje zyskują pozytywną weryfikację. Z jednej strony okazało się, iż zakłócenie głównego strumienia auksyny w pędzie skutkuje aktywacją ekspresji *PIN1* w komórkach prokambialnych pąków bocznych. Synteza oraz odpowiednia wewnątrzkomórkowa organizacja transportera *PIN1* umożliwia uruchomienie transportu auksyny z pąka do pędu, co ostatecznie prowadzi do aktywacji pąka bocznego [2, 69, 84]. W doświadczeniach prowadzonych na nienaruszonej siewce grochu wykazano, iż izotopowo znakowana auksyna naniesiona na pąk boczny nie migruje w kierunku pędu. Jednakże w roślinie z zahamowanym w wyniku odcięcia wierzchołka pędu transportem bazypetalnym, dzięki odpowiedniej relokacji białka *PIN1*, następuje uruchomienie transportu auksyny z pąka bocznego. Ponadto szczegółowe analizy wykazały, iż w komórkach prokambium nieaktywnego pąka, białko *PIN1*-GFP zorientowane jest apolarnie. Jednakże już po około 6 godzinach od usunięcia części wierzchołkowej rośliny, *PIN1*-GFP zmienia lokalizację na częściowo polarną, by po nieco dłuższym czasie zainicjować różnicowanie komórek prokambium w wiązkę przewodzącą łączącą zaktywowany pąk z wiązką przewodzącą pędu [2]. Co równie ciekawe, polaryzacji białka *PIN1*-GFP przeciwdziała aplikacja auksyny w miejscu odcięcia wierzchołka rośliny. Wraz z usunięciem części wierzchołkowej rośliny, w pędzie następuje niemal natychmiastowe zahamowanie ekspresji genów *PIN1* i *AUX1* – szybsze w odcinku położonym powyżej pąka bocznego. Jednakże już po około 6 godzinach, hamowanie ekspresji obu genów w części poniżej pąka bocznego powoli zanika, by ostatecznie po uruchomieniu transportu auksyny z aktywowanego pąka bocznego powrócić do wyjściowego poziomu [2].

Równoległe do badań koncentrujących uwagę na transporcie auksyny, od kilku lat prowadzone są również prace, w których wykorzystywane są mutanty z zakłóconą regulacją aktywacji pąków bocznych [25, 70]. Dotychczas udało się wyselekcjonować cztery różne mutanty *max* (ang. *more axillary growth*) *A. thaliana*, trzy mutanty *rms* (ang. *ramosus*) grochu, cztery mutanty *d* (ang. *dwarf*) lub *htd* (ang. *high tillering dwarf*) ryżu i jednego mutantu *dad* (ang. *decreased apical dominance*) petunii [70]. Wraz z postępem badań okazało się, iż wszystkie poznane mutanty mają zmienione geny kodujące enzymy szlaku biosyntezy strigolaktonów bądź białka funkcjonujące w percepcji tych związków. Strigolaktyny, zidentyfikowane pierwotnie w eksudatach korzeniowych różnych roślin jako substancje stymulujące kiełkowanie nasion roślin pasożytniczych z gatunku *Striga* i *Orobanche*, obecnie wiązane są również z aktywacją rozgałęziania rosnących strzępeków grzybów mikoryzowych [25, 70]. Niezależnie od tego, wielu badaczy uważa obecnie, iż strigolaktyny stanowią nową rodzinę roślinnych hormonów, o czym m.in. mają świadczyć trzy poznane mutanty (*max2*, *rms4* i *d3*) z defektami w genach kodujących białka z kasetą F [70]. Skądinąd

wiadomo, że odpowiednie białka z kasetą F są receptorami auksyn i jasmonianów, a inne współdziałają z kompleksem receptorowym funkcjonującym w percepcji giberelin.

