

УДК 573.2:57.017.6

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ PIN-БЕЛКОВ В ТРАНСПОРТЕ АУКСИНА В КОРНЕ *ARABIDOPSIS THALIANA* L.

© 2014 г. В.В. Коврижных¹, Н.А. Омелянчук¹,
Т.П. Пастернак², В.В. Миронова^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: kviki@bionet.nsc.ru;

² Институт биологии II/ молекулярной физиологии растений, Фрайбург, Германия;

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 12 сентября 2014 г. Принята к публикации 17 октября 2014 г.

Фитогормон ауксин является ключевым фактором морфогенеза растений. Ауксин неравномерно распределяется в тканях растения, формируя градиенты и максимумы концентраций, в соответствии с которыми происходит рост, деление и дифференцировка клеток. Основным вклад в образование градиентов ауксина вносит семейство PIN-FORMED (PIN) белков, трансмембранных транспортеров ауксина. Корень растений представляет собой наиболее удобную модель для изучения регуляции морфогенеза ввиду его достаточно простой клеточной организации. В данном обзоре мы рассматриваем особенности экспрессии PIN транспортеров и их роль в формировании распределения ауксина в корне арабидопсиса. Обсуждаются математические модели, которые позволили доказать связь между паттерном экспрессии PIN-белков и распределением ауксина в меристеме корня.

Ключевые слова: ауксин, активный транспорт, *Arabidopsis thaliana*, математическое моделирование, меристема, корень.

ВВЕДЕНИЕ

Ауксин координирует основные процессы развития растений, такие как эмбриогенез, дифференцировку сосудистой ткани, поддержание меристем, инициацию латеральных органов (боковых корней, боковых побегов, цветков, тропизмы и др.) (Vanneste, Friml, 2009). Градиенты ауксина в тканях в соответствии с его дозой определяют процессы деления, роста и дифференцировки клеток. Распределение ауксина создается в основном за счет активного транспорта ауксина между клетками. Транспорт ауксина осуществляется тремя семействами белков: AUX/LAX (AUXIN-INSENSITIVE1/LIKE AUX1), PIN (PIN-FORMED) и ABCB (в подсемейство ABC транспортеров) (Bennett *et al.*, 1996; Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005; Geisler, Murphy, 2006). PIN-белки осуществляют отток ауксина из клетки и тем самым формируют

направление его потока и градиентов (Petrásek *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006). В частности, мутанты по генам PIN воспроизводят фенотипы растений дикого типа, обработанных ингибиторами активного транспорта, в гораздо большей степени, чем мутанты по генам других транспортеров (Tanaka *et al.*, 2006). Таким образом, поляризация PIN-белков на мембранах клеток и их активность определяют направленность потока ауксина и способствуют образованию локальных максимумов концентраций ауксина, необходимых для инициации органов и в конечном счете для морфогенеза (Blakeslee *et al.*, 2005). Кроме того, PIN-белки могут иметь важную роль в регуляции реакции растений на окружающую среду (Habets *et al.*, 2014).

PIN-белки осуществляют транспорт ауксина как в побегах, так и в корне растений. В данном обзоре мы решили сконцентрироваться на описании экспрессии PIN-белков в корне,

так как с конца прошлого века именно корень (чаще всего *Arabidopsis thaliana* L.) стал модельным объектом для изучения молекулярных процессов развития растений ввиду простого строения, которое не меняется по мере роста корня (Benfey, Schiefelbein, 1994). Например, корень арабидопсиса на всем своем протяжении, за исключением кончика, состоит из стели, окруженной концентрическими слоями эндодермы, кортекса и эпидермиса (рис. 1, а) (Dolan *et al.*, 1993). Стель, в свою очередь, включает центральный сосудистый цилиндр, вмещающий в себя флоэму, ксилему и камбий, окруженные перициклом. В кончике корня находится апикальная меристема корня АМК, в которой между активно делящейся зоной и колумеллой находится область редко делящихся клеток – покоящийся центр (рис. 1, а). АМК окружена потомками своих клеток, сверху – вертикальными рядами последовательно дифференцирующейся стели, снизу (также последовательно от меристемы) – дифференцирующимися клетками колумеллы, а с боков – сначала предшественниками кортекса/эндодермиса и эпидермиса и затем боковым корневым чехликом.

Целью настоящего обзора является описание ключевой роли PIN-белков в транспорте ауксина и эффективности системного подхода в изучении функции PIN генов в корне растений. В задачи обзора входило изложение опублико-

ванных данных по распределению ауксина в корне *A. thaliana* и значению экспрессии PIN генов в установлении этого распределения, а также представление интеграции этих данных в математических моделях.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АУКСИНА В КОРНЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Ауксин является низкомолекулярным веществом, производным триптофана. В первые дни после прорастания ауксин синтезируется исключительно в примордиях листьев и молодых листьях в апексе побега, затем синтез может происходить в разных частях растения, в том числе и в корне, но, тем не менее, основным постоянным источником ауксина в растении всегда является апекс побега (Ljung *et al.*, 2002).

