

Regulace aktivity přenašečů auxinu z buňky

Bakalářská práce

Marie Martincová

Katedra fyziologie rostlin PřFUK

2008

OBSAH

1. Úvod	2
2. Abstrakt a klíčová slova	3
3. Abstract and key words	4
4. Auxiny ve vývoji rostlin	5
5. Mechanismus účinku auxinu	6
6. Transport auxinu	8
6.1. Kanalizační hypotéza	8
6.2. Proteiny přenášející auxin přes membránu	9
6.2.1. Proteiny AUX/LAX	9
6.2.2. Proteiny PGP a TRH	9
6.2.3. Proteiny PIN	11
6.2.3.1. Regulace funkce proteinů PIN	13
6.2.3.2. Ovlivnění genové exprese proteinů PIN	13
6.2.3.3. Konstitutivní cyklování proteinů PIN, transport a cílení proteinů PIN do membrány	13
6.2.3.4. Regulace funkce a aktivity proteinů PIN jejich fosforylací	16
6.2.3.4.1. Regulace aktivity protein kinázy PINOID	18
6.2.3.4.2. Role protein fosfatázy PP2A při regulaci transportu auxinu	20
6.2.3.4.3. Kinázy WAG	21
6.2.3.5. Regulace prostřednictvím fytotropinů	22
6.2.3.6. Regulace funkce proteinů PIN jejich specifickou degradací	22
7. Závěr	23
8. Seznam literatury	24

1. Úvod

Auxin je jedním z hlavních rostlinných hormonů (fytohormonů), mezi které dále počítáme cytokininy, ethylen, kyselinu abscisovou, gibbereliny, brasinosteroidy a další růstové regulátory. Podílí se na mnoha vývojových a morfogenetických procesech založených na diferenciálním dělení a prodlužování buněk, jako jsou vývoj embrya, diferenciace cévního pletiva či růstové odpovědi na vnější podněty (shrnutí ve Woodward a Bartel, 2005; Teale a kol., 2006; Fleming, 2006). Tento pleiotropní účinek auxinu je umožněn mimo jiné jeho polárním transportem, který má za následek lokální akumulace auxinu v určitých tkáních a buňkách.

K největší produkci auxinu dochází v mladých apikálních tkáních (Leyser, 2005), ale je zapotřebí snad ve všech částech rostliny. K jeho distribuci slouží apoplastický i symplastický transportní systém rostliny. Auxin je transportován na delší vzdálenost spolu s dalšími látkami floémem, ale také transportním systémem z buňky do buňky. Právě tento systém je směrově polarizovaný díky nerovnoměrnému rozložení auxinových přenašečů na plazmatické membráně (shrnutí ve Friml a Palme, 2002).

Mezi hlavní dosud popsané přenašeče auxinu do buňky patří permeáza AUXIN1 (AUX1) (Bennett a kol., 1996; Swarup a kol., 2001) a její homology (AUX/LAX), pro přenos auxinu ven z buňky jsou to transmembránové proteiny z rodiny PINFORMED (PIN; Gälweiler a kol., 1998; Petrášek a kol., 2006) a také fosfoglykoproteiny (PGP), rostlinné ortology savčích ABC-transportérů (Dudler a Hertig, 1992; Terasaka a kol., 2005).

Regulace aktivity přenašečů auxinu se děje na několika úrovních, od regulace jejich genové exprese přes regulace funkce na úrovni aktivity a lokalizace proteinů samotných, až po jejich řízenou degradaci.

Vzhledem k dalšímu zaměření své práce je zde hlavní důraz kladen na proteiny rodiny PIN a regulaci jejich funkce prostřednictvím specifické fosforylace a defosforylace u *Arabidopsis thaliana*.

2. Abstrakt a klíčová slova

Rostlinné hormony jsou látky, které se významně podílí na regulaci vývojových a morfogenetických procesů v rostlinách. Auxin (kyselina indolyl-3-octová, IAA) je důležitý hlavně pro dělení a elongaci buněk, diferenciaci cévního pletiva a růstové odpovědi na vnější podněty. Jeho účinek je zprostředkován koncentračními rozdíly mezi jednotlivými buňkami či pletivy. Tyto rozdíly jsou ustanoveny díky unikátní schopnosti tohoto fytohormonu být transportován z buňky do buňky polárně. Samotná polarita transportu auxinu je zajištěna asymetrickým rozmístěním auxinových přenašečů v plazmatické membráně, a to zejména přenašečů auxinu ven z buňky. Mezi ně patří proteiny PINFORMED (PIN) a fosfoglykoproteiny (PGP). Regulace funkce přenašečů auxinu je možná na více úrovních. Tato práce je zaměřena především na regulaci proteinů PIN jejich specifickou fosforylací, protože tomuto tématu se budu nadále věnovat v rámci vypracování své diplomové práce. Možné regulace představují zejména ovlivnění genové exprese proteinů PIN, cílení vzniklých proteinů do plazmatické membrány či změnu jejich aktivity specifickou fosforylací a defosforylací pomocí protein kinázy PINOID (PID) a fosfatázy PP2A. Protože proteiny PIN přirozeně cyklují mezi plazmatickou membránou a endozomálními kompartmenty, lze zvýšit odtok auxinu z buněk inhibicí endocytózy váčků nesoucími přenašeče PIN. Sám auxin se významně podílí na regulaci svého vlastního transportu aktivací exprese některých genů. Mezi ně náleží geny pro jeho přenašeče (AUX1/LAX, PIN, PGP) a geny kódující protein kinázu PID. Auxin může inhibovat endocytózu při cyklování proteinů PIN, ale má schopnost indukovat i specifickou degradaci svých přenašečů. Protein kináza PINOID patří do rodiny rostlinných homologů živočišných AGC kináz a její aktivita zřejmě rozhoduje o umístění přenašečů PIN do membrány a také zvyšuje míru transportu auxinu z buněk. Nedávno bylo zjištěno, že se při lokalizaci proteinů PIN uplatňuje i fosfatáza PP2A, která působí proti účinku kinázy PID. Specifická fosforylace přenašečů auxinu je tedy velmi důležitou regulací, protože jejich fosforylační stav má pravděpodobně vliv na jejich lokalizaci v buňce a tím i na míru transportu auxinu.

Klíčová slova: auxin, fosforylace, PINOID, polární transport auxinu, PINFORMED

3. Abstract

Plant hormones are substances playing a substantial role in the regulation of developmental and morphogenetic processes in plants. Auxin (indole-3-acetic acid, IAA) is important for cell division and elongation, differentiation of vascular tissue and it is also involved in regulation of tropical responses to external stimuli. Its effect is mediated by concentration gradients between individual cells and tissues. Auxin is the only phytohormone that is transported from cell to cell in a polar manner so these gradients can be set and maintained. The directionality of cell-to-cell auxin transport is realized by the asymmetric distribution of plasma membrane-located auxin transporters and auxin efflux carriers in particular. These are PINFORMED (PIN) proteins and phosphoglycoproteins (PGP). This thesis is primarily aimed to PIN proteins and how they are regulated by phosphorylation, because I will study this topic in my following diploma thesis. There are many possible levels of regulation of PIN activity. It is gene expression, protein synthesis, protein targeting and regulation of the function of the mature protein. The function of PIN carrier can be modified by phosphorylation and dephosphorylation by the protein kinase PINOID (PID) and the phosphatase PP2A. Since PIN proteins undergo rapid cycling between the plasma membrane and endosomal compartments the inhibition of endocytosis of PIN-containing vesicles results in increased auxin efflux. Auxin can regulate its own transport by activating expression of some proteins including AUX1/LAX, PIN and PGP transporters and a protein kinase PINOID (PID). Auxin can also inhibit endocytosis of its efflux proteins and induce their degradation. The protein kinase PID belongs to the group of plant homologs of animal AGC kinases. Its role is suggested in positioning of PINs to the plasma membrane and enhancing of auxin transport from the cells. Recently it has been shown that the phosphatase PP2A is also involved in localization of auxin transporters and that it acts antagonistically to the protein kinase PINOID. The regulation of PIN transporters by specific phosphorylation is important because the phosphorylation state of these molecules seems to have crucial impact on the level of transported auxin molecules.

Key words: auxin, phosphorylation, PINOID, polar auxin transport, PINFORMED

4. Auxiny ve vývoji rostlin

Jako auxiny lze označit skupinu chemických látek s příbuznou chemickou strukturou a podobnou biologickou aktivitou. Existují auxiny přirozené a syntetické, vyráběné uměle. Nejvíce zastoupeným přirozeným auxinem v rostlinách je kyselina indolyl-3-octová (IAA) jež má také asi nejvýznamnější účinek. Dalšími přirozenými auxiny jsou kyselina 4-chlor-indolyl-3-octová (4-Cl-IAA), kyselina fenyl-octová (PAA) a kyselina indolyl-3-máselná (IBA). Mezi syntetické auxiny patří například kyselina naftalen-1-octová (NAA) či kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) (Woodward a Bartel, 2005). Tyto auxiny se používají do různých přípravků na podporu zakořeňování a růstu, popřípadě do herbicidů.

