

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Štěpánka Kebrlová

Úloha cytoskeletu v auxinovém transportu
The role of cytoskeleton in auxin transport

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24.8.2017

Štěpánka Kebrlová

Poděkování:

Chtěla bych velice poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Petráškovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, a zejména velkou trpělivost během psaní této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu a pomoc, které se mi dostalo vždy, když jsem ji nejvíce potřebovala.

Abstrakt

Auxiny jsou třídou rostlinných hormonů (fytormonů), z nichž hlavním přirozeně se vyskytujícím auxinem je indol-3-octová kyselina (IAA). Auxiny se kvůli jejich vlivu na regulaci dělení a prodlužování buněk podílejí na mnoha vývojových a fyziologických procesech jako je například vývoj embrya, tvorba cévního pletiva a tropizmy. Tyto účinky jsou často zprostředkovány směrovaným transportem auxinu, který je tak přítomen v široké škále koncentrací v buňkách i celých pletivech. Auxin je lokálně transportován z buňky do buňky z malé části difuzí a většinu transportu pak zprostředkují auxinové přenašeče umístěné na plazmatické membráně (PM). Mezi ně patří přenašeče rodiny AUX1/LAX (AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1), pomáhající toku auxinu do buňky a přenašeče rodin PIN-FORMED (PIN) a ABCB/PGP (z anglického ATP-binding cassette subfamily B/P-glycoprotein), účastníci se toku auxinu směrem z buňky. Tyto proteiny jsou do různé míry závislé na systému membránových váčků, putujících podél aktinového cytoskeletu, který zajišťuje také tzv. cyklování těchto váčků mezi PM a endozomálním prostorem buněk. Regulace transportu auxinu je možná na více úrovních zahrnujících ovlivnění exprese genů pro přenašečové proteiny, regulaci jejich umístování a aktivity a degradace. Transport auxinu může být regulován auxinem vlastním, prostřednictvím jeho účinku na genovou expresi přenašečových proteinů, ale také jeho vlivem na tvarování aktinových filament. Důležitost cytoskeletu v transportu auxinu je studována na základě pokusů s různými inhibitory a je také předmětem této práce. Cílem této práce je tedy podat aktuální obraz poznání mechanismů vázaných na cytoskelet, které se u rostlin účastní lokalizace a regulace funkce auxinových přenašečů.

Klíčová slova: auxin, cytoskelet, auxinové přenašeče, váčkový transport, plazmatická membrána, endocytóza, exocytóza

Abstract

Auxins are a class of plant hormones (phytohormones) with their most frequently endogenously occurring representative indol-3-acetic acid (IAA). Because of their influence on division and elongation of cells, auxins play an important role in many developmental and physiological processes such as embryo development, vascular tissue patterning and tropisms. These effects are often mediated by polar auxin transport, which results in a wide variety of auxin concentrations in cells and entire tissues. Transport of auxin from cell to cell is partly mediated by diffusion, the prevalence of auxin transport is however mediated by auxin carriers located on plasma membrane (PM). Among such carriers belong AUX1/LAX (AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1) transporter family, which helps with auxin influx and families of PIN-FORMED (PIN) and ABCB/PGP (ATP-binding cassette subfamily B/P-glycoprotein) transporters, which take part in auxin efflux. These proteins are in various degrees dependent on a system of membrane vesicles, trafficking along actin cytoskeleton, which ensures among others cycling of these vesicles among PM and endosomal cell space. Regulation of auxin transport is possible on multiple levels including influencing of gene expression for carrier proteins and regulation of their localization, activity and degradation. Auxin transport can even be regulated by auxin itself, both through its effects on gene expression of carrier proteins and its influence on shaping of actin filaments. Importance of cytoskeleton in auxin transport is studied through experiments with various inhibitors and is also described in this thesis. The aim of this thesis is to provide an up-to-date overview on the cytoskeleton-based mechanisms participating in the localization and regulation of function of auxin carriers in plants.

Key words: auxin, cytoskeleton, auxin carriers, vesicular trafficking, plasma membrane, endocytosis, exocytosis

OBSAH

1. Úvod	1
2. Auxin	3
2.1 Auxin ve vývoji rostlin.....	3
2.2 Auxinové přenašeče	4
2.3 Inhibitory auxinového transportu	6
3. Cytoskelet	6
3.1 Cytoskelet jako dynamická kostra rostlinných buněk	6
3.2 Aktinová filamenta.....	7
3.3 Mikrotubuly.....	7
3.4 Role cytoskeletu v auxinovém transportu	8
4. Role cytoskeletu při umístování auxinových přenašečů	9
4.1 Polární distribuce auxinových přenašečů a jejich pohyblivost v PM.....	9
4.2 Závislost lokalizace přenašečů v PM na cytoskeletu.....	10
5. Role cytoskeletu v transportu váčků s auxinovými přenašeči	11
5.1 Exocytóza a endocytóza	11
5.2 Závislost váčkového transportu na cytoskeletu a vliv auxinu na cytoskelet	11
5.3 Váčkový transport přenašečů PIN	12
5.3.1 Regulace váčkového transportu pomocí ARF-GEF	12
5.3.2 Cyklování přenašečových proteinů PIN.....	14
5.4 Váčkový transport přenašečů AUX1	14
6. Role cytoskeletu v degrační dráze auxinových přenašečů	15
7. Závěr	17
8. Seznam použité literatury	18

Seznam použitých zkratk

ABCB/PGP.....	přenašeč auxinu z buňky (ATP-binding cassette subfamily B/P-glycoprotein)
ABPs.....	aktin vazebné proteiny (actin binding proteins)
ARF-GEF.....	ribosilation factor GDP exchange factor
ATP.....	adenosintrifosfát
AUX1/LAX.....	přenašeč auxinu do buňky (AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1)
AXR4	pomocný protein endoplasmatického retikula (AUXIN-RESISTANT4)
BFA.....	brefeldin A
CLASP.....	cytoplasmic linker associated protein
GNOM.....	protein ARF-GEF
IAA.....	indol-3-octová kyselina
NPA.....	1-N-naftylftalamová kyselina
PAT.....	polární auxinový transport (z anglického polar auxin transport)
PBA.....	2- (1-pyrenoyl) benzoová kyselina
PIN.....	přenašeč auxinu z buňky (PIN-FORMED)
PM.....	plazmatická membrána
PVC.....	prevakuolární kompartment
SNX.....	SORTING NEXIN 1
TGN.....	trans-Golgi síť (z anglického Trans-Golgi network)
TIBA.....	2,3,5-trijodbenzoová kyselina
VPS29.....	VACUOLAR PROTEIN SORTING 29

1. Úvod

V procesech regulace vývojových a fyziologických procesů hrají u rostlin důležitou funkci rostlinné hormony, tzv. fytohormony. Tato práce je zaměřená na auxiny, jednu z nejdéle studovaných skupin fytohormonů. Auxiny jsou chemické látky, které mohou být jak přírodní, tak i syntetické. Hlavním přirozeně se vyskytujícím auxinem je indol-3-octová kyselina (IAA). Auxin je prvním fytohormonem objeveným v rostlinách a kvůli jeho pozorovaným účinkům byl pojmenován podle řeckého slova *auxein*, v překladu růst, prodlužovat se (Went et. al. 1926). Auxiny se podílejí hlavně na regulaci procesů během embryogeneze a organogeneze, mají vliv na dělení a prodlužování buněk, tvorbu cévního pletiva, udržování apikální dominance a v neposlední řadě zprostředkují odpověď na vnější podněty v podobě tropizmů, jak shrnuto ve Vanneste and Friml (2009). Tyto účinky jsou do značné míry uskutečněny proto, že auxiny jsou transportovány směrovaně z buňky do buňky od místa syntézy v mladých nadzemních částech rostliny ke kořenové špičce. Takový transport pak způsobuje rozdíly v koncentraci auxinů mezi buňkami i celými pletivy. Auxin může z malé části procházet přes PM difuzí. Většinu transportu však zprostředkovávají auxinové přenašeče umístěné na PM. Mezi tyto přenašeče patří proteiny rodiny PIN, které usnadňují výtok auxinu z buňky. Zmiňovaná směrovanost auxinového toku je způsobena především aktivitou a asymetrickou distributí právě těchto proteinů, jak shrnuto ve Friml and Palme (2002). Mezi další přenašeče pro výtok auxinu z buňky patří proteiny ABCB/PGP a pro vtok auxinu do buňky pak proteiny rodiny AUX1/LAX. Všechny tyto přenašeče jsou integrálními membránovými proteiny, a proto jsou dopravovány do a z PM pomocí váčků, které putují podél aktinových filament, jak shrnuto v Muday and Murphy (2002).

Ukázalo se, že auxinové přenašeče zřejmě cyklují mezi PM a endozomy. Tento jev je nejlépe popsán pro proteiny PIN a vyžaduje regulaci pomocí ARF-GEF, třídy guanin nukleotid výměnných faktorů. Cílení PIN1, který je umístěn v kořeni na bazální PM, je regulováno proteinem GNOM (Kleine-Vehn et al. 2008b), patřícím mezi ARF-GEF. Jiné ARF-GEF pak umisťují další proteiny PIN a AUX1 do apikální PM. Pomocí ARF-GEF také probíhá třídění váčků s nákladem přenašečů do dráhy směřující k lytické vakuole pro degradaci. Tato dráha prochází přes prevakuolární kompartment (PVC), ze kterého ale může ještě dojít k návratu nákladu pomocí retromerního komplexu (Jaillais et al. 2006, Kleine-Vehn et al. 2008c).