Ауксин, синтезированный в побеге, затем распределяется по растению с помощью диффузии и активного транспорта. Для исследования распределения ауксина в растении были созданы две группы искусственных репортерных ауксин-чувствительных конструкций: под управлением ауксин-чувствительного промотора DR5 (Ulmasov *et al.*, 1997) и с белковой частью, содержащей ауксин-зависимый дегрон DII-VENUS (Brunoud *et al.*, 2012).

Высокоактивная синтетическая конструкция



Рис. 1. Анатомическая структура кончика корня *A. thaliana* и распределение ауксина в нем.

а – клеточные типы в меристеме корня; б – распределение ауксина, выявленное с помощью DR5-GFP под конфокальным микроскопом. Максимум активности GFP обозначен черным; в – распределение ауксина, выявленное с помощью DII-VENUS. Максимум концентрации обозначен белым, минимум – черным (адаптировано из: (Brunoud *et al.*, 2012)). Стрелка указывает на покоящийся центр. Шкала – 30 мкм.

DR5 была создана путем сайт-направленного мутагенеза в природном ауксин-чувствительном сайте (AuxRE) промотора GH3 гена сои. DR5 состоит из тандема 7 прямых повторов AuxRE длиной 11 п.н., которые включают последовательность TGTCTC (Ulmasov *et al.*, 1997). Механизм работы данной конструкции заключается в том, что в ответ на накопление ауксина происходит активация промотора, за которой следует синтез репортерного белка (GUS/GFP) в соответствующих клетках. С помощью этой конструкции зарегистрировано два максимума в меристематической зоне: первый максимум ауксина в кончике корня, а точнее – в инициалах колумеллы с некоторым падением уровня в покоем центре и самой колумелле (рис. 1, б) (Sabatini *et al.*, 1999) и второй максимум ауксина в клетках протоксилемы в верхней части меристематической зоны, где происходит преддетерминация сайтов инициации боковых корней (De Smet *et al.*, 2007). Также были выявлены максимумы ауксина в клетках перидермы в зоне дифференциации, где осуществляется инициация боковых корней (De Smet *et al.*, 2007).

Конструкция DII-VENUS состоит из нескольких последовательностей, кодирующих домены Aux/IAA белков (деградация которых регулируется ауксином), слитых с быстро созревающим белком YFP (Brunoud *et al.*, 2012). DII-VENUS экспрессируется под управлением 35S промотора во всех клетках растения. При увеличении концентрации ауксина в клетке SCF^{TIR1} комплекс связывает Aux/IAA-YFP, убиквитинизирует его, после чего белок разрушается протеасомой. Изучение меристематической зоны с помощью DII-VENUS подтвердило все локальные максимумы ауксина, выявленные в ней с помощью DR5 сенсора. Ввиду большей чувствительности DII-VENUS описывает распределение ауксина в меристематической зоне более детально. Наибольший уровень ауксина DII-VENUS регистрирует в покоем центре, инициалах и двух рядах клеток колумеллы, инициалах стели и их ранних потомках и в дифференцирующихся клетках ксилемы (рис. 1, в). Другие клетки в проксимальной меристеме имеют более низкий уровень с минимумом в эпидермисе и кортексе. В дистальной части меристематической зоны (по другому называемой

базальной меристемой или транзитной зоной) уровень ауксина значительно возрастает. Зона увеличения более приближена к кончику корня в эпидермисе и сосудистой ткани. Формирование и динамическое перераспределение ауксина играют важную роль в морфогенезе растения, поэтому актуальной является задача исследования белков-транспортёров, осуществляющих это перераспределение.

ХАРАКТЕРИСТИКА PIN-БЕЛКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Первые представители семейства PIN были описаны на модельном растении *Arabidopsis thaliana*. Значение и функции белков PIN были обнаружены при анализе фенотипических аномалий в мутантах с потерей функции гена: мутантные растения образовывали подобные булавке соцветия, которые дали название семейству PIN. У арабидопсиса описано 8 генов (PIN1–PIN8) (Krecek *et al.*, 2009). Семейство PIN кодирует трансмембранные белки, которые транспортируют ауксин. Точное происхождение белков PIN в эволюционной истории растений не известно. Представители семейства PIN были найдены только в геномах высших растений, начиная со мхов и плаунов (Mravec *et al.*, 2009).

Все PIN-белки имеют аналогичную структуру: С- и N-гидрофобные области отделены центральной гидрофильной петлей (рис. 2). Структура гидрофобных областей консервативна у разных представителей PIN. Гидрофильная область, напротив, является более изменчивой. Трансмембранные С- и N-терминальные домены вместе, вероятно, образуют пору для переноса ауксина, в то время как гидрофильная петля отвечает за локализацию белка и его активность (Dhonukshe *et al.*, 2010).

