

BREFELDINA A – WGLĄD W FUNKCJONOWANIE SYSTEMU BŁON KOMÓREK ROŚLINNYCH*

BREFELDIN A – AN INSIGHT INTO THE FUNCTIONING OF THE MEMBRANE SYSTEM OF PLANT CELLS

Paulina MŁYNKOWIAK*, Przemysław WOJTASZEK

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM, Poznań

Streszczenie: Prawidłowe funkcjonowanie komórek eukariotycznych jest ściśle zależne od sprawnego przemieszczania błon. Brefeldyna A – toksyna pochodzenia grzybowego, zakłóca to przemieszczanie umożliwiając eksperymentalny wgląd w organizację i współdziałanie różnych przedziałów systemu błonowego. Niedawno zidentyfikowano białka docelowe i miejsca działania BFA. W pracy analizujemy mechanizm działania brefeldyny A i wskazujemy szczególne cechy systemu błon wewnętrznych komórek roślinnych, które przesądzają o swoistych reakcjach roślin na tę toksynę. Pokazujemy również, jak badania jednej z takich reakcji na BFA – wytwarzania przedziałów BFA, doprowadziły do odkrycia nowych aspektów procesu endocytozy u roślin. Wskazujemy wreszcie na implikacje, jakie niesie za sobą poznanie mechanizmów działania BFA dla najnowszych koncepcji dotyczących molekularnych i komórkowych mechanizmów polarnego transportu auksyn.

Słowa kluczowe: brefeldyna A (BFA), czynnik wymiany nukleotydów (GEF), endocytoza, polarny transport auksyn, system błon wewnętrznych.

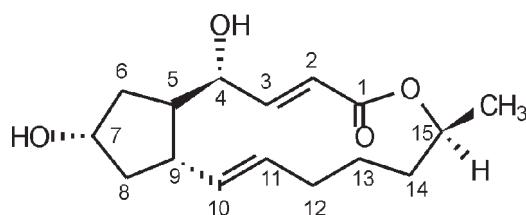
Summary: The functioning of eukaryotic cells is strictly dependent on the proper vesicular traffic within the cell's membrane system. Brefeldin A – a fungal toxin, disturbs this traffic, enabling an experimental insight into the organisation and co-operation of various elements of the system. Recently, BFA target proteins and sites of action have been identified. In this paper, we analyse the mechanism of BFA functioning and indicate those particular properties of the membrane system of plant cells that determine some of the reactions to BFA that are specific to plants. We demonstrate also, how the research into one of such reactions – the formation of BFA compartments has led to the discovery of novel aspects of endocytosis in plants. Finally, we identify implications, born from the recognition of the mechanisms of BFA action, for the modern concepts of molecular and cellular mechanisms of polar auxin transport.

Key words: brefeldin A, endocytosis, guanine nucleotide exchange factor, polar auxin transport, membrane system.

*Autorka jest studentką II roku studiów magisterskich biotechnologii. Autorzy dziękują Ministerstwu Edukacji i Nauki za wsparcie finansowe w ramach projektu badawczego 6 P04C 011 22.

Wykaz skrótów: AG – aparat Golgiego; ARF – czynnik ADP-rybozylacji; BFA – brefeldyna A; COP – kompleks białek oplaszczających pęcherzyki transportujące; ER – retikulum endoplazmatyczne; ERGIC (ang. *ER-Golgi Intermediate Compartment*) – przedział pośredni; VTC (ang. *Vesicular-Tubular Cluster*) – struktura pęcherzykowo-rurkowa; GEF – czynnik wymiany nukleotydów; PAT – polarny transport auksyn; PIN – mutant *Arabidopsis* PIN-FORMED; SNARE (ang. *Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Adaptor protein REceptor*) – białka pośredniczące w fuzji błon; TGN (ang. *trans-Golgi network*) – sieć *trans* aparatu Golgiego.

Wyodrębnienie, przez błony biologiczne, określonych przedziałów o swoistych właściwościach i funkcjach jest cechą charakterystyczną komórek eukariotycznych. Komunikacja pomiędzy różnymi elementami systemu błon wewnętrznych jest jednym



RYCINA 1. Wzór strukturalny brefeldyny A

z kluczowych warunków prawidłowego funkcjonowania komórki. Brefeldyna A (BFA) zakłóca przemieszczanie błon przez aparat Golgiego i transport pęcherzykowy [19]. Ta lipofilna toksyna pochodzenia grzybowego, o strukturze makrocyclicznego pierścienia laktonowego (ryc.1), wyizolowana została po raz pierwszy z *Penicillium brefeldianum*. Dzięki swym właści-

wościom brefeldyna A stała się znakomitym narzędziem badawczym umożliwiając poznanie wielu szczegółów organizacji i działania systemu błon wewnętrznych. Choć BFA wykorzystywana jest do badań od około 40 lat, dopiero w 1992 r. zidentyfikowano białka docelowe [20, 36], a w 2003 r. ustalono mechanizm jej działania [61]. Tu chcemy wskazać na niektóre implikacje, jakie odkrycia te mają dla poznania mechanizmów polarnego transportu auksyn oraz endocytozy u roślin.

SYSTEM BŁON WEWNĘTRZNYCH I JEGO CECHY SZCZEGÓLNE U ROŚLIN

System błon wewnętrznych, jego organizacja i elementy składowe są podobne we wszystkich komórkach eukariotycznych. Organelle systemu: retikulum endoplazmatyczne (ER), aparat Golgiego (AG), wakuole/lizosomy, endosomy, otoczka jądrowa i błona komórkowa, włączana weń coraz częściej, komunikują się nieustannie ze sobą przede wszystkim za pomocą transportu pęcherzykowego [40] (przeгляд literatury w języku polskim w [64, 65]). Wyróżnia się zwykle dwie główne drogi transportu w obrębie systemu: szlak sekrecyjny, prowadzący od ER poprzez AG i sieć *trans* aparatu Golgiego (TGN) do błony komórkowej oraz szlak endocytozy, wiodący od błony komórkowej poprzez różne formy endosomów do lizosomów/wakuol. Analizując dokładniej funkcjonowanie systemu błon wewnętrznych zauważyć można pewne cechy szczególne, charakterystyczne dla różnych grup organizmów eukariotycznych. Przypuszcza się, że wynikają one z przyjęcia odmiennej strategii utrzymania wewnętrznej homeostazy

składu chemicznego [57, 77, 78] przez otoczone ścianą komórki roślin i grzybów oraz „nagie” komórki zwierzęce, co prowadzi do odmiennych sposobów wzrostu komórek [6]. Duże znaczenie ma również rodzaj makrocząsteczek transportowanych w obrębie systemu. O ile bowiem w komórkach zwierzęcych dominującym składnikiem pęcherzyków przemieszczających się w obrębie np. szlaku sekrecyjnego są białka, o tyle w przypadku roślin szlakiem tym transportowane są przede wszystkim polisacharydy budujące ściany komórkowe, z grupy pektyn i hemiceluloz. Do cech wyróżniających system błon wewnętrznych komórek roślinnych zaliczyć należy [14, 27, 34, 40, 56, 63, 74]:

- 1) organizację aparatu Golgiego w postaci dużej liczby ruchliwych stosów (dik-tiosomów) w odróżnieniu od pojedynczego, statycznego i ulokowanego centralnie aparatu Golgiego w komórce zwierzęcej;
- 2) występowanie co najmniej dwóch funkcjonalnych typów wakuol: litycznych i gromadzących białka;
- 3) prawdopodobny brak przedziału pośredniego, podobnego do zwierzęcego ERGIC, pomiędzy ER i AG;
- 4) występowanie ruchliwych miejsc eksportu białek z ER do diktiosomów;
- 5) wykorzystanie filamentów aktynowych, a nie mikrotubul do pozycjonowania i przemieszczania organelli i pęcherzyków transportowych;
- 6) utrzymanie integralności organelli, zwłaszcza stosów AG, w trakcie cytokinezy.

TRANSPORT PĘCHERZYKOWY – GŁÓWNY SZLAK KOMUNIKACYJNY SYSTEMU BŁON WEWNĘTRZNYCH

Transport pęcherzykowy polega na formowaniu pęcherzyków z błony przedziału donorowego, które przemieszczają się, by złączyć się z błoną przedziału akceptorowego [51]. Formowane pęcherzyki pobierają cargo (ładunek), które uwalniane jest do światła przedziału docelowego. Kształtowanie pęcherzyków zachodzi z udziałem cytozolowych białek opłaszczających, których typ wyznacza w pewnym stopniu szlak wędrówki okrytych nimi pęcherzyków. Białka te konieczne są do uformowania pęcherzyków i po ich oddzieleniu od błony donorowej zwykle oddysocjują odsłaniając transbłonowe białka SNARE. Wzajemne oddziaływanie białek v-SNARE w błonie pęcherzyka z białkami t-SNARE w błonie akceptorowej umożliwiają fuzję błon obu przedziałów.

W transporcie postępowym (anterogradowym), w którym makrocząsteczki są eksportowane z ER, pośredniczą pęcherzyki opłaszczone białkami COPII. Przyłączenie białek COPII po stronie cytozolowej błony ER wymaga obecności białka Sar1 o aktywności GTPazowej oraz właściwego czynnika wymiany nukleotydów, w tym przypadku Sec12 (przeгляд w [65]). Białka te zidentyfikowano początkowo u drożdży, a ich odpowiedniki wykryto u wszystkich grup organizmów, w tym roślin [40, 51]. U ssaków odpączkujące z ER pęcherzyki ulegają fuzji tworząc polimorficzną strukturę pęcherzykowo-rurkową ulokowaną pomiędzy ER i AG, określaną jako VTC lub ERGIC. U roślin poszczególne diktiosomy AG przemieszczają się przy udziale systemu aktynomiozynowego wzdłuż struktur ER [11, 52], wymieniając się materiałem [13], w tym

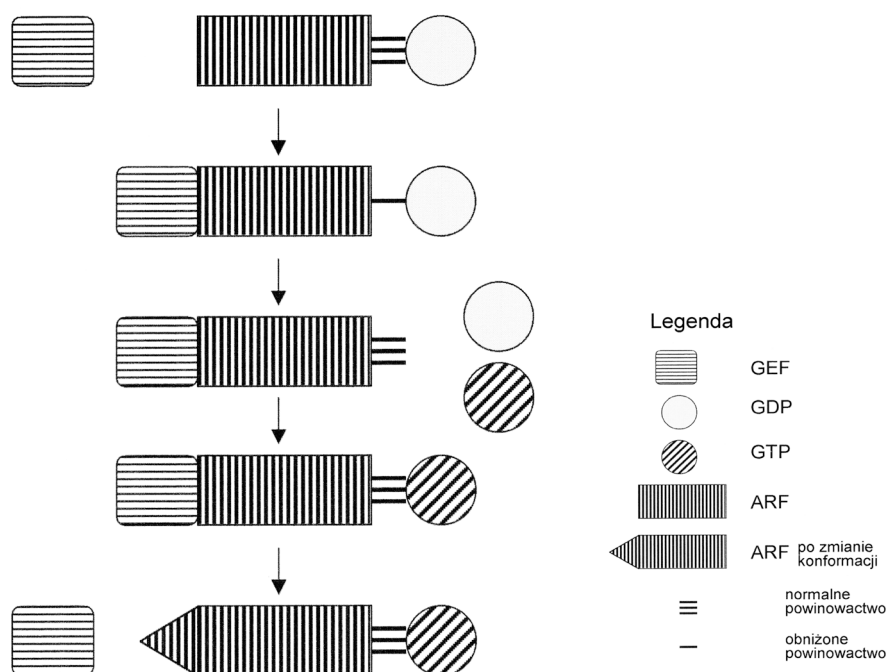
bezpośrednio odbierając w cysternach *cis* diktiosomów cargo niesione przez pęcherzyki oddysocjujące z ER. W obecności brefeldyny A markery cystern *cis* przemieszczają się do ER [68]. Doświadczenia z wykorzystaniem techniki FRAP wykazały natomiast, że powstawanie nowych cystern *cis* związane jest z fuzją wychodzących z ER pęcherzyków opłaszczonych COPII z pęcherzykami COPI wychodzącymi z AG (przeгляд w [75]).

Białka opłaszczające typu COPI związane są z transportem wstecznym (retrogradowym) pęcherzyków z AG do ER oraz w obrębie AG. Asocjację podjednostek kompleksu opłaszczającego COPI indukuje czynnik ARF – małe białko o aktywności GTPazowej, który bierze również udział w formowaniu pęcherzyków okrytych klatryną [82]. Aktywacji ARF dokonują białka ARF-GEF – czynniki wymiany nukleotydów guaninowych. U ssaków znanych jest przynajmniej sześć białek ARF oraz kilka podobnych strukturalnie białek o zróżnicowanej lokalizacji tkankowej. W komórkach drożdży znaleziono tylko trzy, a u *Arabidopsis* 9 do 12 genów *ARF* [41]. Również białka ARF-GEF są dość zróżnicowane. Dotychczas u ssaków opisano pięć odrębnych rodzin ARF-GEF [21], natomiast 8 czynników ARF-GEF *Arabidopsis* zaliczono jedynie do dwóch rodzin: klasy GNOM/Gea1/2p/GBF1 i klasy BIG/Sec7p [41]. W odróżnieniu od czynników ssaczych, wszystkie ARF-GEF *Arabidopsis* należą do tzw. dużych białek ARF-GEF i są przeważnie wrażliwe na BFA.