Regulace transportu auxinu je možná na více úrovních. Hlavní mechanismus představuje regulace genové exprese auxinových přenašečů. Dále pak regulace umístění přenašečových proteinů do PM, kam patří výše zmíněná regulace pomocí ARF-GEF. Také bylo ukázáno, že

konkrétně pro přenašečový protein PIN2 může být důležitá jeho ubikvitinace regulující jeho transport a tím i množství na PM (Abas et al. 2006). Pro umístění přenašečů v PM byla prokázána důležitost propojení s buněčnou stěnou (Feraru et al. 2011, Martinière et al. 2012) a také důležitost sterolového složení membrány (Men et al. 2008), které má vliv i na váčkový transport AUX1 (Willemsen et al. 2003). Pro změnu aktivity přenašečových proteinů PIN a zřejmě také pro jejich cílení na PM je pak důležitá jejich fosforylace pomocí protein kinázy PINOID (PID) a k ní opačně působící funkce fosfatázy PP2A, defosforylující tyto proteiny (Michniewicz et al. 2007). Další možnost regulace transportu představuje samotný auxin, který má schopnost aktivovat expresi genů jak pro přenašečové proteiny, tak pro již zmíněnou protein kinázu PINOID. Auxin také může inhibovat endocytózu při cyklování proteinů PIN a dokonce může způsobovat i degradaci vlastních přenašečů (Paciorek et al. 2005). Schopnost auxinu regulovat svůj transport byla dále potvrzena zjištěním, že auxin má také vliv na tvarování aktinových filament (Maisch and Nick 2007, Nick, Han and An 2009), které je zásadní pro váčkový transport přenašečových proteinů.

Právě důležitost cytoskeletu v transportu auxinu je předmětem této práce a je často studována na základě pokusů s inhibitory, jako jsou latrunkulin B, působící na aktinová filamenta (Baluska et al. 2001), nebo oryzalin působící na mikrotubuly. Aktinové drogy byly použity již v experimentech s koleoptile ovsa (Cande, Goldsmith and Ray 1973) a cuketovými hypokotyly (Butler et al. 1998), kde došlo k redukci polárního auxinového transportu.

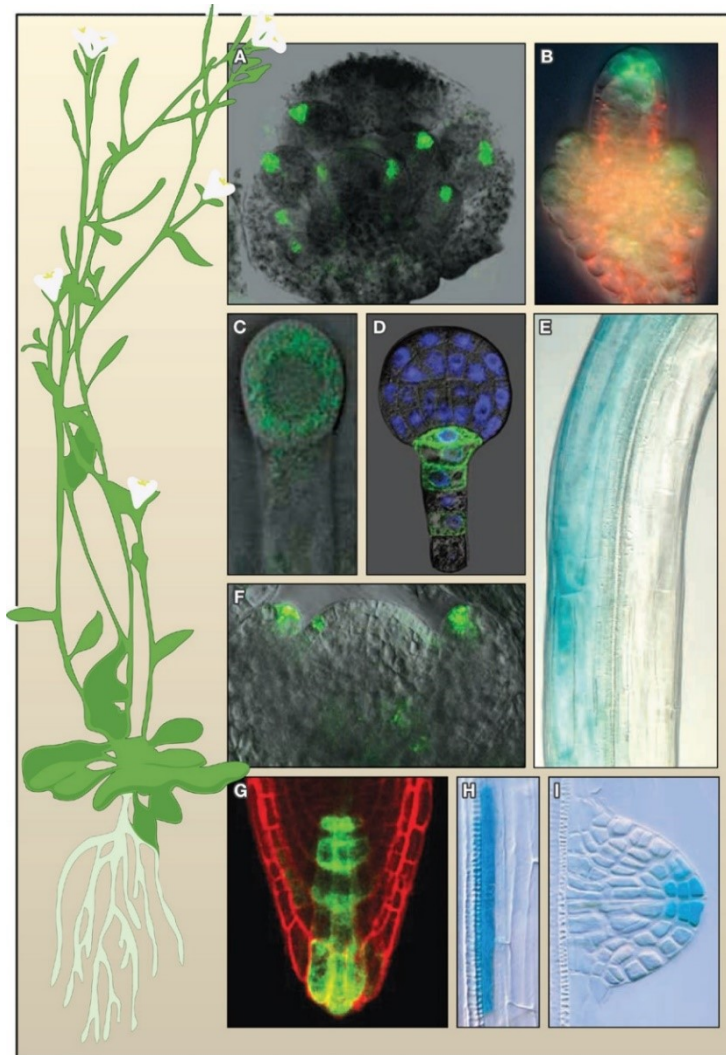
2. Auxin

2.1 Auxin ve vývoji rostlin

Auxiny jsou důležitou třídou fytohormonů. Jsou to chemické látky, které mohou být jak přírodní, tak i syntetické. Přirozeně se vyskytujícími auxiny jsou kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA), kyselina indol-3-máselná (IBA), kyselina fenylacetic (PAA) a kyselina indol-3-octová (IAA), která je z přírodních auxinů nejhojnější. Ze syntetických auxinů jsou nejčastěji používány 2,4-dichlorfenylacetic kyselina (2,4-D) a α -naftylacetic kyselina (NAA).

Auxin (IAA) je syntetizován v celé řadě buněčných typů tvořících rostlinná pletiva, je ale též po rostlině distribuován. Jeho syntéza u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* probíhá hlavně v mladých nadzemních orgánech (Aloni et al. 2003), kde jsou enzymy potřebné pro syntézu nejaktivnější. Odtud je auxin na větší vzdálenosti transportován floémem směrem k bázi stonku a pak dále ke kořenové špičce. Lokálně se pak pohybuje z buňky do buňky, a to z malé části prostou difuzí (v nedisociované podobě), většinu transportu auxinového aniontu pak zprostředkovávají auxinové přenašeče umístěné na PM (Goldsmith et al. 1977). Asymetrická distribuce přenašečů na membráně způsobuje směrování toku auxinu důležité pro mnoho základních růstových a vývojových procesů, což platí hlavně pro distribuci proteinů PIN, přenašečů pro výtoku auxinu z buněk, jak shrnuto v Zazimalová (2007) a Vanneste and Friml (2009). Pro tento jev se vžil označení polární auxinový transport (PAT, z anglického polar auxin transport). PAT je podkladem vzniku tzv. auxinových koncentračních gradientů často s nejvyšší koncentrací auxinu v oblastech největší elongace, jak shrnuto v Lacey (2017).

Auxin funguje jako klíčová signální molekula v mnoha procesech rostlinného růstu a vývoje během embryogeneze a organogeneze. Má vliv na dělení, prodloužení a diferenciaci rostlinných buněk. Polární transport auxinu hraje klíčovou roli ve vývoji embrya, cévního pletiva a kořene, dále v udržování apikální dominance, tropismech a mnohých dalších procesech (Obrázek 1).



Obrázek 1: Distribuce auxinu během vývoje v *Arabidopsis*. Zobrazení distribuce auxinu pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (A, B, C, D, F, G) a obarvené transgenní konstrukty DR5::GUS (E, H, I). Místa aktivity auxinu jsou: (A) špičky primordií květních orgánů ve vyvíjejících se květech, (B) špička primordia vajíčka, (C) apikální buňka dělící se zygoty, (D) kořenový pól embrya v globulárním stádiu, (E) zastíněná strana fotostimulovaného hypokotylu, (F) pozice počátečního vzniku orgánů a špičky květního primordia v meristému výhonku, (G) kořenový apikální meristéum, (H) počáteční místo laterálního kořene, (I) špička objevujícího se primordia laterálního kořene. Převzalo z Vanneste and Friml (2009).

2.2 Auxinové přenašeče

Pohyb auxinu z buňky do buňky je kontrolován proteiny asociovanými s PM. Vedle některých specializovanějších přenašečů, které nejsou předmětem této práce, byly v rostlinách v zásadě popsány tři hlavní přenašečové skupiny pro auxin.

První skupinu tvoří přenašeč usnadňující transport auxinu směrem do buňky, protein AUX1, a jeho homology z rodiny AUX/LAX (Bennett et al. 1996, Swarup et al. 2004). Tyto transmembránové proteiny permeázové povahy transportují auxin symportem s vodíkovými

protony (Bennett et al. 1996, Swarup et al. 2008). Protein AUX1 má v PM buněk rozdílnou lokalizaci podle toho, v jakém místě kořene se nachází (Kleine-Vehn et al. 2006). V buňkách protofloému je zvýšená míra jeho lokalizace na apikální straně (Swarup et al. 2001) proti bazálně lokalizovanému PIN1 přenašeči auxinu ven z buňky (Friml et al. 2002a), což způsobuje směrování auxinu z floému do kořenové špičky. AUX1 je kromě PM také lokalizován v membránách Golgiho aparátu a v endozomů (Kleine-Vehn et al. 2006). Směrovaný váčkový transport AUX1 je závislý na pomocném proteinu endoplasmatického retikula, AXR4 (AUXIN-RESISTANT4) (Dharmasiri et al. 2006).