Zmiany fenotypowe towarzyszące wszystkim poznanym mutacjom sugerowały, iż strigolaktyny są substancjami, które bezpośrednio hamują aktywację pąków bocznych. Jednakże wyniki niektórych doświadczeń wskazywały, że obserwowane zmiany mogą mieć także związek z auksynami, gdyż okazało się, iż w pędzie mutantów *max* rzodkiewnika i *d27* ryżu bazypetalny transport auksyny przebiega zdecydowanie sprawniej niż w roślinach linii dzikich [7, 55]. Ponadto, w pędzie mutantów *max* stwierdzono wyraźnie wyższą ekspresję genów *PIN1*, *3*, *4* i *6* oraz genów *AUX1* i *LAX1* [7, 51]. W nowszych badaniach, wykorzystujących m.in. syntetyczny strigolakton GR24, potwierdzono hamujący wpływ strigolaktonów na aktywację pąków bocznych [35, 92], a w najnowszych doświadczeniach wykazano, iż GR24 hamuje bazypetalny transport auksyny na skutek obniżenia poziomu białka PIN1 w błonach komórek parenchymatycznych ksylemu [13]. Hamowanie przez GR24 akumulacji w błonach białek PIN1, skutkujące obniżeniem bazypetalnego transportu auksyny, wymaga sprawnego układu percepcji strigolaktonów. Świadczą o tym wyniki doświadczeń, w których wykazano, że obserwowane zmiany występują u mutantu *max1*, lecz nie u mutantu *max2* z defektem w genie kodującym białko biorące przypuszczalnie udział w percepcji sygnału strigolaktonowego [13].

Obecnie przypuszcza się, że biosynteza strigolaktonów zachodzi głównie w korzeniu, skąd aktywne formy tego fitohormonu są transportowane ksylemem w górę pędu [35, 92]. Okazało się, że w roślinach jedno- i dwuliściennych auksyna aktywuje ekspresję genów *MAX3* i *MAX4*, co z kolei sugeruje, że oba hormony poprzez pętlę sprzężenia zwrotnego oddziałują na siebie tworząc skoordynowany układ regulacyjny [29, 37]. Wydaje się, iż w układzie tym funkcjonują również cytokininy, bowiem dowiedziono, iż auksyna transportowana w pędzie, reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę oraz degradację cytokinin, które z kolei po wnikięciu do pąków bocznych, wpływają aktywnie na ich wzrost i rozwój [62, 84].

## UKIERUNKOWANA RELOKACJA BIAŁEK PIN W INICJOWANIU KORZENI BOCZNYCH

U większości roślin, korzenie boczne rozwijają się z komórek założycielskich pochodzących z merystemu wierzchołkowego korzenia zlokalizowanych w perycyklu w sąsiedztwie ksylemu [5, 32, 67]. Dwie komórki założycielskie dzielą się antyklinalnie dając dwie mniejsze i dwie większe komórki. W powstałych w wyniku podziału mniejszych komórkach obserwuje się wyraźny wzrost stężenia auksyny, pochodzącej przypuszczalnie z bazalnego regionu merystemu wierzchołkowego korzenia, do którego auksyna dociera przy udziale