K ustanovení odlišných koncentrací auxinu dochází již během časných fází embryogeneze, po rozdělení jednobuněčné zygoty na bazální buňku dávající vznik suspensoru a buňku apikální, ze které vznikne pravé embryo. Auxinu je více ve vznikajícím embryu než v buňkách suspensoru (Friml a kol., 2003). Tento stav trvá až do 32-buněčného embryonálního stádia, kdy je naopak více auxinu v buňkách suspensoru, s maximem v buňkách hypofýzy, jež je prekursorem kořenového meristému. Nestejné rozložení auxinu se uplatňuje i při zakládání a formování orgánů v postembryonální fázi vývoje. Jeho zvýšené hladiny korelují s místy, kde se budou zakládat nová listová a květní primordia či primordia postranních kořenů. Maximální koncentrace auxinu byla v primárním kořeni zjištěna v kolumelových iniciálách a v klidovém centru. Jeho hladina poté klesá úměrně s postupnou diferenciací a zráním buněk. Při vzniku postranních kořenů dochází ke zvyšování hladiny auxinu v buňkách pericyklu, ze kterých bude vznikat kořenové primordium. Během růstu postranního kořene se poté ustanoví gradient auxinu směrem od špičky kořenu k jeho začátku. Podobným způsobem se auxin uplatňuje i při zakládání listů a květních částí. Ještě před vypučením primordia dochází k lokální akumulaci auxinu v buňkách, ze kterých bude vznikat, a poté se zase ustanoví gradient s maximem ve vrcholku nově vznikajícího orgánu. Všechny tyto vzniklé orgány musí být nově propojeny s cévním pletivem rostliny, aby mohl být zajištěn transport asimilátů a živin. Při zakládání a formování nových cévních svazků také dochází k zvýšení lokální hladiny auxinu, což naznačuje, že se tento hormon podílí i na diferenciaci cévního pletiva (shrnutí v Tanaka a kol., 2006).

Jak již bylo zmíněno, lokální zvýšení či snížení koncentrace auxinu v buňkách je signálem pro růstovou odpověď rostliny na vnější podnět, ale může být též signálem ke správné diferenciaci buňky. Proto při vývoji rostliny dochází k dynamickým změnám v distribuci auxinu a ke vzniku různých auxinových gradientů. K určení této distribuce auxinu v rostlinných pletivech lze použít například imunolokalizaci pomocí specifické protilátky,

přímé měření vnitřní hladiny auxinu, či detekce aktivity na auxinu závislého promotoru DR5, jehož aktivita koreluje s obsahem auxinu v buňce (Benková a kol., 2003).

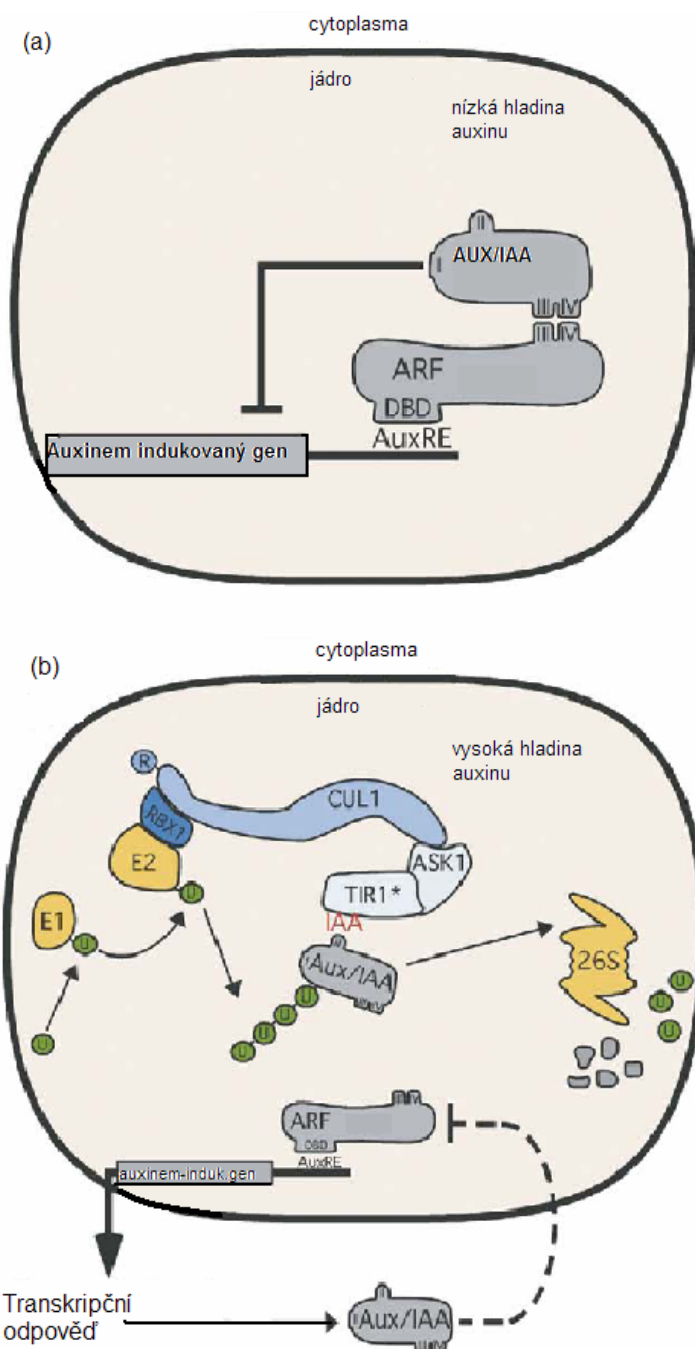
5. Mechanismus účinku auxinu

Auxin vyvolává v buňkách rychlou expresi transkripčních regulátorů rodiny AUXIN/INDOL-3-ACETIC ACID (AUX/IAA). K akumulaci těchto proteinů v buňce dochází v řádu několika minut po aplikaci auxinu. (Abel a kol., 1994). V *Arabidopsis* je doposud známo 29 proteinů rodiny AUX/IAA (Liscum a Reed, 2002). Všechny jsou velmi nestálé a obsahují čtyři vysoce konzervované domény: doména I je represorem transkripce, domény III a IV zprostředkovávají homodimerizaci a heterodimerizaci s dalšími AUX/IAA proteiny a také s takzvanými AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs). Doména II je důležitá pro interakci AUX/IAA s proteinem TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE), který je součástí komplexu ubiquitinační ligázy SCF^{TIR1}. Tento komplex označuje cílové proteiny včetně AUX/IAA ubiquitinem a poté dochází k jejich degradaci v proteasomu. V přítomnosti auxinu, který se váže na receptorový protein TIR1 (Dharmasiri a kol., 2005) se zvyšuje interakce mezi TIR1 a AUX/IAA a dochází k řízené degradaci transkripčních regulátorů AUX/IAA (Gray a kol., 2001).

Mnoho genů, jejichž exprese je regulována auxinem, obsahuje v promotorové oblasti regulační sekvenci, tzv. Auxin-Responsive Element (AuxRE). Na tyto sekvence se váží ARF proteiny jako monomery, homodimery či heterodimery s jinými ARF proteiny nebo s AUX/IAA proteiny, inhibujícími transkripci. Samotné ARF proteiny mohou působit jako inhibitory i aktivátory transkripce, to závisí na povaze jejich centrální domény. AUX/IAA interagují s ARF proteiny přes C-terminální domény III a IV, které jsou konzervované u většiny AUX/IAA i ARFs (shrnutí ve Woodward a Bartel, 2005). Fenotypy různých *arf* mutantů jsou odlišné a velmi různorodé, mnoho jich zatím nebylo ani popsáno. Například u rostlin mutovaných v genu *MONOPTEROUS*, kódujícím protein ARF5, který je aktivátorem transkripce auxinem indukovaných genů, dochází k nesprávnému formování embryonálních os, často se zakládá jen jedna děloha a je poškozeno i cévní pletivo (Hardtke a Berleth, 1998).

Systém indukce tvorby proteinů AUX/IAA auxinem je vlastně důmyslnou negativní zpětnou regulací. Okamžitě po působení auxinu a jeho navázání na receptor v buňce dojde k poklesu hladiny AUX/IAA proteinů (díky jejich ubiquitinaci a následné degradaci v proteasomu) a následně k zesílení transkripce genu *AUX/IAA* zprostředkované nasednutím ARF proteinů na *AuxRE* v promotorové oblasti genu *AUX/IAA*. Tím dojde k akumulaci

AUX/IAA proteinů v buňce a k vypnutí auxinového signálu. Tento systém tedy umožňuje krátkodobou a přechodnou signalizaci (Gray a kol., 2001).



Obr. č.1: Auxinem indukovaná transkripce

Při nízké hladině auxinu (a) represory transkripce AUX/IAA brání přepisování určitých genů. Při vysoké hladině auxinu (b) dojde k navázání IAA na receptor TIR1, který je součástí komplexu ubiquitinační ligázy, ten označí proteiny určené k degradaci (včetně AUX/IAA) ubiquitinem, a ty jsou poté degradované v proteazomu. Tím dojde k odblokování inhibice a transkripční faktory ARF mohou aktivovat expresi auxinem indukovaných genů (upraveno podle Quint a Gray, 2006).

6. Transport auxinu

Auxin je v rostlině transportován dvěma způsoby. Prostřednictvím floému spolu s dalšími látkami či mechanismem opakovaného transportu přes plazmatickou membránu z buňky do buňky. Transport floémem je rychlejší, ale není směrovaný. Probíhá v obou směrech, jak bazipetálně (od vrcholu směrem ke kořeni) tak akropetálně (od kořenů k vrcholu), není regulovaný a je poměrně rychlý (5-20 cm/h). Oproti tomu transport z buňky do buňky je směrovaný, regulovatelný, ale také pomalejší (5-20 mm/h). Hlavní proud směrovaného polární transport auxinu směřuje z vrcholu směrem ke kořeni a kořenové špičce, kde se jeho proud otáčí a vrací se buňkami epidermis do elongační zóny kořene (Friml a Palme, 2002).