MECHANIZM DZIAŁANIA BREFELDYNINY A

Jak wspomniano, na początku lat 90. XX w. stwierdzono, że białkami docelowymi dla BFA są białka GEF. Ustalenie, dlaczego nie wszystkie białka ARF-GEF są wrażliwe na BFA i jaki jest właściwie mechanizm działania toksyny, zajęło kolejne 10 lat. Różne białka ARF działają w różnych etapach sekrecji i endocytozy, a każde z nich wymaga współpracy swojego czynnika wymiany nukleotydów. Zdolność wymiany nukleotydów związana jest z obecnością w białkach GEF domeny Sec7 (lub struktury homologicznej do Sec7) [39]. Jej struktura została określona [15, 49], jak również struktury kompleksu białkowego ARF-domena Sec7 [31] i kompleksu niosącego nukleotyd ARF:GDP-domena Sec7 [8]. Proponowany mechanizm działania GEF jest następujący (ryc. 2): białko GEF rozpoznaje kompleks ARF:GDP i wiążąc się z nim obniża powinowactwo ARF do GDP. Po uwolnieniu GDP wolne miejsce zajmuje GTP. Prowadzi to do zmiany konformacji białka ARF i odłączenia białka GEF, które może oddziaływać z kolejnym białkiem G [58]. Ten ostatni etap jest kluczowy, kontroluje wymianę nukleotydów i uwolnienie aktywnej formy ARF:GTP. Jeżeli GTP nie może przyłączyć się do białka G, może dojść do utworzenia nieprawidłowego kompleksu ARF-GEF. Ponieważ poziom ekspresji białek GEF w komórce jest niższy niż odpowiadających im ARF, już mała ilość wolnego białka G jest wystarczająca do związania całej endogennej puli białek GEF. W efekcie prowadzi to do pośredniego zahamowania endogennej aktywacji białek G.

Porównując różne białka GEF stwierdzono, że na BFA wrażliwe są białka zaliczane do klas tzw. dużych białek GEF, natomiast małe białka GEF, takie jak np. ludzki czynnik ARNO, są najczęściej niewrażliwe [15]. Szczegółowa analiza porównawcza dużych



RYCINA 2. Mechanizm działania czynnika wymiany nukleotydów (GEF)

białek Gea1/2 z białkami ARNO wykazała, że pozycje aminokwasów odpowiadające za wrażliwość na toksynę skupiają się w rejonie domeny Sec7 zachodzącym na nie lub znajdującym się bardzo blisko miejsca wiązania ARF1 [58]. Dokładny obszar działania brefeldyny A określono niedawno, dzięki rozszyfrowaniu struktury kompleksu ARF: GDP-BFA-domena Sec7 [61]. Powstało wobec tego pytanie, czy mechanizm inhibicyjnego działania BFA może polegać na współzawodnictwie BFA i ARF o miejsce wiązania w domenie Sec7? Jeżeli by tak było, mielibyśmy do czynienia z sytuacją, w której mała cząsteczka (taka jak BFA) może skutecznie blokować oddziaływanie białko:białko. Czy jednak mała cząsteczka może wiązać się z białkiem docelowym w sposób kompetycyjny z takim samym powinowactwem jak białkowy partner tego białka? Dokładniejsze analizy wykazały, że o wiele skuteczniejsze może być hamowanie niekompetycyjne, w którym mała cząsteczka wiąże się odwracalnie z już utworzonym kompleksem białkowym w określonym miejscu, innym od tego, gdzie przyłączył się białkowy partner. Daje to dwojakie korzyści: współzawodnictwo między białkiem a małą cząsteczką jest o wiele bardziej efektywnym mechanizmem regulatorowym, a stężenie inhibitora niekompetycyjnego wymagane do jego włączenia się w utworzony kompleks białkowy jest niższe niż stężenie inhibitora kompetycyjnego wymagane do nasycenia białka mającego utworzyć kompleks. I rzeczywiście, dalsze doświadczenia wykazały, że BFA raczej stabilizuje kompleks ARF:GDP-Sec7 niż przeciwdziała jego formowaniu [58]. BFA jest więc inhibitorem niekompetycyjnym: wiążąc się odwracalnie z kompleksem utworzonym pomiędzy

ARF:GDP i domeną Sec7 (ARF:GDP-BFA-domena Sec7) uniemożliwia dysocjację nukleotydu. Powstaje endogenna pula ARF:GDP-GEF, która funkcjonuje jako „negatywny dominant” unieruchamiając białko GEF w kompleksie, a to z kolei uniemożliwia aktywację innych cząsteczek ARF przez ten czynnik.

ZMIANY MORFOLOGICZNE INDUKOWANE DZIAŁANIEM BFA

Jednymi z pierwszych obserwacji komórek zwierzęcych, które wzbudziły zainteresowanie wykorzystaniem BFA w biologii komórki, były dane pokazujące zahamowanie wydzielania białek we wczesnych etapach szlaku sekrecyjnego. Potwierdziły to dane mikroskopowe, wskazujące, że w komórkach traktowanych BFA białka wydzielane i białka błonowe są zatrzymywane w ER. Co więcej, po pewnym czasie białka te zaczynają wykazywać cechy białek poddanych modyfikacjom potranslacyjnym typowym dla aparatu Golgiego (przegląd w [43]). Stąd też wywnioskowano, że BFA zmienia organizację i przemieszczanie błon w AG, a w dalszej konsekwencji również w ER. W komórkach zwierzęcych traktowanych BFA cysterny AG początkowo pęcznieją, a następnie pojawiają się długie, rurkowane wypustki, które z czasem, po rozpadzie na drobniejsze pęcherzyki, łączą się z ER; zanika również przedział VTC. W większości przypadków markery sieci TGN nie przemieszczają się do ER, jednakże struktura TGN, endosomów i lizosomów ulega pewnym zmianom. Ta reakcja na BFA sugeruje, że forma organelli jest wynikiem subtelnej równowagi utrzymywanej dzięki białkom cyto-zolowym gromadzącym się na powierzchniach błon. BFA zakłóca tę równowagę hamując gromadzenie się białek opłaszczających. Proces zaczyna się od dysocjacji podjednostek β kompleksu COPI już 20 sekund po dodaniu BFA w temperaturze 37°C i jest zakończony po upływie 1–2 minut [16, 69]. Wówczas organelle przekształcają się w dynamiczny system rurek występujących w mniejszej lub większej rozciągłości w całej komórce. Ponieważ białka COP wiążą się odwracalnie z błonami, nieopłaszczone rurki są prawdopodobnie trwałą formą struktur błonowych. Każda organella ma nie tylko charakterystyczny zestaw białek opłaszczających, ale również swoisty sygnał przyłączenia/odłączenia tychże białek. Sygnał ten może się zmieniać, gdy rozpoczyna się przekształcanie struktury organelli. Opłaszczenie błon lub jego brak to jeden z elementów, który różnicuje dwa typy przemieszczania błon w komórce: homotypowy i heterotypowy (tab. 1) [43].

