

ZNACZENIE TRANSPORTU PĘCHERZYKOWEGO I RECYKLIZACJI AKWAPORYN ROŚLINNYCH

REGULATION OF PLANT AQUAPORINS THROUGH VESICLE TRAFFICKING

Ewelina PALUCH, Władysław POLCYN

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie: Akwaporyny to tetrameryczne białka, które tworzą kanały w wewnętrznych i zewnętrznych błonach komórkowych. Wspomagają one dyfuzję wody oraz drobnych nienaładowanych związków rozpuszczalnych pomiędzy komórkami jak i pomiędzy przedziałami subkomórkowymi. Ostatnie badania pokazały, że domniemana lokalizacja kanałów wodnych, według której klasyfikuje się akwaporyny roślinne, jest bardziej złożona i różni się od pierwotnie przyjmowanych opisów. Dla przykładu, wykazano lokalizację akwaporyny błony komórkowej (PIP) zarówno w błonie plazmatycznej jak i w błonie chloroplastowej komórek mezofilu liści tytoniu. Mechanizmy kontrolujące eksport akwaporyn z retikulum endoplazmatycznego, ich kierowanie do ostatecznej lokalizacji oraz endocytotyczne wycofywanie z błon komórkowych tworzą nowy model dla studiowania subkomórkowej dynamiki sortowania roślinnych białek błonowych. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja akwaporyn jest w wysokim stopniu wrażliwa na stresy abiotyczne, a dane dotyczące stresu solnego świadczą o możliwości endocytotycznej recykliczacji tych białek.

Słowa kluczowe: akwaporyny, egzocytoza, endocytoza, transport pęcherzykowy, lokalizacja subkomórkowa

Summary: Aquaporins are tetrameric proteins, which form channels in internal and external cell membranes. They facilitate diffusion of water and small uncharged solutes between cells and intracellular compartments. Recent studies have shown that the supposed localization of aquaporins, used in present classification, is more complex and differs from the originally accepted descriptions. For example, it was shown that plasma intrinsic proteins (PIP) are localized both in plasma and chloroplast membrane in tobacco leaf mesophyll cells. The mechanisms controlling the export of aquaporins from endoplasmic reticulum, directing them to the final location and endocytic removal from cell membranes create a new model for the study of subcellular sorting dynamics of plant membrane proteins. Endocytic cycling of aquaporins is highly sensitive to abiotic stresses, and much information was provided on the salt stress.

Key words: aquaporins, exocytosis, endocytosis, vesicle trafficking, sub-cellular localization

WSTĘP

Akwaporyny są tetramerycznymi białkami tworzącymi kanały w wewnętrznych i zewnętrznych błonach komórkowych. Wspomagają one dyfuzję wody oraz drobnych nienaladowanych związków rozpuszczalnych pomiędzy komórkami jak i pomiędzy przedziałami subkomórkowymi. Roślinne akwaporyny wykazują wysoką różnorodność izoform, odpowiednio 35, 37, 36 i 33 u rzodkiewnika i pomidora oraz kukurydzy i ryżu [12, 37, 58, 66, 69]. Roślinne izoformy akwaporyn mogą zostać sklasyfikowane według siedmiu grup, uwzględniających podobieństwa sekwencji i lokalizację wewnątrzkomórkową. Klasyfikacja ta wydziela cztery główne homologiczne podrodziny, do których należą: akwaporyny błony komórkowej (PIP), akwaporyny tonoplastowe (TIP), akwaporyny typowe dla błony peribakteroidalnej (NIP) oraz białka o nieznaczonej homologii do akwaporyny 1 człowieka (SIP) [35, 57]. Trzy pozostałe grupy są do tej pory słabo poznane. Należą do nich niesklasyfikowane białka błonowe X (XIP) [46], GlpF-podobne białka wewnętrzne (GIP) i hybrydowe białka wewnętrzne (HIP) [27]. Także ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja pozostaje wciąż niewiadomą.

Rośliny posiadają niezwykle zdolność do wychwytywania różnych sygnałów z otaczającego je środowiska i odpowiedniego dostosowania właściwości transportu wody. Mechanizmy regulujące gospodarkę wodną za pośrednictwem akwaporyn są wysoce złożone i łączą różne sygnały, przez co na wiele pytań nie uzyskano dotychczas odpowiedzi. Aktywność akwaporyn kontrolowana jest przez szereg bodźców zewnętrznych jak i wewnętrznych cząsteczek sygnałowych. Mechanizmy regulujące aktywność akwaporyn to między innymi: fosforylacja i heteromeryzacja, natomiast czynnikami wpływającymi na ich regulację są między innymi zmiany pH, stężenie jonów Ca^{2+} i H_2O_2 , hormony roślinne oraz lokalne zmiany ciśnienia zmieniające tempo przepływu wody przez kanał. Kanały te są ściśle regulowane na wielu poziomach, co umożliwia kontrolę gęstości ich rozmieszczenia oraz aktywności w błonach komórkowych. Jednakże mechanizmy regulacji potranslacyjnej, które mogą wpływać na strukturę monomerów akwaporyn, ich stabilność w błonie komórkowej oraz modulację dynamiki sortowania akwaporyn do miejsc docelowych w komórce, wydają się być bardzo złożone, a nowe procesy regulacyjne są cały czas odkrywane [13, 29, 55].

Wewnątrzkomórkowy transport akwaporyn może odbywać się przy wykorzystaniu tych samych lub podobnych mechanizmów co białek transportujących auksyny. Prace eksperymentalne dotyczące wpływu auksyn [16] dostarczają danych podważających dotychczasowe poglądy, według których szlaki endo- i egzocytotyczne są od siebie niezależne. Z prac tych wyłania się obraz wręcz przeciwny, pokazujący integrację szlaków sekrecyjnych i endocytotycznych. Regulacja wpływu auksyn może odbywać się dzięki konstytutywnemu krążeniu białek transportowych dla auksyn (PIN) między błoną komórkową a systemami błon we-

wewnętrznych, w tym głównie przedziałami endosomalnymi i przedziałami strefy *trans* aparatu Golgiego (TGN). Prowadzi to do możliwości regulacji transportu błonowego przez konstytutywną recykлизację niektórych składników błony komórkowej. Dzieje się tak w przypadku odzyskiwania białek PIN1, które wspomagają egzocytotyczny transport auksyn. Najnowsze badania wskazują, że internalizacja białek PIN ma miejsce za pośrednictwem transportu pęcherzykowego zależnego od klatryny. Powrót powyższych białek z przedziałów komórkowych do błony plazmalemowej lub ich kierowanie do wakuoli litycznej jest regulowany przez wiele mechanizmów [41].

Dostarczone w ostatnim czasie dane świadczą, że kluczowym mechanizmem regulującym aktywność akwaporyn, zarówno w cyklu dobowym jak i w warunkach stresowych, jest ich odwracalne wycofywanie (recykлизacja) do różnych błon wewnątrzkomórkowych, związane z transportem endocytotycznym [1, 2, 28, 29]. Badania w tej dziedzinie są fragmentaryczne ze względu na brak wiedzy na temat białek oddziałujących z akwaporynami [55]. Nie mniej jednak badania recykлизacji akwaporyn przeprowadzane w warunkach stresowych są prezentowane jako interesujący model krążenia endocytotycznego także dla innych roślinnych białek [48, 53]. Ze względu na udział akwaporyn w odpowiedzi na zmiany warunków środowiskowych badania te dostarczają wiedzy dotyczącej mechanizmów kontrolujących procesy adaptacji roślin do warunków stresowych.

Wyjaśnienie dynamiki ukierunkowanego transportu akwaporyn do właściwych przedziałów komórkowych ma zasadnicze znaczenie w zrozumieniu jak rośliny regulują przepuszczalność hydrauliczną błon komórkowych. Poniższy przegląd przedstawia najnowsze doniesienia odnoszące się do transportu sekrecyjnego akwaporyn oraz ich kluczowych interakcji molekularnych w roślinnym transporcie endocytotycznym.