Druhá skupina zahrnuje proteiny z rodiny PIN, které usnadňují výtok auxinu z buněk. Do této rodiny patří u *Arabidopsis thaliana* celkem osm proteinů, PIN1-8. Jimi zprostředkovaný transport auxinu je zřejmě založený na principu tzv. gradientové pumpy a tedy nevyžaduje přísun ATP (adenosintrifosfát), což je velice výhodné hlavně v rostoucích pletivech, kde je ATP nedostatek, jak shrnuto v Zazímalová (2010). PIN proteiny, které jsou umístěné v PM (PIN1, 2, 3, 4 a 7), jsou asymetricky rozložené a tím určují směr auxinového toku, jak shrnuto v Palme and Gälweiler (1999). Na polárním rozmístění přenašečů PIN závisí například fototropická a gravitropická odpověď zprostředkovaná jejich relokací jak shrnuto Kleine-Vehn and Friml (2008). Membránová lokalizace a regulace množství proteinů na membráně probíhá dynamickým váčkovým transportem mezi PM a endozomálními kompartmenty, jak shrnuto v Murphy (2005).

Třetí skupina přenašečů zahrnuje proteiny ABCB/PGP, zejména její zástupce ABCB1, ABCB4 a ABCB19 (Geisler et al. 2005, Cho, Lee and Cho 2007, Terasaka et al. 2005). Proteiny ABCB1 a ABCB19 stejně jako přenašeče PIN napomáhají výtoku auxinu z buněk, jak shrnuto ve Verrier (2008), Yang and Murphy (2009) a Titapiwatanakun and Murphy (2009). Protein ABCB4 se při nízké koncentraci auxinu účastní jeho vnášení do buňky a při vysoké koncentraci naopak jeho vynášení (Cho et al. 2007, Kubeš et al. 2012). Proteiny ABCB jsou na PM rozmístěny apolárně a jimi zprostředkovaný transport probíhá za hydrolýzy ATP. Primárně tyto přenašeče slouží k transportu auxinu na delší vzdálenosti z apikálních tkání směrem ke kořeni (Bandyopadhyay et al. 2007). Z této rodiny přenašečů je nejlépe prozkoumaný protein ABCB19. Bylo prokázáno, že při společném výskytu ABCB19 s PIN1, ABCB19 stabilizuje PIN1 v PM (Yang et al. 2013) a má tak vliv na míru jeho endocytózy a výskytu na plasmatické membráně (Titapiwatanakun et al. 2009). ABCB19 se dostává do PM váčkovým transportem přes Golgiho aparát a tzv. trans-Golgi síť (z anglického trans-Golgi network, TGN) pomocí mechanismů závislých na sfingolipidových a sterolových interakcích v membráně (Yang et al. 2013).

2.3 Inhibitory auxinového transportu

Inhibitory auxinového transportu jsou důležitými nástroji v hodnocení role transportu auxinu a jím zprostředkovaného rostlinného vývoje. V rostlinné biologii jsou tyto inhibitory využívány už téměř jedno století. Při vysokých koncentracích je jejich působení zaměřené také na váčkový transport proteinů (z anglického vesicular trafficking) (Geldner et al. 2001) a navíc dokáží měnit stabilitu aktinových filament a tak způsobit redukci jejich množství v buňce (Rahman et al. 2007, Dhonukshe et al. 2008a, Zhu et al. 2016).

Mezi inhibitory působící též na aktinová filamenta patří naftylftalamová kyselina (NPA), která tak narušuje polární auxinový transport i cyklování váčků. Efekt tohoto inhibitoru například na gravitační odpověď kořene je kvůli jeho účinku na aktin velmi rychlý a při jeho aplikaci v době gravitropické stimulace dokáže úplně potlačit gravitropický ohyb kořene (Muday, Hu and Brady 2000).

Dalším známým inhibitorem je brefeldin A (BFA), houbový toxin, blokuje anterográdní váčkový transport prostřednictvím ovlivnění funkce obalových proteinů. Na rozdíl od jiných inhibitorů BFA blokuje recyklaci endozomů do PM a následně způsobuje akumulaci těchto endozomů s nákladem auxinových přenašečů do tzv. BFA kompartmentů, které jsou obklopeny cisternami Golgiho aparátu (Geldner et al. 2001, Boutté et al. 2006, Geldner et al. 2003). Takovéto vnitrobuněčné akumulaci podléhají proteiny PIN a AUX1 (Geldner et al. 2001, Grebe et al. 2002) a tato jejich lokalizace je závislá na aktinovém cytoskeletu, jak plyne z experimentů s aktinovou drogou latrunkulinem B (Lat B), který způsobuje depolymerizaci aktinového cytoskeletu (Geldner et al. 2001).

Další inhibitory výtoku auxinu jako 2,3,5-trijodobenzoová kyselina (TIBA) a 2- (1-pyrenoyl) benzoová kyselina (PBA) také zasahují do vnitrobuněčného cyklování nejen proteinů PIN, ale také AUX1 (Geldner et al. 2003). Také byla identifikována další třída inhibitorů ovlivňujících hlavně vtok auxinu. Mezi ně patří například 1-naftoxyoctová kyselina (1-NOA) (Parry et al. 2001). Vše shrnuto v Klíma, Laňková and Zažímalová (2016).

3. Cytoskelet

3.1 Cytoskelet jako dynamická kostra rostlinných buněk

Rostlinný cytoskelet se skládá z aktinových filament a mikrotubulů, které spolu tvoří v buňce hustou a dynamickou síť. Jsou to vláknité polymery tvořené globulárními podjednotkami. Jednotlivé monomery mají na sobě navázaný nukleotidtrifosfát (NTP), kterým

je v případě aktinu ATP (adenosintrifosfát) a v případě mikrotubulů GTP (guanosintrifosfát). Tyto molekuly prochází hydrolyzou a z nich uvolněná energie slouží pro připojení podjednotky k vláknu. Vlákna jsou polarizovaná, což znamená, že mají tzv. plus a minus konec. Aktinová filamenta i mikrotubuly procházejí rychlými procesy polymerace a depolymerace, což z nich dělá velice dynamické struktury. Pro jejich interakce s okolím jsou důležité s nimi asociované proteiny. Dohromady se pak rostlinný cytoskelet a asociované proteiny podílí na mnoha procesech jako je například morfogeneze nebo dělení buňky a také slouží jako transportní síť pro různé organely a váčky.

3.2 Aktinová filamenta

Aktinová filamenta jsou polymery složené z podjednotek globulárního G-aktinu tvořící tenká vlákna ve tvaru pravotočivé dvoušroubovice o průměru 7 nm. Polymerace aktinu probíhá buď nově tzv. nukleací, nebo připojováním globulárních podjednotek na již existující vlákno s tím, že na plus konci polarizovaného vlákna probíhá polymerace rychleji. Aktin asociuje s různými aktin-vazebnými proteiny (actin binding proteins, ABPs), které mají rozmanité funkce. Mezi ně patří například forminy – rodina proteinů zajišťujících nukleaci aktinu. Dále Arp2/3 komplex – komplex sedmi podjednotek vázající se na stranu vlákna, kde dojde k polymeraci aktinu za vzniku větvení. Asociovaný protein profilin váže aktinové podjednotky a v přítomnosti volného plus konce navozuje polymerizaci. Proteiny rodiny ADF/cofilin zvyšují depolymeraci na plus konci aktinového vlákna a dokážou vlákna také štípat, vše shrnuto v McCurdy, Kovar and Staiger (2001). Důležité jsou také asociované molekulární motory – myoziny. Myoziny spolu s aktinem tvoří tzv. aktomyozinový komplex, který zajišťuje proudění cytoplazmy v buňce. Mezi další funkce aktinu patří např.: udržování struktury cytoplazmy a pozice organel, kontrola expanze buněk – hlavně pylové láčky a kořenových vlásků, morfogeneze buněk složitých tvarů jako pokožkové buňky a trichomy a mnoho dalších.

3.3 Mikrotubuly

Mikrotubuly jsou polymery tvořené z podjednotek heterodimerů α - a β -tubulinu, které se skládají v dutá vlákna o průměru 25 nm. Mikrotubuly jsou polarizované – svým minus koncem mohou být ukotveny v tzv. nukleačním komplexu a na plus konci dochází k jejich dynamické polymerizaci a depolymerizaci. Stejně jako aktinová filamenta i mikrotubuly se mohou větvit. Pro správnou funkci mikrotubulů je potřebná jejich interakce s asociovanými proteiny (mikrotubule associated proteins, MAPs), mezi které patří například γ -tubulin, který je důležitý pro nukleaci mikrotubulů. Dále je známý protein CLASP (z anglického cytoplasmic linker

associated protein), který se váže na plus konec mikrotubulů. V *Arabidopsis* jsou proteiny CLASP zapojeny ve zprostředkování propojení mezi mikrotubuly a buněčným kortexem (Ambrose and Wasteneys 2008). V průběhu buněčného cyklu se dynamicky mění struktura a funkce mikrotubulů. Ty jsou uloženy v cytoplazmě a také tvoří souvislou vrstvu v buněčném kortexu, tzv. kortikální mikrotubuly. K jejich přestavbě dochází při buněčném dělení, kde tvoří nejprve předprofázový prstenec, poté dělicí vřetenko a nakonec se podílejí na tvorbě fragmoplastu, který tvoří „lešení“ pro tvorbu buněčné přepážky, jak shrnuto ve Wasteneys (2002).