Mechanizm pośredniczący w transporcie pęcherzykowym jest podobny u wszystkich eukariontów [52]. Stąd BFA działa tak samo, w podobnych miejscach i wywiera podobny efekt podstawowy w postaci zmiany organizacji przemieszczania błon u zwierząt, grzybów i roślin. Jednakże, ze względu na odmienną organizację systemu błon wewnętrznych (patrz wyżej), reakcje komórek roślinnych wykazują pewne cechy swoiste. W komórkach roślin najwcześniej obserwowane są zaburzenia w wydzielaniu białek, przy czym efekt ten jest wyraźnie swoisty dla różnych gatunków roślin i zależy od stężenia i czasu działania BFA. Zmiany morfologiczne w systemie błon wewnętrznych obserwuje się przy stężeniach rzędu dziesiątek $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy zaburzenia transportu białek na szlaku sekrecyjnym pojawiają się już przy stężeniach 0,3 $\mu\text{g/ml}$ [34, 59]. W

TABELA 1. Porównanie dwóch typów transportu błon w komórce

Transport homotypowy	Transport heterotypowy
Nie wymaga opłaszczenia białkowego	Wymaga przyłączenia białek COP do błon oraz obecności białek ARF
Powstające rurki umożliwiają bezpośrednie połączenie pomiędzy błoną donorową i docelową	Powstaje system odrębnych pęcherzyków przenoszących ładunek pomiędzy błoną donorową i docelową – nie dochodzi do bezpośredniego połączenia obu błon
Niewrażliwy na działanie BFA	Wrażliwy na działanie BFA

komórkach ssaków białka ARF-GEF z rodzin wrażliwych na BFA wykazują swoistość działania zależną od miejsca lokalizacji [80]. Na przykład, GBF1 ulokowane są w cysternach *cis* AG, podczas gdy BIG1 i BIG2 gromadzą się głównie w TGN. Działanie BFA w komórkach nadprodukcujących białka BIG2 prowadzi do stabilizacji procesu gromadzenia białek AP1 na błonach TGN, podczas gdy rekrutacja białek COPI na błonach cystern *cis* AG jest zakłócona [71]. Podobną sytuację obserwuje się w komórkach roślinnych, stąd sądzi się, że BFA może, bezpośrednio lub pośrednio, wpływać na funkcjonowanie innych szlaków transportowych, prowadząc do całkowitego zahamowania wędrówki białek [22, 72].

Funkcjonowanie szlaku sekrecyjnego opiera się na transporcie postępowym pęcherzyków opłaszczonych białkami COPII. Tymczasem, analizując efekty działania BFA na wewnątrzkomórkową lokalizację białek COPI w komórkach BY-2 tytoniu (*Nicotiana tabacum*) wykazano, że, podobnie jak w komórkach zwierzęcych [44], najwcześniej obserwowanym procesem jest utrata cytozolowych białek opłaszczających COPI z AG [62]. Jak więc pogodzić te pozornie sprzeczne fakty? Wydaje się, że decydujące znaczenie ma tutaj równowaga pomiędzy szlakami transportowymi przebiegającymi w przeciwnych kierunkach. Biorąc pod uwagę cargo niesione przez pęcherzyki transportowe można zauważyć, że cechą szczególną komórek roślinnych jest znaczące przesunięcie równowagi na korzyść szlaku sekrecyjnego, którym wędrują na zewnątrz składniki ścian komórkowych, przede wszystkim polisacharydy [34, 77, 78]. Stąd też można przypuszczać, że znacznie intensywniejszy „obrót” białkami opłaszczającymi, jak i lipidami błon sprzyja zwiększonej wrażliwości tego szlaku na działanie BFA. Co więcej, można również sądzić, że ta nierównowaga szlaków transportowych, jak również zróżnicowana wrażliwość białek GEF na BFA są źródłem odmiennych reakcji morfologicznych na BFA, obserwowanych wyłącznie w komórkach roślinnych, u których działanie BFA prowadzi do powstania jednej lub dwóch charakterystycznych struktur: przedziału hybrydowego ER-Golgi oraz tzw. przedziałów BFA (ang. *BFA compartments*).

Hybryda ER-Golgi

W komórkach ssaków utrata białek opłaszczających COPI prowadzi do wzmożonego formowania nieopłaszczonych rurek błonowych wzdłuż mikrotubul [38, 69]. Po 10

minutach działania toksyny rurki są już niewidoczne. Ulegają fuzji z ER. W komórkach roślinnych BFA nie prowadzi do gwałtownej zmiany struktury AG. Diktiosomy są wstępnie utrzymywane w normalnym ułożeniu i kształcie, oprócz widocznego ubytku cystern po stronie *cis* [62]. Stopniowo jednak cysterny AG łączą się z ER, formując hybrydę ER-Golgi. W niektórych przypadkach pozostałości cystern mogą się łączyć bocznie z innymi diktiosomami, tworząc przerośnięte kompleksy AG, które dopiero później zlewają się w hybrydę z ER [62]. Z kolei w niektórych typach komórek powstawanie hybrydy ER-Golgi następuje przez zlewanie się indywidualnych cystern AG z ER i przez pewien czas można obserwować diktiosomy z przyłączonymi cysternami hybrydowymi [51]. Przypuszcza się, że zmiany te odzwierciedlają wysoką stabilność strukturalną indywidualnych diktiosomów, która jest konieczna w warunkach częstego i szybkiego ich przemieszczania w obrębie komórki [11, 52]. Co ciekawe, w odróżnieniu od zwierząt, w komórkach roślinnych proces zlewania się błon ER i aparatu Golgiego jest niezależny od obecności funkcjonalnego cytoszkieletu [13].