importerów AUX1 z części wierzchołkowej merystemu [17]. Wyniki innych analiz sugerują, że rosnące stężenia auksyny w komórkach założycielskich pozostaje w związku z aktywacją jednego ze szlaków biosyntezy IAA [24]. Co ciekawe, stężenie auksyny w komórkach założycielskich oscyluje z regularnym, około 15 godzinnym czasowym interwałem, pokrywającym się z interwałem różnicowania komórek założycielskich [17]. W błonach mniejszych komórek założycielskich białko PIN1 wbudowywane jest do błon antyklinalnych, jednakże w komórkach dzielących się peryklinalnie z komórek założycielskich dających kolejne warstwy komórek zawiązka korzenia, transporter PIN1 jest już na ogół zorientowany od strony formującego się zawiązka [6]. Do tych samych błon położonych od strony wierzchołka rosnącego zawiązka, wbudowywane są również białka PIN3, PIN4 i PIN6, współdziałające w generowaniu strumienia auksyny skierowanego do merystemu wierzchołkowego korzenia bocznego [6]. W komórkach epidermy rosnącego zawiązka, ekspresji ulega gen *PIN2*, którego produkt wbudowywany jest do błony po stronie bazalnej (od strony korzenia głównego). Taka lokalizacja *PIN2* pozwala zawrócić strumień auksyny z merystemu wierzchołkowego z powrotem do podstawy korzenia bocznego [6]. Wzrost korzenia bocznego pociąga konieczność przeniknięcia zawiązka przez warstwę endodermy, kory i epidermy korzenia głównego. Wymaga to odpowiedniej przebudowy ścian komórkowych, w której uczestniczą enzymy modyfikujące składniki ścian, kodowane przez geny aktywowane przez rosnące stężenie auksyny. Eksperymentalnie potwierdzono, iż w komórkach położonych naprzeciw rosnącego zawiązka korzenia bocznego, ekspresji ulega *LAX3* (homolog *AUX1*), którego produkt importuje auksynę do komórek, w których ściany muszą ulec odpowiednim modyfikacjom [89].

## LITERATURA

- [1] 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.
- [2] BALLA J, KALOUSEK P, REINÖHL V, FRIML J, PROCHÁZKA S. Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *Plant J* 2011; **65**: 571-577.
- [3] BAYER EM, SMITH RS, MANDEL T, NAKAYAMA N, SAUER M, PRUSINKIEWICZ P, KUHLEMEIER C. Integration of transport-based models for phyllotaxis and midvein formation. *Genes Dev* 2009; **23**: 373-384.
- [4] BENJAMINS R, GALVÁN AMPUDIA CS, HOOYKAAS PJJ, OFFRINGA R. PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1623-1630.
- [5] BENKOVÁ E, BIELACH A. Lateral root organogenesis – from cell to organ. *Curr Opin Plant Biol* 2010; **13**: 677-683.
- [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 T, SIEBERER T, WILLETT B, BOOKER J, LUSCHNIG C, LEYSER O. The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol* 2006; **16**: 553-563.
- [8] BOHN-COURSEAU I. Auxin: a major regulator of organogenesis. *C R Biologies* 2010; **333**: 290-296.