NOWE DANE NA TEMAT LOKALIZACJI IZOFORM AKWAPORYN

Ostatnie badania pokazały, że domniemana lokalizacja akwaporyn, według której klasyfikuje się akwaporyny roślinne, jest bardziej złożona i różni się od pierwotnie przyjmowanych opisów. Dla przykładu, w komórkach mezofilu liści tytoniu, wykazano, że akwaporyny typu PIP można znaleźć zarówno w błonie komórkowej jak i w błonie chloroplastowej. Lokalizacja w chloroplastach została ustalona dla białka NtPIP1 używając techniki immunogold, a także z użyciem mutantów wykazujących przejściową ekspresję NtPIP1 znakowanego mGFP4 [81]. Lokalizacja chloroplastowa akwaporyny NtPIP1 i jej homologu AtPIP1;2 z *Arabidopsis thaliana* została powiązana z transportem dwutlenku węgla w mezofilu [33, 81]. Sugeruje się, że NtPIP1 preferencyjnie bierze udział w transporcie wody w błonie komórkowej, natomiast transport CO₂ jest dominującą funkcją tego białka gdy zlokalizowane jest

w chloroplastach [81]. Nieznana jest jednak odpowiedź na pytanie dotyczące mechanizmu prowadzącego do dostarczenia tego białka do błony chloroplastowej [3, 70]. Białka PIP mogą ulegać translokacji bezpośrednio z ER do chloroplastów przez strukturalną asocjację lub ich wydłużenia zwane stromulami [3].

Początkowo uważano, że białka TIP występują wyłącznie w błonie tonoplastowej. Mogą one jednak wykazywać zróżnicowaną lokalizację wewnątrzkomórkową. Dla przykładu znakowane białkami fluorescencyjnymi AtTIP3;1 i AtTIP3;2 lokalizowały się zarówno w błonie tonoplastowej jak i w błonie komórkowej komórek zarodkowych *Arabidopsis*. Obserwacja ta wydaje się swoista dla podklasy białek TIP specyficznej dla nasion i jest ograniczona do występowania we wczesnych fazach kiełkowania [21]. Natomiast izoforma AtTIP5;1 specyficzna dla pyłku, skoniugowana z białkiem GFP, wykazywała kolokalizację z barwnikiem mitochondrialnym MitoTracker, w czasie ekspresji w komórkach wegetatywnych transgenicznego pyłku *Arabidopsis* [74]. Jednak bezpośredniego dowodu na temat lokalizacji natywnego białka w mitochondriach wciąż brakuje.

Białka TIP wykazują wysoką różnorodność funkcjonalną, która dotyczy transportu wody, glicerolu, związków azotowych (mocznik, NH_3) lub nadtlenu wodoru (H_2O_2) [85]. Badania nad izoformami TIP wykazały, że komórka roślinna może posiadać morfologicznie i funkcjonalnie różne typy wakuoli [20]. Różnorodność ta może wynikać z różnego sposobu sortowania izoform TIP do ostatecznego miejsca wbudowania ich w błonę. Jednak białka TIP należące do różnych podklas mogą również ulegać koekspresji w tej samej wakuoli [21, 22, 34]. Przykładem tego mogą być transgeniczne rośliny *Arabidopsis*, u których wykazano, że zarówno AtTIP1;1 jak i AtTIP3;1 obecne są w centralnej wakuoli siewek [21]. Wynik ten nie przeczy istnieniu wielu typów wakuol w komórkach roślinnych, ale wskazuje na to, że odmienne izoformy TIP mogą być kierowane do tego samego typu wakuoli. Można również zauważyć nierównomierność rozmieszczenia białek TIP w wakuolach. Dla przykładu AtTIP1;1 skoniugowane z białkiem GFP znakowały wewnątrz wakuolarnie wgłębienia lub błony dwóch sąsiadujących wakuol leżących w pobliżu [6, 67]. Lokalizacja ta może sprzyjać przepływowi wody i niskocząsteczkowych substancji lub wpływać na właściwości adhezyjne pomiędzy sąsiadującymi wakuolami [6]. Stwierdzono, że niektóre izoformy mogą mieć lokalizację ograniczoną do rejonów biegunowych komórki, których oś jest wyznaczana różnymi bodźcami kierunkowymi, np. gradientem stężenia boru w tkance. AtNIP5;1 jest indukowana w czasie niedoboru boru w korzeniach *Arabidopsis*, gdzie służy jako kanał dla kwasu borowego. Zgodnie z funkcją pasywnego poboru tego jonu, AtNIP5;1 umiejscowione są preferencyjnie w domenach błon komórkowych znajdujących się po tej stronie komórki, która jest bliższa zewnętrznym warstwom korzenia [79]. BOR1, receptor dla kwasu borowego, kolokalizuje się w tych samych komórkach ale w domenach błony komórkowej znajdujących się od strony wewnętrznych warstw korzenia. Te przeciwstawne lokalizacje mogą ułatwiać międzykomórkowy transport

boru z roztworu glebowego do tkanek przewodzących korzenia. Podobne zachowanie zostało opisane dla białka OsNIP2;1 (transportera krzemu Lis1), które funkcjonuje jako kanał dla kwasu krzemowego u ryżu [51]. Lis1 i Lis2, transportery kwasu krzemowego [50], zlokalizowane są odpowiednio w zewnętrznych i wewnętrznych częściach komórek korzenia, tworząc drogę dla transportu krzemu. Dodatkowo ZmPIP2;1 ulega preferencyjnie ekspresji w zewnętrznych domenach błony plazmalemowej komórek epidermalnych korzenia [30], natomiast OsPIP2;1 i OsPIP2;5 wykazują preferencyjną akumulację w wewnętrznych częściach w komórkach endodermalnych korzeni ryżu [68]. Są to, według naszej wiedzy, jedyne przykłady białek PIP o polarnym wzorze lokalizacji. Potencjalna rola takiej polarnej lokalizacji w ukierunkowanym transporcie wody pozostaje wciąż niewiadoma.

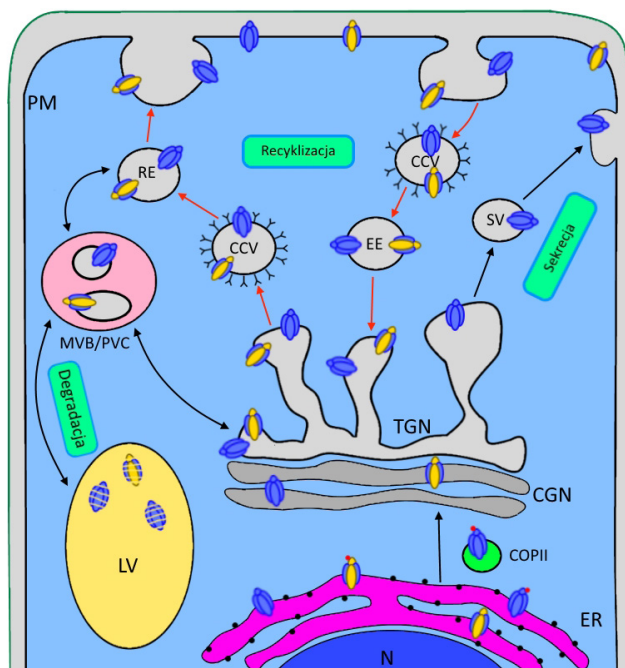
BIOSYNTeza I TRANSPORT AKWAPORYN DO BŁON WEWNĘTRZNYCH I BŁONY KOMÓRKOWEJ

Izoformy PIP i TIP traktowane są jako markery odpowiednio – roślinnej błony komórkowej i wakuolarnej, jednak wiele jeszcze zostaje do wyjaśnienia odnośnie mechanizmów determinujących kierowanie tych białek do miejsc przeznaczenia. Stabilne inhibitory transportu pęcherzykowego takie jak brefeldyna A (BFA) i wortmanina (Wm) są wykorzystywane do badań w komórkach roślinnych [60]. Związki te pozwalają na określenie lokalizacji niektórych białek i ich udziału w poszczególnych etapach transportu pęcherzykowego. W ostatnich latach, inhibitory te są szeroko wykorzystywane do obserwacji mikroskopowych [60], a także w badaniach biochemicznych i proteomicznych [47, 77, 78].

BIOSYNTeza I TRANSPORT AKWAPORYN Z RETIKULUM ENDOPLAZMATYCZNEGO DO APARATU GOLGIEGO

Białka błonowe są transportowane szlakiem wydzielniczym, wprowadzane kotranslacyjnie do światła retikulum endoplazmatycznego (ER), gdzie ma miejsce formowanie się wiązań dwusiarczkowych, oligomeryzacja i glikozylacja. Skutkuje to utworzeniem tetrameru stabilizowanego mostkami dwusiarczkowymi pomiędzy sąsiednimi monomerami [8]. Białka transbłonowe akumulują się w specyficznych poddomenach błony ER zwanej miejscem wyjścia (eksportowym) ER (ERESs) [15, 32], gdzie powstają pęcherzyki opłaszczane białkiem COPII, pośredniczące w transporcie białek z ER do diktiosomów (ryc.1). Wzbogacenie pączkujących pęcherzyków COPII w białkowy ładunek odbywa się poprzez specyficzne oddziaływania, w których pośredniczy motyw eksportowy ER. Motyw eksportowy Asp-X-Glu (DXE) zawiera dwa aminokwasy kwasowe oraz jeden aminokwas o nieokreślonym

łańcuchu bocznym. Motyw ten został zidentyfikowany w wielu białkach drożdży, ssaków oraz roślin, w tym w akwaporynach [17, 32, 56, 73, 84, 88, 90]. Jednak nie wszystkie sekwencje dwukwasowe funkcjonują jako motyw eksportowy ER [32, 56, 72, 88]. Rola tych motywów w eksporcie białek PIP z siateczki endoplazmatycznej do innych kompartmentów komórkowych została określona poprzez analizę mutantów kukurydzy i rzodkiewnika [73, 88].



