

Dynamika aktinového cytoskeletu a transport auxinu

The role of actin dynamics in auxin transport

Bakalářská práce

Lenka Stillerová



Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra experimentální biologie rostlin

Praha 2010

Školitelka bakalářské práce: doc. RNDr. Fatima Cvrčková, Dr. rer. nat.

Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v
Praze

Konzultantka bakalářské práce: Ing. Rosero Alpala Elvia Amparo

Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v
Praze

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury pod vedením doc. RNDr. Fatimy Cvrčkové, Dr. rer. nat. a Ing. Rosero Alpala Elvia Amparo.

V Praze dne 25. dubna 2010

Seznam zkratek

Aux1/Lax.....	transportér auxinu do buňky (AUXIN-RESISTANT 1/LIKE AUX1)
PIN.....	transportér auxinu z buňky (PIN-FORMED)
PGP.....	fosfoglykoprotein, transportér auxinu z buňky
MDR.....	transportér auxinu z buňky (multidrug resistance)
ABCB.....	transportér auxinu z buňky (savčí)
ARF-GEF.....	auxin response factor guanin exchange factor
PID.....	serin/threonin protein kináza (PINFORMED)
Arp.....	actin related protein
ROP.....	RHO-related proteins from plants
NPA.....	1-naftylftalamová kyselina (1-naphthylphthalamic acid)
TIBA.....	2,3,5-trijodobenzoová kyselina (2,3,5-triiodobenzoic acid)
PBA.....	2-(1-pyrenoyl)benzoová kyselina (2-(1-pyrenoyl)benzoic acid)
ABP.....	aktin vazebný protein (actin binding protein)
ADF.....	aktin depolymerační faktor (actin depolymerization factor)
ARPC.....	podjednotka Arp2/3 proteinového komplexu
WASP/SCAR/WAVE.....	rodiny proteinů aktivující Arp2/3 komplex
CRIB.....	doména WASP/SCAR proteinů
GAPs.....	GTPasa activating proteins
GEFs.....	guanine nucleotide exchange factors
GDI.....	guanine nucleotide-dissociation inhibitors
CK.....	cytokinin
IAA.....	indol-3-octová kyselina
2,4-D.....	2,4-dichlorfenoxycetová kyselina
NAA.....	naftalen-1-octová kyselina
GFP.....	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GNOM.....	ARF-GEF kompartment
SNARE.....	membránové proteiny
H ⁺ ATPasa.....	protonová pumpa, translokuje protony přes membránu
PI-4,5-P2.....	fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát

<i>PIN</i>	- označení genu
Pin1, Pin	- označení proteinu
<i>pin1</i>	- označení mutantní alely

OBSAH

1. Abstrakt	4
2. Abstract	5
3. Úvod	6
4. Aktin	7
4.1 Aktin se účastní mnohých životně důležitých buněčných procesů.....	7
4.2 Aktin je konzervovaný v eukaryotech.....	7
4.3 Aktinová vlákna.....	8
4.4 Profilin a ADF/cofilin se váží na aktin.....	8
4.4.1 Profilin.....	8
4.4.2 ADF/cofilin.....	9
4.5 Vznik aktinových vláken.....	10
4.6 Regulace nukleace aktinu a přestaveb aktinového cytoskeletu.....	11
5. Cytoskeletární dráhy pro váčky	12
6. Auxin	13
6.1 Vývoj a architektura kořenů jsou regulovány fytohormony.....	13
6.2 Chemiosmotický model transportu auxinu.....	13
6.3 Transportéry auxinu.....	15
6.3.1 Aux1/Lax.....	15
6.3.2 ABCB/PGP/MDR.....	15
6.3.3 PIN.....	15
6.4 Kontrola polarita a množství transportovaného auxinu.....	16
7. Interakce mezi auxinem a aktinem	16
7.1 Vliv auxinu na aktinový cytoskelet.....	16
7.2 Interakce inhibitorů polárního transportu auxinu s aktinem.....	17
7.2.1 NPA, TIBA, PBA.....	17
7.2.2 Latrunculin B.....	18
7.3 Role aktinu v lokalizaci a cílení Pin1, Pin2, Aux1.....	18
8. Exocytóza jako hlavní mechanismus buněčné morfogeneze	20
9. Cyklující domény v rostlinných buňkách	20
10. Závěr	21
11. Seznam použité literatury	22

1. Abstrakt

Rostliny využívají k řízení fyziologických a vývojových procesů signální molekuly zvané fytohormony. Mezi ně patří i auxiny, které se podílejí na regulaci procesů, jako jsou embryogeneze, organogeneze, tvorba pletiv a tropizmů. Auxiny jsou v rostlinách transportovány polárně. K jejich distribuci slouží floém a specializované membránové transportní proteiny, v menší míře auxin difunduje přes plasmatickou membránu. Aux1/Lax přenašeče transportují auxin do buňky, z buňky ho transportují hlavně PIN přenašeče, které udávají směr toku auxinu. Asymetrické rozmístění PIN proteinů v membráně je závislé na dopravě váčků z Golgiho aparátu do plasmatické membrány. Transport se uskutečňuje podél aktinových vláken, která se dynamicky přestavují díky regulacím, čímž je zajišťováno nerovnoměrné rozmístění proteinů.

PIN proteiny cyklují dynamicky v buňce mezi endosomy a plasmatickou membránou. Cyklování je regulováno ARF-GEF proteiny a serin/threonin protein kinázou (PID, *PINOID*). Nově syntetizované PIN proteiny jsou nejprve rovnoměrně rozmístěny v membráně, posléze jsou přemístěny do daných míst. Regulace tvorby a přestaveb aktinových vláken je zásadním faktorem pro transport váčků s PIN proteiny. Existuje mnoho proteinů, které se podílí na vzniku aktinových vláken, polymeraci, větvení, depolymeraci, ... Asi nejvíce regulacím podléhá samotná nukleace aktinu, které se účastní řada proteinů, jako Arp2/3 proteinový komplex, forminy, Spire a Cordon-Bleu regulátory, leiomodin a další. Ty jsou regulovány ROP proteiny, které se účastní všech přestaveb aktinového cytoskeletu, ale i morfogeneze, cytokineze, pohybu váčků, transkripce, buněčného cyklu, apoptózy a odpovědi na stres, ...

Interakce auxinu a aktinu jsou studovány na základě četných pokusů. Sledují se vlivy různých typů auxinů v různých koncentracích na aktin. Poté se využívá inhibitorů transportu auxinu, např. 1-naftylftalamové kyseliny (NPA), 2,3,5-trijodbenzoové kyseliny (TIBA) a 2-(1-pyrenoyl)benzoové kyseliny (PBA). Použitím specifického toxinu latrunculinu B, který efektivně depolymeruje F-aktin, bylo odhaleno, že aktin není jediným kritickým regulátorem polárního růstu rostliny. Můžeme se domnívat, že zde hraje roli i tubulin.

Klíčová slova: transport auxinu, aktinový cytoskelet, PIN proteiny, polarita auxinu, inhibitory auxinu, *Arabidopsis thaliana*

2. Abstract

Phytohormones are signalling molecules directing physiological and developmental processes in plants. One of them, auxin, is involved in the diverse regulation of plant processes, e.g. embryogenesis, organogenesis, vascular tissue formation and tropisms. Auxin transport is polar. Auxin is distributed via the phloem, utilizing specialized membrane transport proteins; small amount diffuse also through the membrane. Aux1/Lax transporters mediate auxin entry into the cell, auxin efflux is mediated mostly by PIN transporters, which are the crucial factors in determining the directionality of auxin flow. Asymmetric localization of membrane PIN proteins depends on vesicle transport from Golgi to the plasma membrane. Vesicles are transported along actin filaments which are dynamically rebuilt by regulators. They are maintaining asymmetric cellular localization of the auxin transport proteins.

PIN proteins are cycling between endosomes and plasma membrane. Cycling is regulated by ARF-GEF proteins and serin/threonin kinase (PID, *PINOID*). Newly synthesized PIN proteins are equally distributed in the plasma membrane, afterwards they are asymmetrically redistributed. Regulation of actin filaments formation and remodelling is the crucial factor for transport of vesicles with PIN proteins. Many proteins which regulate actin nucleation, polymerization/depolymerization, branching, ... exist. Actin nucleation is one of the most controlled processes. Arp2/3 protein complex, formins, SPIRE and Cordon-Bleu regulators, leiomodin and others participate in nucleation; these regulators are also regulated by ROP proteins. ROP proteins participate in all of actin remodelling, also in morphogenesis, cytokinesis, vesicle motion, cell cycle, apoptosis, stress responses, ...

Interactions between auxin and actin are being characterized by many experiments. Effects of many auxin types and auxin concentration on actin are observed. Auxin transport inhibitors like 1-naphthylphthalamic acid (NPA), 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) and 2-(1-pyrenoyl)benzoic acid (PBA) are often used. Experiments with latrunculin B, toxin which depolymerizes F-actin, suggest that actin is not the only critical determinant of polarized plant growth. We can assume that tubulin participates as well.