3.4 Role cytoskeletu v auxinovém transportu

Role cytoskeletu v auxinovém transportu spočívá hlavně v jeho vlivu na lokalizaci přenašečů auxinu v buňce. Zajišťuje jejich transport do PM, správnou funkci a lokalizaci v PM a také procesy degradace. Aktinová filamenta a mikrotubuly tvoří pod PM vrstvu tzv. kortikálního cytoskeletu. Kortikální cytoskelet je spletitou sítí s vlivem na pohyblivost auxinových přenašečů v PM. Kortikální mikrotubuly se podílí hlavně na polárním umístění přenašečů auxinu do PM (Boutté et al. 2006, Kleine-Vehn et al. 2008b), jejich udržování v PM a také se účastní při různých typech endocytózy. Na umístění přenašečů do PM se podílí i aktinový cytoskelet (Muday et al. 2000, Kleine-Vehn et al. 2008b). Hlavní role aktinu pro auxinový transport je pak ve zprostředkování transportu váček s přenašeči auxinu. Tyto váčky se pohybují po filamentech aktinu za pomoci molekulárních motorů myozinů, jak shrnuto v Ivakov and Persson (2013). Aktin zajišťuje také tzv. cyklování váček mezi PM a endozomálními kompartmenty, které zahrnuje procesy endocytózy a exocytózy, jak shrnuto v Kleine-Vehn and Friml (2008). V mnoha studiích byla navržena závislost procesů cyklování a asymetrického rozložení auxinových přenašečů na aktinovém cytoskeletu (Muday et al. 2000, Geldner et al. 2001, Kleine-Vehn et al. 2006, Boutté et al. 2006, Titapiwatanakun et al. 2009). Organizace a stabilita aktinových filament má tedy velký vliv na pohyb auxinových přenašečů po buňce pomocí regulace váčkového transportu. Podrobně shrnuto ve Zhu and Geisler (2015).

Důležitost cytoskeletu v transportu auxinu se potvrdila pomocí tzv. cytoskeletálních drog. Mezi nejznámější z těchto drog patří latrunkulin B izolovaný z mořské houby a také houbový metabolit cytochalasin D. Obě tyto drogy narušují aktinovou polymerizaci a tím i polární auxinový transport (Butler et al. 1998). Pro narušování struktury mikrotubulů se používá droga oryzalin.

4. Role cytoskeletu při umístování auxinových přenašečů

4.1 Polární distribuce auxinových přenašečů a jejich pohyblivost v PM

Buněčná polarita a s ní související polární lokalizace auxinových přenašečů (zejména proteinů PIN) v PM je velice důležitá pro určení směru auxinového toku (Kleine-Vehn et al. 2008b), který je zásadní pro mnoho vývojových procesů. Polární lokalizace auxinových přenašečů jako PIN1 a PIN2 je způsobena alespoň z části jejich nízkou laterální pohyblivostí v (Kleine-Vehn et al. 2011). Omezení laterální pohyblivosti proteinů v PM může být způsobeno tvorbou shluků (z anglického slova cluster) proteinů, v případě přenašečových proteinů auxinu se hovoří i o tzv. polárních doménách. Dále dochází k omezení pohyblivosti lipidovými mikrodomény, které způsobují nehomogenitu PM (Kleine-Vehn et al. 2011). Také se mohou tvořit mikrodomény způsobené vymezením částí PM pomocí cytoskeletu v těsné blízkosti PM. Pohyblivost přenašečových proteinů v PM omezují ještě další interakce s cytoskeletem nebo buněčnou stěnou (Feraru et al. 2011, Martinière et al. 2011, Martinière et al. 2012), též shrnuto pro auxinové přenašeče a další proteiny v Martinière and Runions (2013). Nízká pohyblivost integrálních proteinů PM jako jsou právě přenašeče auxinu, byla již víckrát potvrzena pomocí fluorescenční metody FRAP (z anglického Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Kleine-Vehn et al. 2006, Men et al. 2008, Martinière et al. 2012).

Ukázalo se, že cytoskelet a organizace proteinů do shluků mají jen malý vliv na dynamiku proteinů v PM a stejně tak i lipidové mikrodomény (Martinière et al. 2012). Zároveň se potvrdilo, že nejvíce omezuje laterální difuzi proteinů v PM buněčná stěna (Martinière et al. 2012). Kvůli turgorovému tlaku jsou PM a buněčná stěna těsně přilehlé. To umožňuje fyzické interakce domén polárních proteinů (jako jsou PIN) se složkami buněčné stěny, což ovlivňuje laterální pohyblivost těchto proteinů (Feraru et al. 2011, Martinière et al. 2012). Vliv buněčné stěny na pohyblivost proteinů potvrdily výsledky pokusů s plazmolýzou buněk (Martinière et al. 2012). Největší důležitost je přikládána hlavní složce buněčné stěny tj. celulóze, u které byla prokázána její role v regulaci buněčné polaritě i polaritě přenašečových proteinů PIN (Feraru et al. 2011).

Pro správné získání polaritě přenašečů na PM se také potvrdilo jako klíčové její sterolové složení, a to pro proteiny PIN (Men et al. 2008) a AUX1 (Kleine-Vehn et al. 2006).

Pomocí nedávno představené metody pro pozorování integrálních proteinů PM, tj. RICS (z anglického Raster Image Correlation Spectroscopy) bylo ukázáno, že přenašečový protein

PIN1 se v membráně pohybuje rychleji než AUX1 (Laňková et al. 2016) a že tato dynamika je závislá na struktuře cytoskeletu.

Dále bylo zjištěno, že přenašečový protein ABCB19 dokáže stabilizovat protein PIN1 v mikrodoménách PM (Titapiwatanakun et al. 2009). Při společném výskytu těchto dvou přenašečů jejich interakce snižuje dynamické cyklování PIN1 a zvyšuje se jeho transportní aktivita pro auxin (Titapiwatanakun et al. 2009).

4.2 Závislost lokalizace přenašečů v PM na cytoskeletu

Auxinové přenašeče dosahují svého cíle na PM transportem membránových váčků podél „kolejí“ tvořených aktinem. Přenašečové proteiny jsou nejprve transportovány rovnoměrně na obě strany nově vznikající membrány a poté jsou z jedné strany odstraněny (Men et al. 2008). Asymetrická lokalizace přenašečů se proto objevuje až po buněčném dělení, kdy je například konkrétně pro proteiny PIN určena bazální PM jako hlavní cíl umístění, z důvodu začátku zakládání a udržování polaritý rostlinných buněk (Boutté et al. 2006).

Jedním z mechanismů vysvětlujících proces polární lokalizace výtokových přenašečů auxinu na bazální membránu je připojení tzv. přenašečového komplexu přes aktinový cytoskelet. Tento komplex se skládá z několika proteinů. Nejdůležitějším z těchto proteinů je regulační podjednotka vázající inhibitory auxinového transportu, jako je kyselina 1-N-naftylftalamová (NPA). Vazebné místo pro NPA zajišťuje interakci s aktinovým cytoskeletem a tato specifická interakce pak umožňuje regulaci lokalizace výtokových přenašečů právě jenom na bazální membránu (Muday et al. 2000). Později se zjistilo, že nejenom bazální, ale i apikální polární umístění přenašečů závisí na aktinovém cytoskeletu (Kleine-Vehn et al. 2008b).

Dalším mechanismem souvisejícím s lokalizací přenašečů PIN je zapojení kortikálních mikrotubulů. V pokusech s rozrušením mikrotubulů došlo ke ztrátě schopnosti buňky polárně cílit proteiny PIN na PM a také došlo k přemístění těchto proteinů na laterální stranu PM (Boutté et al. 2006). I další pokusy potvrdily důležitost mikrotubulů v polární lokalizaci přenašečových proteinů PIN. Při depolymerizaci mikrotubulů byla dokonce pozorována změna polaritý cílení přenašečů z bazální na apikální (Kleine-Vehn et al. 2008b).

Celkově se tedy kortikální cytoskelet potvrdil jako důležitý regulátor polární lokalizace přenašečů pro výtok auxinu. Rozdílná situace ale panuje u přenašečů AUX1 pro vtok auxinu do buněk. Jejich lokalizace a vnitrobuněčná dynamika vyžaduje nepoškozený aktinový cytoskelet, a to ve větší závislosti než přenašeče PIN1. Váčkový transport a polární lokalizace AUX1 ale nejsou výrazně závislé na mikrotubulech. Udržení přenašečů AUX1 v PM stejně tak

vyžaduje aktin, ale vliv má také sterolové složení membrány (Kleine-Vehn et al. 2006). V určitém rozporu s předešlými poznatky je práce navrhuující úplnou nezávislost lokalizace auxinových přenašečů PIN1 a PIN2 na aktinu (Rahman et al. 2007), která je ale v tomto závěru ojedinělá.