RYCINA 1. Transport pęcherzykowy białek PIP w komórce roślinnej. Czerwonymi strzałkami oznaczono endocytotyczną ścieżkę recykliczacji PIP, która odbywa się przez wycofanie białek do TGN i ponowną wysyłkę do PM, w jedną i drugą stronę za pośrednictwem CCV oraz innych endosomów (EE, RE). Kolorem niebieskim oznaczono homotertramery, kolorem żółto-niebieskim – heterotetramery PIP. CCV – pęcherzyki opłaszczone klatryną, CGN, TGN – strefa *cis* lub *trans* aparatu Golgiego, COPII – białko opłaszczające pęcherzyki transportu z ER do CGN, EE – endosom wczesny, LV – wakuola lityczna, PM – błona cytoplazmatyczna, PVC/MVB – przedziały przedwakuolaryjne, RE – endosom recykliczacyjny, SV – pęcherzyk na szlaku sekrecyjnym akwaporyn. Czerwoną kropką oznaczono prawidłowy sygnał eksportowy z ER, zawierający motyw Asp-X-Glu

FIGURE 1. Vesicular transport of PIP proteins in plant cell. Red arrows indicate endocytotic of recycled PIPs, which is held by the withdrawal of proteins to the TGN and re-dispatch to the PM, both ways via CCV and other endosomes (EE, RE). Blue color indicates homotetramers, yellow-blue color indicates heterotetramers of PIP. CCV – clathrin coated vesicles, CGN – *cis*-Golgi network, TGN – *trans*-Golgi network, COPII – vesicle coat protein that transports proteins from the ER to CGN, EE – early endosome, LV – lytic vacuole, PM – plasma membrane, PVC/MVB – pre-vacuolar compartment, RE – recycling endosome, SV – secretion vesicle. Red dot indicates proper export signal from ER containing Asp-X-Glu motif

Funkcjonalność motywu DXE została zbadana poprzez substitucję aminokwasów skrajnych, pozostawiając jednak niezmienną właściwość środkowej pozycji w sekwencji. Mutacja sekwencji motywu DIE na AIA w ZmPIP2;4 i ZmPIP2;5 prowadzi do zatrzymania zmienionych białek w ER, podczas przejściowej ekspresji w protoplaście kukurydzy [88]. Podobne wyniki uzyskano gdy sekwencja kodująca dwukwasowy motyw DVE *Arabidopsis* AtPIP2;1 została poddana mutacji do sekwencji kodującej motyw AVA [73]. Wszystkie mutacje prowadziły do zatrzymania takiego konstruktów w ER, co sugeruje że motyw DXE jest niezbędny dla prawidłowego kierowania akwaporyn [73].

Początkowe badania, w których dokonywano koekspresji białek PIP1 i PIP2 w oocytach *Xenopus* wskazały na funkcjonalne interakcje podczas ukierunkowania ich do błony komórkowej [19]. W protoplastach mezofilu kukurydzy, w których dochodzi do koekspresji izoform ZmPIP1 i ZmPIP2, potwierdzono, że zachodzi fizyczna interakcja pomiędzy tymi podklasami białek, skutkująca utworzeniem heterotetramerów [87]. Udowodniono to za pomocą techniki rezonansowego przeniesienia energii fluorescencji (FRET), która stosuje znakowanie białek dwoma różnymi markerami fluorescencyjnymi. Jeżeli energia wzbudzenia powodowana światłem specyficznym tylko dla jednego z białek zostanie przekazana w drodze przeniesienia rezonansowego, to skutkuje to fluorescencją drugiego białka, świadcząca o odległości pomiędzy nimi nie większej niż 10 nm. Gdy w protoplastach umożliwiano ekspresję tylko izoformy ZmPIP1, białka te pozostawały w ER, natomiast izoformy ZmPIP2 były prawidłowo skierowywane do błony komórkowej [88]. Może to sugerować, że izoformy PIP1 nie posiadają własnego sygnału potrzebnego do eksportu z ER, a fizyczne interakcje z PIP2 są niezbędne dla prawidłowej lokalizacji docelowej [88]. Potwierdzają to eksperymenty z komórkami epidermalnymi transgenicznymi korzeni *Arabidopsis* [73]. Gdy dochodziło do koekspresji AtPIP1;4 (znakowanej mCherry) z mutantem AtPIP2;1 (znakowanej GFP), w którym sekwencja DXE została podstawiona przez DXD, okazało się, że zatrzymywane w ER są zarówno białko AtPIP1;4-mCherry jak i powstały kompleks białkowy PIP1;4-PIP2;1. Jednak ekspresja z dzikim typem AtPIP2;1-GFP prowadzi do prawidłowego ukierunkowania do błony plazmatycznej. Ciekawym jest fakt, że zatrzymanie białka AtPIP2;1-GFP w ER nie miało żadnego wpływu na kierowanie białka AtTIP1;1-mCherry do błony wakuolarnej. Ekspresja zmutowanego białka AtPIP2;1 w transgenicznym roślina *Arabidopsis*, skutkuje 36-45% zmniejszeniem przewodnictwa hydraulicznego korzeni (Lpr) względem roślin typu dzikiego [73]. Izoforma AtPIP2;1 zatrzymana w ER może oddziaływać fizycznie z innymi białkami PIP, co utrudnia ich prawidłowy transport do błony komórkowej [73]. Może to wyjaśnić obniżenie Lpr.

Motywy dwukwasowe są zaangażowane w kierowanie białek PIP do błony komórkowej, ale nie jest to jedyny element regulujący ten proces. Dla przykładu ZmPIP2;1 jest odpowiednio transportowane do błony komórkowej chociaż nie zawiera żadnego motywu dwukwasowego. Natomiast obecność motywów dwukwa-

sowych (EDD, DKD lub EKD) na N-terminalnym końcu białka ZmPIP1 powoduje zatrzymywanie go w ER, podczas przejściowej ekspresji w mezofilu protoplastów kukurydzy [88]. Co ciekawe, zamiana *N*-terminalnego regionu ZmPIP1;2 na region pochodzący z izoformy ZmPIP2;5, który zawiera funkcjonalny motyw dwukwasowy, nie jest wystarczająca by uruchomić eksport białka z ER. Oznacza to, że peptyd sygnałowy o sekwencji blokującej eksport ZmPIP1;2 z ER może być obecny w innym miejscu sekwencji. Co prawdopodobne, *N*-koniec ZmPIP1;2 nie bierze udziału w zatrzymaniu białka w ER. Inne motywy, takie jak motywy dwuzasadowe (R/K-X-R/K) lub dihydrofobowe, również odgrywają rolę w interakcji pomiędzy COPII a eksportem z ER [14, 86], jednak ich wpływ na kierowanie roślinnych akwaporyn nie został do tej pory poznany.

Wstępne badania pokazały, że sortowanie nowo zsyntetyzowanych izoform α -TIP fasoli i AtTIP3;1 rzodkiewnika do wakuoli było niewrażliwe na działanie brefeldyny. Można wnioskować, że transport odbywa się na drodze niezależnej od aparatu Golgiego (AG) [25]. Ostatnie badania, potwierdzają, że istnieją dwie drogi sortowania i kierowania izoform AtTIP do wakuoli, różniące się wrażliwością na BFA. AtTIP2;1 i AtTIP3;1 są transportowane na drodze szlaku niewrażliwego na BFA (niezależnego od AG), natomiast AtTIP1;1 szlakiem wrażliwym na brefeldynę (zależnym od AG) [64].

KIEROWANIE AKWAPORYN Z APARATU GOLGIEGO DO PM

Nowo syntetyzowane białka błonowe transportowane są z retikulum endoplazmatycznego dalej przez aparat Golgiego (AG) i przedziały strefy *trans* aparatu Golgiego (TGN) (ryc. 1). Częściowa kolokalizacja markera AG, ST-mYFP i CFP-ZmPIP2;5, obserwowana była w protoplastach mezofilu kukurydzy, co sugeruje, że ruch izoform PIP przez AG odbywa się analogicznie do sposobu opisanego dla innych białek błonowych [54]. W drodze z AG do błony komórkowej, akwaporyny przechodzą przez TGN. Dla przykładu, gdy ZmPIP2,5 ulega przejściowej ekspresji w protoplastach mezofilu kukurydzy, białko to jest kolokalizowane z markerem TGN, VTI12. TGN pochodzi z najdalszej cysterny *trans* AG i działa jako centrum w sortowaniu białek na skrzyżowaniu pomiędzy ścieżkami wydzielniczymi i endocytozy [63, 65].