- [9] 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* 2006; **119**: 1255-1265.
- [10] BOUTTÉ Y, GREBE M. Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2009; **12**: 1-9.
- [11] BOWMAN JL, FLOYD SK. Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 67-88.
- [12] CHEN M, LIU H, KONG J, YANG Y, ZHANG N, LI R, YUE J, HUANG J, LI C, CHEUNG AY, TAO L-Z. *RopGEF7* regulates PLETHORA-dependent maintenance of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2011; in press
- [13] CRAWFORD S, SHINOHARA N, SIEBERER T, WILLIAMSON L, GEORGE G, HEPWORTH J, MÜLLER D, DOMAGALSKA MA, LEYSER O. Strigolactone enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* 2010; **137**: 2905-2913.
- [14] CROWELL EF, GONNEAU M, STIERHOF Y-D, HÖFTE H, VERNHETTES S. Regulated trafficking of cellulose synthases. *Curr Opin Plant Biol* 2010; **13**: 700-705.
- [15] DE REUILLE PB, BOHN-COURSEAU I, LJUNG K, MORIN H, CARRARO N, GODIN C, TRAAS J. Computer simulations reveal properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 1627-1632.
- [16] DE SMET I, LAU S, MAYER U, JÜRGENS G. Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. *Plant J* 2010; **61**: 959-970.
- [17] DE SMET I, TETSUMURA T, DE RYBEL B, FREI DIT FREY N, LAPLAZE L, CASIMIRO I, SWARUP R, NAUDTS M, VANNESTE S, AUDENAERT D, INZÉ D, BENNETT MJ, BEECKMAN T. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 2007; **134**: 681-690.
- [18] DETTMER J, ELO A, HELARIUTTA Y. Hormone interactions, during vascular development. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 347-360.
- [19] 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.
- [20] DHONUKSHE P, GRIGORIEV I, FISCHER R, TOMINAGA M, ROBINSON DG, HAŠEK J, PACIOREK T, PETRÁŠEK J, SEIFERTOVÁ D, TEJOS R, MEISEL LA, ZAŽIMALOVÁ 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.
- [21] DHONUKSHE P, HUANG F, GALVÁN- AMPUDIA CS, MÄHÖNEN AP, KLEINE-VEHN J, XU J, QUINT A, PRASAD K, FRIML J, SCHERES B, OFFRINGA R. Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS (N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development* 2010; **137**: 3245-3255.
- [22] DHONUKSHE P, TANAKA H, GOH 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] DOMAGALSKA MA, LEYSER O. Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2011; **12**: 211-221.
- [24] DUBROVSKY JG, SAUER M, NAPSUCIALY-MEDIVIL S, IVANCHANKO MG, FRIML J, SHISHKOVA S, CELENZA J, BENKOVÁ E. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 8790-8794.
- [25] DUN EA, BREWER P, BEVERIDGE CA. Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends Plant Sci* 2009; **14**: 364-372.
- [26] EFFENDI Y, RIETZ S, FISCHER U, SCHERER GFE. The heterozygous *abp1/ABP1* insertional mutant has defects in functions requiring polar auxin transport and in regulation of early auxin-regulated genes. *Plant J* 2011; **65**: 282-294.
- [27] ENDLER A, PERSSON S. Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 2011; **4**: 199-211.

- [28] FERARU E, FERARU MI, KLEINE-VEHN J, MARTINIÈRE A, MOUILLE G, VANNESTE S, VERNHETTES S, RUNIONS J, FRIML J. PIN polarity maintenance by the cell wall in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2011; **21**: 338-343.
- [29] FOO E, BULLIER E, GOUSSOT M, FOUCHER F, RAMEAU C, BEVERIDGE CA. The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* 2005; **17**: 464-474.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] FUKAKI H, TASAKA M. Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 437-449.
- [33] FUKUDA H. Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 379-391.
- [34] GOLZ JF. Signalling between the shoot apical meristem and developing lateral organs. *Plant Mol Biol* 2006; **60**: 889-903.
- [35] GOMEZ-ROLDAN V, FERMAS S, BREWER PB, PUECH-PAGÉS V, DUN EA, PILLOT J-P, LETISSE F, MATUSOVA R, DANOUN S, PORTAIS J-C, BOUWMEESTER H, BÉCARD G, BEVERIDGE CA, RAMEAU C, ROCHANGE SF. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 2008; **455**: 189-194.
- [36] GRUNEWALD W, FRIML J. The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J* 2010; **29**: 2700-2714.
- [37] HAYWARD A, STIRNBERG P, BEVERIDGE C, LEYSER O. Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol* 2009; **151**: 400-412.
- [38] HAZAK O, BLOCH D, PORATY L, STERNBERG H, ZHANG J, FRIML J, YALOVSKY S. A Rho scaffold integrates the secretory system with feedback mechanisms in regulation of auxin distribution. *PLOS Biol* 2010; **8**: 1-16.
- [39] HEISLER MG, HAMANT O, KRUPINSKI P, UYTTEWAAL M, OHNO C, JÖNSSON H, TRAAS J, MEYEROWITZ EM. Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLoS Biol* 2010; **8**: 1-12.
- [40] 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.
- [41] HUANG F, ZAGO MK, ABAS L, VAN MARION A, GALVÁN AMPUDIA CS, OFFRINGA R. Phosphorylation of conserved PIN motifs directs *Arabidopsis* PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell* 2010; **22**: 1118-1128.
- [42] JENIK PD, GILLMOR CS, LUKOWITZ W. Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**: 207-236.
- [43] KITAKURA S, VANNESTE S, ROBERT S, LÖFKE C, TEICHMANN T, TANAKA H, FRIML J. Clatrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2011; **23**: 1920-1931.
- [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, HUANG F, NARAMOTO S, ZHANG J, MICHNIEWICZ M, OFFRINGA R, FRIML J. PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009; **21**: 3839-3849.
- [46] KLEINE-VEHN J, LANGOWSKI Ł, WIŚNIEWSKA J, DHONUKSHE P, BREWER PB, FRIML J. Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants. *Mol Plant* 2008; **1**: 1056-1066.
- [47] KOWALCZYK S, HETMANN A, CZARNOTA M. Małe, monomeryczne białka G roślin. *Post Biochem* 2011; **57**: 442-453.