Przedział BFA

Znacznie wcześniejsze są opisy drugiej ze struktur, pokazujące proces dezintegracji diktiosomów w zlepek rurek i pęcherzyków, określany jako przedział BFA. Analiza wędrówki białek przez system błon wewnętrznych w komórkach poddanych działaniu BFA wykazała, że białka uwalniane z aparatu Golgiego gromadzą się w dużych skupiskach błonowych zlokalizowanych w okolicach jądra komórkowego. Owe skupiska rozmieszczone są w jak największych odległościach od siebie, po przeciwnych stronach jądra i zgodnie z osią symetrii komórki [67]. Obecnie interpretuje się te wczesne wyniki jako proces horyzontalnego rozszczepienia diktiosomów w reakcji na BFA. Większość cystern zostaje zaabsorbowana przez ER z przejściowym uformowaniem hybrydy ER-Golgi. Natomiast cysterny *trans* diktiosomów oraz pęcherzyki TGN zlewają się formując przedział BFA. Pozycja rozszczepienia stosów Golgiego jest wyznaczana przez cysterny niezaangażowane w pączkowanie pęcherzyków opłaszczonych białkami COPI.

W minimalnej, trudnej do zaobserwowania, formie przedział BFA zawiera tylko TGN i jedną lub dwie cysterny *trans*-Golgiego. Jego formowanie zaczyna się znacznie szybciej od innych zmian wywołanych BFA, gdyż obecność przedziałów BFA można odnotować równolegle z pozornie nienaruszonymi stosami AG [29, 62]. Elementy ER nie biorą udziału w tworzeniu tej struktury [37]. Obserwacje te sugerują, że musi istnieć jakieś dodatkowe źródło błon zasilające tworzenie przedziału BFA. Ostatnie badania wskazują, że tworzenie przedziału BFA zasila szlak endocytozy [2, 53] (patrz również niżej). Przedział BFA jest więc hybrydą cysterny *trans* AG:TGN:endosomy, zwykle o określonej organizacji przestrzennej: w centrum znajdują się pęcherzyki szlaku endocytozy, a na peryferiach zlokalizowane są pozostałości stosów AG rozmieszczone w sposób spolaryzowany z cysternami *trans* zwróconymi w stronę przedziału BFA (przegląd w [66]). W komórkach roślin formowanie dużych przedziałów BFA jest unikatową cechą jedynie pewnych typów komórek. Struktury te są formowane w komórkach merystematycznych korzenia, natomiast brak ich w komórkach sekrecyjnych czapeczki korzenia, komórkach metaksylemu i w innych komórkach korzenia

aktywnych w procesie egzocytozy. Jedynym wyjątkiem są komórki epidermalne zaangażowane w formowanie włóśników korzeniowych [2].

„BFA, CZYLI TAM I Z POWROTEM” – ENDOCYTOZA U ROŚLIN

Do niedawna kwestionowano istnienie endocytozy u roślin [35]. Głównym argumentem w dyskusjach było 1) występowanie ścian komórkowych oraz 2) względy mechaniczne, a więc trudności w formowaniu pęcherzyków transportowych w warunkach ciśnienia turgorowego przyciskającego błonę komórkową do ścian. Jednakże wykorzystanie nowych technik obrazowania, a przede wszystkim nowych sond, takich jak: białko GFP lub jego pochodne, asocjujących z błoną barwników z rodziny FM, steroli roślinnych znakowanych filipiną czy wreszcie BFA, w przekonujący sposób wykazały, że endocytoza jest zjawiskiem powszechnym u roślin, a mechanizmy endocytozy są dość zbliżone do tych, jakie znane są w komórkach zwierzęcych (przegląd w [1, 66]). Ostatnio wykazano również, że nawet w komórkach charakteryzujących się wysokim turgorem, takich jak komórki szparkowe, endocytoza jest zjawiskiem konstytutywnym i że tą drogą pobierane są barwniki markerowe oraz wycofywane białka błony komórkowej [47].

Zastosowanie BFA w odpowiednich stężeniach umożliwiło selektywne hamowanie bądź to procesów wydzielania białek na zewnątrz komórek roślinnych, bądź też pobierania substancji z zewnątrz czy wycofywania białek błony komórkowej. Badania te wykazały, że w obecności BFA internalizacji endocytotycznej i gromadzeniu się w przedziałach BFA ulegają m.in. przekaźniki wypływu auksyn z rodziny PIN (patrz niżej) [28, 29], H^+ -ATP-aza błony komórkowej [2, 29], a także peryferyczne białko ARG1 błony komórkowej powiązane z odpowiedzią roślin na bodźce grawitacyjne [12]. Zjawisko to jest charakterystyczne wyłącznie dla roślin, gdyż u zwierząt nie obserwuje się internalizacji markerów błony komórkowej pod wpływem BFA. Co więcej, odmycie BFA w obecności cykloheksimidu [29] prowadziło do powrotu niektórych białek do błon komórkowych, co uznać można za bezpośrednią wskazówkę na istnienie u roślin pełnego systemu umożliwiającego krążenie białek błon komórkowych. Podobne obserwacje dotyczą steroli roślinnych błon komórkowych [32]. Doświadczenia na korzeniach *Arabidopsis* pokazują również, że o ile akumulację białek błony komórkowej w przedziałach BFA można zaobserwować już po ok. 30 min działania toksyny, o tyle nagromadzenie wewnątrz komórki białek wydzielanych szlakiem sekrecyjnym możliwe jest dopiero przy długotrwałej, bo trwającej co najmniej 24 godz., obecności BFA [81]. Wydaje się, że wspomniane wyżej doświadczenia jasno dowodzą, że endocytoza i endosomy przyczyniają się do formowania przedziałów BFA.

Jednym z nieoczekiwanych efektów pośrednich działania BFA, swoistym, jak się wydaje, dla komórek roślinnych jest obecność w pęcherzykach endocytotycznych i dalej w przedziałach BFA pektyn ściany komórkowej, w tym homogalakuronanu o niskim stopniu estryfikacji (do 40%), czy dimerów ramnogalakuronanu II skompleksowanych z jonami

boranowymi [2]. Dotychczas bowiem uważano, że makrocząsteczki wydzielane są do ścian komórkowych nieodwracalnie i że jedynie produkty ich degradacji, takie jak: oligosacharyny lub elicytory, mogą powrócić do protoplastu jako cząsteczki sygnałowe. Oba wspomniane polimery pektynowe powstają jedynie w ścianach komórkowych, a nie są syntezowane w szlaku sekrecyjnym. Przykładowo, homogalakuronan jest wytwarzany w aparacie Golgiego w postaci polimeru silnie estryfikowanego (zwykle powyżej 80%), a usuwanie grup metylowych następuje w ścianach przy udziale metyloesterazy pektyn [77]. Co ważniejsze, traktowanie protoplastów BFA prowadzi do pojawienia się przedziałów BFA niezawierających polimerów pektynowych [2]. W roślinach pozbawionych boru, gwałtownie wzrasta zawartość pektyn w ścianach komórkowych i nie obserwuje się internalizacji deestryfikowanego homogalakuronanu czy kompleksów boranowych z ramnogalakuronanem II [79]. Ponieważ polimery pektynowe odgrywają kluczową rolę w determinacji wytrzymałości mechanicznej i porowatości ścian, można przypuszczać, że ich kontrolowana internalizacja jest istotnym czynnikiem regulatorowym wpływającym na wzrost, polarność i morfogenezę komórek i tkanek roślinnych.