Pęcherzyki zawierające białka PIP, które opuszczają TGN muszą zostać prawidłowo wstawione w błonę plazmalemową. W tym względzie, syntaksyna SYP121, białko Q-SNARE (rodzina białek pośredniczących w fuzji pęcherzyków), pośredniczy w transporcie pęcherzyków pomiędzy przedziałami wewnątrzkomórkowymi i powierzchnią komórki [23, 80]. Nadekspresja dominującego cytozolowego fragmentu SYP121 (SYP121-Sp2) upośledza skierowywanie kanału potasowego KAT1 do błony plazmatycznej ale nie H^+ -ATPazy PMA2 [76, 80]. Wynik ten

wskazuje, że SYP121, poprzez swoją rolę w fuzji pęcherzyków, prezentuje punkt kontrolny dla ukierunkowania specyficznych ładunków do błony plazmatycznej. Besserer i współpracownicy [7] wykazali, że ten sam fragment Sp2 białka SYP121 upośledza transport białka ZmPIP2;5-mYFP do błony plazmatycznej. Natomiast syntaksyny błony plazmatycznej SYP71 i SYP122, przedziału prewakuolarnego SYP21, ani też pełnej długości białko SYP121-Sp2 nie wykazują takiego efektu. W porównaniu do efektu SYP121-Sp2 na ukierunkowanie ZmPIP2;5-mYFP, zwiększenie przepuszczalności hydraulicznej protoplastu spowodowane przez ten drugi konstrukt było neutralizowane poprzez koekspresję nie z SYP121-Sp2 ale z syntaksyną SYP121 o niepełnej długości. Kilka dowodów dostarczonych przez techniki chromatografii powinowactwa, molekularnego uzupełnienia fluorescencji i FRET również wskazują na fizyczne interakcje pomiędzy ZmPIP2;5 i SYP121 [7].

Biorąc pod uwagę fakt, że białka SNARE (receptory umożliwiające prawidłowe dokowanie i fuzje pęcherzyków) posiadają szeroki zakres wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia, można sądzić, że mogą kontrolować transport akwaporyn na różnych etapach, selektywnie w zależności od izoformy. Dla przykładu, VAMP721 i VAMP722 są dwoma blisko spokrewnionymi białkami R-SNARE biorącymi udział w wydzielniczym transporcie do PM poprzez TGN lub przez wczesny przedział endosomalny. U podwójnego mutantu *vamp721-vamp722*, kierowanie PIP2;1-GFP do PM jest poważnie zakłócone, natomiast lokalizacja tonoplastowej akwaporyny TIP1;1-GFP nie jest zaburzona w porównaniu do roślin kontrolnych [89]. Należy jeszcze określić czy VAMP721 czy VAMP722 również fizycznie oddziałują z akwaporynami, pomimo tego, że bezpośrednia interakcja nie jest warunkiem dla tego mechanizmu regulacyjnego.

Analizy proteomiczne zidentyfikowały izoformy PIP w mikrodomenach nierozpuszczalnych w detergencie, tak zwanych tratwach lipidowych, u różnych gatunków roślin [9, 40, 43, 59]. Ostatnio zostało pokazane, że AtPIP2;1 wykazuje specyficzną dynamikę dyfuzji w błonie u roślin [44]. Badania kolokalizacji markera steroli wiążących antybiotyku, filipiny [26], i markera tratw lipidowych, flot1 [9], doprowadziły do wniosku, że w nienaruszonych komórkach roślinnych, AtPIP2;1 jest głównie zlokalizowana w tratwach lipidowych ale może również się z nich przemieszczać [44]. Interesujące jest to, że ściana komórkowa, która jest pierwszym miejscem biorącym udział w odbiorze bodźca zewnętrznego, odgrywa istotną rolę w unieruchomieniu białek błonowych (głównie kanałów, transporterów i receptorów) wliczając w to AtPIP2;1 [52]. Jednakże, niska mobilność może być spowodowana interakcją z innym, niezidentyfikowanym do tej pory, składnikiem błony komórkowej.

Identyfikacja białkowych kinaz i fosfataz, ich substraty i określenie specyficznych miejsc fosforylacji, miało istotne znaczenie dla zrozumienia sygnalizacji komórkowej. Fosforylacja była pierwszą znaną modyfikacją, która bezpośrednio wpływała na aktywność kanałów białkowych [55] ale również może kontrolować ich kierunkowanie do błony plazmatycznej [62]. C-koniec AtPIP2;1 posiada ufos-

forylowane Ser²⁸⁰ i Ser²⁸³. W celu imitowania braku fosforylacji dokonano mutacji sekwencji kodujących te dwa aminokwasy. Ekspresja tych struktur w korzeniach *Arabidopsis* wskazuje, że fosforylacja Ser²⁸³, w przeciwieństwie do Ser²⁸⁰, jest niezbędna do prawidłowego kierowania akwaporyn do błony komórkowej. Mutacja Ser²⁸³Ala u izoformy AtPIP2;1, pozbawionej fosforylowanych reszt, powodowała zatrzymanie białka w ER. Natomiast izoformy z mutacją Ser²⁸³Asp, która imituje fosforylację w tej pozycji, nie wykazywały tego efektu. Sugeruje to, że fosforylacja Ser²⁸³ jest niezbędna dla prawidłowego transportu akwaporyn. Wyznakowanie akwaporyn obydwu mutantów białkiem GFP dało różne obrazy potwierdzające wynik. Białka PIP2;1-GFP mutantu Ser²⁸³Ala obserwowano wyraźnie wokół jądra komórkowego i dodatkowo były rozsiane po całej komórce, co odpowiada zatrzymaniu białka w ER, natomiast u mutantu Ser²⁸³Asp białko PIP2;1-GFP obserwowano w błonie plazmalemowej [62]. Natura tych wewnątrzkomórkowych przedziałów musi zostać jednak jednoznacznie określona. Mogą one odpowiadać przedziałom przedwakuolarnym (PVC/MVB). Struktury te mogą być również znakowane przez konstrukty AtPIP po traktowaniu korzeni H₂O₂ [10].

KONSTITUTYWNE KRĄŻENIE I ROZPROSZENIE IZOFORM PIP W OBRĘBIE BŁONY PLAZMATYCZNEJ

Wysoko rozdzielcze techniki mikroskopowe dostarczyły nowych danych dotyczących rozmieszczenia izoform PIP i ich konstytutywnego krążenia w obrębie błony komórkowej [44, 48, 53]. Pojedyncze cząsteczki AtPIP2;1-GFP obserwowane były na powierzchni komórek epidermalnych korzeni *Arabidopsis* przy użyciu techniki mikroskopii zmiennego kąta fal zanikających [44]. Około jedna trzecia cząsteczek wykazywała model dyfuzji Browna, pozostała część wykazywała skierowany, ograniczony ruch lub mieszany tryb dyfuzji w PM, w stosunku z ich dynamiką w błonie ER [73]. Jednakże, przeciwnie do PM, ER jest bardzo mobilnym przedziałem komórkowym. W tych samych analizach modalny współczynnik dyfuzji AtPIP2;1-GFP był dziesięciokrotnie niższy niż LTi6a-GFP, białka indukowanego niską temperaturą, które jest markerem błony plazmatycznej, co wskazuje na niską dyfuzję akwaporyn. W przeciwieństwie do kanału potasowego KAT1 i transportera auksyny należącego do podrodziny PIN, które są zlokalizowane punktowo w strukturach PM, izoformy PIP wydają się być równomiernie rozmieszczone w obrębie błony komórkowej, gdy są obserwowane przy użyciu standardowej mikroskopii konfokalnej [7, 11, 87]. Fluorescencyjna spektroskopia korelacji (FCS) została wykorzystana w celu monitorowania gęstości struktury AtPIP2;1-GFP w błonie plazmatycznej, uzyskując wartość około 30 cząsteczek/m². Kombinacja technik śledzenia pojedynczej cząsteczki (SPT) i FCS z użyciem substancji chemicznych pozwoliły ocenić rolę mikrodomen bogatych w sterole w dynamice AtPIP2;1-GFP.