- [48] KOWALCZYK S, STARZYŃSKA E. Ukierunkowana relokalizacja białek transportujących auksyny a odpowiedzi tropowe roślin. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 723-744.
- [49] KŘEČEK P, SKŮPA P, LIBUS J, NARAMOTO S, TEJOS R, FRIML J, ZAŽÍMALOVÁ E. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Gen Biol* 2009; **10**: 249-249.11.
- [50] KUHLEMEIER C. Phyllotaxis. *Trends Plant Sci* 2007; **12**: 143-150.
- [51] LAZAR G, GOODMAN HM. *MAX1*, a regulator of the flavonoid pathway, control vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 472-476.
- [52] LEE OR, KIM SJ, KIM HJ, HONG JK, RYU SB, LEE SH, GANGULY A, CHO H-T. Phospholipase A<sub>2</sub> is required for PIN-FORMED protein trafficking to the plasma membrane in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 2010; **22**: 1812-1825.
- [53] LEYSER O. Auxin, self-organisation, and the colonial nature of plants. *Curr Biol* 2011; **21**: R331-R337.
- [54] LI G, XUE H-W. *Arabidopsis* PLD $\zeta$ 2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *Plant Cell* 2007; **19**: 281-295.
- [55] LIN H, WANG R, QIAN Q, YAN M, MENG X, FU Z, YAN C, JIANG B, SU Z, LI J, WANG Y. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* 2009; **21**: 1512-1525.
- [56] MANCUSO S, MARRAS AM, MUGNAI S, SCHLICHT M, ŽÁRSKY V, LI G, SONG L, XUE H-W, BALUŠKA F. Phospholipase D $\zeta$ 2 drives vesicular secretion of auxin for its polar cell-cell transport in the transition zone of the root apex. *Plant Signal Behav* 2007; **2**: 240-244.
- [57] MARKHAM JE, MOLINO D, GISSOT L, BELLEC Y, HÉMATY K, MARION J, BELCRAM K, PALAUQUI J-C, SATIAT-JEUNEMAÎTRE B, FAURE J-D. Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2011; **23**: 2362-2378.
- [58] MÖLLER B, WEIJERS D. Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**: 1-13.
- [59] MONGRAND S, STANISLAS T, BAYER EMF, LHERMINIER J, SIMON-PLAS F. Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci* 2010; **15**: 656-663.
- [60] MRAVEC J, PETRÁŠEK J, LI N, BOEREN S, KARLOVA R, KITAKURA S, PAŘEZOVÁ M, NARAMOTO S, NODZYŃSKI T, DHONUKSHE P, BEDNAREK SY, ZAŽÍMALOVÁ E, DE VRIES S, FRIML J. Cell plate restricted association of DRP1A and PIN proteins is required for cell polarity establishment in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2011; **21**: 1055-1060.
- [61] MRAVEC J, SKŮPA P, BAILLY A, HOYEROVÁ K, KŘEČEK P, BIELACH A, PETRÁŠEK J, ZHANG J, GAYKOVA V, STIERHOF Y-D, DOBREV PI, SCHAWARZEROVÁ K, ROLČIK J, SEIFERTOVÁ D, LUSCHNIG C, BENKOVÁ E, ZAŽÍMALOVÁ E, GEISLER M, FRIML J. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* 2009; **459**: 1136-1140.
- [62] MÜLLER D, LEYSER O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann Bot* 2011; **107**: 1203-1212.
- [63] NICK P, HAN M-J, AN G. Auxin stimulates its own transport by shaping actin filaments. *Plant Physiol* 2009; **151**: 155-167.
- [64] OSTROWSKI M, JAKUBOWSKA A. Receptory auksyn. *Post Biol Kom* 2008; **35**: 79-95.
- [65] PAYNE RJH, GRIERSON CS. A theoretical model for ROP localization by auxin in *Arabidopsis* root hair cells. *PLoS One* 2009; **4**: 1-8.
- [66] PEER WA, BLAKESLEE JJ, YANG H, MURPHY AS. Seven things we think we know about auxin transport. *Mol Plant* 2011; **4**: 1-18.
- [67] PÉRET B, DE RYBEL B, CASIMIRO I, BENKOVÁ E, SWARUP R, LAPLAZE L, BEECKMAN T, BENNETT MJ. *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 2009; **14**: 399-408.
- [68] PETRÁŠEK J, FRIML J. Auxin transport routes in plant development. *Development* 2009; **136**: 2675-2688.
- [69] PRUSINKIEWICZ P, CRAWFORD S, SMITH RS, LJUNG K, BENNETT T, ONGARO V, LEYSER O. Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 17431-17436.