5. Role cytoskeletu v transportu váčků s auxinovými přenašeči

5.1 Exocytóza a endocytóza

PM je velice dynamickou strukturou, ve které dochází k neustálým změnám. Její složení se mění na základě různých vnějších podnětů. Tyto změny jsou zajišťovány pomocí procesů exocytózy a endocytózy. Proteiny PM prochází tzv. metabolickým proteinovým obratem (z anglického turnover), tzn. nejprve jejich dodání do PM pomocí exocytózy a poté jejich internalizaci (přesun do nitra buňky) pomocí endocytózy.

Endocytóza v rostlinách zprostředkovává internalizaci a recyklaci molekul PM včetně membránových proteinů a sterolů (Geldner et al. 2001, Baluska et al. 2002, Geldner et al. 2003, Grebe et al. 2003). Dominantní dráhu internalizace proteinů z PM představuje endocytóza zprostředkovaná klatrinem (obalovým proteinem transportovaných váčků). Tuto dráhu využívají i přenašečové proteiny auxinu PIN, které by mohly být dokonce hlavním substrátem pro tento druh endocytózy (Dhonukshe et al. 2007). Pro správnou funkci dějů probíhajících na PM je důležitá její tekutost. Při snížení tekutosti například nízkou teplotou nebo DMSO (dimethylsulfoxid) může dojít k redukcí úrovně endocytózy váčků z PM a tím ke změnám v hojnosti proteinů jako jsou auxinové přenašeče na membráně (Jásik et al. 2013).

5.2 Závislost váčkového transportu na cytoskeletu a vliv auxinu na cytoskelet

Transport váčků uvnitř buňky se odehrává podél cytoskeletu. Na základě pokusů s inhibitory cytoskeletu byly zjištěny dvě dráhy transportu váčků: dráha do a z PM závislá na aktinu, která funguje během interfáze a dráha do buněčné desky závislá na mikrotubulech, která funguje během buněčného dělení (Geldner et al. 2001). Dráhu závislou na aktinovém cytoskeletu využívají přenašeče auxinu při cyklování mezi PM a endozomálními kompartmenty (Geldner et al. 2001, Paciorek et al. 2005, Dhonukshe et al. 2007). Důležitým kritériem pro dopravu váčků na specifické místo PM je organizace aktinového cytoskeletu, tvořícího „koleje“ pro váčky. Aktin tak ovlivňuje správnou lokalizaci váčků s přenašeči auxinu a tím také tok auxinu, jak shrnuto v Muday and Murphy (2002) a Blakeslee, Peer and Murphy (2005).

Ukázalo se, že na organizaci aktinu má vliv samotný auxin, který dokáže pomocí tvarování aktinových filament ovlivňovat svůj vlastní transport (Maisch and Nick 2007, Nick et al. 2009). Mezi polární auxinovým transportem a aktinovou organizací tak funguje regulační okruh umožňující auxinu zvyšovat svůj transport (Nick et al. 2009). Tato regulace je zřejmě v souladu s dalšími mechanismy pozitivní zpětné vazby jako na auxinu závislá exprese přenašečových proteinů pro výtok auxinu (Vieten et al. 2005), které tak mohou také přispívat ke zvýšení toku auxinu. Pokusy prováděné v rýži ukázaly, že auxin navozuje tvorbu svazků (z anglického bundling) aktinu v kořenech, a naopak navozuje podporu tvorby jemného vysoce dynamického aktinu při vysokých koncentracích ve výhonku (Nick et al. 2009, Li et al. 2014), přičemž právě svazkování aktinu má vliv na zprostředkování váčkového transportu.

5.3 Váčkový transport přenašečů PIN

Přenašečové proteiny jsou pomocí exocytózy umísťovány do tzv. polárních domén na PM, kde jsou pevně udržovány. Na okrajích těchto domén se ale proteiny mohou uvolňovat a dochází k jejich internalizaci pomocí endocytózy závislé na klatrinu (Kleine-Vehn et al. 2011). Jako spojení mezi dráhou exocytózy a endocytózy váčků s proteiny PIN funguje Golgiho aparát (Boutté et al. 2006). V transportu proteinů PIN byla prokázána důležitost aktinu (Geldner et al. 2001) a také nepřímá role mikrotubulů (Boutté et al. 2006). Pro dopravu proteinů PIN1 a PIN2 do PM se ukázala důležitost proteinového komplexu exocyst (Drdová et al. 2013). Jeho vliv na polární auxinový transport a dopravu proteinů PIN se potvrdil pomocí pokusu s mutací v podjednotce komplexu exocystu – SEC6 v *Arabidopsis* (Tan et al. 2016). Dále se ukázalo, že na váčkový transport přenašečů PIN má vliv dostupnost fosfátu (Pi) v buňce. Při nízkých koncentracích Pi dochází k aktivním změnám v aktinových filamentech, doprovázených redukcí váčkového transportu a také je ovlivněna polární lokalizace přenašečů PIN na PM (Kumar et al. 2015). Vliv na váčkový transport přenašečů PIN ve spojení s dynamikou aktinového cytoskeletu má také rostlinný alkaloid narciklasin (Hu et al. 2015).

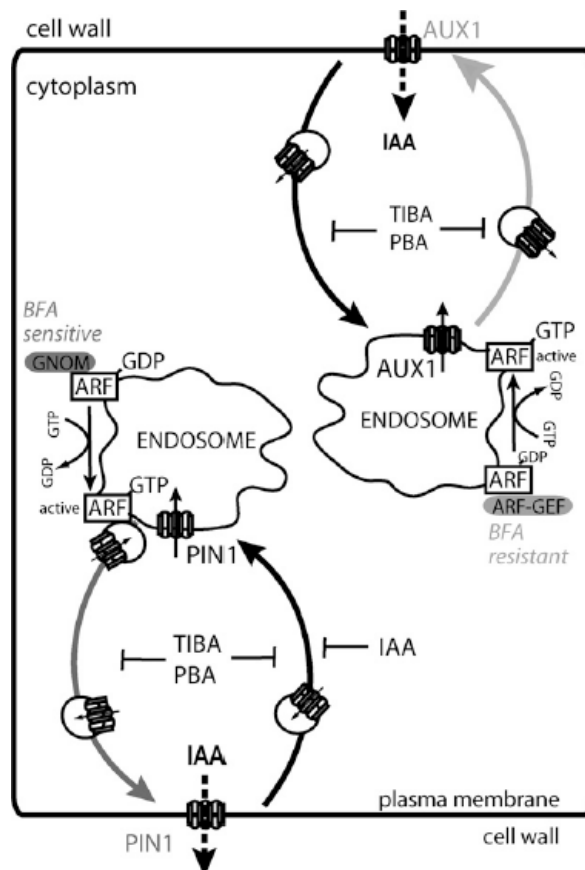
5.3.1 Regulace váčkového transportu pomocí ARF-GEF

Regulace dráhy endozomálního váčkového transportu se účastní s membránou asociované GDP/GTP výměnné faktory pro malé G proteiny ARF (ADP-ribosylační faktory) (ARF-GEF) (Steinmann et al. 1999, Geldner et al. 2003). Mezi ARF-GEF patří protein GNOM, který je citlivý k inhibitoru váčkového transportu brefeldinu A (BFA) (Obrázek 2). Tento protein hraje roli například při pučení váčků a výběru jejich nákladu (Steinmann et al. 1999). Je lokalizovaný

v endozomech, kde také zřejmě reguluje jejich strukturu a funkci (Steinmann et al. 1999, Geldner et al. 2003). Funkce proteinu GNOM je důležitá již při zakládání apikálně-bazální osy embrya (Steinmann et al. 1999). GNOM je potřebný pro recyklování přenašečů auxinu PIN, čímž se zajišťuje jejich správná polární lokalizace. Hlavně bazální lokalizace proteinu PIN1 je na rozdíl od jiných přenašečových proteinů na GNOM velice závislá (Steinmann et al. 1999).

Ukázalo se, že apikální a bazální dráhy cílení proteinů PIN do PM jsou spolu propojené, ale zároveň vzdálené z pohledu regulátorů váčkového transportu ARF-GEF. Cílení různých proteinů PIN využívá apikální a bazální dráhy závislé na ARF-GEF různě citlivých k BFA. Propojení drah se ukazuje při inhibici ARF-GEF citlivých k BFA, kdy vede k převedení bazálně cílených PIN (jako PIN1) do apikální dráhy (Kleine-Vehn et al. 2008a).

Cílení PIN na bazální stranu buňky je závislé na funkci proteinu GNOM citlivého k BFA. Apikální cílení PIN je pak regulováno zřejmě jiným ARF-GEF, necitlivým k BFA. Pro PIN proteiny by toto odlišení drah cílení do PM mohlo mít významnou regulační funkci z důvodu umožnění rychlé změny v polaritě těchto přenašečů (Kleine-Vehn et al. 2008b).



Obrázek 2: Model pro dráhy cyklování přenašečových proteinů AUX1 a PIN1 mezi PM a endozomy za využití ARF-GEF, zobrazení vlivů inhibitorů auxinového transportu. Transport PIN1 na PM vyžaduje k BFA citlivý endozomální protein GNOM ARF-GEF, zatímco transport AUX1 závisí na jiném k BFA rezistentním ARF-GEF. Převzato z Kleine-Vehn et al. (2006).