Dla przykładu, traktowanie komórki metylo- β -cyklodekstryną (M β CD), substancją usuwającą sterole, zmniejszało współczynnik dyfuzji AtPIP2;1-GFP dwudziestokrotnie. Proporcja cząsteczek AtPIP2;1-GFP o ograniczonej dyfuzji wzrosła o 164% w porównaniu do liczby u roślin kontrolnych. Tyrfostyna A23, inhibitor endocytozy zależnej od klatryny [65], zmniejszała dziesięciokrotnie współczynnik dyfuzji, zwiększając przy tym dwukrotnie proporcję AtPIP2;1-GFP o mieszanym współczynniku dyfuzji. Zwiększała ona również o 32% zagęszczenie tej akwaporyny w błonie plazmatycznej. Całościowe dane sugerują, że AtPIP2;1 wzajemnie oddziałuje z domenami bogatymi w sterole oraz strukturami opłaszczonymi klatryną na powierzchni komórki lub w jej pobliżu. Te interakcje decydują o właściwościach dyfuzyjnych AtPIP2;1 i endocytozie, poprzez mechanizmy molekularne, które do tej pory nie są poznane.

ENDOCYTOTYCZNE WYCOFYWANIE AKWAPORYN Z BŁON KOMÓRKOWYCH

Endocytoza jest niezbędnym procesem dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Uczestniczy w transporcie białek, sygnalizacji komórkowej, funkcjonowaniu receptorów czy wchłanianiu substancji rozpuszczonych z zewnątrz. U roślin najlepiej poznana jest endocytoza z udziałem pęcherzyków opłaszczonych klatryną (CCV) (ryc.1). Proces ten zachodzi poprzez internalizację białek błony komórkowej, z udziałem białek pośredniczących w okrytych klatryną dołkach, przekształcających się następnie w pęcherzyki. Po odłączeniu od błony komórkowej tworzą ruchliwą organelę zwaną endosomem. W ostatnich latach sformułowano pogląd o możliwości wycofania akwaporyn z błony komórkowej w postaci pęcherzyków endosomalnych. Taki transport wsteczny może mieć miejsce w cyklu dobowego obrotu metabolicznego akwaporyn (nocny spadek akumulacji, [30]), a także w odpowiedzi na suszę. Pozwala to roślinie zmienić ilość kanałów akwaporynowych bez degradacji proteolitycznej przez stosowanie mechanizmu ich konstytutywnej lub indukowanej recykliczacji [28, 49].

Użycie specyficznych inhibitorów lub mutantów *Arabidopsis* pomogło w poznaniu szlaku wstecznego transportu akwaporyn do sieci TGN i post-TGN. Tyrfostyna A23, analog tyrozyny, specyficznie zapobiega interakcjom pomiędzy podjednostką $\mu 2$ kompleksu AP-2 wiążącego klatrynę z motywem Yxx ϕ obecnym w domenach błony cytoplazmatycznej przeznaczonych do endocytozy [4]. Motyw Yxx ϕ można znaleźć na C-końcu wszystkich akwaporyn. Brakuje jednak dowodu potwierdzającego bezpośrednią rolę tych motywów w endocytozie. Endocytoza zależna od klatryny może być inhibowana chemicznie lub genetycznie poprzez, tyrfostynę A23 lub przez nadekspresję ciężkiego łańcucha klatryny tak zwanego „clathrin Hub” [45]. Metody te prowadzą do inhibicji endocytozy AtPIP2;1

w komórkach korzeni *Arabidopsis*, co wskazuje że, akwaporyny podlegają endocytozie zależnej od klatryny [16].

Dalszy los akwaporyn po endosomalnym odstawieniu do TGN jest tematem spornym. Białka mogą ulegać recykliczacji do błony plazmalemmowej lub też być kierowane do ciał wielopęcherzykowych (MVB) w celu degradacji. Na drodze endocytozy do TGN, białka PIP są kolokalizowane z SNX1 (przedział endosomalny sortowania neksyny 1). Czy przedział SNX1 należy do TGN czy do MVB pozostaje sprawą kontrowersyjną [36, 75]. Ponieważ MVB pochodzi z dojrzewania TGN [71], przedział znakowany SNX1 powinien raczej być rozważany jako przedział pośredni. Dojrzewanie TGN angażuje biogenezę pęcherzyków wydzielniczych, które są kierowane do PM lub do MVB [38, 83]. Dane te sugerują, że w zależności od zapotrzebowania komórki, białka PIP znajdujące się w TGN mogą być przemieszczane do PM z wykorzystaniem pęcherzyków wydzielniczych i CCV lub też przedziału SNX1.

Brefeldyna A inicjuje akumulację białek błony plazmalemmowej w tak zwanych ciałach BFA [24]. W komórkach traktowanych BFA, białka PIP gwałtownie się akumulowały w ciałach BFA, co sugeruje występowanie konstytutywnego krążenia izoform PIP [61]. Badania genetyczne zidentyfikowały BEX5 (BFA-visualized exocytic trafficking defective) jako nowe białko regulujące transport akwaporyn z TGN do PM [18]. U mutantu *bex5-1 Arabidopsis* traktowanego BFA, akumulację białka PIP2;1-GFP w ciałach BFA obserwowano nawet po usunięciu (wymyciu) substancji, natomiast u roślin typu dzikiego proces ten jest odwracalny, co pokazuje, że BEX5 bierze udział w egzocytozie akwaporyn.

U *Arabidopsis* białka AtPIP2;1 internalizowane są przez CCV [16], jednak w warunkach stresu solnego dochodzi do internalizacji tych białek powiązanej z trawami lipidowymi [44]. W warunkach stresu solnego, tyrfostyna A23 nie powoduje inhibicji endocytozy natomiast BFA utrudnia egzocytozę [48]. Pokazuje to, że zachodzi selektywna regulacja recykliczacji białek błony komórkowej. Równowaga pomiędzy endocytozą AtPIP2;1 zależną od traw lipidowych i tą zależną od CCV jest przesunięta na korzyść endocytozy zależnej od traw lipidowych [44], co sugeruje istnienie alternatywnych mechanizmów regulacji zasobności błony plazmalemmowej w akwaporyny, zwłaszcza w warunkach stresu.

Powyższe dane świadczą o zaangażowaniu endo- i egzocytozy w transporcie akwaporyn i ich regulacji w PM. Model recykliczacji niektórych składników błony komórkowej roślin został przedstawiony dla białka PIN ułatwiającego polarny wpływ auksyny z komórki [39]. Jednak czy konstytutywne krążenie jest uniwersalną regułą dla roślinnych kanałów błonowych i transporterów czy też ma wpływ tylko na pewne klasy tych białek? W przypadku akwaporyn konstytutywna recykliczacja może powodować plastyczność w kontroli aktywności kanału wodnego w odpowiedzi na zmiany środowiskowe i/lub pozwala na równomierne rozmieszczenie

izoform w błonach. Akwaporyny są często uważane za białka nie umieszczone polarnie na obwodzie komórki, jednak u kukurydzy białka ZmPIP2;5 wykazują spolaryzowaną lokalizację w epidermalnych komórkach wierzchołka korzenia [31]. Mechanizm odpowiedzialny za tą polaryzację wymaga dokładniejszych analiz.

TRANSPORT I WEWNĄTRZKOMÓRKOWA LOKALIZACJA AKWAPORYN W WARUNKACH STRESU

Wiele badań opisuje rolę akwaporyn w odpowiedzi rośliny na czynniki środowiskowe [14, 55]. Regulacja transportu i ich rozmieszczenie może być wydajnym sposobem na adaptację roślin do gwałtownie zmieniających się warunków środowiska. Wpływ stresu na wewnątrzkomórkową lokalizację i transport roślinnych akwaporyn po raz pierwszy został kompleksowo zbadany w 2004 roku, na zawiesinie komórkowej i na liściach *Mesembryanthemum crystallinum* poddanych stresowi wodnemu i solnemu [82]. Po potraktowaniu komórek hiperosmotycznym roztworem mannitolu stwierdzono redystrybucję izoformy McTIP1;2 z błony tonoplastowej do błon pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. Proces ten był zależny od statusu glikozylacji McTIP1;2, gdyż potraktowanie tunikamycyną – inhibitorem glikozylacji białek – blokowało redystrybucję. W optymalnych warunkach w korzeniach *Arabidopsis*, AtTIP1;1 nie jest glikozylowana, co wydaje się sprzyjać równomiernemu rozmieszczeniu w błonie wakuolarnej [11]. Natomiast w warunkach stresu solnego AtTIP1;1 była również wykrywana we wpukleniach błony tonoplastowej [67]. Relokalizacja ta wydaje się być specyficzna dla wybranych izoform, ponieważ AtTIP2;1-GFP pozostawała tylko i wyłącznie w domenach peryferyjnych błony tonoplastowej wakuoli centralnej w warunkach stresu solnego [11]. Nie wiadomo czy obserwowana relokalizacja AtTIP1;1 towarzyszy przekształcaniu aparatu wakuolarnego podczas odpowiedzi na stres, czy też odzwierciedla przystosowanie właściwości transportowych błony tonoplastu.