Endocytoza jest procesem zależnym od funkcjonowania cytoszkieletu komórki [60, 66]. W komórkach zwierzęcych, nienaruszony cytoszkielet aktynowy warunkuje prawidłowy przebieg endocytozy [23]. Najnowsze obserwacje sugerują, że podobna sytuacja ma miejsce u roślin. Depolimeryzacja aktyny przez latrunkulinę B czy cytochalazynę D hamuje formowanie dużych przedziałów BFA [2] lub krążenie steroli błon komórkowych [32]. Podobnie, endocytozę hamuje zastosowanie inhibitora miozyny [3]. Natomiast depolimeryzacja mikrotubul przez oryzalinę nie wpływa na endocytozę pektyn [2].

OPOWIEŚĆ O SKRZATACH – BFA I POLARNY TRANSPORT AUKSYN

Auksyny są uważane za integrator wzrostu i rozwoju roślin działający podobnie jak morfogeny u zwierząt [9, 24]. Zidentyfikowano je prawie 80 lat temu, ale dopiero w ostatnich latach zaczynamy poznawać mechanizmy molekularne działania tych hormonów [17, 18, 19, 42]. Decydujące znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania auksyn ma ich polarny transport (PAT) w roślinach. Ponieważ został on wyczerpująco omówiony w wielu pracach przeglądowych (np. [24, 45, 50, 55], w literaturze polskiej [7, 76]), tu ograniczymy się jedynie do przedstawienia zagadnień związanych bezpośrednio z BFA lub takich, które ujrzały światło dzienne już po publikacji wymienionych prac.

W połowie lat 80. XX w. pojawiły się pierwsze wyniki badań przesiewowych mutantów *A. thaliana* o zaburzonych procesach embriogenezy [48]. Jednym z nich był mutant *GNOM* (znany również jako *EMB30*) o szerokiej gamie fenotypów, których wspólną cechą był brak merystemu korzeniowego i, najczęściej, nieprawidłowo wykształcone tkanki wzdłuż osi góra-dół [46, 70]. W późniejszym okresie stwierdzono również, że *GNOM* działa także w dalszych etapach rozwoju roślin, wpływając na funkcjonowanie merystemu korzeniowego i organizację zawiązków korzeni bocznych [30]. Mutację zlokalizowano w genie kodującym białko podobne do białka *Sec7* z drożdży

[70], które zidentyfikowano jako białko ARF-GEF [73]. Białko GNOM należy do klasy GNOM/Gea1/2p/GBF1 [41]. W komórkach *Arabidopsis* jest ono związane z cytoplazmatyczną stroną endosomu i jest niezbędne do utrzymania integralności endosomów [28]. Różni się tym samym od innych białek tej klasy, które u drożdży i zwierząt związane są z transportem w obrębie AG i pomiędzy ER i AG.

Fenotyp mutantów *GNOM* można wywołać w warunkach *in vitro* traktując zarodki wysokimi stężeniami auksyn lub inhibitorów PAT [33]. To sugeruje, że GNOM może w jakiś sposób brać udział w transporcie auksyn. I rzeczywiście, stwierdzono, że w mutantach *gnom* zakłócona jest lokalizacja PIN1 – potencjalnych białek wspomagających wypływ auksyn [29]. W genomie *Arabidopsis* znajduje się 8 genów kodujących białka PIN, z czego 5 zostało dotąd w pełni scharakteryzowanych. Wszystkie one, a w szczególności PIN1 [26], wpływają na transport auksyn, choć ich funkcja jako przenośników auksyn lub regulatorów transportu, jest nadal niejasna [55]. Najbardziej uderzającą cechą białek PIN jest ich ścisła lokalizacja, nie tylko na poziomie tkankowym, ale również w określonych domenach błony komórkowej w zależności od położenia komórki w ciele rośliny [10, 24, 55]. Sugeruje się wobec tego, że lokalizacja białek PIN nie jest zależna od struktury tych białek, ale jest określana przez ukierunkowany transport tych białek do wybranych rejonów komórki [55]. Co ciekawsze, najnowsze dane zdają się świadczyć, że same auksyny są jednym z czynników regulujących ekspresję genów i dystrybucję białek PIN [10, 54].

U roślin BFA indukuje powstawanie pęcherzykowych agregatów zwanych przedziałami BFA. Gromadzą się w nich zarówno białka PIN1, jak i GNOM [29, 73], co sugeruje, że białka PIN1 krążą pomiędzy błoną komórkową a przedziałami endosomalnymi w pęcherzykach wzdłuż cytoszkieletu aktynowego [4, 29, 50]. Tak więc uszkodzenie GNOM zakłóca wewnątrzkomórkowy transport pęcherzykowy, co prowadzi do zaburzeń w krążeniu PIN1 i w konsekwencji do rozregulowania transportu auksyn. Analiza porównawcza sekwencji białek ARF-GEF opornych i wrażliwych na działanie BFA wskazała reszty aminokwasowe krytyczne dla odporności białek. Prosta substytucja aminokwasowa (zamiana ⁶⁹⁶M na L w obrębie domeny Sec7) w genie *GNOM* okazała się wystarczająca do uzyskania mutantów niewrażliwych na toksynę, a tym samym wykazujących nienaruszony transport auksyn i prawidłowe krążenie białka PIN1 w obecności BFA [28].

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie brefeldyny A przyczyniło się do rozwikłania wielu zagadek funkcjonowania systemu błon roślin. W niniejszej pracy wskazaliśmy jedynie niektóre z nich, według naszej opinii najciekawsze. Szczególnie ostatnie z omawianych, a związane z polarnym transportem auksyn zainspirowały niektórych badaczy do sformułowania bardzo interesującej, acz dość niezwykłej hipotezy, zgodnie z którą PAT w wielu aspektach przypomina proces wydzielania neuroprzekazników przez synapsy nerwowe zwierząt [4, 5]. Wspomniano już wcześniej, że auksyny mogą spełniać rolę analogiczną do morfogenów zwierząt [9, 25]. Można mieć nadzieję, że brefeldyna A okaże się przydatna również w badaniach zmierzających do wyjaśnienia i rozpoznania tych fascynujących problemów.