- [70] RAMEAU C. Strigonolactones, a novel class of plant hormone controlling shoot branching. *C R Biologies* 2010; **333**: 344-349.
- [71] REINHARDT D. Phyllotaxis – a new chapter in an old tale about beauty and magic numbers. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 487-493.
- [72] REINHARDT D, MANDEL T, KUHLEMEIER C. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 2000; **12**: 507-518.
- [73] 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.
- [74] RICHTER S, GELDNER N, SCHRADER J, WOLTERS H, STIERHOFY 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.
- [75] ROBERT S, KLEINE-VEHN J, BARBEZ E, SAUER M, PACIOREK T, BASTER P, VANNESTE S, ZHANG J, SIMON S, ČOVANOVÁ M, HAYASHI K, DHONUKSHE P, YANG Z, BEDNAREK SY, JONES AM, LUSCHNIG C, ANIENTO F, ZAŽÍMALOVÁ E, FRIML J. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 2010; **143**: 111-121.
- [76] ROLLAND-LAGAN A-G. Vein patterning in growing leaves: axes and polarities. *Curr Opin Genet Develop* 2008; **18**: 348-353.
- [77] ROUDIER F, GISSOT L, BEAUDOIN F, HASLAM R, MICHAELSON L, MARION J, MOLINO D, LIMA A, BACH L, MORIN H, TELLIER F, PALAUQUI J-C, BELLEC Y, RENNE C, MIQUEL M, DACOSTA M, VIGNARD J, ROCHAT C, MARKHAM JE, MOREAU P, NAPIER J, FAURE J-D. Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2010; **22**: 364-375.
- [78] SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ C, RUBIO-SOMOZA I, SIBOUT R, PERSSON S. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends Plant Sci* 2010; **15**: 291-301.
- [79] SAUER M, KLEINE-VEHN J. AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *Plant Cell* 2011; **23**: 2033-2043.
- [80] SAWCHUK MG, DONNER TJ, SCARPELLA E. Auxin transport-dependent, stage-specific dynamics of leaf vein formation. *Plant Sign Behav* 2008; **3**: 286-289.
- [81] SCARPELLA E, BARKOULAS M, TSIANTIS M. Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: 1-17.
- [82] SCARPELLA E, MARCOS D, FRIML J, BERLETH T. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Dev* 2006; **20**: 1015-1027.
- [83] SCHLICHT M, STRNAD M, SCANLON MJ, MANCUSO S, HOCHHOLDINGER F, PALME K, VOLKMANN D, MENZEL D, BALUSKA F. Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. *Plant Signal Behav* 2006; **1**: 122-133.
- [84] SHIMIZU-SATO S, TANAKA M, MORI H. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 429-435.
- [85] SHIMOMURA S. Identification of a glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma membrane protein interacting with the C-terminus of auxin-binding protein 1: a photoaffinity crosslinking study. *Plant Mol Biol* 2006; **60**: 663-677.
- [86] SOREK N, SEGEV O, GUTMAN O, BAR E, RICHTER S, PORATY L, HIRSCH JA, HENIS YI, LEWINSOHN E, JÜRGENS G, YALOVSKY S. An S-acylation switch of conserved G domain cysteines is required for polarity signaling by ROP GTPases. *Curr Biol* 2010; **20**: 914-920.