Key words: auxin transport, actin cytoskeleton, PIN proteins, polar auxin, auxin inhibitors, *Arabidopsis thaliana*

3. Úvod

Auxin, IAA neboli indol-3-octová kyselina je jedním z životně důležitých fytohormonů rostlin. Jeho název je odvozen z řeckého slova *auxein*, což v překladu znamená narůstat, zvětšovat se, nabývat, a to také vypovídá o účinku této látky na rostlinu. Společně s dalšími fytohormony, jmenujme například cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou nebo etylén, řídí auxiny rostlinný růst a vývoj. Všechny hormony jsou syntetizovány v určitém místě rostliny a pak transportovány vodivými pletivy do míst, kde ovlivňují různé fyziologické procesy.

Auxin se syntetizuje hlavně v mladých nadzemních částech rostliny a je transportován zejména floémem směrem k bázi rostliny, odtud může být transportován floémem zase akropetálně nebo vstoupit do buněk a být přesně směřován k cíli. Do buněk vstupuje jednak pasivně difúzí, ale ve větší míře aktivně pomocí přenašečů Aux1/Lax, z buňky poté přenašeči PIN nebo PGP. Nejznámějším účinkem auxinů je stimulace prodlužování buněk a apikální dominance, dále se účastní např. větvení a růstu kořenů,... Auxin je po rostlině transportován polárně, díky nerovnoměrnému rozmístění přenašečů v membráně (Friml and Palme 2002). Proteiny transportující auxin přes mebrány jsou závislé na dynamice transportu váčků po aktinových vláknech (Muday and Murphy 2002). Proto jsou i auxiny a s ním související procesy, které řídí, závislé na buněčném cytoskeletu. Naopak také cytoskelet je v mnohých případech silně ovlivněn nebo poškozen při poškození transportu auxinu.

Při studiu vlivu auxinu na cytoskelet je využíváno inhibitorů transportu auxinu, jako jsou např. 1-naftylftalamová kyselina (NPA), 2,3,5-trijodbenzoová kyselina (TIBA) a 2-(1-pyrenoyl)benzoová kyselina (PBA) (Dhonukshe et al. 2008a, Tanaka et al. 2006, Petrášek et al. 2003). Ne ve všech případech je polarita růstu rostliny narušena při narušení cytoskeletu. Toto bylo popsáno u latrunculinu B, který depolymeruje F-aktin (Baluška et al. 2001). Mechanismy, kterými jsou auxinové přenašeče lokalizovány do membrány, jsou pro nás stále nejasné. Víme, že v distribuci PIN proteinů hraje významnou roli protein kináza PID (*PINOID*; Friml et al. 2004). Samotná lokalizace PIN proteinů v membráně je na aktinu nezávislá (Rahman et al. 2007).

S aktinem a celkově s cytoskeletem souvisí transport membránových váčků, pomocí nichž jsou dopravovány samotné proteiny po buňce z místa na místo. Exocytóza a endocytóza jsou základními mechanismy utváření celkové dynamiky transportu auxinu a s ním úzce souvisejícího cytoskeletu. Nesmíme zapomínat, že samotná regulace utváření a přestaveb aktinových vláken je nesmírně složitá a v mnohých ohledech prozatím nevyjasněná. Ve své práci jsem se na začátek

obširněji zaměřila právě na výstavbu aktinových vláken a jejich regulacím. Nadále, při pojednání o interakcích mezi aktinem a auxinem, jsem se vzhledem k široce studovanému tématu u odlišných organismů zaměřila na práce týkající se kořenu *Arabidopsis thaliana*.

4. Aktin

4.1 Aktin se účastní mnohých životně důležitých buněčných procesů

Velká část dnešních poznatků o aktinu pramení z výzkumů prováděných na svalových aktomyosinových komplexech u *Metazoi*. Nesvalový aktin se ale účastní také mnohých životně důležitých procesů v buněčné morfogenezi eukaryot, pohybu améboidních buněk a v neposlední řadě hlavně v intracelulárním transportu. O aktinu nevíme zdaleka vše a je předmětem intenzivního výzkumu.

Přestavby aktinových filament se podílí na konkrétních procesech jako je tvorba filopodií, lamellipodií a membránových záhybů (membrane ruffles) u živočišných buněk (Small et al. 2002). Takzvané aktinové "komety" mohou organelami a buněčnými patogeny pohybovat v cytoplasmě (Goldberg 2001, Pollard and Borisy 2003).

Je nepostradatelný pro buněčný cyklus. Konkrétně cytokineze je závislá na dopravě exocytotických váčků (Field, Li and Oegema 1999). U *Metazoi* se aktin podílí na tvorbě aktomyosinového cytoticketického kruhu (Hales et al. 1999).

Dále se aktin účastní například pučení kvasinek (Pruyne et al. 2004b). U rostlin hraje významnou roli v tvorbě rostlinných trichomů (Szymanski 2005), vrcholovém růstu kořenových vlásků závislém na F-aktinu (Baluška et al. 2000) nebo ve vývoji pylového zrna (Vidali, McKenna and Hepler 2001). Aktinová filamenta slouží mimo jiné jako transportní dráha pro váčky- hlavně exocytotické. Ty jsou dopravovány do expandujících míst buněčného povrchu nebo u nepohybujících se buněk do míst růstu.

4.2 Aktin je konzervovaný v eukaryotech

Aktin je vysoce konzervovaný protein u eukaryot. Tvoří různorodou rodinu, kde jsou i ty nejvíce odlišné proteiny z cca 85% identické. Jeho izoformy naopak nacházíme u různých typů organismů, například 1 gen kóduje aktin u pučících a dělicích se kvasinek, u člověka je kódován 6 geny, u rostlin existuje až 100 aktinových izoform.

U mnohých organismů (např. *Dictyostelium discoideum*) dochází při odpovědi na různé

stresové situace k fosforylaci Tyr-35 aktinu, která pravděpodobně zamezí polymeraci (Jungbluth et al. 1995). U spor *D. discoideum* dochází k fosforylaci pravděpodobně jako reakce na hladovění a účastní se navození dormance (Kishi et al. 1998). Mechanismy těchto posttranslačních modifikací nejsou zatím známy, vodítkem by mohly být nedávno objevené defosforylační proteiny z genů skupiny III, jejichž exprese narůstá v průběhu bobtnání semene (Xu et al. 2004). U *A. thaliana* bylo objeveno několik genů aktinu, které se liší v časovém a prostorovém uspořádání exprese, ty můžeme dělit na dvě fylogenetické skupiny-vegetativní a generativní, a liší se také funkcí.

4.3 Aktinová vlákna

Aktin je zřejmě esenciální pro život eukaryotních buněk. Jeho polymerací vznikají vlákna, která tvoří vnitřní mechanickou podporu buňky, udávají tvar buňky, utváří dráhy pro pohyb buněčného materiálu do místa určení a účastní se motility buňky v případě, že nemá buněčnou stěnu. Aktin se v eukaryotních buňkách vyskytuje ve dvou formách, jednak jako rozpustný globulární G-aktin a jako vláknitý F-aktin. V buňce je mezi těmito dvěma formami udržována rovnováha pomocí interakcí s dalšími proteiny účastnícími se přestaveb aktinu. Proteiny vázající se s G-aktinem kontrolují dostupnost aktinu a vazbu s nukleotidem, ovlivňují tak rychlost polymerizace na rostoucím (+) konci (=barbed end) stejně jako rychlost depolymerizace na nerostoucím (-) konci (=pointed end).

Reorganizace a dynamika aktinu je řízena aktin vazebnými proteiny (ABPs). Dvěmi hlavními modulátory aktinové dynamiky jsou univerzálně rozšířené proteiny profilin (Carlsson et al. 1977) a depolymerační faktor ADF/cofilin (Nishida, Maekawa and Sakai 1984). Specifickými modulátory například pro *Metazoa* jsou thymosin- β 4(T β 4) a pro *Toxoplasma* toxofilin (Safer, Golla and Nachmias 1990, Poupel et al. 2000).

4.4 Profilin a ADF/cofilin se váží na aktin

4.4.1 Profilin

Profilin je v buňce všude se vyskytující protein, má podíl na vazbě monomerního G-aktinu s ATP (Mockrin and Korn 1980) a napomáhá tak polymeraci aktinu. Kromě vazby na aktin se profilin u *A. thaliana* váže k dalším proteinům, jako jsou prolin bohaté fosfoproteiny a Arp2/3 komplex. Váže se též k malé signální molekule fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu (PI-4,5-

P₂). Podíl má také na recyklaci G-aktinu odděleného z + konce vlákna za účasti ADF/cofilin proteinů (Maciver and Hussey 2002).

Polymerace se účastní čepičkovací (capping) proteiny, které zajišťují dostupnost + konců aktinových vláken. Jejich mutací způsobenou přemírou profilinu je polymerace inhibována (Hopmann and Miller 2003). V neposlední řadě je profilin součástí signalizačních drah (v cytoskeletu) a jeho aktivita je regulována právě PI-4,5-P₂ (Lassing and Lindberg 1985).