LITERATURA

- [1] BAHAJI A, CORNEJO MJ, ORTIZ-ZAPATER E, CONTRERAS I, ANIENTO F. Uptake of endocytic markers by rice cells: variations related to the growth phase. *Eur J Cell Biol* 2001; **80**: 178–186.
- [2] BALUŠKA F, HLAVACKA A, ŠAMAJ J, PALME K, ROBINSON DG, MATOH T, MCCURDY DW, MENZEL D, VOLKMANN D. F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells insights from brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiol* 2002; **130**: 422–431.
- [3] BALUŠKA F, ŠAMAJ J, HLAVACKA A, KENDRICK-JONES J, VOLKMANN D. Actin-dependent fluid-phase endocytosis in inner cortex cells of maize root apices. *J Exp Bot* 2004; **55**: 463–473.
- [4] BALUŠKA F, ŠAMAJ J, MENZEL D. Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion? *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 282–285.
- [5] BALUŠKA F, VOLKMANN D, MENZEL D. Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell communication. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 106–111.
- [6] BALUŠKA F, WOJTASZEK P, VOLKMANN D, BARLOW P. The architecture of polarized cell growth: the unique status of elongating plant cells. *BioEssays* 2003; **25**: 569–576.
- [7] BANASIAK AS. Polarny transport auksyny – hipotezy i odkrycia. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 605–618.
- [8] BÉRAUD-DUFOUR S, ROBINEAU S, CHARDIN P, PARIS S, CHABRE M, CHERFILS J, ANTONNY B. A glutamic finger in the guanine exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the β-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J* 1998; **17**: 3651–3659.
- [9] BHALERAO RP, BENNETT MJ. The case for morphogens in plants. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 939–943.
- [10] BLILOU I, WILDWATER M, WILLEMSSEN V, PAPONOV I, FRIML J, HEIDSTRA R, AIDA M, PALME K, SCHERES B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 2005; **433**: 39–44.
- [11] BOEVINK P, OPARKA K, CRUZ SS, MARTIN B, BETTERIDGE A, HAWES C. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* 1998; **15**: 441–447.
- [12] BOONSIRICHAH K, SEDBROOK JC, CHEN R, GILROY S, MASSON P. Altered response to gravity is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell* 2003; **15**: 2612–2625.
- [13] BRANDIZZI F, SNAPP E, ROBERTS A, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, HAWES C. Membrane protein transport between the ER and Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* 2002; **14**: 1293–1309.
- [14] CARTER CJ, BEDNAREK SY, RAIKHEL NV. Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 701–707.
- [15] CHERFILS J, MENETREY J, MATHIEU M, LE BRAS G, ROBINEAU S, BÉRAUD-DUFOUR S, ANTONNY B, CHARDIN P. Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* 1998; **392**: 101–105.
- [16] DASCHER C, BALCH WE. Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1437–1448.
- [17] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 441–445.
- [18] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, WEIJERS D, LECHNER E, YAMADA M, HOBBIE L, EHRISMANN JS, JÜRGENS G, ESTELLE M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 2005; **9**: 109–119.
- [19] DINTER A, BERGER EG. Golgi disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 1998; **109**: 571–590.
- [20] DONALDSON JG, FINAZZID, KLAUSNER RD. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 1992; **360**: 350–352.
- [21] DONALDSON JG, JACKSON CL. Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 475–482.
- [22] DRIOUICH A, ZHANG GF, STAEHELIN LA. Effect of brefeldin A on the structure of the Golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*). *Plant Physiol* 1993; **101**: 1363–1373.
- [23] ENGQVIST-GOLDSTEIN AEY, DRUBIN DG. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**: 287–332.
- [24] FRIML J. Auxin transport – shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 7–12.
- [25] FRIML J, VIETEN A, SAUER M, WEIJERS D, SCHWARZ H, HAMANN T, OFFRINGA R, JÜRGENS G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 2003; **426**: 147–153.

- [26] GÄLWEILER L, GUAN C, MÜLLER A, WISMAN E, MENDGEN K, YEPHREMOV A, PALME K. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 1998; **282**: 2226–2230.
- [27] GELDNER N. The plant endosomal system – its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta* 2004; **219**: 547–560.
- [28] GELDNER N, ANDERS N, WOLTERS H, KEICHER J, KOMBERGER W, MULLER P, DELBARRE A, UEDA T, NAKANO A, JÜRGENS G. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling auxin transport and auxin-dependent plant growth. *Cell* 2003; **112**: 219–230.
- [29] GELDNER N, FRIML J, STIERHOF Y-D, JÜRGENS G, PALME K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 2001; **413**: 425–428.
- [30] GELDNER N, RICHTER S, VIETEN A, MARQUARDT S, TORRES-RUIZ RA, MAYER U, JÜRGENS G. Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* 2004; **131**: 389–400.
- [31] GOLDBERG J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 1998; **95**: 237–248.
- [32] GREBE M, XU J, MOBIUS W, UEDA T, NAKANO A, GEUZE HJ, ROOK MB, SCHERES B. *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* 2003; **13**: 1378–1387.
- [33] HADFI K, SPETH V, NAUHAUS G. Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* 1998; **125**: 879–887.
- [34] HANTON SL, BORTOLOTTI LE, RENNA L, STEFANO G, BRANDIZZI F. Crossing the divide – transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plants. *Traffic* 2005; **6**: 267–277.
- [35] HAWES C, CROOKS K, COLEMAN J, SATIAT-JEUNEMAITRE B. Endocytosis in plants: fact or artifact? *Plant Cell Environ* 1995; **18**: 1245–1252.
- [36] HELMS JB, ROTHMAN JE. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 1992; **360**: 352–354.
- [37] HENDERSON J, SATIAT-JEUNEMAITRE B, NAPIER R, HAWES C. Brefeldin A-induced disassembly of the Golgi apparatus is followed by disruption of the endoplasmic reticulum in plant cells. *J Exp Bot* 1994; **45**: 1347–1351.
- [38] HESS MW, MÜLLER M, DEBBAGE PL, VETTERLEIN M, PAVELKA M. Cryopreparation provides new insight into the effect of brefeldin A on the structure of the HepG2 Golgi apparatus. *J Struct Biol* 2000; **130**: 63–72.
- [39] JACKSON CL, CASANOVA JE. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 60–67.
- [40] JÜRGENS G. Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; **20**: 481–504.
- [41] JÜRGENS G, GELDNER N. Protein secretion in plants: from the *trans*-Golgi network to the outer space. *Traffic* 2002; **3**: 605–613.
- [42] KEPINSKI S, LEYSER O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 446–451.
- [43] KLAUSNER RD, DONALDSON JG, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992; **116**: 1071–1080.
- [44] KREIS TE, LOWE M, PEPPERKOK R. COPs regulating membrane traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 677–706.
- [45] LEYSER O. Auxin distribution and plant pattern formation: how many angles can dance on the point of PIN? *Cell* 2005; **121**: 819–822.
- [46] MAYER U, BÜTTNER G, JÜRGENS G. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 1993; **117**: 149–162.
- [47] MECKEL T, HURST AC, THIEL G, HOMANN U. Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K⁺-channel KAT1. *Plant J* 2004; **39**: 182–194.
- [48] MEINKE DW. Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: Analysis of mutants with a wide range of lethal phenotypes. *Theor Appl Genet* 1985; **69**: 543–552.
- [49] MOSESSEVA E, GULBIS JM, GOLDBERG J. Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human arno and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell* 1998; **92**: 415–423.