V polovině sedmdesátých let byl navržen model pro transport auxinu, tzv. chemiosmotická hypotéza (Rubery a Sheldrake, 1974). Protonové pumpy lokalizované na plazmatické membráně vytvářejí na ní protonový gradient způsobující, že v apoplastu je nižší pH (asi 5,5) než v symplastu (pH asi 7). Auxin (IAA) je slabá kyselina s disociační konstantou pK rovnou 4,7. To znamená, že v nízkém pH apoplastu dochází k jeho pouze částečné disociaci. Nedisociované nepolární molekuly (IAAH) jsou hydrofóbní a jsou schopny přecházet přes plazmatickou membránu na základě koncentračního gradientu prostou pasivní difúzí bez dodání energie, zatímco disociované formy (IAA^-) jsou polární a do buněk mohou být transportovány jedině aktivně pomocí specifického přenašeče. V cytosolu, kde je pH okolo 7, je většina auxinu disociována, a proto nemůže pasivně procházet plazmatickou membránou. Jedinou možností jak se může dostat ven je aktivní transport pomocí přenašeče. Z toho vyplývá, že při transportu auxinu z buňky do buňky záleží především na množství a lokalizaci vnašečů auxinu. Ty mohou být na plazmatické membráně umístěny asymetricky a ve shlucích, čímž je způsoben polarizovaný transport auxinu (shrnuto v Benjamins a kol., 2005).

6.1. Kanalizační hypotéza

Protože vyšší rostliny jsou sesilní organismy, nepohyblivé a setrvávající stále na jednom místě, musí být jejich vývoj velice flexibilní, aby se přizpůsobily měnícím se podmínkám prostředí. Jejich růst je neukončený, vykazují vysokou regenerační schopnost a v případě poranění mohou i post-embryonálně vytvářet nové orgány. Při zakládání nových listů, květů či postranních vrcholů vznikají nové osy polarity, musí se tedy polarizovat jak rostlinná pletiva, tak jednotlivé buňky, k čemuž je zapotřebí mezibuněčný polarizační signál - auxin (Reinhardt a kol., 2000).

Pro transport auxinu pletivem byla formulována takzvaná kanalizační hypotéza (Sachs, 1974, 1991), která předpokládá, že auxin má zpětnovazebný efekt jak na svůj vlastní transport, tak i na jeho polarizaci. Tato pozitivní zpětná vazba je zprostředkována zvýšením transportní kapacity auxinu a polarizací buněk a to tak, že sám auxin je schopen regulovat transkripci, lokalizaci a degradaci svých vlastních přenašečů v buňce. Existuje korelace mezi tokem auxinu a propustností membrány. Už při malých odchylkách ve směru transportu auxinu dochází ke vzniku nové transportní cesty, kterou je auxin veden k sinku.

6.2. Proteiny přenášející auxin přes membránu

6.2.1. Proteiny AUX/LAX

Auxiny jako slabé kyseliny v nízkém pH apoplastu částečně disociují. Disociované polární molekuly auxinu nemohou procházet přes membránu do buňky prostou difúzí, musí být tedy transportovány specifickým přenašečem. Jako takový slouží protein AUX1 a jeho homology z rodiny AUX/LAX (AUXIN-RESISTANT/LIKE AUX) (Bennet a kol., 1996; Swarup a kol., 2004). Tyto přenašeče jsou podobné aminokyselinovým permeázám. IAA, která je strukturně podobná tryptofanu, je pro ně tedy vhodným substrátem a do buněk je transportována symportem s protony. Protein AUX1 se účastní odpovědi kořene na gravitropický stimul tím, že zvyšuje objem transportu auxinu (Marchant a kol., 1999), kořeny mutanta *aux1* jsou agravitropické. V buňkách protofloému je tento přenašeč lokalizován asymetricky na membráně horní strany buněk, zatímco na spodní straně jsou umístěny přenašeče auxinu ven z buňky. Tento systém slouží zřejmě ke směrování transportu auxinu z floému do kořenové špičky (Swarup a kol., 2001). Přenašeč AUX1 se vyskytuje na plazmatické membráně, v membráně Golgiho aparátu a v endozomech. Jeho množství na membráně je regulované dynamickým cyklováním mezi plazmatickou membránou a endozomálními kompartmenty (Kleine-Vehn a kol., 2006). Polární lokalizace AUX1 je zprostředkována pomocí proteinu AXR4 (AUXIN-RESISTANT4), který je asociován s endoplazmatickým retikulem a pravděpodobně se účastní post-translačních modifikací proteinu AUX1 (Dharmasiri a kol., 2006). Role aktivního přenosu pomocí proteinů AUX/LAX byla nedávno též potvrzena v procesu fylotaxe (Bainbridge a kol., 2008).

6.2.2. Proteiny PGP a TRH

Proteiny PIN nejsou jedinými transportéry auxinu z buňky. Jako takové mohou sloužit i fosfoglykoproteiny (PGP), jež jsou rostlinnými ortology skupiny savčích ABC-transportérů

(ATP-binding cassette transporters), které zajišťují rezistenci vůči některým lékům a toxickým látkám (Noh a kol., 2001). Mutanty v PGP genech vykazují různé vývojové vady spojené s poškozeným transportem auxinu, jako je redukovaný dlouhivý růst, špatně definovaná apikální dominance a pozměněná odpověď na tropické stimuly (Bandyopadhyay a kol., 2007). PGP proteiny nejsou většinou v buňkách umístěny polarizovaně, což naznačuje jejich roli v nesměrovaném transportu auxinu na delší vzdálenosti. Je ale zajímavé, že v buňkách některých pletiv, jako je endodermis a kůra elongační zóny kořene, jsou PGP1 i PGP4 lokalizovány asymetricky. Pravděpodobně se tedy účastní i polárního transportu auxinu (Geisler a kol., 2005).

Proteiny PGP mohou fungovat jak v roli přenašeče auxinu z buňky, tak i do buňky. Zvýšená exprese PGP1 v kvasinkových a savčích buňkách vede ke zvýšenému odtoku auxinu z buněk, PGP1 je tedy exportérem auxinu. Naproti tomu PGP4, exprimovaný hlavně v kořenové špičce, slouží k importu auxinu do buněk za spotřeby ATP. Působí tedy společně s proteinem AUX1, který vnáší auxin do buňky symportem s protony (Terasaka a kol., 2005). Pokud jsou PGP4 a PGP1 lokalizovány v buňkách polárně, jsou umístěny na opačných koncích buněk. Jejich transportní funkce pro auxin se tedy pravděpodobně doplňují (Geisler a kol., 2006).

V zásadě se naskýtají dvě možnosti funkce PGP proteinů. Buď působí na plazmatické membráně samostatně a přispívají tak spolu s proteiny PIN k transportu auxinu, nebo s proteiny PIN interagují a tím je na plazmatické membráně stabilizují, účastní se tedy i polarizovaného transportu. Bylo zjištěno, že PIN1 kolokalizuje s PGP19 na plazmatické membráně. Oba tyto proteiny se vyskytují v mikrodoménách bohatých na sterol, které připomínají lipidové rafty (Bandyopadhyay a kol., 2007). V mutantu *pgp19* se PIN1 v těchto mikrodoménách nevyskytuje, což naznačuje, že spolu PIN1 a PGP19 opravdu interagují a PGP19 stabilizuje komplex přenašeče PIN1 na membráně.

Při zvýšené expresi proteinů PIN a PGP dochází buď ke zvýšení či snížení míry transportu auxinu. Zatímco koexprese PGP1 nebo PGP19 s PIN1 vede ke zvýšení transportu, při společné expresi PIN2 s těmito dvěma přenašeči dochází k opačnému jevu, tj. ke snížení exportu auxinu. Ale v obou případech, jak při antagonistickém tak při synergistickém působení obou přenašečů, je zvýšena sensitivita ke kyselině 1-naftylftalamové (NPA) a také substrátová specifita k transportu IAA. Fenotypy dvojitých mutantů *pin pgp* naznačují jejich aditivní funkci, ačkoliv jednoduché mutanty jsou značně odlišné (Blakeslee a kol., 2007). Proteiny PIN a PGP se tedy podle těchto výsledků účastní koordinovaných, ale vzájemně nezávislých transportních mechanismů. PGP přispívá hlavně k nesměrovanému transportu

auxinu na dlouhé vzdálenosti, zatímco proteiny PIN ho transportují spíše polarizovaně a na kratší vzdálenosti. V buňkách některých tkání však spolu také interagují a spolupracují.

Regulace funkce přenašečů PGP je zatím prostudována hlavně u savců. Fosforylace zprostředkovaná protein kinázou C (PKC) stimuluje PGP ke zvýšenému transportu. Proto se při léčbě rakoviny používají mj. inhibitory PKC. Fosforylace proteinů PGP je pomocí nich redukována a dochází k větší akumulaci léčiva v rakovinných buňkách. Podobně je tomu i u rostlin, existuje přímé spojení mezi transportem auxinu a mírou fosforylace PGP (shrnuto v Geisler a kol., 2006). Přenašeče PGP jsou citlivé také k flavonoidům, jež jsou v rostlinách normálně přítomny jako prekurzory žlutých rostlinných barviv. Tyto látky jsou zřejmě přirozeně se vyskytujícími ekvivalenty NPA, inhibitoru transportu auxinu ven z buněk. PGP1 i PGP4 váží flavonoidy i NPA a jsou jimi inhibovány, při jejich zvýšené hladině tedy dochází k akumulaci auxinu v buňkách. Aktivita přenašečů PGP1 a PGP19 je regulována také pomocí proteinu TWISTED DWARF1 (TWD1) (Geisler a kol., 2003; Bouchard a kol., 2006). Tento protein je zakotvený v plazmatické membráně pomocí glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy, interaguje s PGP1 či PGP19 a pravděpodobně celý přenašečový komplex auxinu na membráně stabilizuje. Je také možné, že TWD1 ovlivňuje transportní kapacitu přenašečů PGP, protože jeho interakcí s nimi dochází k zakrytí části jejich C-koncové domény, která se účastní navázání a hydrolýzy ATP, některý z těchto procesů může být tedy ovlivněn.