Izoformy profilinu se vyskytují u mnoha organismů, jsou ale méně konzervovány než aktin, ale jejich strukturní a funkční homologie je značná. Například profilin pylu *Zea mays* je specifický pro danou rostlinu a evolučně vzdálený od profilinu *D. discoideum*, jeho expresí v mutovaném (obsahuje dvě mutace profilinu) *D. discoideum* dochází k nahrazení defektních funkcí (Karakesisoglou et al. 1996). Tento jev vypovídá právě o homologii profilinů u různých organismů, přestože jsou sekvenčně specifické pouze z 34-44%. Jeho důležitost byla ověřena na pylu (Vidali et al. 2001) a kořenových vláscích, kde výrazně ovlivnil vrcholový růst (Baluška et al. 2000). Vyšší exprese profilinu u *A. thaliana* způsobuje růst kořenových vlásků, naopak nižší exprese vegetativní profilin1 isoformy způsobuje snížení elongace hypokotylu, inhibici růstu kořenových vlásků a necitlivost k světlu. Translací antisense RNA je redukována buněčná elongace a jiné vývojové změny (Ramachandran et al. 2000, McKinney, Kandasamy and Meagher 2001).

Některé změny jako například navození kvetení zatím nelze přímo přiřknout aktivitě aktinu, přestože snížená exprese ADF, který se přímo s profilinem účastní na polymeraci aktinu, pravděpodobně způsobuje pozdní kvetení (Dong et al. 2001). Vzhledem k mnohým poznatkům by se dalo předpokládat, že cytoskelet netvoří pouze transportní cesty pro různé váčky, ale pravděpodobně se i aktivně účastní signalizace. Tomuto fenoménu by mohly napovídat například intenzivní přestavby F-aktinových sítí v buňce, kterou lze chápat jako „multisenzorovou“, protože na základě vyhodnocení vnějších podnětů jako světlo nebo množství vody řídí zavírání průduchů, mechanickým kontaktem nebo při opravách zranění (Volkmann and Baluška 1999).

4.4.2 ADF/cofilin

ADFs (aktin depolymerující faktory) a cofilin patří do rodiny proteinů preferenčně vázajících rozpustný nebo vláknitý ADP-aktin. Fosforylací Ser zbytků na N-konci těchto proteinů vede u savců a *Acanthamoeba castellanii* ke snížení výstavby aktinových filament (Agnew,

Minamide and Bamburg 1995). Tento mechanismus je dobře dokumentován také u rostlinných buněk. Množství proteinů je striktně regulováno, zvýšená exprese a některé mutace cofilinu jsou letální (Iida and Yahara 1999, McKim et al. 1994).

U *D. discoideum* existují dva typy cofilinů, které se liší funkcí. Cofilin-1 je přítomen ve vegetativních buňkách a v raných fázích vývoje. Pro buňku je esenciální, váže a depolymeruje aktinová filamenta, díky němu dochází k přestavbám aktinových sítí (Aizawa, Sutoh and Yahara 1996). Cofilin-2 narozdíl od prvního postrádá regulační sekvenci a nevyskytuje se v jeho společnosti. Vyskytuje se hlavně v místech agregace, jeho funkce jsou různorodé, ale jeho specifická hlavní funkce nám zatím uniká (Aizawa et al. 2001). *A. thaliana* má nejméně 6 ADF izoform (McCurdy, Kovar and Staiger 2001), které jsou regulovány fosforylací.

4.5 Vznik aktinových vláken

Aktinová vlákna jsou přednostně prodlužována na neočepičkovaných + koncích již existujících vláken nebo mohou vznikat *de novo* tzv. nukleací. Čepička na konci vlákna brání jeho prodlužování. Odčepičkovat vlákno nebo oddělit F-aktin z konce vlákna mohou aktin vazebné proteiny severin, gelsolin nebo proteiny z ADF/cofilin rodiny. Gelsolin také může dát vznik zcela novému vláknu (Yin et al. 1981). V ptačí žaludeční svalovině byl před několika lety objeven protein fesselin, který se také účastní jak prodlužování, tak vzniku vlákna *de novo* (Beall and Chalovich 2001).

K nukleaci může docházet několika způsoby, např. za účasti Arp2/3 proteinového komplexu, forminů, poměrně nedávno objevených SPIRE a Cordon-Bleu regulátorů (Renault, Bugyi and Carlier 2008), leiomodinu, ... Arp2/3 komplex se skládá ze 7 proteinů Arp2, Arp3 a ARPCs, tyto podjednotky byly a jsou nadále předmětem výzkumu u vyšších rostlin (Mathur 2005). U *A. thaliana* byly na základě deformace listových trichomů klasifikovány geny *DISTORTED*. Mezi nimi se nacházejí také geny *CROOKED*, *DISTORTED1* a *WURM*, které kódují vysoce konzervované podjednotky aktinového Arp2/3 komplexu (Mathur et al. 2003b, Mathur et al. 2003a). U mutantů v těchto genech byly pozorovány deformace hypokotylu, děložních lístků a kořenových vlásků. V trichomech byly pozorovány přestavby jednak v aktinových sítích, ale i mikrotubulech (Mathur and Chua 2000).

Komplex Arp2/3 se váže na „bok“ existujícího vlákna a podílí se na vzniku nové „větve“. U *A. thaliana* jsou geny Arp2/3 komplexu přepisovány například u pylu a prekurzorů xylému,

tedy v buňkách, kde dochází k velkým změnám struktury (Klahre and Chua 1999). K aktinové nukleaci *de novo* dochází díky forminům. Tato rodina proteinů obsahuje vždy minimálně dvě domény FH1 a FH2 bohaté na prolin (Evangelista et al. 2002). Vazbou profilinu na FH1 doménu je nukleace regulována. U vyšších rostlin existují dvě skupiny forminů, první skupina obsahuje většinou proteiny lokalizované v membráně a druhá cytoplasmatické proteiny.

4.6 Regulace nukleace aktinu a přestaveb aktinového cytoskeletu

Všechny mechanismy nukleace aktinu podléhají regulaci mnoha dalšími proteiny. Jednu z hlavních rolí v regulaci Arp2/3 komplexu hrají proteiny z rodiny WASP/SCAR (Symons et al. 1996, Bear, Rawls and Saxe 1998). Tyto proteiny byly identifikovány u *D. discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae*, živočichů a v neposlední řadě také u vyšších rostlin *A. thaliana* a kukuřice (Frank et al. 2004), zde se používá označení WAVE. Arp2/3 komplex je samostatně neaktivní, WAVE komplex zprostředkovává signály RHO GTPáz (RAC/ROP; viz níže) přes svou podjednotku Scar jako aktivační pro Arp2/3.

Protein CARMIL (čepičkový protein, linker Arp2/3 a myosinu), dosud identifikovaný u *Acanthamoeba castellanii*, *D. discoideum*, savců, aktivuje nukleaci a váže čepičkový protein nebo SH3 doménu myosinu I (Jung et al. 2001). Coronin, který se vyskytuje u všech zkoumaných eukaryot vyjma rostlin, asociuje s Arp2/3 komplexem a inhibuje nukleaci a může podporovat tvorbu aktinových sítí směřováním komplexu na „boky“ filament. Tohoto proteinu je potřeba také v chemotaxi, cytokinesi a endocytóze (de Hostos et al. 1991).

Forminy se také účastní regulace tvorby aktinových vláken. U některých živočichů a hub interagují se signálními molekulami RHO GTPázami nebo Src proteiny, které ovlivňují reorganizaci aktinu. Forminy se také podílejí na interakcích mezi aktinem a mikrotubuly nebo na buněčné polaritě při pučení kvasinek (Lee et al. 1999, Pruyne et al. 2004a).

RHO GTPázy jsou regulační proteiny, které se účastní všech procesů přestaveb aktinových vláken. Kromě toho se vyskytují v regulačních drahách v celé buňce- v endocytóze, chemotaxi, výstavbě mikrotubulů, morfogenezi, cytokinezi, pohybu váčků, transkripci, buněčném cyklu, apoptóze a odpovědi na stres, ... (Johnson 1999). Jsou velkou skupinou proteinů vyskytujících se u všech eukaryot, která se na základě podobnosti sekvencí a funkcí dělí na podrodiny Ras, Rho, Rab, Ran a Arf. V rámci podrodiny Rho se můžeme setkat s dělením na tři větve - Rho, Rac a Cdc42 (Kahn, Der and Bokoch 1992). U *A. thaliana* se nevyskytují malé

GTPázy ze skupiny Ras, které se nacházejí např. u *S. cerevisiae* či savců (Vernoud et al. 2003). RHO proteiny rostlin ROPs (RHO-of-plants) se akumulují do míst růstu buňky. Studium ROP proteinů se provádí například na buňkách tvořících kořenové vlásky, které zajišťují příjem živin a vody z půdy nebo interakce se symbionty a obranu proti patogenům. ROP proteiny jsou akumulovány do míst růstu kořenového vlásku a zvýšením Rop2 aktivity je rapidně stimulován růst vlásků (Jones et al. 2002). Rop2 také reguluje reorganizaci kortikálního aktinu v rostoucích buňkách. Exprese dominantní inaktivní alely („dominant negative“ mutace) tohoto proteinu u *A. thaliana* inhibuje polární růst buněk epidermis, exprese hyperaktivní mutantní isoformy způsobuje buněčnou expanzi v průběhu rané fáze rostlinné organogeneze (Fu, Li and Yang 2002).