Redystrybucja białek PIP w odpowiedzi na bodziec po raz pierwszy została opisana w komórkach ssaczych. Przykładem takiego mechanizmu jest transfer nerkowych AQP2 pomiędzy pęcherzykami wewnątrzkomórkowymi a błoną apikalną głównych komórek kanalikula zbiorczego [58]. Proces ten jest pod kontrolą wazopresyny [58]. Wiązanie receptora sprzężonego z cyklazą adenylanową zwiększa poziom cytozolowego cAMP i wapnia, prowadząc do fosforylacji akwaporyn za pośrednictwem kinazy A. Fosforylowane formy są potem przemieszczane z subapikalnych, wewnątrzkomórkowych pęcherzyków do błony apikalnej, zwiększając tym samym jej przepuszczalność hydrauliczną, sprzyjającą absorpcji zwrotnej wody i zagęszczaniu moczu.

Roślinna redystrybucja plazmatycznych akwaporyn była wstępnie badana w korzeniach *Arabidopsis*, w odniesieniu do odpowiedzi na kilka bodźców, które zmieniają przewodnictwo hydrauliczne korzenia (Lpr). Wpływ stresu solnego na aktywność białek PIP u *Arabidopsis* zależała od intensywności i czasu trwania stresu. Traktowanie 100 mM NaCl powodowało zmniejszenie Lpr o 70% po 4 h, a już po 2 h od podania soli następowało zwiększenie wewnątrzkomórkowego znakowania komórek korzenia wykazujących ekspresję AtPIP1;2-GFP i AtPIP2;1-GFP [11]. Wystawienie korzeni *Arabidopsis* na stres solny lub kwas salicylowy, cząsteczki sygnałowej związanej ze stresem biotycznym, jednocześnie zwiększało akumulację reaktywnych form tlenu (ROS), wewnątrzkomórkową akumulację AtPIP-GFP i obniżało Lpr [10].

ROS są pośrednimi czynnikami w efektach zasolenia i działania kwasu salicylowego na wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie akwaporyn, a tym samym na Lpr. Aplikacja egzogenego nadtlenu wodoru (H_2O_2), będącego również cząsteczką sygnałową, wywołuje podobne efekty jak zasolenie i kwas salicylowy [10]. Co ciekawe, obecność katalazy do wyłapywania ROS podczas wystawiania korzeni na stres solny lub działanie kwasu salicylowego, zapobiegało efektom powyższych działań na redystrybucję izoform AtPIP. Niska temperatura jest kolejnym czynnikiem stresowym, który prowadzi do obniżenia Lpr. U ogórka hodowanego w niskiej temperaturze, dochodzi do gromadzenia się nadtlenu wodoru. Działanie na korzenie egzogennym H_2O_2 obniża Lpr w tym samym stopniu, jak chłodzenie [42].

Stres solny zwiększał dwukrotnie współczynnik dyfuzji AtPIP2;1-GFP wewnątrz błony plazmatycznej w minutowych przedziałach czasowych [44]. Towarzyszył temu spadek o 46% w zagęszczeniu AtPIP2;1-GFP w błonie plazmatycznej. Całkowita ilość AtPIP2;1, mierzona testem ELISA w innym układzie badawczym, nie zmieniała się pod wpływem stresu solnego nawet przez 6 godzin [11], co może sugerować, że efekt zmniejszenia zagęszczenia białek może być raczej powodowany przemieszczeniem się akwaporyn z błony do środka komórki niż procesem degradacji.

Do potwierdzenia hipotezy zwiększonego krążenia AtPIP-GFP w warunkach stresu solnego wykorzystywano również BFA. BFA powodowała agregację pęcherzyków pochodzących ze ścieżki endocytozy i wydzielniczej w tzw. przedziałach BFA. Znakowanie przedziałów BFA poprzez AtPIP-GFP obserwowano w komórkach korzeni przed zadziałaniem stresu suszy. W eksperymentach wymywania, usunięcie BFA powodowało zniknięcie efektu szybszego wybarwiania pod wpływem stresu solnego w stosunku do warunków kontrolnych. Wyniki tych eksperymentów przyczyniły się do wniosku, że stres solny wzmacnia krążenie izoform AtPIP, działając zarówno na endocytozę jak i na egzocytozę. Co interesujące, krążenie AtPIP w warunkach stresu solnego blokowane było przez syntetyczny homolog auksyny, natomiast stawało się ono niewrażliwe na homolog tyrozyny, tyrfostynę A23 [48]. Wydaje się zatem, że stres suszy może zwiększyć endocytozę zależną od klatryny, która może zdominować efekt A23 lub stać się niewrażliwa na ten związek.

W 2011 roku Li i współpracownicy przedstawili rolę mikrodomen bogatych w sterole w endocytozie indukowanej stresem solnym [44]. Mechanizm ten może

wywoływać niewrażliwość na A23. Podsumowując, endocytoza AtPIP odbywa się ścieżką, która jest zależna od klatryny w warunkach spoczynku. W warunkach stresu solnego, endocytoza AtPIP może być zwiększona poprzez aktywację dwóch równoległych ścieżek: zależnych od klatryny i od mikrodomen bogatych w sterole. Dowód na endocytozę niezależną od klatryny został również przedstawiony w kontekście poboru glukozy przez komórki tytoniu typu BY-2 [5], co sugeruje że ścieżka ta nie jest ograniczona do odpowiedzi na stres solny.

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich kilku lat obserwuje się wzrastające zainteresowanie ukierunkowanym transportem pęcherzykowym roślinnych akwaporyn. Mechanizmy kontrolujące eksport akwaporyn z retikulum endoplazmatycznego, ich kierowanie do ostatecznej lokalizacji oraz endocytotyczne wycofywanie z błon komórkowych tworzą nowy model dla studiowania subkomórkowej dynamiki sortowania roślinnych białek błonowych. Pokazane zostało, że wzory wewnątrzkomórkowej lokalizacji są bardziej skomplikowane niż początkowo uważano, przy czym niektóre akwaporyny wykazują podwójną lokalizację. Przykładem mogą być akwaporyny TIP występujące w błonie tonoplastowej i komórkowej czy niektóre izoformy białka PIP zlokalizowane w błonie komórkowej i wewnętrznej błonie chloroplastów. Wewnątrzkomórkowa dynamika i lokalizacja akwaporyn jest w wysokim stopniu wrażliwa na stresy abiotyczne, a najwięcej danych o ich redystrybucji dostarczono analizując wpływ stresu solnego. Poza zrozumieniem mechanizmów adaptacji do stresu, badania te ujawniają znaczenie pęcherzykowego krążenia akwaporyn dla regulacji symplastycznego transportu wody w tkankach roślinnych.

PODZIĘKOWANIA

Autor jest stypendystą w ramach Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2 „Transfer wiedzy”, Priorytetu VIII „Regionalne Kadry Gospodarki” Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej i z budżetu państwa

Praca finansowana w ramach projektu badawczego przyznanego przez Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu nr GDWB-07/2014