Vedle přenašečů PGP a PIN hraje v přenosu auxinu z buňky roli ještě jeden protein, TINY ROOT HAIR1 (TRH1), sloužící k přenosu draslíku v kořenech (Vicente-Agullo a kol., 2004). Mutant *trh1* má poškozený vývoj kořenových vlásků a kořenový gravitropismus. Oba tyto defekty lze odstranit exogenní aplikací auxinu. Protein TRH1 je exprimován hlavně v kořenové čepičce, kde zřejmě vytvářením gradientu iontů přes membránu slouží k reorientaci proudu auxinu proudícího ze stéle do buněk epidermis a kortexu.

6.2.3. Proteiny PIN

Při studiu květních mutantů *Arabidopsis thaliana* byla popsána mutace *pin-formed*, jejíž fenotyp se nápadně podobá fenotypu rostlin pěstovaných za přítomnosti inhibitorů polárního transportu auxinu, jako jsou například kyseliny 1-naftylftalamová (NPA) nebo 2,3,5-trijodobenzoová (TIBA). *pin-formed* mutanty mají špatně vyvinutou osu květenství i samostatné květy, nedochází ke vzniku květních primordií a pokud ano, vzniká na vzrostném vrcholu pouze jakýsi pestíku podobný útvar, kolem kterého je méně kališních a více korunních lístků. V květu se můžou nacházet i tyčinky. Pestík je sterilní, nevyvíjejí se v něm

vajíčka. Listy jsou u mutanta *pin1* též abnormální, mohou být širší, protože hlavní céva se větví už u báze listu. Je poškozena také fylotaxe i vývoj děloh (Okada a kol., 1991).

Pokud zvnějšku aplikujeme na rostlinu auxin, dojde k indukci tvorby laterálních květních primordií a vzniká nepoškozené květenství, z čehož je vidět, že pro vývoj i správné umístění orgánů je přísun auxinu nutný (Reinhardt a kol., 2000). V *pin1* mutantech je jeho obsah ve vzrostném vrcholu nedostatečný a k formování laterálních orgánů nedochází. Dalším důkazem, že se proteiny rodiny PIN podílejí na polárním transportu auxinu, je studie na PIN2. Když byl tento protein nadprodukován v kvasinkových buňkách, docházelo u nich ke zvýšenému transportu radioaktivně značeného IAA z buněk. Stejný postup vedl také u buněk BY-2 a *Arabidopsis* k menšímu zadržování a zvýšenému odtoku různých radioaktivně značených IAA, což ale neplatilo pro látky podobné, jako je například kyselina benzoová nebo prekurzor auxinu tryptofan. Transport IAA z buněk přitom byl citlivý k inhibitorům transportu auxinu a jeho rychlost byla přímo úměrná množství nadprodukovaných proteinů PIN (Petrášek a kol., 2006).

Molekulární analýzou genu PIN1 bylo zjištěno, že kóduje protein, který je dlouhý 622 aminokyselin a má 8-12 transmembránových domén obklopujících pravděpodobně hydrofilní centrální oblast. Podobnou strukturu má i mnoho jiných proteinů, účastnících se široké škály transmembránových transportních procesů. Proteiny PIN patří do skupiny sekundárních přenašečů, které přenášejí chemické látky přes membránu na úkor energie elektrochemického gradientu na membráně (Gälweiler a kol., 1998).

Bylo zjištěno, že PIN1 patří do proteinové rodiny o osmi členech, jejichž exprese je tkáňově specifická. I když mají všechny proteiny PIN funkci v transportu auxinu, ukazuje se, že různé proteiny PIN se také účastní různých vývojových procesů. PIN1 v *Arabidopsis* zprostředkovává organogenezi a diferenciaci cévního pletiva, PIN2 gravitropický růst a PIN3 diferenciální růst stonku zprostředkovávající fototropickou odpověď. PIN4 řídí aktivitu kořenového meristému a PIN7 ranný vývoj embrya. Protože PIN proteiny mají více funkcí, které se částečně překrývají, jednotlivé *pin* mutanty nevykazují takové poškození, jaké by se předpokládalo. Když dojde k mutaci v jednom z *PIN* genů, může být jeho funkce kompenzována ektopickou expresí jiného typu proteinu PIN. Mutace ve více *PIN* genech mají proto větší dopad, protože už nemůže dojít k funkční náhradě jiným genovým produktem, a mohou být i letální. Tato částečná záměnnost jednotlivých proteinů je pro rostliny velmi důležitá a přispívá k jejich vysoké plasticitě (Vieten a kol., 2005).

6.2.3.1. Regulace funkce proteinů PIN

Stejně jako mnoho jiných proteinů lze i proteiny PIN regulovat na více úrovních. První představuje možnost regulace množství vznikajících proteinů prostřednictvím aktivace či inhibice jejich transkripce a teoretické ovlivnění proteosyntézy a maturace proteinu (ačkoliv o té doposud není nic známo). Cílem dalších regulačních mechanismů je transport proteinů do membrány a jejich lokalizace v buňce. Může být také přímo ovlivněna funkce již maturovaných proteinů prostřednictvím kompetitivní a nekompetitivní inhibice, fosforylace, defosforylace a řízené degradace (shrnuto v Zažímalová a kol., 2007).

6.2.3.2. Ovlivnění genové exprese transportních proteinů PIN

Auxin může zvyšovat svůj odtok z buněk pomocí indukce exprese svých vlastních transportních proteinů rodiny PIN (Paponov a kol., 2008). Míra indukce závisí jak na délce působení auxinu, tak na jeho koncentraci, a je také specifická pro určitý buněčný typ a pro určitý typ proteinu PIN jinak rychlá. Každý typ přenašeče PIN potřebuje pro indukci své transkripce jinou koncentraci auxinu. Regulace genové exprese je zprostředkována AUX/IAA-závislou dráhou. Auxin způsobí rychlou degradaci represorů AUX/IAA, transkripční faktory ARFs jsou tedy uvolněny z jejich inhibice a mohou aktivovat transkripci proteinů PIN, možná ve spolupráci s dráhou aktivovanou dalšími transkripčními faktory PLETHORA (Blilou a kol., 2005). V mutantech solitary root 1 (*slr-1*), jejichž represor IAA14 je stabilizovaný a nepodléhá auxinem indukované degradaci, nedochází po působení auxinu ke zvýšené expresi PIN proteinů (Vieten a kol., 2005).

Proteiny PIN mohou být regulovány také post-transkripčně, i když o tomto typu regulace toho doposud není moc známo. Nedávno byly objeveny dva geny, *MOP2* a *MOP3* (*MODULATOR OF PIN*) (Malenica a kol., 2007). Mutanty *mop2* a *mop3* mají podobný fenotyp jako mutanty *pin1*, což naznačuje jejich roli v regulaci polárního transportu auxinu. Tyto dva geny nemají vliv na lokalizaci proteinů PIN ani na jejich expresi, ale jejich absence v mutantních rostlinách významně snižuje množství proteinů PIN i jejich aktivitu. Tento fakt naznačuje možnost post-transkripční regulace množství proteinů PIN.

6.2.3.3. Konstitutivní cyklování proteinů PIN a transport a cílení proteinů PIN do membrány

Přenašeče auxinu ven z buňky nezůstávají stále na jednom místě v plazmatické membráně, ale místo toho dochází k jejich neustálému dynamickému cyklování mezi plazmatickou membránou a vnitrobuněčnými endozomálními kompartmenty (Geldner a kol., 2001). Cyklování se účastní protein GNOM, GDP/GTP výměnný faktor pro malé G proteiny

typu ARF (ADP-ribosylační faktor) (Geldner a kol., 2003), který je citlivý k brefeldinu A (BFA). Je nezbytný pro pučení váčků a výběr jejich obsahu, reguluje transport váčků a řídí správnou lokalizaci proteinů PIN1 v membráně, což je důležité především při formování apikálně-bazální osy embrya (Steinmann a kol., 1999). GNOM se ale zřejmě neúčastní cyklování všech PIN proteinů. U PIN2 byla popsána dráha závislá na váčcích obsahujících protein SORTING NEXIN 1 (*AtSNX1*), který je ale stejně jako GNOM citlivý k BFA. Existují tedy nejméně dvě různé endozomální cesty pro cyklování proteinů PIN (Jaillais a kol., 2006).