ROP GTPázy interagují s několika specifickými rostlinnými efekty, jako jsou Ric proteiny s doménou CRIB nebo komponenty syntázy kalózy. GTPázy se nacházejí ve dvou možných stavech, buď v aktivní formě s navázaným GTP, nebo v neaktivní formě s navázaným GDP. Stav GTPázy je regulován GAPs (GTPase activating proteins) a GEFs (guanine nucleotide exchange factors), který katalyzuje disociaci GDP. Dalším kofaktorem jsou GDIs (guanine nucleotide-dissociation inhibitors), které regulují cyklování RHO GTPáz mezi membránou a cytoplasmou. U rostlin konzervované dvě třídy GDIs a GAPs mají unikátní regulační funkce a GEF byl donedávna znám jen jeden u *A. thaliana*, poměrně nedávno byla objevena nová skupina specifická pro rostliny RHO-GEFs (ROP-GEFs, PRONE-GEFs; Berken, Thomas and Wittinghofer 2005).

5. Cytoskeletární dráhy pro váčky

Mnoho věcí, které známe o cytoskeletu, pochází z výzkumů prováděných na kořenových vláscích, které se nacházejí ve vrcholové prodlužující se zóně. V těchto rostoucích buňkách tvoří cytoskelet silná filamenta, která jsou po dokončení vývoje buňky nahrazena jemnou aktinovou sítí (Baluška et al. 2000). Cytoskelet se účastní transportu látek a organel na delší vzdálenosti. U *A. thaliana* jsou do transportu váček při prodlužování kořenových vlásků zapojeny motorové proteiny myosiny XI (Ojangu et al. 2007, Prokhnevsky, Peremyslov and Dolja 2008).

Mikrotubuly u rostlin kontrolují směr růstu, jejich poškození např. oryzalinem způsobuje u *Medicago truncatula* zvlnění kořenových vlásků (Sieberer et al. 2002). Navíc determinují umístění sekrečních domén v neexpandujících buňkách a také de novo umístění Pin1 v kortexu

na rozhraní kořenových buněk po dokončení cytokineze. Aktin má funkci kontroly exocytózy a kortikální aktin může sloužit jako bariéra pro váčky v daných místech membrány, kde neprobíhá endo/exocytóza, kdežto mikrotubuly pro ně tvoří spleťité průchozí transportní cesty.

6. Auxin

6.1 Vývoj a architektura kořenů jsou regulovány fytohormony

V současné době jsou studie hormonálních mechanismů, které kontrolují/regulují růst, diferenciaci, vývoj a architekturu buněk, zaměřeny mimo jiné na výzkum kořenového systému. Vzhledem k rozsáhlosti problematiky se na něj soustředíme i my. Hlavními fytohormony, které se zde účastní buněčné signalizace, jsou cytokinin (CK) a auxin (IAA).

Oba hormony mohou být produkovány buňkami v kořeni i v nadzemní části (Nordstrom et al. 2004) a to v závislosti na umístění buňky v rostlinném těle, vývojovém stádiu a vnějších faktorech. Mladé nadzemní orgány jsou hlavními místy produkce auxinu u *A. thaliana* a kořenový vrchol je místem syntézy cytokininu (Aloni et al. 2003, Aloni et al. 2004). Primárně jsou cytokininy syntetizovány v buňkách kořenové čepičky a jsou transportovány symplastem do míst prodlužování a z diferencovaných buněk xylémem do jednotlivých orgánů (Aloni et al. 2004, Aloni et al. 2005). V kořeni jsou cytokininy negativními regulátory růstu a diferenciaci (Werner et al. 2003). Polární transport auxinu hraje podstatnou roli v diferenciaci, vývoji a gravitropním růstu kořenů hlavního i postranních (Sabatini et al. 1999).

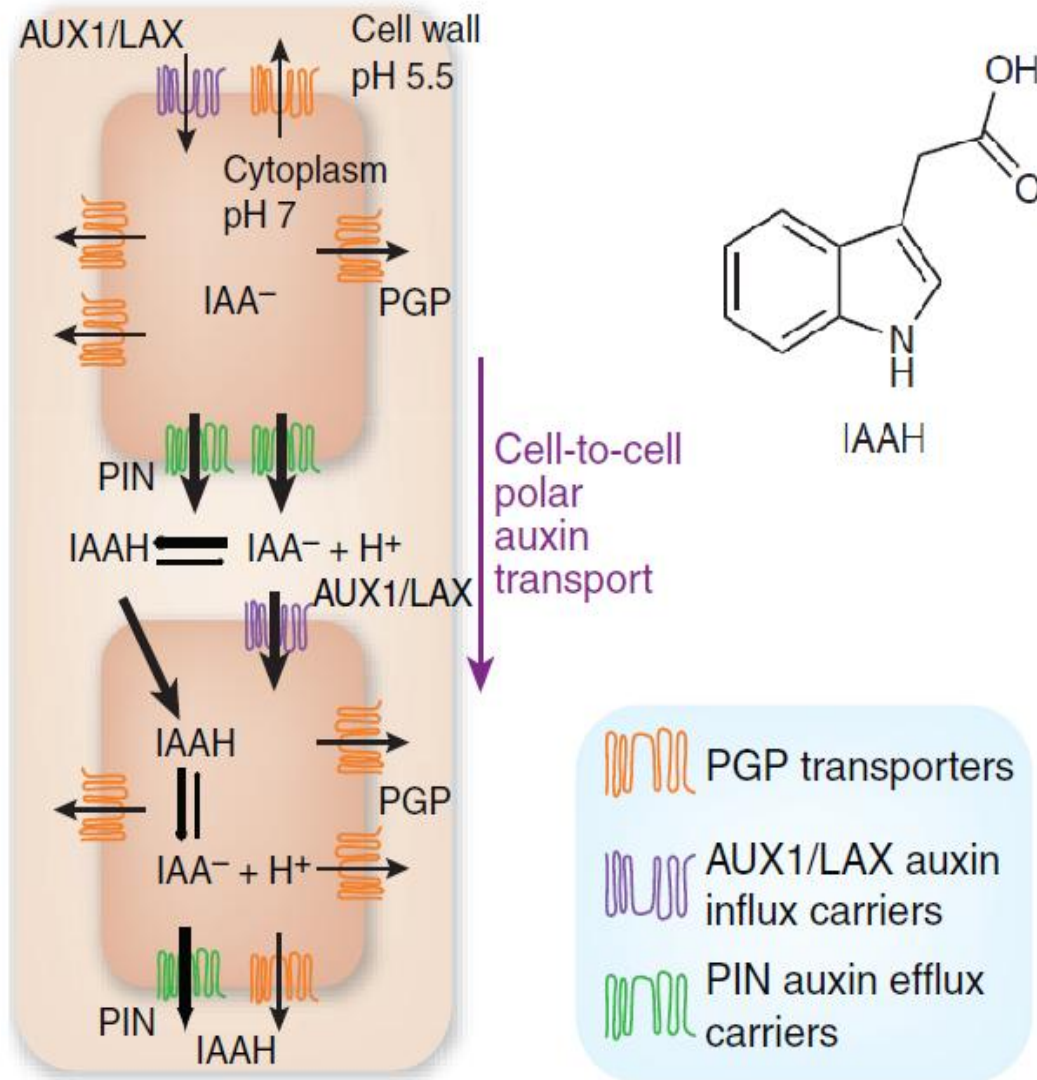
6.2 Chemiosmotický model transportu auxinu

Snad nejvíce probádaným asymetricky rozloženým proteinem v rostlinné buňce je přenašeč auxinu, který kontroluje polární transport auxinu. Auxin se transportuje mezi buňkami ze vzrostného vrcholu k bázi rostliny. To způsobuje hromadění auxinu v oblastech intenzivní elongace (Ortuño et al. 1990).

Pohyb auxinu z a do buňky zprostředkovávají dva proteinové komplexy-přenašeč do buňky (Aux1/Lax) a přenašeč z buňky (PIN), navíc jsou v plasmatické membráně přítomny ještě ATP dependentní transportéry, které transportují auxin taktéž z buňky. V 70. letech minulého století byl formulován chemiosmotický model, znázorňující transport auxinu v buňce (obr. 1).

Transport auxinu závisí na odlišném pH v extracelulárním prostoru a cytoplasmě, které je generováno H⁺ATPasou. V buněčné stěně je pH 5,5 a auxin je částečně protonován, proto může

volně difundovat přes plasmatickou membránu do buňky, uvnitř které je pH 7, v důsledku disociace proto auxin spontánně neuniká přes membránu. Kromě volné difúze může auxin do buňky vstupovat přes transmembránové přenašeče Aux1/Lax a z buňky přes přenašeče PIN a transportéry ABCB/PGP.



Obr. 1 : Chemiosmotický model, který je založený na rozdílném pH mezi apoplastem (prostor buněčné stěny) a cytoplasmou. Protonovaný auxin – indol-3-oxová kyselina/IAAH – může difundovat skrze buněčnou stěnu do cytoplasmy nebo může být transportována Aux1/Lax transportními proteiny do buňky. Uvnitř buňky IAA disociuje a posléze může být transportována PGP nebo PIN proteiny z buňky. Asymetrické rozmístění těchto proteinů řídí a udává tok auxinu mezi buňkami (Robert and Friml 2009).

6.3 Transportéry auxinu

6.3.1 *Aux1/Lax*

Díky modelovému organismu *A. thaliana* je také dobře prostudována molekulární podstata těchto proteinů. Aux1/Lax byl identifikován díky mutantu *Arabidopsis auxin1(aux1)*, jehož kořeny byly odolné vůči auxinu, membránově nepropustnému derivátu auxinu 2,4-dichlorfenoxyoctové kyselině (2,4-D) a ethylenu a vykazoval agravitropní růst kořene (Maher and Martindale 1980, Pickett, Wilson and Estelle 1990).