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Lubuskie

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



LITERATURA

- [1] ALEXANDERSSON E, DANIELSON JA, RADE J, MOPARTHI VK, FONTES M, KJELLBOM P, JOHANSON U. Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J* 2010; **61**: 650-660
- [2] ALEXANDERSSON E, FRAYSSE L, SJOVALL-LARSEN S, GUSTAVSSON S, FELLERT M, KARLSSON M, JOHANSON U, KJELLBOM P. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* 2005; **59**: 469-484
- [3] ANDERSSON MX, GOKSOR M, SANDELIUS AS. Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *J Biol Chem* 2007; **282**: 1170-1174
- [4] BANBURY DN, OAKLEY JD, SESSIONS RB, BANTING G. Tyrphostin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Biol Chem* 2003; **278**: 12022-12028
- [5] BANDMANN V, HOMANN U. Clathrin-independent endocytosis contributes to uptake of glucose into BY-2 protoplasts. *Plant J* 2012; **70**: 578-584
- [6] BEEBO A, THOMAS D, DER C, SANCHEZ L, LEBORGNE-CASTEL N, MARTY F, SCHOEFS B, BOUHIDEL K. Life with and without AtTIP1;1, an *Arabidopsis* aquaporin preferentially localized in the apposing tonoplasts of adjacent vacuoles. *Plant Mol Biol* 2009; **70**: 193-209
- [7] BESSERER A, BURNOTTE E, BIENERT GP, CHEVALIER AS, ERRACHID A, GREFFEN C, BLATT MR, CHAUMONT F. Selective regulation of maize plasma membrane aquaporin trafficking and activity by the SNARE SYP121. *Plant Cell* 2012; **24**: 3463-3481
- [8] BIENERT GP, CAVEZ D, BESSERER A, BERNY MC, GILIS D, ROOMAN M, CHAUMONT F. A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers. *Biochem J* 2012; **445**: 101-111
- [9] BORNER GH, SHERRIER DJ, WEIMAR T, MICHAELSON LV, HAWKINS ND, MACASKILL A, NAPIER JA, BEALE MH, LILLEY KS, DUPREE P. Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* 2005; **137**: 104-116
- [10] BOURSIAIC Y, BOUDET J, POSTAIRE O, LUU DT, TOURNNAIRE-ROUX C, MAUREL C. Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant J* 2008; **56**: 207-218
- [11] BOURSIAIC Y, CHEN S, LUU DT, SORIEUL M, VAN DEN DRIES N, MAUREL C. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* 2005; **139**: 790-805
- [12] CHAUMONT F, BARRIEU F, WOJCIK E, CHRISPEELS MJ, JUNG R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1206-1215
- [13] CHAUMONT F, MOSHELION M, DANIELS MJ. Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* 2005; **97**: 749-764
- [14] CONTRERAS I, YANG Y, ROBINSON DG, ANIENTO F. Sorting signals in the cytosolic tail of plant p24 proteins involved in the interaction with the COPII coat. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 1779-1786
- [15] DASILVA LL, SNAPP EL, DENECKE J, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, HAWES C, BRANDIZZI F. Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *Plant Cell* 2004; **16**: 1753-1771
- [16] DHONUKSHE P, ANIENTO F, HWANG I, ROBINSON DG, MRAVEC J, STIERHOF YD, FRIML J. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2007; **17**: 520-527
- [17] DUNKEL M, LATZ A, SCHUMACHER K, MULLER T, BECKER D, HEDRICH R. Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family. *Mol Plant* 2008; **1**: 938-949
- [18] FERARU E, FERARU MI, ASAOKA R, PACIOREK T, DE RYCKE R, TANAKA H, NAKANO A, FRIML J. BEX5/RabA1b regulates trans-Golgi network-to-plasma membrane protein trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012; **24**: 3074-3086

- [19] FETTER K, VAN WILDER V, MOSHELION M, CHAUMONT F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* 2004; **16**: 215-228
- [20] FRIGERIO L, HINZ G, ROBINSON DG. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic* 2008; **9**: 1564-1570
- [21] GATTOLIN S, SORIEUL M, FRIGERIO L. Mapping of tonoplast intrinsic proteins in maturing and germinating *Arabidopsis* seeds reveals dual localization of embryonic TIPs to the tonoplast and plasma membrane. *Mol Plant* 2011; **4**: 180-189
- [22] GATTOLIN S, SORIEUL M, HUNTER PR, KHONSARI RH, FRIGERIO L. In vivo imaging of the tonoplast intrinsic protein family in *Arabidopsis* roots. *BMC Plant Biol* 2009; **9**: 133
- [23] GEELEN D, LEYMAN B, BATOKO H, DI SANSEBASTIANO GP, MOORE I, BLATT MR. The abscisic acid-related SNARE homolog NtSyr1 contributes to secretion and growth: evidence from competition with its cytosolic domain. *Plant Cell* 2002; **14**: 387-406
- [24] GELDNER N, ANDERS N, WOLTERS H, KEICHER J, KORNBURGER W, MULLER P, DELBARRE A, UEDA T, NAKANO A, JURGENS G. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 2003; **112**: 219-230
- [25] GOMEZ L, CHRISPEELS MJ. Tonoplast and Soluble Vacuolar Proteins Are Targeted by Different Mechanisms. *Plant Cell* 1993; **5**: 1113-1124
- [26] 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
- [27] GUSTAVSSON S, LEBRUN AS, NORDEN K, CHAUMONT F, JOHANSON U. A novel plant major intrinsic protein in *Physcomitrella patens* most similar to bacterial glycerol channels. *Plant Physiol* 2005; **139**: 287-295
- [28] HACHEZ C, BESSERER A, CHEVALIER AS, CHAUMONT F. Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends Plant Sci* 2013; **18**: 344-352
- [29] HACHEZ C, CHAUMONT F. Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels. *Adv Exp Med Biol* 2010; **679**: 1-17
- [30] HACHEZ C, HEINEN RB, DRAYE X, CHAUMONT F. The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. *Plant Mol Biol* 2008; **68**: 337-353
- [31] HACHEZ C, MOSHELION M, ZELAZNY E, CAVEZ D, CHAUMONT F. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol Biol* 2006; **62**: 305-323
- [32] HANTON SL, RENNA L, BORTOLOTTI LE, CHATRE L, STEFANO G, BRANDIZZI F. Diacidic motifs influence the export of transmembrane proteins from the endoplasmic reticulum in plant cells. *Plant Cell* 2005; **17**: 3081-3093
- [33] HECKWOLF M, PATER D, HANSON DT, KALDENHOFF R. The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO(2) transport facilitator. *Plant J* 2011; **67**: 795-804
- [34] HUNTER PR, CRADDOCK CP, DI BENEDETTO S, ROBERTS LM, FRIGERIO L. Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol* 2007; **145**: 1371-1382
- [35] ISHIKAWA F, SUGA S, UEMURA T, SATO MH, MAESHIMA M. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 2005; **579**: 5814-5820
- [36] JAILLAIS Y, SANTAMBROGIO M, ROZIER F, FOBIS-LOISY I, MIEGE C, GAUDE T. The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell* 2007; **130**: 1057-1070
- [37] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON S, GUSTAVSSON S, SJÖVALL S, FRAYSSE L, WEIG AR, KJELLBOM P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* 2001; **126**: 1358-1369
- [38] KANG BH, NIELSEN E, PREUSS ML, MASTRONARDE D, STAEHELIN LA. Electron tomography of RabA4b- and PI-4Kbeta1-labeled trans Golgi network compartments in *Arabidopsis*. *Traffic* 2011; **12**: 313-329

- [39] KITAKURA S, VANNESTE S, ROBERT S, LOFKE C, TEICHMANN T, TANAKA H, FRIML J. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2011; **23**: 1920-1931
- [40] KORDOWIAK AM, KORDOWIAK S. Tratwy lipidowe – mikrodomeny błon biologicznych. *Post Biol Kom* 2011; **38**: 231-245
- [41] KOWALCZYK S, STARZYŃSKA E. Ukierunkowana relokalizacja białek transportujących auksyny a odpowiedzi tropowe roślin. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 723-744
- [42] LEE SH, SINGH AP, CHUNG GC. Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport. *J Exp Bot* 2004; **55**: 1733-1741
- [43] LEFEBVRE B, FURT F, HARTMANN MA, MICHAELSON LV, CARDE JP, SARGUEIL-BOIRON F, ROSSIGNOL M, NAPIER JA, CULLIMORE J, BESSOULE JJ, MONGRAND S. Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* 2007; **144**: 402-418
- [44] LI X, WANG X, YANG Y, LI R, HE Q, FANG X, LUU DT, MAUREL C, LIN J. Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis plasma* membrane aquaporin regulation. *Plant Cell* 2011; **23**: 3780-3797
- [45] LIU SH, WONG ML, CRAIK CS, BRODSKY FM. Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* 1995; **83**: 257-267
- [46] LOPEZ D, BRONNER G, BRUNEL N, AUGUIN D, BOURGERIE S, BRIGNOLAS F, CARPIN S, TOURNAIRE-ROUX C, MAUREL C, FUMANAL B, MARTIN F, SAKR S, LABEL P, JULIEN JL, GOUSSET-DUPONT A, VENISSE JS. Insights into Populus XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *J Exp Bot* 2012; **63**: 2217-2230
- [47] LUCZAK M, BUGAJEWSKA A, WOJTASZEK P. Inhibitors of protein glycosylation or secretion change the pattern of extracellular proteins in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 2008; **46**: 962-969
- [48] LUU DT, MARTINIERE A, SORIEUL M, RUNIONS J, MAUREL C. Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in *Arabidopsis* roots under salt stress. *Plant J* 2012; **69**: 894-905
- [49] LUU DT, MAUREL C. Aquaporin trafficking in plant cells: an emerging membrane-protein model. *Traffic* 2013; **14**: 629-635
- [50] MA JF, TAMAI K, YAMAJI N, MITANI N, KONISHI S, KATSUHARA M, ISHIGURO M, MURATA Y, YANO M. A silicon transporter in rice. *Nature* 2006; **440**: 688-691
- [51] MA JF, YAMAJI N, MITANI N, TAMAI K, KONISHI S, FUJIWARA T, KATSUHARA M, YANO M. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 2007; **448**: 209-212
- [52] MARTINIERE A, LAVAGI I, NAGESWARAN G, ROLFE DJ, MANETA-PEYRET L, LUU DT, BOTCHWAY SW, WEBB SE, MONGRAND S, MAUREL C, MARTIN-FERNANDEZ ML, KLEINE-VEHN J, FRIML J, MOREAU P, RUNIONS J. Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 12805-12810
- [53] MARTINIERE A, LI X, RUNIONS J, LIN J, MAUREL C, LUU DT. Salt stress triggers enhanced cycling of *Arabidopsis* root plasma-membrane aquaporins. *Plant Signal Behav* 2012; **7**: 529-532
- [54] MATHESON LA, HANTON SL, BRANDIZZI F. Traffic between the plant endoplasmic reticulum and Golgi apparatus: to the Golgi and beyond. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 601-609
- [55] MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU DT, SANTONI V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 595-624
- [56] MIKOSCH M, HURST AC, HERTEL B, HOMANN U. Diacidic motif is required for efficient transport of the K⁺ channel KAT1 to the plasma membrane. *Plant Physiol* 2006; **142**: 923-930
- [57] MIZUTANI M, WATANABE S, NAKAGAWA T, MAESHIMA M. Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2006; **47**: 1420-1426
- [58] MOELLER HB, OLESEN ET, FENTON RA. Regulation of the water channel aquaporin-2 by posttranslational modification. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; **300**: F1062-1073