- [87] STARZYŃSKA E, KEŚY J, KOWALCZYK S. Permeazy AUX/LAX, transportery ABC i białka PIN w polarnym transporcie auksyn. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 123-140.
- [88] SUKUMAR P, EDWARDS KS, RAHMAN A, DELONG A, MUDAY GK. PINOID kinase regulates root gravitropism through modulation of PIN2-dependent basipetal auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2009; **150**: 722-735.
- [89] 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.
- [90] TANAKA H, KITAKURA S, DE RYCKE R, DE GROODT R, FRIML J. Fluorescence imaging-based screen identifies ARF GEF component of early endosomal trafficking. *Curr Biol* 2009; **19**: 391-397.
- [91] TITAPIWATANAKUN B, MURPHY AS. Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J Exp Botany* 2009; **60**: 1093-1107.
- [92] UMEHARA M, HANADA A, YOSHIDA S, AKIYAMA K, ARITE T, TAKEDA-KAMIYA N, MAGOME H, KAMIYA Y, SHIRASU K, YONEYAMA K, KYOZUKA J, YAMAGUCHI S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 2008; **455**: 195-200.
- [93] WENZEL CL, SCHUETZ M, YU Q, MATSSON J. Dynamics of *MONOPTEROS* and *PINFORMED1* expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2007; **49**: 387-398.
- [94] WIEDENMANN J, IVANCHENKO S, OSWALD F, SCHMITT F, RÖCKER C, SALIH A, SPINDLER K-D, NIENHAUS GU. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 15905-15910.
- [95] WU H-M, HAZAK O, CHEUNG AY, YALOVSKY S. RAC/ROP GTPases and auxin signaling. *Plant Cell* 2011; **23**: 1208-1218.
- [96] XU T, WEN M, NAGAWA S, FU Y, CHEN J-G, WU M-J, PERROT-RECHENMANN C, FRIML J, JONES AM, YANG Z. Cell surface-and Rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* 2010; **143**: 99-110.
- [97] ZAŽÍMALOVÁ E, MURPHY AS, YANG H, HOYEROVÁ K, HOŠEK P. Auxin transporters- why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: 1-14.
- [98] ZHANG J, NODZYŃSKI T, PĚNČÍK A, ROLČÍK J, FRIML J. PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 918-922.
- [99] ZHANG J, VANNESTE S, BREWER PB, MICHNIEWICZ M, GRONES P, KLEINE-VEHN J, LÖFKE C, TEICHMANN T, BIELACH A, CANNOOT B, HOYEROVÁ K, CHEN X, XUE H-W, BENKOVÁ E, ZAŽÍMALOVÁ E, FRIML J. Inositol triphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> signaling modulates auxin transport and PIN polarity. *Dev Cell* 2011; **20**: 855-866.
- [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 – A. Kononowicz

Otrzymano: 03.12.2011

Przyjęto: 30.07.2012

Ewelina Starzyńska

Zakład Biochemii

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej

Uniwersytet im. M. Kopernika

ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

tel.: 0 56 61 14 542

e-mail: e.starzynska@umk.pl