AUX1 gen kóduje protein homologní k aminokyselinovým permeázám (Bennett et al. 1996). Aux1 protein je asymetricky umístěn v různých typech buněk, zejména v horní části mladých kořenových buněk. U *A. thaliana* 3 typy proteinů rodiny LAX (LIKE AUX1) plní, jak se zdá, podobnou funkci jako Aux1, například regulují fyloxi (Bainbridge et al. 2008). Aux1 protein transportuje auxin do buňky přes buněčnou membránu pomocí symportu s H⁺.

6.3.2 *ABCB/PGP/MDR*

Fosfoglykoproteiny (PGPs) z rodiny transportních proteinů, které mají ATP vazebnou kazetu, se také účastní transportu auxinu (Geisler et al. 2005). Některé z nich se účastní transportu auxinu z buňky podobně jako PIN proteiny. Tyto exportní proteiny mohou fungovat buď součinně, nebo i antagonisticky v různých vývojových procesech (Blakeslee et al. 2007).

Využívají odlišné transportní mechanismy. Pakliže se oba proteiny vyskytují na polární buněčné doméně, mohou spolu interagovat synchronně, čímž je regulován PIN v membránové mikrodoméně (Titapiwatanakun et al. 2009). PGP se může vyskytovat na nepolární doméně, nezávisle na PIN, a může zprostředkovávat nepolární transport auxinu z buňky, která ho syntetizuje (Mravec et al. 2008).

6.3.3 *PIN*

Proteiny rodiny *PIN* jsou zásadní pro transport auxinu, neboť udávají polaritu toku auxinu. Funkce PIN byla demonstrována na tabákových BY-2 buňkách, kvasinkách a savčích HeLa buňkách (Petrášek et al. 2006, Okada et al. 1991, Galweiler et al. 1998). Jsou asymetricky rozloženy v plasmatické membráně a účastní se embryogeneze, organogeneze, vývoje kořenového meristému, diferenciace cév nebo tropických pohybů.

Důležité jsou změny v umístění PIN proteinů v buňkách v průběhu vývoje rostliny, například u *A. thaliana* jsou v časném stádiu vývoje Pin7 lokalizovány na horní straně suspenzorových buněk, které zprostředkovávají transport auxinu k mladému embryu. V pozdějších fázích vývoje jsou Pin1 a Pin7 lokalizovány ve spodní části buněk a transportují auxin směrem od embrya ke kořeni (Friml et al. 2003).

6.4 Kontrola polariry a množství transportovaného auxinu

Mechanismus, jakým je kontrolován polární transport a množství auxinu během růstu a vývoje rostliny, je nejasný. Zatím existují pouze domněnky, které možná povedou k objasnění této problematiky. Aktivita mnoha proteinů je v různorodých organismech regulována de/fosforylací zprostředkovanou protein kinázami a protein fosfatázami, tak by tomu mohlo být i v tomto případě. Analýzy mutantů vedly k nálezům protein kináz, které měly roli v regulaci transportu auxinu a jeho redistribuci, ale i v dalších procesech. Prozatím neznáme cíle de/fosforylace. Dalším možným aktérem v ustanovení polariry auxinu jsou samotné váčky cyklující uvnitř buňky. Po opůsobení inhibítoem, který snižuje sekreci váček Golgiho aparátu, je snižen transport auxinu (Sally and David 2004). V neposlední řadě se polariry auxinu mění na základě vnějších podnětů (Evans 1991).

7. Interakce mezi auxinem a aktinem

7.1 Vliv auxinu na aktinový cytoskelet

Asymetrické rozložení auxinových transportérů v buňce je založeno na dynamice transportu váček po aktinových vláknech (Muday and Murphy 2002). Když byly auxin IAA, syntetické auxiny NAA a 2,4-D aplikovány v různých koncentracích do média a na něm byly pěstovány rostlinky *A. thaliana*, byly pozorovány specifické fenotypové změny. Čím vyšší koncentrace auxinu, tím pomaleji kořen narůstal v porovnání s kontrolní rostlinou, pouze u 30 nM 2,4-D kořen po 3 dnech kultivace vykazoval klidový stav a u NAA po třech dnech došlo k rapidní inhibici elongace. Aktin byl vizualizován pomocí GFP (green fluorescent protein), u buněk opůsobených IAA a NAA došlo částečně k zesílení a zhoustnutí vláken, ale 2,4-D způsobil narušení cytoskeletu (Rahman et al. 2007).

17nM latrunculin B, inhibitor aktinu, inhibuje prodlužování kořene až na 50% a způsobuje obdobná poškození cytoskeletu jako 2,4-D, avšak bez výskytu "teček" (puncta).

Latrunculin B a 2,4-D má negativní vliv také na cytoplasmatické proudění v buňce, které je řízeno aktomyosinovým systémem (Rahman et al. 2007).

7.2 Interakce inhibitorů polárního transportu auxinu s aktinem

7.2.1 NPA, TIBA, PBA

Jakým přesně způsobem ovlivňuje auxin dynamiku aktinového cytoskeletu, můžeme pozorovat, když narušíme jeho polární transport inhibitory. Často se využívá 1-naftylftalamové kyseliny (NPA), 2,3,5-trijodbenzoové kyseliny (TIBA) a 2-(1-pyrenoyl)benzoové kyseliny (PBA).

TIBA a PBA mají vliv na transport váčků, blokují reverzibilně endocytózu a pohyb Golgiho aparátu a endosomů a indukují tak snížení dynamiky cytoskeletu (Dhonukshe et al. 2008a). Typickým projevem stabilizace aktinového cytoskeletu jsou tlusté svazky vláken (patches). TIBA nebo aktin-stabilizující látka jasplakinolid způsobuje defekty ve vývoji kořene, jeho růstu, zakládání postranních kořenů a gravitropním růstu, které jsou typickými znaky pro mutanty s poruchou transportu auxinu (Tanaka et al. 2006). 10 μ M dávka NPA a 40 μ M TIBA u *A. thaliana* inhibuje elongaci kořene asi o 50%. NPA narušuje vláknitý aktin a dává vznik aktinovým tečkám, obdobně jako 2,4-D, u tabákových buněk PNA vliv na aktin nemá (Petrášek et al. 2003), a TIBA způsobuje tzv. svazkování filament podobně jako IAA/NAA. TIBA a NPA jsou již po půl století známy jako inhibitory transportu auxinu. Mechanismus, jakým obě látky mění strukturu aktinu, není doposud jasný.

Po porovnání kořene opůsobeného NPA(nebo 2,4-D) s mutantem *aux1* a kontrolou je zřejmé, že tyto dva inhibitory nepůsobí přímo na auxinové transportní proteiny, ale narušují aktin jiným způsobem. IAA, NAA a TIBA zpomalují kořenový růst zmenšením elongační zóny v kořeni, 2,4-D, NPA a latrunculin B způsobují zpomalení růstu snížením dělení buněk v kořeni pomocí depolymerace aktinu, blokují vnitrobuněčnou dynamiku PIN proteinů, ale nemají vliv na rozmístění (tedy polaritu) Pin1 a Pin2 (viz. níže; Rahman et al. 2007).

7.2.2 Latrunculin B

Latrunculin B je vysoce specifický toxin izolovaný z mořské houby, který efektivně depolymeruje aktinová filamenta u všech zkoumaných eukaryot. Latrunculin B po hodině působení na semenáček *A. thaliana* způsobil depolymeraci většiny F-aktinových filament v kořenových buňkách (Baluška et al. 2001). Pakliže je semenáček přímo pěstovaný na médiu s latrunculinem B až do doby, kdy je dokončen jeho postembryotický vývoj, buď za světla, nebo tmy, dochází u rostlinky k takzvanému dwarfismu, kdy je rostlina po morfologické stránce relativně v pořádku, ale je extrémně malého vzrůstu. To dokazuje, že F-aktin není pro správný polární růst rostliny nezbytný (Baluška et al. 2001). Zdá se tedy, že transport váčků a následná exocytóza může být zprostředkována také tubulinovým cytoskeletem.