Tzv. konstitutivní cyklování zahrnuje dva důležité a stále se opakující procesy. Endocytózu, tj. pohyb vezikulů z plazmatické membrány do endozomálních kompartmentů, a exocytózu, tj. pohyb zpět do membrány. Exocytóza váčků je narozdíl od endocytózy citlivá k BFA, který způsobuje akumulaci proteinů (včetně proteinů PIN) ve vnitrobuněčných kompartmentech, tzv. BFA kompartmentech, tvořených nahloučením endocytických váčků a endomembrán. Toto působení je reverzibilní, po vymytí BFA dojde znovu k navrácení proteinů PIN do membrány. K akumulaci proteinů PIN do BFA kompartmentů dochází i pokud je v buňkách inhibována biosyntéza proteinů. To potvrzuje, že tyto kompartmenty nevznikají pouze z nově syntetizovaných proteinů, ale představují nahloučení váčků obsahujících proteiny PIN z plazmatické membrány (Geldner a kol., 2001). Druhý důležitý krok, endocytóza, je regulována auxinem samotným (Paciorek a kol., 2005), což bylo prokázáno pro PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, ale i pro další cyklující proteiny, jako je vodní kanál PIP2 nebo membránová H^+ ATPáza. Auxin inhibuje endocytózu těchto proteinů, a to vede k jejich zvýšenému výskytu na membráně. Auxin tím sám zvyšuje množství svých vnašečů na membráně a tím i svůj transport ven z buněk, což je důležitá negativní zpětná regulace vnitrobuněčné hladiny auxinu. Jakým mechanismem inhibice endocytózy probíhá zatím není úplně jasné. Pravděpodobně se tohoto procesu účastní i jeden z kandidátů na protein zprostředkující citlivost k inhibitorům auxinu, protein BIG (Gil a kol., 2001). U mutantů *big* je endocytóza proteinů PIN a dalších proteinů daleko méně citlivá k auxinu než u wild-type rostlin a tyto mutanty mají také některé vývojové vady, spojené s poškozením transportu auxinu, jako je potlačená apikální dominance a poškozený růst postranních kořenů. Při endocytóze vznikají váčky obalené klatrinem, do kterých jsou proteiny PIN, ale třeba i kanál PIP2 směřovány pomocí klatrin-adaptorového komplexu (Dhonukshe a kol., 2007). Pokud tento komplex na membráně není, dochází sice ke vzniku klatrinových vezikulů, ale PIN v nich není obsažen. Ukazuje se, že endocytóza zprostředkovaná klatrinem je v rostlinných buňkách asi hlavním endocytickým mechanismem.

Jsou tři důvody, proč k dynamickému cyklování proteinů PIN dochází (shnuto v Zažímalová a kol., 2007). Může sloužit k rychlé relokizaci těchto přenašečů a tím i ke změně směru transportu auxinu. Proteiny PIN mohou mít i funkci receptoru a cyklování může být součástí přenosu signálu a způsobem, jakým receptor regeneruje, a nebo může PIN fungovat nejenom jako přenašeč auxinu ven z buňky, ale může způsobovat i jeho akumulaci ve specifických endozomálních váčcích a cílit jeho transport do jiných částí buňky. Toto téma je ale stále ještě velmi málo prozkoumané, je i možné, že k cyklování dochází ze všech tří možných důvodů.

Důležitou strukturou účastnící se transportu váčků je cytoskelet, který vlastně tvoří i jakousi kostru buňky – drží jednotlivé organely i proteiny signálních drah na svém místě. Je pravděpodobné, že se protein PIN nevyskytuje v membráně samostatně, ale tvoří komplex s dalšími proteiny. Jedním z nich je NPA-vázací protein (NBP) (Butler a kol., 1998). Právě NBP je pravděpodobně tou částí komplexu, která je zodpovědná za vazbu s aktinovým cytoskeletem. To dokazuje i pokus, kdy po inkubaci buněk s Cytochalasinem D, cytoskeletální drogou, která způsobuje fragmentaci aktinových filament, došlo ke snížení míry transportu auxinu. Z toho vyplývá, že NPA-vázací protein a tedy i celý komplex přenašeče auxinu je asi držen na membráně v náležité poloze pomocí aktinového cytoskeletu (shrnut v Muday a kol., 2000).

Též genová exprese ovlivněná auxinem rozhoduje o lokalizaci proteinů PIN buňce. V buňkách primárního kořene *Arabidopsis* je PIN1 lokalizován na bazální straně buněk stélé, pericyklu a endodermis, zatímco PIN2 na apikální straně epidermálních buněk a na bazální straně mladých buněk kortexu. Inkubace kořenů v roztoku s biologicky aktivním auxinem (IAA) vedla ke změně polarit PIN1 i PIN2 v určitých buňkách (Sauer a kol., 2006). Umístění PIN1 nebylo ve stélé ovlivněno, ale v buňkách pericyklu a endodermis došlo k jeho přesunu na vnitřní boční stěnu. Lokalizace PIN2 nebyla ovlivněna v buňkách epidermis, ale došlo k jeho přesunu na vnější boční stěnu v buňkách kortexu. Takto působí auxin na lokalizaci proteinů PIN i při nízké koncentraci. Změny jejich polarit nezávisí na vlastnostech jednotlivých typů proteinů PIN, ale jsou specifické pro určitý buněčný typ, jak vyplývá ze studia buněk ektopicky exprimujících PIN1 v buňkách kortexu. Zde došlo po inkubaci s auxinem k jeho relokizaci na vnější boční stěnu buněk stejně, jako k tomu došlo v případě PIN2. Studium mutantních linií *arf* bylo dále zjištěno, že změny polarit proteinů PIN jsou zprostředkovány signalizační dráhou závislou na AUX/IAA-ARF, u *arf* mutantů nedochází k tak znatelné relokizaci PIN proteinů. Stejně tak u linií mutovaných v *AUX/IAA* nedochází k polarizaci buněk. Zatím není zcela jasné, jak přesně AUX/IAA a ARF působí na cílení

proteinů PIN do určitých částí membrány, nejspíše se toho účastní ještě nějaký další, doposud neznámý faktor. Které součásti AUX/IAA-ARF signální dráhy se účastní regulace změny polaritativy proteinů PIN je závislé na typu pletiva, protože v každém pletivu se mohou exprimovat různé specifické AUX/IAA proteiny i transkripční regulátory ARF a interagovat spolu, což se projevuje ve specifickém cílení proteinů PIN do různých stran buněk u různých buněčných typů. Z těchto poznatků je tedy zřejmé, že sám auxin způsobuje polarizaci buněk a zprostředkovává tak svůj směrovaný transport.

6.2.3.4. Regulace funkce a aktivity proteinů PIN jejich fosforylací

Post-translační modifikace různých proteinů reverzibilní fosforylací je jednou z nejčastějších regulací řídicích aktivit proteinů. Zajišťují ji enzymy kinázy a fosfatázy. V signální cestě auxinu nebyla dlouho účast žádné kinázy známa až do objevu serin-threoninové kinázy PINOID (PID) (Bennet a kol., 1995) účastnící se přenosu a šíření auxinového signálu. Mutanty *pid* mají fenotyp podobný jako rostliny mutantní v genu pro PIN1 (shrnuto v DeLong a kol., 2002, Christensen a kol., 2000). Je narušena fylotaxie, laterální orgány jsou rozmístěny náhodně. Květenství je skoro holé, jen s malým počtem květů, ve kterých se může vyskytovat nadbytek korunních lístků, často srostlých, tyčinek je zde naopak méně než v normálních květech a morfogeneze gynecia je také poškozena. Nadprodukce proteinů PID vede k agravitropickému růstu kořene i hypokotylu a někdy až k úplnému kolapsu meristému primárního kořene v důsledku vyčerpání auxinu (Benjamins a kol., 2001).

Zvýšení exprese genu *PID* po působení auxinu naznačuje, že tento gen patří mezi auxinem indukovanou skupinu genů (Benjamins a kol., 2001). Tomu také odpovídá nález sekvencí *AuxRE* (auxin responsive elements) v promotorové oblasti genu pro protein kinázu PID. Ta je nejvíce exprimována v primordiích děloh embrya, v květních primordiích a v cévních pletivech zejména blízko meristémů a po působení auxinu též v listových primordiích. PID je asociována s plazmatickou membránou pomocí interakce s membránovými proteiny, byla prokázána kolokalizace s přenašeči PIN (Michniewicz a kol., 2007). Centrální hydrofilní smyčka proteinů PIN je také substrátem pro fosforylací zprostředkovanou kinázou PID.

Gen *PINOID* kóduje protein o 438 aminokyselinách s velmi podobnou sekvencí, jako mají jiné serin-threoninové protein kinázy. Obsahuje všech 11 subdomén typických pro katalytickou doménu ostatních kináz (Hanks a kol., 1988) a 13 ze 14 aminokyselin, které katalytickou doménu definují. U kinázy PID je zaměněn glycin na 225. pozici za aspartát, což ale nebrání proteinu PID fosforylovat substrát, alespoň v *in vitro* pokusech (Christensen a

kol., 2000). Záměnou této jedné aminokyseliny dochází ke změně konzervovaného motivu DFG (Asp-Phe-Gly) v subdoméně VII za triplet DFD (Asp-Phe-Asp), který je charakteristický pro členy rostlinné kinázové rodiny AGCVIII. PID má pravděpodobně i regulační doménu v úseku mezi VII. a VIII. subdoménou. V *Arabidopsis* je kódováno 23 AGCVIII kináz, jež jsou ortology živočišných kináz rodiny AGC (Galván-Ampudia a Offringa, 2007), a patří do nich mimo kinázy PID i fototropiny (receptory modrého světla) a proteiny WAG1 a WAG2, jež nejspíše také hrají roli v regulaci transportu auxinu (Santner a Watson, 2006).

Protein kináza PID má prokazatelný vliv na lokalizaci auxinových transporterů PIN v buňce (Friml a kol., 2004). Příliš nízká hladina proteinů PID v podkožkových buňkách primárního kořene *Arabidopsis* (malá míra fosforylace přenašečů PIN) vede k lokalizaci proteinů PIN na bazální straně buněk (směrem ke špičce kořene), zatímco nadprodukce kinázy PID (větší míra fosforylace) způsobuje přesun proteinů PIN na apikální stranu buňky. Tím je také vysvětlen kolaps kořenového meristému u rostlin produkujících nadměrné množství kinázy PID. V podkožkových buňkách kontrolních rostlin směřují proteiny PIN1, PIN2 a PIN4 (uložené bazálně) transportní proud auxinu do kořenové špičky. Tím zde dochází k akumulaci auxinu nutné pro ustanovení a fungování kořenového meristému. V rostlinách nadprodukcí kinázy PID však dochází k přesunu PIN2 a PIN4 na apikální stranu buněk. Proud auxinu tak už není směřovaný do kořenové špičky, jeho hladina v meristému se brzy vyčerpá a dojde ke kolapsu meristému primárního kořene (Friml a kol., 2004).