- [50] MUDAY GK, PEER WA, MURPHY AS. Vesicular cycling mechanisms that control auxin transport polarity. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 301–304.
- [51] NEBENFÜHR A. Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, RabS and SNAREs. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 507–512.
- [52] NEBENFÜHR A, STAEHELIN LA. Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 160–167.
- [53] NEBENFÜHR A, RITZENTHALER C, ROBINSON DG. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* 2002; **130**: 1102–1108.
- [54] PACIOREK T, ZAŽIMALOVÁ E, RUTHARDT N, PETRÁŠEK J, STIERHOF Y-D, KLEINE-VEHN J, MORRIS DA, EMANS N, JÜRGENS G, GELDNER N, FRIML J. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 2005; **435**: 1251–1256.
- [55] PAPONOV IA, TEALE WD, TREBAR M, BLILOU I, PALME K. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 170–177.
- [56] PAVELKA M, ROBINSON DG. The Golgi apparatus in mammalian and higher plant cells: a comparison. [w] Robinson DG [red.] The Golgi apparatus and the plant secretory pathway. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2003: 16–35.
- [57] PETERS WS, HAGEMANN W, TOMOS DA. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in „soft” plant tissues. *Comp Biochem Physiol Part A* 2000; **125**: 151–167.
- [58] PEYROCHE A, ANNTONY B, ROBINEAU S, ACKER J, CHERFILS J, JACKSON CL. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 1999; **3**: 275–285.
- [59] PIMPL P, HANTON SL, TAYLOR JP, PINTO-DA SILVA LL, DENECKE J. The GTPase ARF1 controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell* 2003; **15**: 1242–1256.
- [60] QUALMANN B, KESSELS MM, KELLY RB. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 2000; **150**: F111–F116.
- [61] RENAULT L, GUIBERT B, CHERFILS J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 2003; **426**: 525–530.
- [62] RITZENTHALER C, NEBENFÜHR A, MOVAFEGHI A, STUSSI-GARAUD C, BEHNIA L, PIMPL P, STAEHELIN LA, ROBINSON DG. Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* 2002; **14**: 237–261.
- [63] ROBINSON DG, RITZENTHALER C. Perturbation of ER-Golgi vesicle trafficking. [w] Robinson DG [red.] The Golgi apparatus and the plant secretory pathway. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2003: 193–207.
- [64] ROSZEK K, GNIOT-SZULŻYCKA J. Wielorakie formy pęcherzyków oplaszczonych klatryną w zależnym od receptorów transporcie i segregacji makromolekuł. *Post Biol Kom* 2001; **27**: 295–314.
- [65] ROSZEK K, GNIOT-SZULŻYCKA J. Transport makromolekuł pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego. Rola pęcherzyków COPI i COPII oraz przedziału pośredniego. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 443–465.
- [66] ŠAMAJ J, BALUŠKA F, VOIGT B, SCHLICHT M, VOLKMANN D, MENZEL D. Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* 2004; **135**: 1150–1161.
- [67] SATIAT-JEUNEMAITRE B, COLE L, BOURET T, HOWARD R, HAWES C. Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *J Microsc* 1996; **181**: 162–177.
- [68] SAINT-JORE CM, EVINS J, BATOKO H, BRANDIZZI F, MOORE I, HAWES C. Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *Plant J* 2002; **29**: 661–678.
- [69] SCIACY N, PRESLEY J, SMITH C, ZAAL KJM, COLE N, MOREIRA JE, TERASAKI M, SIGGIA E, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1137–1155.
- [70] SHEVELL DE, LEU WM, GILLMOR CS, XIA G, FELDMANN KA, CHUA N-H. EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* 1994; **77**: 1051–1062.
- [71] SHINOTSUKA C, YOSHIDA Y, KAWAMOTO K, TAKASTU H, NAKAYAMA K. Overexpression of an ADP-ribosylation factor – guanine nucleotide exchange factor, BIG2, uncouples brefeldin A-induced adaptor protein-1 coat dissociation and membrane tubulation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9468–9473.

- [72] STAEHELIN LA, DRIOUICH A. Brefeldin A effects in plants: Are different Golgi responses caused by different sites of action? *Plant Physiol* 1997; **114**: 401–403.
- [73] STEINMANN T, GELDNER N, GREBE M, MANGOLD S, JACKSON CL, PARIS S, GÄLWEILER L, PALME K, JÜRGENS G. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 1999; **286**: 316–318.
- [74] SURPIN M, RAIKHEL N. Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 100–109.
- [75] WARD TH, BRANDIZZI F. Dynamics of proteins in Golgi membranes: comparisons between mammalian and plant cells highlighted by photobleaching techniques. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 172–185.
- [76] WIŚNIEWSKA J, TYBURSKI J, TRETYN A. Polarny transport auksyny – przełom w badaniach? *Post Biol Kom* 2004; **31**: 9–24.
- [77] WOJTASZEK P. Genes and plant cell walls: a difficult relationship. *Biol Rev (Cambridge)* 2000; **75**: 437–475.
- [78] WOJTASZEK P. Czym jest komórka roślinna? Miejsce ścian komórkowych. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 315–324.
- [79] YU Q, HLAVACKA A, MATOH T, VOLKMANN D, MENZEL D, GOLDBACH HE, BALUŠKA F. Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices. *Plant Physiol* 2002; **130**: 415–421.
- [80] ZHAO X, LASELL TK, MELANCON P. Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 119–133.
- [81] ZHENG H, KUNST L, HAWES C, MOORE I. A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant J* 2004; **37**: 398–414.
- [82] ZHU Y, TRAUB LM, KORNFELD S. ADP-ribosylation factor 1 transiently activates high-affinity adaptor protein complex AP-1 binding sites on Golgi membranes. *Mol Biol Cell* 1998; **9**: 1323–1337.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

*Otrzymano: 11.07.2005 r.
Przyjęto: 23.11.2005 r.
ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań
e-mail: przemow@ibch.poznan.pl*