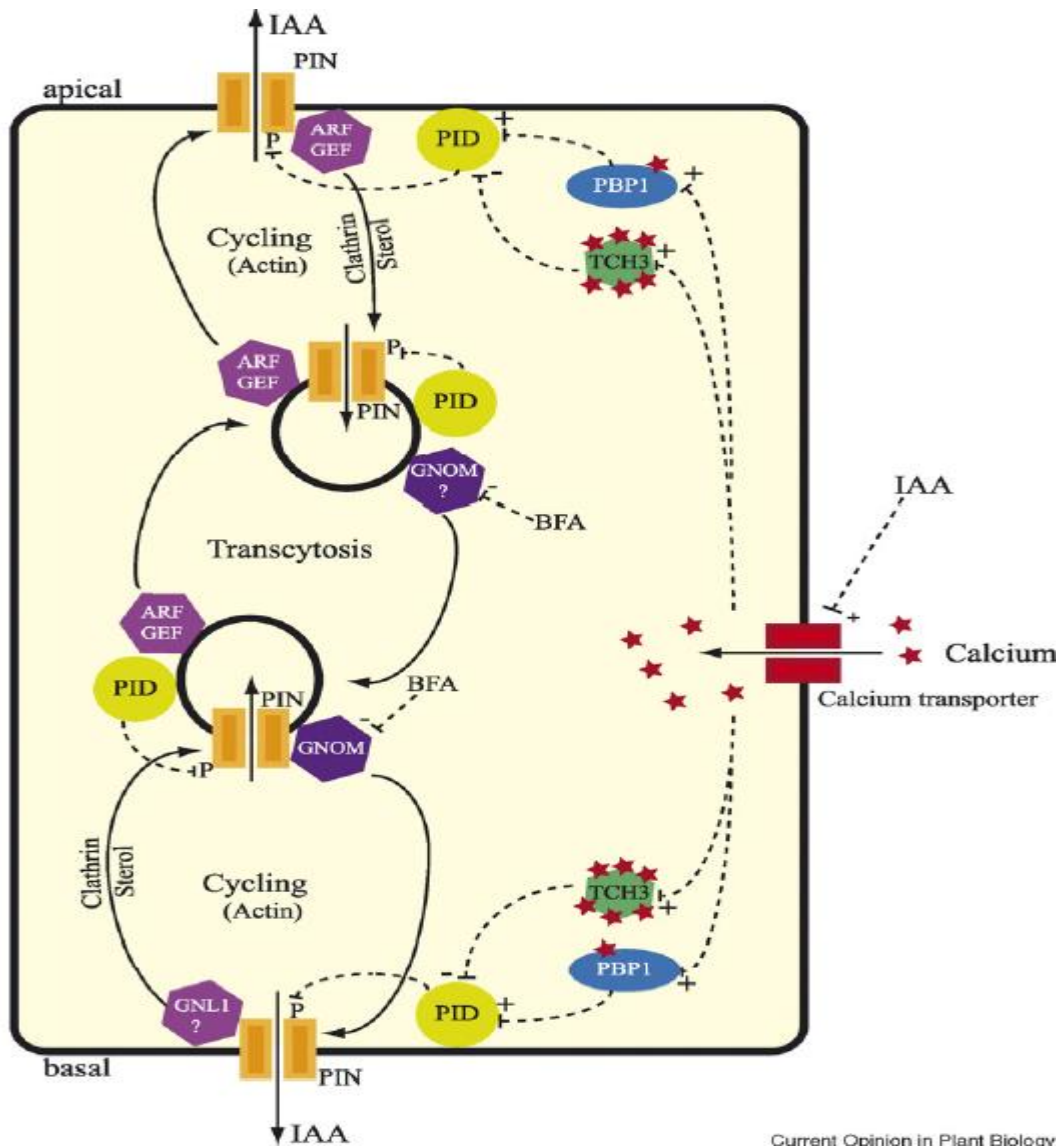
7.3 Role aktinu v lokalizaci a cílení Pin1, Pin2, Aux1

U vzrostného vrcholu *A. thaliana* se Pin2 vyskytuje ve střední, podélné vnitřní části epidermálních buněk, u kořenového vrcholu v kortikálních buňkách. IAA, NAA, NPA ani 2,4-D neměly žádný významný vliv na rozmístění Pin2, ale vlivem latrunculinu B vznikala v epidermálních buňkách velká inklusní tělíska (Rahman et al. 2007). U Pin1 po krátkém opůsobení inhibitory aktinu nedošlo k žádným viditelným změnám v lokalizaci (Geldner et al. 2001), po dlouhém vlivu inhibitorů také ne. U Pin2 byly provedeny obdobné experimenty. Z výsledků plyne, že lokalizace Pin1 a Pin2 je nezávislá na aktinu (Rahman et al. 2007). Auxin se pohybuje celou rostlinou pomocí transmembránových proteinů, do kterých patří i PIN proteiny, které jsou pro něj esenciální, ale mechanismus jejich lokalizace je stále nejasný.

PIN proteiny se v kořeni *A. thaliana* pohybují dynamicky mezi plasmatickou membránou a endosomy. To bylo demonstrováno využitím brefeldinu A (Geldner et al. 2001), který zablokuje exocytózu závislou na G-proteinu typu ARF (prostřednictvím ARF-GEF). Bazální recyklování Pin1 v pokožkových buňkách kořene vyžaduje k pohybu ARF-GEF GNOM citlivý k brefeldinu A a apikální cyklování Pin2 je zprostředkováváno ARF-GEF proteiny odolnými vůči brefeldinu A (Obr. 2; Geldner et al. 2003).

V kortexových buňkách jsou Pin1 i Pin2 přítomny na stejné, bazální straně membrány. Aux proteiny cyklují mezi membránou a endosomy také prostřednictvím ARF-GEF proteinů, které jsou odolné vůči brefeldinu A (Kleine-Vehn et al. 2006). Rozhodující pro distribuci PIN proteinů je serin/threonin protein kináza PID (*PINOID*; Friml et al. 2004). S vyšší aktivitou PID

byl indukován přesun PIN proteinů z bazální na apikální stranu kořenových buněk u *A. thaliana* (Friml et al. 2004).



Obr. 2 : Model funkce PIN proteinů jakožto klíčového regulátoru dynamického umístění PIN v buněčné membráně. PIN proteiny cyklují mezi endosomem a plasmatickou membránou prostřednictvím exocytózy a clathrinem zprostředkované endocytózy. Toto cyklování vyžaduje ARF-GEF proteiny, specifický pro PIN jsou ARF-GEF proteiny GNOM. PIN na bazální membráně buňky vyžaduje brefeldin citliví ARF-GEF GNOM pro zprostředkování exocytózy. PIN na apikální membráně vyžaduje brefeldin rezistentní ARF-GEF GNOM. Transport PIN proteinů mezi oběma membránami je zajištěn transcytózou. PID protein slouží k fosforylaci PIN, určeného pro endocytózu. Aktivita PID je ovlivňována Ca^{2+} ionty (Robert and Offringa 2008).

8. Exocytóza jako hlavní mechanismus buněčné morfogeneze

Exocytotické váčky lze chápat jako membránové přepravníky, které jsou schopné fúzovat s plasmatickou membránou, a tak do míst určených přepravovat různé složky membrán.

Tyto váčky mohou vznikat v různých membránových kompartmentech, v závislosti na buněčném typu, a také cesta váčku může být rozmanitá. Například u *A. thaliana* jsou SNARE (obsahují tento typ receptoru) váčky vedeny minimálně třemi cestami (Uemura et al. 2004, shrnuto v Žárský et al. 2009).

Jedním z kompartmentů, který dává vzniknout váčkům, je trans-Golgiho systém. Ten pravděpodobně slouží navíc jako časný endosom a recyklující endosom. Prvním dobře charakterizovaným recyklujícím endosomem byl na ARF-GEF (auxin response factor guanin exchange factoru) GNOM závislý kompartment, který se účastní cyklování PIN proteinů (Geldner et al. 2003). Tyto PIN proteiny se dovnitř buňky dostávají clathrinem zprostředkovanou endocytózou (Dhonukshe et al. 2007). Následná doprava PIN proteinů k plasmatické membráně je závislá na přítomnosti inhibitoru exocytózy-brefeldinu A.

Další důležitou součástí rostlinné membrány je Aux1 přenašeč, který je transportován SNX1/pozdním endosomem.

9. Cyklující domény v rostlinných buňkách

Většina součástí plasmalemy plně diferencovaných rostlinných buněk kontinuálně cykluje uvnitř samotné buňky. Mohou cyklovat rychle nebo pomalu, dle typu váčku, například clathrinové váčky cyklují s poločasem cca 50 s. U *Metazoi* mají Ca^{2+} ionty vliv na změnu mezi rychlým a pomalým cyklováním v buňce, obdobně by tomu mohlo být i u rostlin. Nejlépe prostudovanými recyklujícími doménami u rostlin jsou ty, které se účastní polárního transportu auxinů, např. PIN transporter, jehož endocytóza je regulována samotným auxinem (Geldner et al. 2003, Paciorek et al. 2005).

Vliv auxinu a ROP proteinů na endocytózu by mohl mít souvislost s aktivací auxinu prostřednictvím dráhy receptor ser/thr kinázy PRONE-GEF (Žárský and Fowler 2009). Některé proteiny jsou polarizovány právě díky endocytóze. Nově nasyntetizovaný Pin1 se u *A. thaliana* nachází ve všech místech plasmalemy kořenových buněk, ale posléze je směřován endocytózou přes pozdní endosom do daných míst (Dhonukshe et al. 2008b). Transport PIN a AUX proteinů do míst membrány je také závislý na sterolovém složení membrány (Souter et al. 2002).

10. Závěr

V průběhu polárního růstu a morfogeneze se musí buňka přestavovat a přizpůsobovat na základě růstových signálů, jedním z nich je i fytohormon auxin. Ten hraje také velice významnou roli v přestavbách aktinových vláken. Právě dynamické přestavby v aktinovém cytoskeletu jsou nedílnou součástí zajišťující polární růst. Proto je na místě, zabývat se vzájemnými interakcemi auxinu a aktinu.