5.3.2 Cyklování přenašečových proteinů PIN

Některé proteiny, včetně přenašečů pro výtok auxinu PIN, tzv. cyklují mezi PM a endozomálními kompartmenty (Geldner et al. 2001, Paciorek et al. 2005, Dhonukshe et al. 2007). Toto cyklování proteinů probíhá pomocí váčků pohybujících se po aktinových filamentech a vyžaduje aktivitu ARF-GEF známého jako GNOM (Geldner et al. 2001, Geldner et al. 2003). Rolí tohoto cyklování proteinů PIN může být umožnění rychlých změn v jejich polaritě na PM v odpovědi např. na environmentální podněty (Friml et al. 2002b, Dhonukshe et al. 2007, Kleine-Vehn et al. 2008a). Také bylo navrženo, že počáteční sekrece nově syntetizovaných proteinů PIN je nepolární a jejich endocytotické cyklování je tedy následně potřebné pro správné polární umístění přenašečů v PM (Dhonukshe et al. 2008b).

Nakonec může být cyklování přenašečových proteinů PIN také prostředkem pro pozitivní zpětnovazebnou regulaci auxinového transportu, kdy samotný auxin inhibuje krok endocytózy v cyklování proteinů PIN (Paciorek et al. 2005). Tato inhibice pak způsobuje zvyšování množství přenašečů PIN na PM, čímž se zvýší výtok auxinu z buněk. Tento mechanismus účinku byl prokázán pouze pro přirozeně se vyskytující auxiny, nikoliv pro jejich syntetické analogy nebo jiné rostlinné hormony (Paciorek et al. 2005).

5.4 Váčkový transport přenašečů AUX1

Podobně jako v případě přenašečových proteinů auxinu PIN, probíhá mezi PM a vnitrobuněčným obsahem AUX1 cyklování závislé na aktinovém cytoskeletu (Kleine-Vehn et al. 2006) a také na sterolovém složení membrány (Willemsen et al. 2003). Váčkový transport přenašečů AUX1 se v mnoha ohledech odlišuje od transportu proteinů PIN. Rozdíly jsou například v sekretorní dráze nově syntetizovaných přenašečů, nebo také v cílení na PM, kdy je transport AUX1 citlivější na zásahy s aktinovým cytoskeletem, než je transport proteinů PIN. Navíc na rozdíl od proteinů PIN není dynamika AUX1 závislá na regulátoru endozomálního váčkového transportu ARF-GEF GNOM (Kleine-Vehn et al. 2006), ale na jiném k BFA rezistentním ARF-GEF (Obrázek 2). Pro regulaci svého váčkového transportu na určité místo PM využívá AUX1 průvodní protein endoplazmatického retikula, tzv. AUXIN-RESISTANT4 (AXR4), který zřejmě může tento transport usnadňovat pomocí posttranslačních úprav AUX1 (Dharmasiri et al. 2006).

AUX1 se vyskytuje také na membránách Golgiho aparátu a endozomů. Takto vnitrobuněčně uložený AUX1 podléhá působení inhibitoru váčkového transportu BFA, protože a rozdíl od transportu na PM využívá ARF-GEF citlivý k BFA (Kleine-Vehn et al. 2006). Po působení

BFA se AUX1 akumuluje v tzv. BFA kompartmentech, obklopených cisternami Golgiho aparátu (Geldner et al. 2003).

Díky rozdílům v regulacích váčkového transportu proteinů pro vtok auxinu – AUX1 a výtoku auxinu – PIN, jako je například také regulace samotným auxinem, který má vliv na endocytózu proteinů PIN ale ne AUX1 (Paciorek et al. 2005), je umožněno jemné ladění polárního auxinového transportu v odpovědi na různé podněty.

6. Role cytoskeletu v degradační dráze auxinových přenašečů

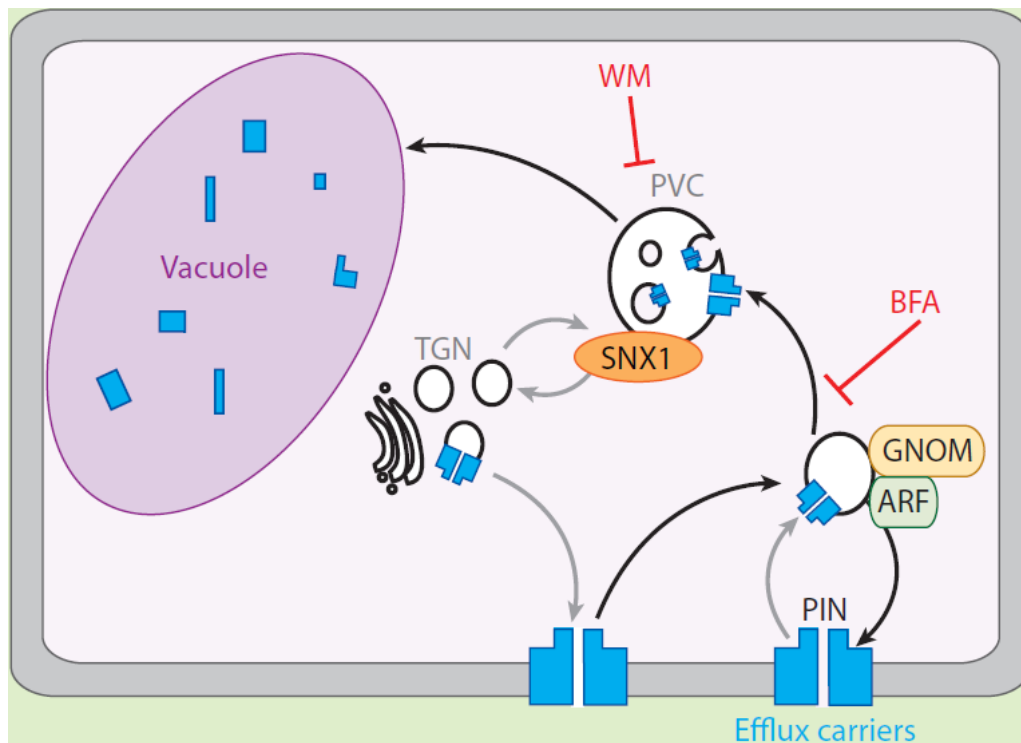
Dráha cílená do lytické vakuoly je pro degradaci používaná mnoha náklady včetně přenašečových proteinů. Přesun přenašečových proteinů z PM do degradační dráhy může být ovlivněn různými vývojovými nebo environmentálními faktory, jako je například gravitace nebo množství světla (Friml et al. 2002b, Laxmi et al. 2008, Kleine-Vehn et al. 2008c, Jásik et al. 2013).

Na základě pokusů s aktinovou drogou latrunkulinem B byla pro váčkový transport proteinu PIN2 do lytické vakuoly ukázána závislost na aktinovém cytoskeletu (Kleine-Vehn et al. 2008c). Dále byla na základě pokusů s inhibítorem brefeldinem A (BFA) potvrzena závislost endozomálního třídění (z anglického sorting) na aktivitě ARF-GEF citlivého k BFA. Ten se uplatňuje v dráze váčkového transportu proteinu PIN2 do lytické vakuoly přes prevakuolární kompartment (PVC) (Kleine-Vehn et al. 2008c). PVC obsahují specifické „receptory vakuolárního třídění“ (z anglického vacuolar sorting receptors – VSRs) zapojené v třídění váčků s proteiny z Golgiho aparátu do lytické vakuoly (Geldner 2004, Tse et al. 2004).

V rostlinách byly identifikovány podjednotky tzv. retromerního komplexu – SORTING NEXIN 1 (SNX1) a VACUOLAR PROTEIN SORTING 29 (VPS29) (Jaillais et al. 2006, Kleine-Vehn et al. 2008c), fungující jako faktory v dráze třídění váčků do lytické vakuoly. Bylo navrženo, že retromerní komplex hraje důležitou roli v návratu proteinů PIN z PVC, pravděpodobně do trans-Golgi sítě (TGN) (Kleine-Vehn et al. 2008c) (Obrázek 3). Podjednotka SNX1 se ukázala být v asociaci s proteinem CLASP, který se váže na mikrotubuly. CLASP pak zvyšuje úroveň proteinů PIN2 určených pro recyklaci, čímž omezuje jejich degradaci. Toto spojení umožňuje kontrolovat hojnost proteinů PIN v buňce (Ambrose et al. 2013).

Třídění proteinů PIN do lytické vakuoly je tedy založené na procesech závislých na aktivitě ARF-GEF a k tomu opačné aktivitě retromerního komplexu, což umožňuje regulaci množství přenašečových proteinů a tím i toku auxinu (Kleine-Vehn et al. 2008c).

Aktivita proteazomu – proteinového komplexu pro degradaci proteinů je také zapojená v deградаční dráze přenašečových proteinů auxinu. Proteazom rozpoznává proteiny označené ubiquitinem, který slouží jako signál odlišující proteiny určené k degradaci a proteiny určené pro dráhu do PM. Tímto způsobem se dá regulovat množství přenašečových proteinů na plasmatické membráně, jako například proteinu PIN2 při gravitropismu kořene. Také se ukázalo, že na degradaci proteinu PIN2 má určitý vliv auxin (Abas et al. 2006).