- [59] MONGRAND S, MOREL J, LAROCHE J, CLAVEROL S, CARDE JP, HARTMANN MA, BONNEU M, SIMON-PLAS F, LESSIRE R, BESSOULE JJ. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* 2004; **279**: 36277-36286
- [60] MULLER J, METTBACH U, MENZEL D, SAMAJ J. Molecular dissection of endosomal compartments in plants. *Plant Physiol* 2007; **145**: 293-304
- [61] PACIOREK T, ZAZIMALOVA E, RUTHARDT N, PETRASEK J, STIERHOF YD, KLEINE-VEHN J, MORRIS DA, EMANS N, JURGENS G, GELDNER N, FRIML J. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 2005; **435**: 1251-1256
- [62] PRAK S, HEM S, BOUDET J, VIENNOIS G, SOMMERER N, ROSSIGNOL M, MAUREL C, SANTONI V. Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol Cell Proteomics* 2008; **7**: 1019-1030
- [63] RICHTER S, VOSS U, JURGENS G. Post-Golgi traffic in plants. *Traffic* 2009; **10**: 819-828
- [64] RIVERA-SERRANO EE, RODRIGUEZ-WELSH MF, HICKS GR, ROJAS-PIERCE M. A small molecule inhibitor partitions two distinct pathways for trafficking of tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2012; **7**: e44735
- [65] ROBINSON DG, JIANG L, SCHUMACHER K. The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant Physiol* 2008; **147**: 1482-1492
- [66] SADE N, VINOCUR BJ, DIBER A, SHATIL A, RONEN G, NISSAN H, WALLACH R, KARCHI H, MOSHELION M. Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytol* 2009; **181**: 651-661
- [67] SAITO C, UEDA T, ABE H, WADA Y, KUROIWA T, HISADA A, FURUYA M, NAKANO A. A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant J* 2002; **29**: 245-255
- [68] SAKURAI-ISHIKAWA J, MURAI-HATANO M, HAYASHI H, AHAMED A, FUKUSHI K, MATSUMOTO T, KITAGAWA Y. Transpiration from shoots triggers diurnal changes in root aquaporin expression. *Plant Cell Environ* 2011; **34**: 1150-1163
- [69] SAKURAI J, ISHIKAWA F, YAMAGUCHI T, UEMURA M, MAESHIMA M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1568-1577
- [70] SCHATTAT M, BARTON K, BAUDISCH B, KLOSGEN RB, MATHUR J. Plastid stromule branching coincides with contiguous endoplasmic reticulum dynamics. *Plant Physiol* 2011; **155**: 1667-1677
- [71] SCHEURING D, VIOTTI C, KRUGER F, KUNZL F, STURM S, BUBECK J, HILLMER S, FRIGERIO L, ROBINSON DG, PIMPL P, SCHUMACHER K. Multivesicular bodies mature from the trans-Golgi network/early endosome in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2011; **23**: 3463-3481
- [72] SEVIER CS, WEISZ OA, DAVIS M, MACHAMER CE. Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 13-22
- [73] SORIEUL M, SANTONI V, MAUREL C, LUU DT. Mechanisms and effects of retention of over-expressed aquaporin AtPIP2;1 in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 2011; **12**: 473-482
- [74] SOTO G, FOX R, AYUB N, ALLEVA K, GUAIMAS F, ERIJMAN EJ, MAZZELLA A, AMODEO G, MUSCHIETTI J. TIP5;1 is an aquaporin specifically targeted to pollen mitochondria and is probably involved in nitrogen remobilization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2010; **64**: 1038-1047
- [75] STIERHOF YD, VIOTTI C, SCHEURING D, STURM S, ROBINSON DG. Sorting nexins 1 and 2a locate mainly to the TGN. *Protoplasma* 2013; **250**: 235-240
- [76] SUTTER JU, CAMPANONI P, TYRRELL M, BLATT MR. Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane. *Plant Cell* 2006; **18**: 935-954
- [77] TAKAC T, PECHAN T, RICHTER H, MULLER J, ECK C, BOHM N, OBERT B, REN H, NIEHAUS K, SAMAJ J. Proteomics on brefeldin A-treated *Arabidopsis* roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *J Proteome Res* 2011; **10**: 488-501
- [78] TAKAC T, PECHAN T, SAMAJOVA O, OVECKA M, RICHTER H, ECK C, NIEHAUS K, SAMAJ J. Wortmannin treatment induces changes in *Arabidopsis* root proteome and post-Golgi compartments. *J Proteome Res* 2012; **11**: 3127-3142

- [79] TAKANO J, TANAKA M, TOYODA A, MIWA K, KASAI K, FUJI K, ONOUCHI H, NAITO S, FUJIWARA T. Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 5220-5225
- [80] TYRRELL M, CAMPANONI P, SUTTER JU, PRATELLI R, PANEQUE M, SOKOLOVSKI S, BLATT MR. Selective targeting of plasma membrane and tonoplast traffic by inhibitory (dominant-negative) SNARE fragments. *Plant J* 2007; **51**: 1099-1115
- [81] UEHLEIN N, OTTO B, HANSON DT, FISCHER M, MCDOWELL N, KALDENHOFF R. Function of Nicotiana tabacum aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell* 2008; **20**: 648-657
- [82] VERA-ESTRELLA R, BARKLA BJ, BOHNERT HJ, PANTOJA O. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol* 2004; **135**: 2318-2329
- [83] VIOTTI C, BUBECK J, STIERHOF YD, KREBS M, LANGHANS M, VAN DEN BERG W, VAN DONGEN W, RICHTER S, GELDNER N, TAKANO J, JURGENS G, DE VRIES SC, ROBINSON DG, SCHUMACHER K. Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell* 2010; **22**: 1344-1357
- [84] VOTSMEIER C, GALLWITZ D. An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J* 2001; **20**: 6742-6750
- [85] WUDICK MM, LUU DT, MAUREL C. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol* 2009; **184**: 289-302
- [86] YUASA K, TOYOOKA K, FUKUDA H, MATSUOKA K. Membrane-anchored prolyl hydroxylase with an export signal from the endoplasmic reticulum. *Plant J* 2005; **41**: 81-94
- [87] ZELAZNY E, BORST JW, MUYLEAERT M, BATOKO H, HEMMINGA MA, CHAUMONT F. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 12359-12364
- [88] ZELAZNY E, MIECIELICA U, BORST JW, HEMMINGA MA, CHAUMONT F. An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *Plant J* 2009; **57**: 346-355
- [89] ZHANG L, ZHANG H, LIU P, HAO H, JIN JB, LIN J. *Arabidopsis* R-SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 are required for cell plate formation. *PLoS ONE* 2011; **6**: e26129
- [90] ZUZARTE M, RINNE S, SCHLICHTHORL G, SCHUBERT A, DAUT J, PREISIG-MULLER R. A di-acidic sequence motif enhances the surface expression of the potassium channel TASK-3. *Traffic* 2007; **8**: 1093-1100

Redaktor prowadzący – Andrzej Kononowicz

Otrzymano: 03.12.2014

Przyjęto: 26.03.2015

Ewelina Paluch

Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii UAM

ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań

tel. (61) 829 58 85

email: e.paluch@amu.edu.pl