Vliv kinázy PID na lokalizaci proteinů PIN není u všech buněk stejný. Při pozorování umístění PIN1 a PIN3 v buňkách kořenových vlásků *Arabidopsis* před a po nadprodukcí kinázy PID bylo zjištěno, že vysoká hladina PIDu v těchto buňkách nemá stejný účinek jako v podkožkových buňkách primárního kořene. V buňkách kořenového vlásku kontrolních rostlin jsou PIN1 i PIN3 lokalizovány kolem celé membrány s nejvyšší koncentrací na apikální a bazální straně, jejich distribuce tedy není nijak polarizovaná. Při použití inhibitoru protein kinázy staurosporinu došlo k narušení lokalizace proteinů PIN, které se namísto rozmístění okolo celé membrány shlukovaly do oddělených kompartmentů. Toto naznačuje zapojení kinázy PID v cílení proteinů PIN do správných částí membrány (Lee a Cho, 2006). Po nadprodukcí kinázy PID v těchto buňkách nedochází k přesunu proteinů PIN, jen k inhibici růstu kořenových vlásků. Tuto inhibici lze zvrátit dodáním exogenního IAA, inhibitorů transportu auxinu (NPA) či inhibitoru protein kináz, staurosporinu. Tyto výsledky ukazují, že protein PID nejspíše pozitivně reguluje transport auxinu ven z buňky. Při zvýšené

míře jeho exprese dochází v buňkách kořenových vlásků k poklesu koncentrace auxinu pod určitou hladinu, která je k jejich růstu nezbytná.

V buňkách, ve kterých nejsou proteiny PIN polárně distribuovány tedy PID kináza nezpůsobuje jejich relokalizaci, ale spíše aktivuje přenašeče auxinu, či zvyšuje míru jejich zabudování do membrány. Záleží tedy hlavně na buněčném typu, na tom, jestli jsou proteiny PIN lokalizovány polárně či ne, jestli bude kináza PID způsobovat jejich přesun, nebo spíše usnadňovat jejich transport do membrány a tím zvyšovat odtok auxinu z buněk (Lee a Cho, 2006).

6.2.3.4.1. Regulace aktivity protein kinázy PINOID

Aktivita kinázy PID je regulována více mechanismy, jejichž různá aktivita má v důsledku dopad na to, zda bude či nebude tato kináza fosforylovat svůj substrát. Samotná kináza PID je schopna se v malé míře autofosforylovat, stejně jako mnoho dalších kináz (Benjamins a kol., 2003). Čím vyšší je míra autofosforylace, tím se zvyšuje schopnost PID fosforylovat další substráty.

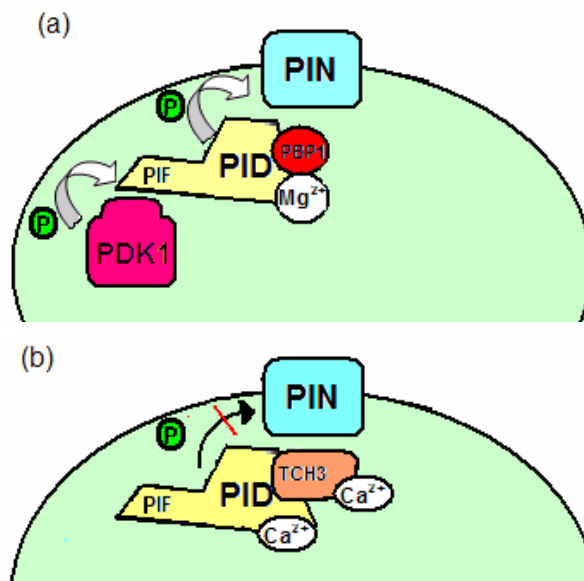
Bylo zjištěno, že aktivace kinázy PID je umožněna její fosforylací zprostředkovanou PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) a celý proces je nejspíše kontrolován složitou fosforylační kaskádou (Zegzouti a kol., 2006a). V *in vitro* pokusech bylo zjištěno, že interakce mezi PDK1 a PID vede k rychlému zvýšení množství fosforylovaných kináz PID. PDK1 aktivuje PID tím, že ji fosforyluje na jednom či více serinech v její aktivační smyčce, čímž dochází k podpoře její autofosforylační aktivity, a tím i její schopnosti fosforylovat substrát.

Stejně jako u savčích kináz bylo i u *Arabidopsis* zjištěno, že pro funkční interakci mezi PID a PDK1 je nutná přítomnost domény PIF (PDK1-interacting fragment) na proteinu PID. Tuto hydrofobní C-terminální doménu obsahující dva fenylalaniny a zajišťující interakci mezi PDK1 a kinázou typu AGC má většina AGCVIII kináz v *Arabidopsis* (Biondi a Nebreda, 2003). V případě náhrady dvou fenylalaninů valinem došlo sice k interakci PID s kinázou PDK1, ale už ne k její fosforylaci. Navázání PDK1 na PIF je tedy důležitým krokem, vedoucím ke konformačním změnám v PDK1 a k stimulaci její fosforylační aktivity (Zegzouti a kol., 2006a).

Kináza PID dále interaguje se dvěma proteiny vázajícími vápník. Jsou to TOUCH3 (TCH3), protein podobný kalmodulinu, a PID-BINDING PROTEIN 1 (PBP1) (Benjamins a kol., 2003). Transkripce všech těchto tří proteinů (PID, TCH3 i PBP1) je indukovatelná auxinem, přičemž ani TCH3 ani PBP1 nejsou substrátem pro fosforylaci zprostředkovanou

PID. PBP1 se v buňkách tvoří jen v malém množství, ale s kinázou PID interaguje poměrně silně a způsobuje zvýšení její autofosforylační schopnosti. Funguje tedy asi jako kofaktor při pozitivní regulaci aktivity kinázy PID. Protein TOUCH3 je tvořen ve větším množství a jeho interakce s PID je závislá na navázání Ca^{2+} na TCH3, narozdíl od PBP1. Ten se v malé míře váže na PID i v nepřítomnosti Ca^{2+} a po jeho navázání se tato interakce jen zvyšuje. Díky příbuznosti TCH3 s kalmodulinem lze pozorovat při použití inhibitoru kalmodulinu (tetracain) zvýšení aktivity kinázy PID. TCH3 je tedy nejspíše negativním regulátorem aktivity kinázy PID (Benjamins a kol., 2003).

Též samotné kationty Ca^{2+} a Mg^{2+} jsou považovány za regulátory aktivity kinázy PID. PID, stejně jako jiné kinázy, je aktivní při navázaném Mg^{2+} , přičemž při jeho zvýšené hladině dochází ke zvýšení autofosforylační schopnosti PID a míry transfosforylace dalšího substrátu. Při inkubaci kinázy PID s ekvimolárními koncentracemi Ca^{2+} a Mg^{2+} dochází k poklesu autofosforylace i transfosforylace a při zvyšování koncentrace Ca^{2+} je autofosforylace zastavena úplně. Ca^{2+} tedy pravděpodobně negativně ovlivňuje aktivitu kinázy PID prostřednictvím kompetitivní inhibice. Váže se do stejného vazebného místa jako Mg^{2+} , který je pro funkci PID nezbytný (Zegzouti a kol., 2006a).



Obr. č. 2: Regulace kinázy PID

Interakce kinázy PID s kinázou PDK1 zvyšuje fosforylační schopnost kinázy PID, stejně jako navázání PBP1 a Mg^{2+} (a), jsou to tedy pozitivní regulátory aktivity proteinu PID. Naopak navázání proteinu TCH3 a vápenatých kationtů její fosforylační schopnost snižuje. Působí jako negativní regulátory aktivity kinázy PID.

Kationty vápníku jsou tedy asi schopné negativně ovlivňovat aktivitu kinázy PID jak její přímou inhibicí navázáním do místa pro Mg^{2+} , tak nepřímo přes inhibici zprostředkovanou interakcí mezi PID a proteinem TCH3 vázajícím vápník.

6.2.3.4.2. Role protein fosfatázy PP2A při regulaci transportu auxinu

Mutant *roots curl in NPA 1 (rcn1)* posloužil k identifikaci dalšího enzymu hrajícího roli v transportu auxinu, protein fosfatázy PP2A. Kořeny mutantů *rcn1* se chovají atypicky v přítomnosti inhibitoru transportu auxinu NPA. Zatímco u kořenů kontrolních rostlin způsobuje NPA zastavení kroucení kořenů, u kořenů *rcn1* mutantů toto kroucení a vlnění podporuje. Toto chování v přítomnosti NPA naznačuje jeho roli v regulaci transportu auxinu.

Mutant *rcn1* nese inzerci T-DNA v genu kódujícím regulační podjednotku A proteinu PP2A (Garbers a kol., 1996). Gen kódující PP2A je mezi eukaryoty velmi konzervovaný, kóduje heterotrimerický enzym, fosfatázu. Ta se skládá z jedné katalytické (C) a dvou regulačních (A a B) podjednotek. Podjednotka A tvoří vlastní „kostru“ holoenzymu a také přímo působí na aktivitu katalytické podjednotky C. Podjednotka B je velmi heterogenní, je kódována třemi nepříbuznými genovými rodinami. Vazbou různých B podjednotek dochází ke změně afinity PP2A vůči specifickým substrátům. V *Arabidopsis* jsou kódovány tři A, pět C a nejméně 12 odlišných B podjednotek, což umožňuje sestavení velkého množství různých izoform enzymu PP2A, jejichž exprese může být buněčně i tkáňově specifická (shrnutí v DeLong a kol., 2002).