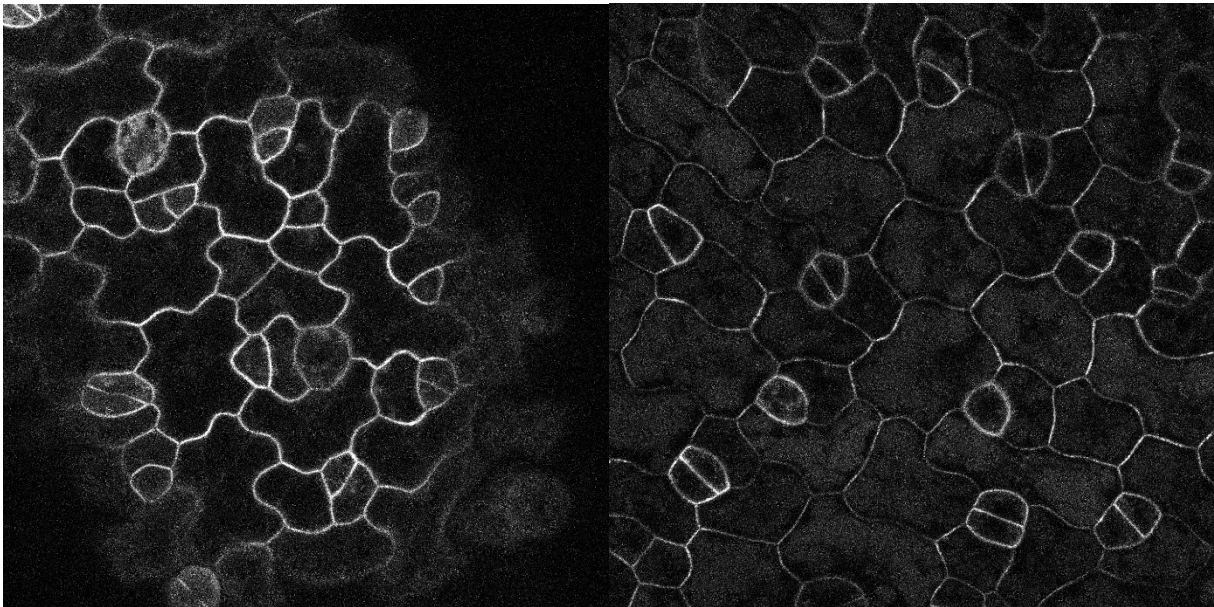


Obrázek 3: Cílení přenašečových proteinů PIN do vakuoly. PIN degradace je kontrolována mnoha událostmi třídění na PM, v endozomech a v PVC. Podjednotka retromerového komplexu – SNX1 umístěná na PVC, se účastní návratu proteinů PIN z deградаční dráhy přes TGN zpět do PM. Převzato z Kleine-Vehn and Friml (2008).

7. Závěr

Již dlouho se ví, že auxin (IAA) je signální molekulou hrající roli v mnoha procesech růstu a vývoje rostlin. Umožňuje rostlinám reagovat na vnější podněty v průběhu jejich sesilního života. Transport auxinu mezi buňkami zajišťují auxinové přenašeče, jejichž dynamické přemísťování uvnitř buněk zprostředkovává cytoskelet. Dynamika vzájemného ovlivňování mezi auxinem a cytoskeletem je aktuálním tématem výzkumu. Hlavní metodou studia jejich vztahu je vedle molekulárně genetických metod použití různých inhibitorů působících na polární auxinový transport a cytoskeletálních drog. Postupně tak dochází k prohlubování znalostí molekulárních principů jejich interakce.

Výše zmíněnému tématu se budu dále věnovat ve své diplomové práci, pro kterou již provádím laboratorní výzkum. V současnosti se zabývám pozorováním umístění fluorescenčně označených přenašečových proteinů PIN na plazmatické membráně pokožkových buněk děložních lístků *Arabidopsis thaliana*. Pro pozorování využívám mladé semenáčky s mutací v podjednotkách aktinového komplexu Arp2/3. V mutantních rostlinkách zjišťuji pomocí konfokální mikroskopie změny ve tvaru pokožkových buněk a umístění fluorescenčního signálu přenašečů PIN (Obrázek 4).



Obrázek 4: Pokožkové buňky děložních lístků *Arabidopsis thaliana* u dva dny starých semenáčků s fluorescenčně označeným přenašečem PIN3. Levý obrázek ukazuje buňky kontrolní rostliny tzv. wild type (WT), pravý obrázek ukazuje buňky mutantní rostlinky v *arp5* podjednotce aktinového komplexu (PIN3::PIN3:YFP x *arp5*). Jsou vidět rozdíly v intenzitě a umístění fluorescenčního signálu, který je v mutantní rostlině očividně nestejnorodý a vyskytuje se kromě PM také uvnitř buněk. Signál uvnitř buněk zřejmě představuje přenašeče PIN3 určené k degradaci ve vakuole.

8. Seznam použité literatury

- Abas, L., R. Benjamins, N. Malenica, T. Paciorek, J. Wiśniewska, J. Wirniewska, J. C. Moulinier-Anzola, T. Sieberer, J. Friml & C. Luschnig (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol*, 8, 249-56.
- 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.
- Ambrose, C., Y. Ruan, J. Gardiner, L. M. Tamblyn, A. Catching, V. Kirik, J. Marc, R. Overall & G. O. Wasteneys (2013) CLASP interacts with sorting nexin 1 to link microtubules and auxin transport via PIN2 recycling in Arabidopsis thaliana. *Dev Cell*, 24, 649-59.
- Ambrose, J. C. & G. O. Wasteneys (2008) CLASP modulates microtubule-cortex interaction during self-organization of acentrosomal microtubules. *Mol Biol Cell*, 19, 4730-7.
- Baluska, F., A. Hlavacka, J. Samaj, K. Palme, D. G. Robinson, T. Matoh, D. W. McCurdy, D. Menzel & D. Volkmann (2002) F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiol*, 130, 422-31.
- Baluska, F., J. Jasik, H. G. Edelman, T. Salajová & D. Volkmann (2001) Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Dev Biol*, 231, 113-24.
- Bandyopadhyay, A., J. J. Blakeslee, O. R. Lee, J. Mravec, M. Sauer, B. Titapiwatanakun, S. N. Makam, R. Bouchard, M. Geisler, E. Martinoia, J. Friml, W. A. Peer & A. S. Murphy (2007) Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms. *Biochem Soc Trans*, 35, 137-41.
- 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.
- Blakeslee, J. J., W. A. Peer & A. S. Murphy (2005) Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 494-500.
- Boutté, Y., M. T. Crosnier, N. Carraro, J. Traas & B. Satiat-Jeunemaitre (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. *J Cell Sci*, 119, 1255-65.
- Butler, J. H., S. Hu, S. R. Brady, M. W. Dixon & G. K. Muday (1998) In vitro and in vivo evidence for actin association of the naphthylphthalamic acid-binding protein from zucchini hypocotyls. *Plant J*, 13, 291-301.
- Cande, W. Z., M. H. Goldsmith & P. M. Ray (1973) Polar auxin transport and auxin-induced elongation in the absence of cytoplasmic streaming. *Planta*, 111, 279-96.
- Cho, M., S. H. Lee & H. T. Cho (2007) P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*, 19, 3930-43.
- Dharmasiri, S., R. Swarup, K. Mockaitis, N. Dharmasiri, S. K. Singh, M. Kowalchuk, A. Marchant, S. Mills, G. Sandberg, M. J. Bennett & M. Estelle (2006) AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science*, 312, 1218-20.
- 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. Petrášek, D. Seifertová, R. Tejos, L. A. Meisel, E. Zazimalová, T. W. Gadella, 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. Mähönen, 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.
- Drdová, E. J., L. Synek, T. Pečenková, M. Hála, I. Kulich, J. E. Fowler, A. S. Murphy & V. Zárský (2013) The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in Arabidopsis. *Plant J*, 73, 709-19.
- Feraru, E., M. I. Feraru, J. Kleine-Vehn, A. Martinière, G. Mouille, S. Vanneste, S. Vernhettes, J. Runions & J. Friml (2011) PIN polarity maintenance by the cell wall in Arabidopsis. *Curr Biol*, 21, 338-43.
- Friml, J., E. Benková, I. Blilou, J. Wisniewska, T. Hamann, K. Ljung, S. Woody, G. Sandberg, B. Scheres, G. Jürgens & K. Palme (2002a) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell*, 108, 661-73.
- Friml, J., J. Wiśniewska, E. Benková, K. Mendgen & K. Palme (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature*, 415, 806-9.
- 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. Müller, 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. (2004) The plant endosomal system--its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta*, 219, 547-60.
- Geldner, N., N. Anders, H. Wolters, J. Keicher, W. Kornberger, P. Muller, A. Delbarre, T. Ueda, A. Nakano & G. Jürgens (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. Jürgens & K. Palme (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413, 425-8.
- Goldsmith, M. H. M., & Goldsmith, T. H. (1977, January). Chemiosmotic model for polar transport of auxin. In *Plant Physiology* (Vol. 59, No. 6, pp. 90-90). 15501 MONONA DRIVE, ROCKVILLE, MD 20855: AMER SOC PLANT PHYSIOLOGISTS.
- Grebe, M., J. Friml, R. Swarup, K. Ljung, G. Sandberg, M. Terlou, K. Palme, M. J. Bennett & B. Scheres (2002) Cell polarity signaling in Arabidopsis involves a BFA-sensitive auxin influx pathway. *Curr Biol*, 12, 329-34.
- Grebe, M., J. Xu, W. Möbius, T. Ueda, A. Nakano, H. J. Geuze, M. B. Rook & B. Scheres (2003) Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol*, 13, 1378-87.
- Hu, Y., X. Na, J. Li, L. Yang, J. You, X. Liang, J. Wang, L. Peng & Y. Bi (2015) Narciclasine, a potential allelochemical, affects subcellular trafficking of auxin transporter proteins and actin cytoskeleton dynamics in Arabidopsis roots. *Planta*, 242, 1349-60.
- Jaillais, Y., I. Fobis-Loisy, C. Miège, C. Rollin & T. Gaude (2006) AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis. *Nature*, 443, 106-9.
- Jásik, J., B. Boggetti, F. Baluška, D. Volkmann, T. Gensch, T. Rutten, T. Altmann & E. Schmelzer (2013) PIN2 turnover in Arabidopsis root epidermal cells explored by the photoconvertible protein Dendra2. *PLoS One*, 8, e61403.
- Kleine-Vehn, J., P. Dhonukshe, M. Sauer, P. B. Brewer, J. Wiśniewska, T. Paciorek, E. Benková & J. Friml (2008a) ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Curr Biol*, 18, 526-31.