Velkou rychlostí se dopředu posunul také výzkum exocytózy a endocytózy. Jsou zkoumány funkce, vlastnosti jednotlivých membránových kompartmentů, u některých se jejich existence předpovídá. S rozvojem molekulární biologie, jakožto nástroje moderní vědy, budou do budoucna detailně zmapovány transportní proteiny auxinu, které by mohly vnést světlo do prozatím nejasných principů. S ohledem na obšírnost tématu regulace nukleace aktinu jsem této tematicce nenechala příliš prostoru. Je ale na místě připomenout, že v celé rostlinné buňce se RHO GTPázy účastní, dalo by se s nadsázkou říci, všech buněčných procesů. I jejich samotná regulace je složitá a je studována na mnoha modelových organismech. Dá se ale předpokládat, že množství objevených proteinů, které se účastní regulačních drah aktinové nukleace, a nejen té, bude přibývat.

S využitím inhibitorů se v posledních letech objevují stále nové informace o vlivu inhibitorů na polární transport auxinu, poukazuje se tak na další možné mechanismy jejich regulačního účinku. Mnoho z inhibitorů má za následek i změny v aktinové struktuře. Tato fakta mohou vést k domněnce, že inhibitory transportu auxinu mohou fungovat jako blok při cyklování transportních váček mezi plasmatickou membránou a vnitřními membránovými kompartmenty. Tím je zabráněno dopravě auxinových přenašečů do potřebných míst a je tak narušen polární transport auxinu. Mechanismus inhibitorů při regulaci cyklování váček je doposud nejasný a můžeme očekávat, že v následujících letech bude podroben intenzivnímu výzkumu.

11. Seznam použité literatury

- Agnew, B. J., L. S. Minamide & J. R. Bamburg (1995) Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem*, 270, 17582-7.
- Aizawa, H., Y. Kishi, K. Iida, M. Sameshima & I. Yahara (2001) Cofilin-2, a novel type of cofilin, is expressed specifically at aggregation stage of Dictyostelium discoideum development. *Genes Cells*, 6, 913-21.
- Aizawa, H., K. Sutoh & I. Yahara (1996) Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in Dictyostelium. *J Cell Biol*, 132, 335-44.
- Aloni, R., M. Langhans, E. Aloni, E. Dreieicher & C. I. Ullrich (2005) Root-synthesized cytokinin in Arabidopsis is distributed in the shoot by the transpiration stream. *J Exp Bot*, 56, 1535-44.
- Aloni, R., M. Langhans, E. Aloni & C. I. Ullrich (2004) Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. *Planta*, 220, 177-82.
- Aloni, R., K. Schwalm, M. Langhans & C. I. Ullrich (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Planta*, 216, 841-53.
- Bainbridge, K., S. Guyomarc'h, E. Bayer, R. Swarup, M. Bennett, T. Mandel & C. Kuhlemeier (2008) Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev*, 22, 810-23.
- Baluska, F., J. Jasik, H. G. Edelman, T. Salajova & D. Volkmann (2001) Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Dev Biol*, 231, 113-24.
- Baluska, F., J. Salaj, J. Mathur, M. Braun, F. Jasper, J. Samaj, N. H. Chua, P. W. Barlow & D. Volkmann (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Dev Biol*, 227, 618-32.
- Beall, B. & J. M. Chalovich (2001) Fesselin, a synaptopodin-like protein, stimulates actin nucleation and polymerization. *Biochemistry*, 40, 14252-9.
- Bear, J. E., J. F. Rawls & C. L. Saxe, 3rd (1998) SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J Cell Biol*, 142, 1325-35.
- Bennett, M. J., A. Marchant, H. G. Green, S. T. May, S. P. Ward, P. A. Millner, A. R. Walker, B. Schulz & K. A. Feldmann (1996) Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 273, 948-50.
- Berken, A., C. Thomas & A. Wittinghofer (2005) A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature*, 436, 1176-80.
- Blakeslee, J. J., A. Bandyopadhyay, O. R. Lee, J. Mravec, B. Titapiwatanakun, M. Sauer, S. N. Makam, Y. Cheng, R. Bouchard, J. Adamec, M. Geisler, A. Nagashima, T. Sakai, E. Martinoia, J. Friml, W. A. Peer & A. S. Murphy (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19, 131-47.
- Carlsson, L., L. E. Nystrom, I. Sundkvist, F. Markey & U. Lindberg (1977) Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol*, 115, 465-83.
- de Hostos, E. L., B. Bradtke, F. Lottspeich, R. Guggenheim & G. Gerisch (1991) Coronin, an actin binding protein of Dictyostelium discoideum localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J*, 10, 4097-104.
- Dhonukshe, P., F. Aniento, I. Hwang, D. G. Robinson, J. Mravec, Y. D. Stierhof & J. Friml (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol*, 17, 520-7.
- Dhonukshe, P., I. Grigoriev, R. Fischer, M. Tominaga, D. G. Robinson, J. Hasek, T. Paciorek, J. Petrasek, D. Seifertova, R. Tejos, L. A. Meisel, E. Zazimalova, T. W. Gadella, Jr., Y. D. Stierhof, T. Ueda, K. Oiwa, A. Akhmanova, R. Brock, A. Spang & J. Friml (2008a) Auxin transport inhibitors impair vesicle

- motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 4489-94.
- Dhonukshe, P., H. Tanaka, T. Goh, K. Ebine, A. P. Mahonen, K. Prasad, I. Blilou, N. Geldner, J. Xu, T. Uemura, J. Chory, T. Ueda, A. Nakano, B. Scheres & J. Friml (2008b) Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature*, 456, 962-6.
- Dong, C. H., G. X. Xia, Y. Hong, S. Ramachandran, B. Kost & N. H. Chua (2001) ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13, 1333-46.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D. C. Amberg, C. Boone & A. Bretscher (2002) Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol*, 4, 260-9.
- Evans, M. L. (1991) Gravitropism: interaction of sensitivity modulation and effector redistribution. *Plant Physiol*, 95, 1-5.
- Field, C., R. Li & K. Oegema (1999) Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 68-80.
- Frank, M., C. Egile, J. Dyachok, S. Djakovic, M. Nolasco, R. Li & L. G. Smith (2004) Activation of Arp2/3 complex-dependent actin polymerization by plant proteins distantly related to Scar/WAVE. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16379-84.
- Friml, J. & K. Palme (2002) Polar auxin transport--old questions and new concepts? *Plant Mol Biol*, 49, 273-84.
- Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa & G. Jurgens (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426, 147-53.
- Friml, J., X. Yang, M. Michniewicz, D. Weijers, A. Quint, O. Tietz, R. Benjamins, P. B. Ouwerkerk, K. Ljung, G. Sandberg, P. J. Hooykaas, K. Palme & R. Offringa (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*, 306, 862-5.
- Fu, Y., H. Li & Z. Yang (2002) The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis. *Plant Cell*, 14, 777-94.
- Galweiler, L., C. Guan, A. Muller, E. Wisman, K. Mendgen, A. Yephremov & K. Palme (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282, 2226-30.
- Geisler, M., J. J. Blakeslee, R. Bouchard, O. R. Lee, V. Vincenzetti, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwatanakun, W. A. Peer, A. Bailly, E. L. Richards, K. F. Ejendal, A. P. Smith, C. Baroux, U. Grossniklaus, A. Muller, C. A. Hrycyna, R. Dudler, A. S. Murphy & E. Martinoia (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J*, 44, 179-94.
- Geldner, N., N. Anders, H. Wolters, J. Keicher, W. Kornberger, P. Muller, A. Delbarre, T. Ueda, A. Nakano & G. Jurgens (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, 112, 219-30.
- Geldner, N., J. Friml, Y. D. Stierhof, G. Jurgens & K. Palme (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413, 425-8.
- Goldberg, M. B. (2001) Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 595-626, table of contents.
- Hales, K. G., E. Bi, J. Q. Wu, J. C. Adam, I. C. Yu & J. R. Pringle (1999) Cytokinesis: an emerging unified theory for eukaryotes? *Curr Opin Cell Biol*, 11, 717-25.
- Hopmann, R. & K. G. Miller (2003) A balance of capping protein and profilin functions is required to regulate actin polymerization in *Drosophila* bristle. *Mol Biol Cell*, 14, 118-28.
- Iida, K. & I. Yahara (1999) Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, 4, 21-32.
- Johnson, D. I. (1999) Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 54-105.