Byla zjištěna účast různých PP2A na mnoha důležitých procesech v rostlině, jako jsou například přechody mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu, buněčné dělení, odpověď na chlad či napadení patogenem, nebo regulace aktivity enzymů účastnících se metabolických drah. Jejich aktivita tedy není omezena jen na regulaci transportu auxinu (Zhou a kol., 2004).

Rostliny mutantní v A podjednotce proteinu PP2A (*rcn1*) jsou často agravitropické, dělohy se u nich vyvíjejí nesprávně a může docházet i ke kolapsu kořenového meristému. Všechny tyto defekty ukazují na poruchu transportu auxinu. Podobný fenotyp jako mutant *rcn1* mají i rostliny s nadprodukovanou kinázou PID. Dále u *rcn1* mutantů dochází k přesunu proteinů PIN z bazální na apikální stranu v kořenových buňkách kortexu, tj. ke stejnému jevu, který by mohl být spuštěn nadprodukcí kinázy PID. Oba tyto proteiny (PID i PP2A) jsou asociované s membránou, kde kolokalizují s proteiny PIN. To naznačuje zapojení fosfatázy PP2A v regulaci transportu auxinu a její antagonistickou funkci s kinázou PID, i když stále není jasné, v jakém vzájemném vztahu jsou. Mohou fungovat buď jako kinázo-fosfatázový pár a přímo fosforylovat a defosforylovat PIN a nebo PP2A defosforyluje PID kinázu, čímž

sníží její schopnost fosforylovat PIN. Vždy se ale v případě PP2A jedná o negativní regulátor aktivity proteinů PIN a tím i transportu auxinu ven z buňky (Michniewicz a kol., 2007).

6.2.3.4.3. Kinázy WAG

Do stejné podskupiny AGCVIII kináz, do které patří PINOID, náleží také proteiny WAG1 a WAG2 (Bögre a kol., 2003). Kolokalizují s kinázou PID u plazmatické membrány, mají podobnou aminokyselinovou sekvenci a účastní se regulace polárního transportu auxinu (Galván-Ampudia a Offringa, 2007). WAG 1 i WAG2 jsou tedy serin/threoninové kinázy, oproti kináze PID ovšem postrádají doménu PIF, která slouží k interakci s kinázou PDK1 a nemají ani aktivační smyčku. Přesto mohou PDK1 vázat, ale nedochází už k jejich fosforylaci, nejsou pro tuto kinázu substrátem (Zegzouti a kol., 2006b). Semenáčky *Arabidopsis* mutantní v genech *wag1* nebo *wag2* vykazují zvýšené kroucení a kudrnatění kořínků. Tento fenotyp se vyskytuje u kontrolních rostlin jen v případě jejich naklonění v úhlu menším než 90°. Kroucení kořenů je jevem, který je spojen s transportem auxinu, aplikace NPA u kontrolních rostlin ho zastavuje, ne však u dvojitých mutantů *wag1/wag2*. Kinázy WAG hrají tedy asi roli v potlačování kroucení kořenů, pravděpodobně prostřednictvím regulace transportu auxinu. Doposud však není jasné, do jaké části transportu auxinu zasahují a jakým působí mechanismem (Santner a Watson, 2006).

6.2.3.5. Regulace prostřednictvím fytotropinů

Funkce a aktivita již maturovaných a na membráně umístěných přenašečů auxinu PIN mohou být ovlivněny kompetitivní či nekompetitivní inhibicí pomocí takzvaných inhibitorů polárního transportu auxinu. Jejich působením dochází k omezení transportu auxinu ven z buněk a jeho následné zvýšené akumulaci v buňkách (Katekar a Geissler, 1980). Mezi tyto inhibitory patří například kyselina 2,3,5-trijodbenzoová (TIBA), působící též jako slabý auxin. Asi nejvýznamnějšími inhibitory jsou tzv. fytotropiny s nejčastěji používaným představitelem, kyselinou 1-naftylftalamovou (NPA). Mechanismus jejího působení není zatím znám, ale pravděpodobně je její funkce zprostředkována přes další, NPA-vázající protein (NBP), který se vyskytuje na plazmatické membráně v komplexu s proteiny PIN (Butler a kol., 1998, Benjamins a kol., 2005). Jedním z kandidátů na NBP je protein BIG (Gil a kol., 2001), vázaný s aktinovým cytoskeletem. Počet proteinů, které váží NPA s vyšší či nižší afinitou, je však vyšší. Patří mezi ně např. i proteiny PGP (Geisler a kol., 2005).

Přirozeně vyskytujícími se obdobami fytotropinů mohou být flavonoidy, látky vyskytující se v rostlinách a vážící se na potenciální NBP (Jacobs a Rubery, 1988). Rostliny se zvýšenou hladinou flavonoidů jsou zakrslé s poškozeným polárním transportem auxinu, zatímco u rostlinných mutantů s nedostatkem flavonoidů dochází ke zvýšenému transportu auxinu ven z buněk (Murphy a kol., 2000). Flavonoidy jsou tedy pravděpodobně přirozené inhibitory transportu auxinu z buněk.

6.2.3.6. Regulace funkce proteinů PIN jejich specifickou degradací

Poslední a konečnou regulací hladiny proteinů PIN v buňkách je jejich degradace. Ta byla zatím popsána hlavně v případě PIN2, který je zodpovědný za bazipetální transport auxinu směrem z kořenové špičky do elongační zóny kořene, změnou jeho hladiny na spodní a svrchní straně kořene je též zajištěna rychlá gravitropická reakce. Po gravitropickém stimulu je více auxinu transportováno do elongační zóny kořene na jeho spodní straně, zatímco na jeho svrchní straně je ho méně. Ustanovení příliš velké koncentrace auxinu na spodní straně inhibuje růst kořene, svrchní strana ho přeroste a dochází k jeho ohnutí. S koncentrací auxinu koreluje také hladina proteinů PIN2, jejich hladina klesá na svrchní straně kořene. Tento pokles je způsobený degradací těchto přenašečů a je pro něj důležitý protein AXR1, který se účastní proteolýzy zprostředkované ubiquitinem (Sieberer a kol., 2000). Degradace je tedy post-translační regulací, při níž dochází k ubiquitinaci části endocytovaných proteinů PIN. Do plazmatické membrány se jich tedy vrací méně, čímž je snížen i transport auxinu z buněk. Po gravitropickém stimulu dochází k přemístění přenašečů PIN3 na spodní stranu buněk kořenové špičky, tím je v ní také ustanoveno koncentrační maximum auxinu. Díky přenašečům AUX1 a PIN2 je odsud auxin transportován ve velkém množství do elongační zóny spodní strany kořene. Při krátkodobém působení auxinem dochází k inhibici endocytózy PIN2, na membráně jich tedy zůstává více a stihnou odtransportovat velké množství auxinu. Po delším působení ale auxin podporuje degradaci těchto proteinů v proteazomu, což vede k vyrovnání hladin auxinu na obou stranách kořene a zabrání se tím jeho dalšímu ohýbání (Abas a kol., 2006).

Nejenom množství PIN2, ale i jiných proteinů PIN (PIN1 a PIN7) může být po působení vyšších koncentrací auxinu tkáňově specificky sníženo degradací. Degradace přenašečů auxinu v proteazomu je tedy velmi účinným mechanismem, účastnícím se kontroly toho, jak velké množství molekul PIN bude v různých buňkách rostliny přítomno (Vieten a kol., 2005).

7. Závěr

Vědecký výzkum vedl v posledních letech k pochopení toho, jakým způsobem je zajištěn polární transport auxinu rostlinou. Byla zjištěna úloha některých enzymů, jako je protein kináza PINOID (Bennet a kol., 1995) či fosfatáza PP2A (Garbers a kol., 1996). Tyto dva proteiny kolokalizují na plazmatické membráně spolu s přenašečem PIN a působí zřejmě antagonisticky na jeho aktivitu. Kináza PID zvyšuje míru transportu auxinu z buňky tím, že podporuje zabudování většího množství přenašečů PIN do membrány, PP2A naopak míru transportu snižuje. Mohou fungovat buď jako kinázo-fosfatázový pár a přímo fosforylovat a defosforylovat proteiny PIN, a nebo PP2A defosforyluje kinázu PID, čímž snižuje její schopnost fosforylovat PIN (Michniewicz a kol., 2007). Oba tyto proteiny se také účastní lokalizace transportérů PIN v buňce. Specifická fosforylace přenašečů auxinu je tedy velmi důležitou regulací, protože jejich fosforylační stav má pravděpodobně vliv na jejich lokalizaci v buňce i na míru transportu auxinu (shrnutí v DeLong a kol., 2002).

Tématem regulace polárního transportu auxinu se budu dále zabývat ve své diplomové práci, která by měla objasnit jakým způsobem jsou protein kinázy rodiny AGC, do které patří i PID, v této regulaci zapojeny. Hlavním cílem bude porozumění tomu, jakým způsobem je v buňce kináza PID umístována a jak ovlivňuje rychlost endocytózy proteinů PIN při jejich cyklování, jestli aktivita kinázy PID vede spíše ke stimulaci exocytózy či inhibici endocytózy přenašečů PIN, jestli je vlastní umístování proteinů PIN závislé na přítomnosti funkční kinázy PID nebo ne, a jestli v lokalizaci kinázy PID hraje nějakou roli cytoskelet. Dále bych měla izolovat tabákové homology PID a WAG kináz z *Arabidopsis thaliana* a pokusit se o jejich funkční analýzu.