- 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.
- Kleine-Vehn, J. & J. Friml (2008) Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 447-73.
- Kleine-Vehn, J., L. Langowski, J. Wisniewska, P. Dhonukshe, P. B. Brewer & J. Friml (2008b) Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants. *Mol Plant*, 1, 1056-66.
- Kleine-Vehn, J., J. Leitner, M. Zwiewka, M. Sauer, L. Abas, C. Luschnig & J. Friml (2008c) Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17812-7.
- Kleine-Vehn, J., K. Wabnik, A. Martinière, Ł. Langowski, K. Willig, S. Naramoto, J. Leitner, H. Tanaka, S. Jakobs, S. Robert, C. Luschnig, W. Govaerts, S. W. Hell, J. Runions & J. Friml (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol*, 7, 540.
- Kubeš, M., H. Yang, G. L. Richter, Y. Cheng, E. Młodzińska, X. Wang, J. J. Blakeslee, N. Carraro, J. Petrášek, E. Zažímalová, K. Hoyerová, W. A. Peer & A. S. Murphy (2012) The Arabidopsis concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *Plant J*, 69, 640-54.
- Kumar, M., N. Pandya-Kumar, A. Dam, H. Haor, E. Mayzlish-Gati, E. Belausov, S. Wininger, M. Abu-Abied, C. S. McErlean, L. J. Bromhead, C. Prandi, Y. Kapulnik & H. Koltai (2015) Arabidopsis response to low-phosphate conditions includes active changes in actin filaments and PIN2 polarization and is dependent on strigolactone signalling. *J Exp Bot*, 66, 1499-510.
- Laxmi, A., J. Pan, M. Morsy & R. Chen (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, 3, e1510.
- Lacek, J., Katarzyna, R., Christian, L., & Eva, Z. (2017) Polar Auxin Transport. *eLS*.
- Laňková, M., J. Humpolíčková, S. Vosolobě, Z. Cit, J. Lacek, M. Čovan, M. Čovanová, M. Hof & J. Petrášek (2016) Determination of Dynamics of Plant Plasma Membrane Proteins with Fluorescence Recovery and Raster Image Correlation Spectroscopy. *Microsc Microanal*, 22, 290-9.
- Li, G., W. Liang, X. Zhang, H. Ren, J. Hu, M. J. Bennett & D. Zhang (2014) Rice actin-binding protein RMD is a key link in the auxin-actin regulatory loop that controls cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 10377-82.
- Maisch, J. & P. Nick (2007) Actin is involved in auxin-dependent patterning. *Plant Physiol*, 143, 1695-704.
- Martinière, A., P. Gayral, C. Hawes & J. Runions (2011) Building bridges: formin1 of Arabidopsis forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton. *Plant J*, 66, 354-65.
- Martinière, A., I. Lavagi, G. Nageswaran, D. J. Rolfe, L. Maneta-Peyret, D. T. Luu, S. W. Botchway, S. E. Webb, S. Mongrand, C. Maurel, M. L. Martin-Fernandez, J. Kleine-Vehn, J. Friml, P. Moreau & J. Runions (2012) Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 12805-10.
- Men, S., Y. Boutté, Y. Ikeda, X. Li, K. Palme, Y. D. Stierhof, M. A. Hartmann, T. Moritz & M. Grebe (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol*, 10, 237-44.
- Michniewicz, M., M. K. Zago, L. Abas, D. Weijers, A. Schweighofer, I. Meskiene, M. G. Heisler, C. Ohno, J. Zhang, F. Huang, R. Schwab, D. Weigel, E. M. Meyerowitz, C. Luschnig, R. Offringa & J. Friml (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell*, 130, 1044-56.

- Muday, G. K., S. Hu & S. R. Brady (2000) The actin cytoskeleton may control the polar distribution of an auxin transport protein. *Gravit Space Biol Bull*, 13, 75-83.
- Muday, G. K. & A. S. Murphy (2002) An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell*, 14, 293-9.
- Nick, P., M. J. Han & G. An (2009) Auxin stimulates its own transport by shaping actin filaments. *Plant Physiol*, 151, 155-67.
- Paciorek, T., E. Zazimalová, N. Ruthardt, J. Petrásek, Y. D. Stierhof, J. Kleine-Vehn, D. A. Morris, N. Emans, G. Jürgens, N. Geldner & J. Friml (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, 435, 1251-6.
- Parry, G., A. Delbarre, A. Marchant, R. Swarup, R. Napier, C. Perrot-Rechenmann & M. J. Bennett (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *Plant J*, 25, 399-406.
- 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.
- Steinmann, T., N. Geldner, M. Grebe, S. Mangold, C. L. Jackson, S. Paris, L. Gälweiler, K. Palme & G. Jürgens (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, 286, 316-8.
- Swarup, K., E. Benková, R. Swarup, I. Casimiro, B. Péret, Y. Yang, G. Parry, E. Nielsen, I. De Smet, S. Vanneste, M. P. Levesque, D. Carrier, N. James, V. Calvo, K. Ljung, E. Kramer, R. Roberts, N. Graham, S. Marillonnet, K. Patel, J. D. Jones, C. G. Taylor, D. P. Schachtman, S. May, G. Sandberg, P. Benfey, J. Friml, I. Kerr, T. Beeckman, L. Laplace & M. J. Bennett (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol*, 10, 946-54.
- Swarup, R., J. Friml, A. Marchant, K. Ljung, G. Sandberg, K. Palme & M. Bennett (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev*, 15, 2648-53.
- Swarup, R., J. Kargul, A. Marchant, D. Zadik, A. Rahman, R. Mills, A. Yemm, S. May, L. Williams, P. Millner, S. Tsurumi, I. Moore, R. Napier, I. D. Kerr & M. J. Bennett (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell*, 16, 3069-83.
- Tan, X., Y. Feng, Y. Liu & Y. Bao (2016) Mutations in exocyst complex subunit SEC6 gene impaired polar auxin transport and PIN protein recycling in Arabidopsis primary root. *Plant Sci*, 250, 97-104.
- Terasaka, K., J. J. Blakeslee, B. Titapiwatanakun, W. A. Peer, A. Bandyopadhyay, S. N. Makam, O. R. Lee, E. L. Richards, A. S. Murphy, F. Sato & K. Yazaki (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *Plant Cell*, 17, 2922-39.
- 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.
- Tse, Y. C., B. Mo, S. Hillmer, M. Zhao, S. W. Lo, D. G. Robinson & L. Jiang (2004) Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in Nicotiana tabacum BY-2 cells. *Plant Cell*, 16, 672-93.
- Vanneste, S. & J. Friml (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136, 1005-16.
- Vieten, A., S. Vanneste, J. Wisniewska, E. Benková, R. Benjamins, T. Beeckman, C. Luschnig & J. Friml (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*, 132, 4521-31.

- Went, F. W. (1926). On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. In *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet* (Vol. 30, No. 5, p. 1).
- Willemsen, V., J. Friml, M. Grebe, A. van den Toorn, K. Palme & B. Scheres (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell*, 15, 612-25.
- Yang, H., G. L. Richter, X. Wang, E. Młodzińska, N. Carraro, G. Ma, M. Jenness, D. Y. Chao, W. A. Peer & A. S. Murphy (2013) Sterols and sphingolipids differentially function in trafficking of the *Arabidopsis* ABCB19 auxin transporter. *Plant J*, 74, 37-47.
- Zhu, J., A. Bailly, M. Zwiewka, V. Sovero, M. Di Donato, P. Ge, J. Oehri, B. Aryal, P. Hao, M. Linnert, N. I. Burgardt, C. Lücke, M. Weiwad, M. Michel, O. H. Weiergräber, S. Pollmann, E. Azzarello, S. Mancuso, N. Ferro, Y. Fukao, C. Hoffmann, R. Wedlich-Söldner, J. Friml, C. Thomas & M. Geisler (2016) TWISTED DWARF1 Mediates the Action of Auxin Transport Inhibitors on Actin Cytoskeleton Dynamics. *Plant Cell*, 28, 930-48.