- Jones, M. A., J. J. Shen, Y. Fu, H. Li, Z. Yang & C. S. Grierson (2002) The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell*, 14, 763-76.
- Jung, G., K. Remmert, X. Wu, J. M. Volosky & J. A. Hammer, 3rd (2001) The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol*, 153, 1479-97.
- Jungbluth, A., C. Eckerskorn, G. Gerisch, F. Lottspeich, S. Stocker & A. Schweiger (1995) Stress-induced tyrosine phosphorylation of actin in Dictyostelium cells and localization of the phosphorylation site to tyrosine-53 adjacent to the DNase I binding loop. *FEBS Lett*, 375, 87-90.
- Kahn, R. A., C. J. Der & G. M. Bokoch (1992) The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *FASEB J*, 6, 2512-3.
- Karakesisoglou, I., M. Schleicher, B. C. Gibbon & C. J. Staiger (1996) Plant profilins rescue the aberrant phenotype of profilin-deficient Dictyostelium cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 34, 36-47.
- Kishi, Y., C. Clements, D. C. Mahadeo, D. A. Cotter & M. Sameshima (1998) High levels of actin tyrosine phosphorylation: correlation with the dormant state of Dictyostelium spores. *J Cell Sci*, 111 (Pt 19), 2923-32.
- Klahre, U. & N. H. Chua (1999) The Arabidopsis actin-related protein 2 (AtARP2) promoter directs expression in xylem precursor cells and pollen. *Plant Mol Biol*, 41, 65-73.
- Kleine-Vehn, J., P. Dhonukshe, R. Swarup, M. Bennett & J. Friml (2006) Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell*, 18, 3171-81.
- Lassing, I. & U. Lindberg (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, 314, 472-4.
- Lee, L., S. K. Klee, M. Evangelista, C. Boone & D. Pellman (1999) Control of mitotic spindle position by the *Saccharomyces cerevisiae* formin Bni1p. *J Cell Biol*, 144, 947-61.
- Maciver, S. K. & P. J. Hussey (2002) The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol*, 3, reviews3007.
- Maher, E. P. & S. J. Martindale (1980) Mutants of Arabidopsis thaliana with altered responses to auxins and gravity. *Biochem Genet*, 18, 1041-53.
- Mathur, J. (2005) The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *Bioessays*, 27, 377-87.
- Mathur, J. & N. H. Chua (2000) Microtubule stabilization leads to growth reorientation in Arabidopsis trichomes. *Plant Cell*, 12, 465-77.
- Mathur, J., N. Mathur, B. Kernebeck & M. Hulskamp (2003a) Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15, 1632-45.
- Mathur, J., N. Mathur, V. Kirik, B. Kernebeck, B. P. Srinivas & M. Hulskamp (2003b) Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development*, 130, 3137-46.
- McCurdy, D. W., D. R. Kovar & C. J. Staiger (2001) Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma*, 215, 89-104.
- McKim, K. S., C. Matheson, M. A. Marra, M. F. Wakarchuk & D. L. Baillie (1994) The *Caenorhabditis elegans* unc-60 gene encodes proteins homologous to a family of actin-binding proteins. *Mol Gen Genet*, 242, 346-57.
- McKinney, E. C., M. K. Kandasamy & R. B. Meagher (2001) Small changes in the regulation of one Arabidopsis profilin isoform, PRF1, alter seedling development. *Plant Cell*, 13, 1179-91.
- Mockrin, S. C. & E. D. Korn (1980) Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*, 19, 5359-62.
- Mravec, J., M. Kubes, A. Bielach, V. Gaykova, J. Petrasek, P. Skupa, S. Chand, E. Benkova, E. Zazimalova & J. Friml (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development*, 135, 3345-54.

- Muday, G. K. & A. S. Murphy (2002) An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell*, 14, 293-9.
- Nishida, E., S. Maekawa & H. Sakai (1984) Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry*, 23, 5307-13.
- Nordstrom, A., P. Tarkowski, D. Tarkowska, R. Norbaek, C. Astot, K. Dolezal & G. Sandberg (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8039-44.
- Ojangu, E. L., K. Jarve, H. Paves & E. Truve (2007) *Arabidopsis thaliana* myosin XIX is involved in root hair as well as trichome morphogenesis on stems and leaves. *Protoplasma*, 230, 193-202.
- Okada, K., J. Ueda, M. K. Komaki, C. J. Bell & Y. Shimura (1991) Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation. *Plant Cell*, 3, 677-684.
- Ortuño, A., J. Sánchez-Bravo, J. R. Moral, M. Acosta & F. Sabater (1990) Changes in the concentration of indole-3-acetic acid during the growth of etiolated lupin hypocotyls. *Physiologia Plantarum*, 78, 211-217.
- Paciorek, T., E. Zazimalova, N. Ruthardt, J. Petrasek, Y. D. Stierhof, J. Kleine-Vehn, D. A. Morris, N. Emans, G. Jurgens, N. Geldner & J. Friml (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, 435, 1251-6.
- Petrasek, J., A. Cerna, K. Schwarzerova, M. Elckner, D. A. Morris & E. Zazimalova (2003) Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiol*, 131, 254-63.
- Petrasek, J., J. Mravec, R. Bouchard, J. J. Blakeslee, M. Abas, D. Seifertova, J. Wisniewska, Z. Tadele, M. Kubes, M. Covanova, P. Dhonukshe, P. Skupa, E. Benkova, L. Perry, P. Krecek, O. R. Lee, G. R. Fink, M. Geisler, A. S. Murphy, C. Luschnig, E. Zazimalova & J. Friml (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, 312, 914-8.
- Pickett, F. B., A. K. Wilson & M. Estelle (1990) The aux1 Mutation of *Arabidopsis* Confers Both Auxin and Ethylene Resistance. *Plant Physiol*, 94, 1462-1466.
- Pollard, T. D. & G. G. Borisy (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112, 453-65.
- Poupel, O., H. Boleti, S. Axisa, E. Couture-Tosi & I. Tardieux (2000) Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol Biol Cell*, 11, 355-68.
- Prokhnovsky, A. I., V. V. Peremyslov & V. V. Dolja (2008) Overlapping functions of the four class XI myosins in *Arabidopsis* growth, root hair elongation, and organelle motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 19744-9.
- Pruyne, D., L. Gao, E. Bi & A. Bretscher (2004a) Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 15, 4971-89.
- Pruyne, D., A. Legesse-Miller, L. Gao, Y. Dong & A. Bretscher (2004b) Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 559-91.
- Rahman, A., A. Bannigan, W. Sulaman, P. Pechter, E. B. Blancaflor & T. I. Baskin (2007) Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant J*, 50, 514-28.
- Ramachandran, S., H. E. Christensen, Y. Ishimaru, C. H. Dong, W. Chao-Ming, A. L. Cleary & N. H. Chua (2000) Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124, 1637-47.
- Renault, L., B. Bugyi & M. F. Carlier (2008) Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol*, 18, 494-504.
- Robert, H. S. & J. Friml (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nat Chem Biol*, 5, 325-32.
- Robert, H. S. & R. Offringa (2008) Regulation of auxin transport polarity by AGC kinases. *Curr Opin Plant Biol*, 11, 495-502.

- Sabatini, S., D. Beis, H. Wolkenfelt, J. Murfett, T. Guilfoyle, J. Malamy, P. Benfey, O. Leyser, N. Bechtold, P. Weisbeek & B. Scheres (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99, 463-72.
- Safer, D., R. Golla & V. T. Nachmias (1990) Isolation of a 5-kilodalton actin-sequestering peptide from human blood platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2536-40.
- Sally, W. & M. David (2004) Targeting of auxin carriers to the plasma membrane: effects of monensin on transmembrane auxin transport in Cucurbita pepo L. tissue. *Planta*, 193, Number 2, 194-202.
- Sieberer, B. J., A. C. Timmers, F. G. Lhuissier & A. M. Emons (2002) Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of Medicago truncatula root hairs. *Plant Physiol*, 130, 977-88.
- Small, J. V., T. Stradal, E. Vignal & K. Rottner (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*, 12, 112-20.
- Souter, M., J. Topping, M. Pullen, J. Friml, K. Palme, R. Hackett, D. Grierson & K. Lindsey (2002) hydra Mutants of Arabidopsis are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell*, 14, 1017-31.
- Symons, M., J. M. Derry, B. Karlak, S. Jiang, V. Lemahieu, F. McCormick, U. Francke & A. Abo (1996) Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, 84, 723-34.
- Szymanski, D. B. (2005) Breaking the WAVE complex: the point of Arabidopsis trichomes. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 103-12.
- Tanaka, H., P. Dhonukshe, P. B. Brewer & J. Friml (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2738-54.
- Titapiwatanakun, B., J. J. Blakeslee, A. Bandyopadhyay, H. Yang, J. Mravec, M. Sauer, Y. Cheng, J. Adamec, A. Nagashima, M. Geisler, T. Sakai, J. Friml, W. A. Peer & A. S. Murphy (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J*, 57, 27-44.
- Uemura, T., T. Ueda, R. L. Ohniwa, A. Nakano, K. Takeyasu & M. H. Sato (2004) Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct*, 29, 49-65.
- Vernoud, V., A. C. Horton, Z. Yang & E. Nielsen (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 131, 1191-208.
- Vidali, L., S. T. McKenna & P. K. Hepler (2001) Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Mol Biol Cell*, 12, 2534-45.
- Volkman, D. & F. Baluska (1999) Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks. *Microsc Res Tech*, 47, 135-54.
- Werner, T., V. Motyka, V. Laucou, R. Smets, H. Van Onckelen & T. Schmulling (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*, 15, 2532-50.
- Xu, Q., M. Ibarra, D. Mahadeo, C. Shaw, E. Huang, A. Kuspa, D. Cotter & G. Shaulsky (2004) Transcriptional transitions during Dictyostelium spore germination. *Eukaryot Cell*, 3, 1101-10.
- Yin, H. L., J. H. Hartwig, K. Maruyama & T. P. Stossel (1981) Ca²⁺ control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J Biol Chem*, 256, 9693-7.
- Zarsky, V., F. Cvrckova, M. Potocky & M. Hala (2009) Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytol*, 183, 255-72.
- Žárský, V. & J. Fowler. 2009. *ROP (Rho-related protein from plants) GTPases for spatial control of root hair morphogenesis*. Berlin, Germany: Springer.