8. Seznam literatury

- Abas, L., a kol. (2006). "Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism." *Nature Cell Biology* 8(3): 249-256.
- Abel, S., a kol. (1994). "Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(1): 326-330.
- Bainbridge, K., a kol. (2008). "Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning." *Genes & Development* 22(6): 810-823.
- Bandyopadhyay, A., a kol. (2007). "Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms." *Biochemical Society Transactions* 35: 137-141.
- Benjamins, R., a kol. (2003). "PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins." *Plant Physiology* 132(3): 1623-1630.
- Benjamins, R., a kol. (2005). "Regulating the regulator: the control of auxin transport." *Bioessays* 27(12): 1246-1255.
- Benjamins, R., a kol. (2001). "The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport." *Development* 128(20): 4057-4067.
- Benkova, E., a kol. (2003). "Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation." *Cell* 115(5): 591-602.
- Bennett, M. J., a kol. (1996). "Arabidopsis AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism." *Science* 273(5277): 948-950.
- Bennett, S. R. M., a kol. (1995). "Morphogenesis in PINOID mutants of Arabidopsis-thaliana." *Plant Journal* 8(4): 505-520.
- Biondi, R. M. and Nebreda, A. R. (2003). "Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions." *Biochemical Journal* 372: 1-13.
- Blakeslee, J. J., a kol. (2007). "Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis." *Plant Cell* 19(1): 131-147.
- Blilou, I., a kol. (2005). "The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots." *Nature* 433(7021): 39-44.
- Bogre, L., a kol. (2003). "Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases." *Trends in Plant Science* 8(9): 424-431.
- Bouchard, R., a kol. (2006). "Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of Arabidopsis P-glycoproteins." *Journal of Biological Chemistry* 281(41): 30603-30612.
- Butler, J. H., a kol. (1998). "In vitro and in vivo evidence for actin association of the naphthylphthalamic acid-binding protein from zucchini hypocotyls." *Plant Journal* 13(3): 291-301.
- DeLong, A., a kol. (2002). "Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals." *Plant Molecular Biology* 49(3-4): 285-303.
- Dharmasiri, N., a kol. (2005). "The F-box protein TIR1 is an auxin receptor." *Nature* 435(7041): 441-445.
- Dharmasiri, S., a kol. (2006). "AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1." *Science* 312(5777): 1218-1220.
- Dhonukshe, P., a kol. (2007). "Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis." *Current Biology* 17(6): 520-527.
- Dudler, R. and Hertig, C. (1992). "Structure of an MDR-like gene from Arabidopsis-thaliana - Evolutionary implications." *Journal of Biological Chemistry* 267(9): 5882-5888.
- Fleming, A. J. (2006). "Plant signalling: the inexorable rise of auxin." *Trends in Cell Biology* 16(8): 397-402.

- Friml, J. and Palme, K. (2002). "Polar auxin transport - old questions and new concepts?" *Plant Molecular Biology* 49(3-4): 273-284.
- Friml, J., a kol. (2003). "Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis." *Nature* 426(6963): 147-153.
- Friml, J., a kol. (2004). "A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux." *Science* 306(5697): 862-865.
- Galvan-Ampudia, C. S. and Offringa, R. (2007). "Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale." *Trends in Plant Science* 12(12): 541-547.
- Galweiler, L., a kol. (1998). "Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue." *Science* 282(5397): 2226-2230.
- Garbers, C., a kol. (1996). "A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis." *Embo Journal* 15(9): 2115-2124.
- Geisler, M., a kol. (2005). "Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1." *Plant Journal* 44(2): 179-194.
- Geisler, M., a kol. (2003). "TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with Arabidopsis multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19." *Molecular Biology of the Cell* 14(10): 4238-4249.
- Geisler, M. and Murphy, A. S. (2006). "The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development." *Febs Letters* 580(4): 1094-1102.
- Geldner, N., a kol. (2003). "The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth." *Cell* 112(2): 219-230.
- Geldner, N., a kol. (2001). "Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking." *Nature* 413(6854): 425-428.
- Gil, P., a kol. (2001). "BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in Arabidopsis." *Genes & Development* 15(15): 1985-1997.
- Gray, W. M., a kol. (2001). "Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins." *Nature* 414(6861): 271-276.
- Hanks, S. K., a kol. (1988). "The protein-kinase family - conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." *Science* 241(4861): 42-52.
- Hardtke, C. S. and Berleth, T. (1998). "The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development." *Embo Journal* 17(5): 1405-1411.
- Christensen, S. K., a kol. (2000). "Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID." *Cell* 100(4): 469-478.
- Jacobs, M. and Rubery, P. H. (1988). "Naturally-occurring auxin transport regulators." *Science* 241(4863): 346-349.
- Jaillais, Y., a kol. (2006). "AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis." *Nature* 443(7107): 106-109.
- Katekar, G. F. and Geissler, A. E. (1980). "Auxin transport inhibitors.4. Evidence of a common-mode of action for a proposed class of auxin transport inhibitors - the phytotropins." *Plant Physiology* 66(6): 1190-1195.
- Kleine-Vehn, J., a kol. (2006). "Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1." *Plant Cell* 18(11): 3171-3181.
- Lee, S. H. and Cho, H. T. (2006). "PINOID positively regulates auxin efflux in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells." *Plant Cell* 18(7): 1604-1616.
- Leyser, O. (2005). "The fall and rise of apical dominance - Commentary." *Current Opinion in Genetics & Development* 15(4): 468-471.
- Liscum, E. and Reed, J. W. (2002). "Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development." *Plant Molecular Biology* 49(3-4): 387-400.

- Malenica, N., a kol. (2007). "MODULATOR OF PIN genes control steady-state levels of Arabidopsis PIN proteins." *Plant Journal* 51(4): 537-550.
- Marchant, A., a kol. (1999). "AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues." *Embo Journal* 18(8): 2066-2073.
- Michniewicz, M., a kol. (2007). "Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux." *Cell* 130(6): 1044-1056.
- Muday, G. K., a kol. (2000). "The actin cytoskeleton may control the polar distribution of an auxin transport protein." *Gravitational and Space Biology Bulletin* 13(2): 75-83.
- Murphy, A., a kol. (2000). "Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids." *Planta* 211(3): 315-324.
- Noh, B., a kol. (2001). "Multidrug resistance-like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development." *Plant Cell* 13(11): 2441-2454.
- Okada, K., a kol. (1991). "Requirement of the auxin polar transport-system in early stages of Arabidopsis floral bud formation." *Plant Cell* 3(7): 677-684.
- Paciorek, T., a kol. (2005). "Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells." *Nature* 435(7046): 1251-1256.
- Paponov, A. I., a kol. (2008). "Comprehensive Transcriptome Analysis of Auxin Responses in Arabidopsis." *Molecular Plant* 1(2): 321-337.
- Petrasek, J., a kol. (2006). "PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux." *Science* 312(5775): 914-918.
- Quint, M. and Gray, W. M. (2006). "Auxin signaling." *Current Opinion in Plant Biology* 9(5): 448-453.
- Reinhardt, D., a kol. (2000). "Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs." *Plant Cell* 12(4): 507-518.
- Rubery, P. H. and Shelldrake (1974). "Carrier-mediated auxin transport." *Planta* 118(2): 101-121.
- Ruegger, M., a kol. (1997). "Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of Arabidopsis is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects." *Plant Cell* 9(5): 745-757.
- Sachs, T. (1975). "Control of differentiation of vascular networks." *Annals of Botany* 39(160): 197-204.
- Sachs, T. (1991). "Cell polarity and tissue patterning in plants." *Development* S1: 83-93.
- Santner, A. A. and Watson, J. C. (2006). "The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in Arabidopsis." *Plant Journal* 45(5): 752-764.
- Sauer, M., a kol. (2006). "Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity." *Genes & Development* 20(20): 2902-2911.
- Sieberer, T., a kol. (2000). "Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1." *Current Biology* 10(24): 1595-1598.
- Steinmann, T., a kol. (1999). "Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF." *Science* 286(5438): 316-318.
- Swarup, R., a kol. (2001). "Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex." *Genes & Development* 15(20): 2648-2653.
- Swarup, R., a kol. (2004). "Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1." *Plant Cell* 16(11): 3069-3083.
- Tanaka, H., a kol. (2006). "Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development." *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(23): 2738-2754.
- Teale, W. D., a kol. (2006). "Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(11): 847-859.

- Terasaka, K., a kol. (2005). "PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots." *Plant Cell* 17(11): 2922-2939.
- Vicente-Agullo, F., a kol. (2004). "Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in *Arabidopsis* roots." *Plant Journal* 40(4): 523-535.
- Vieten, A., a kol. (2007). "Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development." *Trends in Plant Science* 12(4): 160-168.
- Vieten, A., a kol. (2005). "Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-independent cross-regulation of PIN expression." *Development* 132(20): 4521-4531.
- Woodward, A. W. and Bartel, B. (2005). "Auxin: Regulation, action, and interaction." *Annals of Botany* 95(5): 707-735.
- Zazimalova, E., a kol. (2007). "Polar transport of the plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins." *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(13): 1621-1637.
- Zegzouti, H., a kol. (2006a). "Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(16): 6404-6409.
- Zegzouti, H., a kol. (2006b). "Structural and functional insights into the regulation of *Arabidopsis* AGC VIIIa kinases." *Journal of Biological Chemistry* 281(46): 35520-35530.
- Zhou, H. W., a kol. (2004). "Disparate roles for the regulatory A subunit isoforms in *Arabidopsis* protein phosphatase 2A." *Plant Cell* 16(3): 709-722.