Все белки PIN *A. thaliana* на основе своей структуры могут быть разделены на два подсемейства. Более многочисленное подсемейство «длинных» PIN характеризуется наличием центральной гидрофильной петли, разделяющей две гидрофобные области друг от друга (рис. 2). Каждая гидрофобная область имеет пять трансмембранных участков. К этому подсемейству принадлежат белки PIN1–PIN4 и PIN7, которые расположены в плазматической мембране и

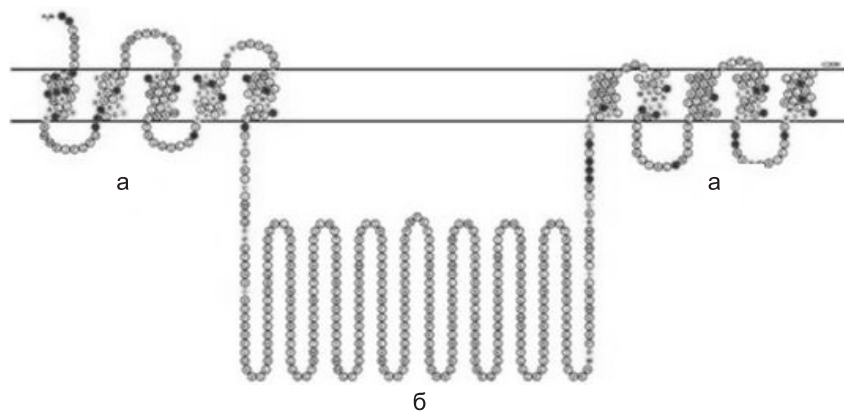


Рис. 2. Структура «длинных» PIN-белков.

а – гидрофобная область, состоящая из 5 трансмембранных участков; б – гидрофильная петля (адаптировано из: (Krecek *et al.*, 2009)).

транспортируют ауксин из клетки. Кроме того, PIN6 также относят к «длинным» PIN на основе высокой гомологии его последовательности к белкам семейства в трансмембранных участках и по наличию гидрофильной петли, которая немного редуцирована. Ауксин непосредственно повышает транскрипцию многих «длинных» PIN (Vieten *et al.*, 2007).

Отличительная особенность подсемейства «коротких» PIN (PIN5 и PIN8) – отсутствие гидрофильной петли. Они локализованы в ЭПР и обеспечивают внутриклеточное разделение ауксина между цитоплазмой и полостью ЭПР (PIN5), между цитоплазмой и вакуолями (PIN8), а также гомеостаз ауксина в клетке. Ауксин снижает транскрипцию белков PIN5 и PIN8 (Friml *et al.*, 2003).

Локализация PIN-белков в клетке. PIN-белки играют важную роль в формировании полярности клетки (Medvedev, 2012). Поэтому важным является понимание механизмов их полярной локализации. Существуют две гипотезы, объясняющие данный механизм: первая основана на рециркуляции PIN-белков, вторая – на их деградации. Синтезируемые на рибосомах белки PIN попадают в ЭПР. Из ЭПР они поступают в аппарат Гольджи, в котором упаковываются в везикулы. Далее путем экзоцитоза белки PIN встраиваются равномерно во внешнюю мембрану клетки. Согласно первой гипотезе, внутриклеточная рециркуляция белков PIN – важный регуляторный механизм их локализации на мембране (Kleine-Vehn *et al.*,

2011). Он осуществляется при помощи клатрин-зависимого эндоцитоза и вторичного экзоцитоза (Geldner *et al.*, 2001). На первой стадии эндоцитоза происходит интернализация везикул, содержащих белки PIN. На второй стадии – включение их в эндомембраны, согласно различиям в гидрофильной петле, которые обуславливают различия в клеточной локализации PIN-белков. Механизм вторичного экзоцитоза обеспечивает рециркуляцию белков PIN в конкретные участки ПМ (например, PIN1 – в базальные, PIN2 – в апикальные). Кроме того, часть PIN-белков транспортируются везикулярным путем на деградацию. Вторая гипотеза предполагает, что рециркуляция белков вносит малый вклад в их полярную локализацию и после эндоцитоза везикулы с PIN-белками деградируют (Tejos *et al.*, 2014).

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ PIN ГЕНОВ ДЛЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АУКСИНА И МОРФОГЕНЕЗА КОРНЯ

Экспрессия PIN генов в эмбриогенезе *Arabidopsis thaliana*. PIN-белки формируют градиент ауксина, определяющий дифференцировку клеток уже в эмбриогенезе. После первого деления зиготы образуется двуклеточный проэмбрио (предзародыш), апикальная клетка которого в основном даст начало всему зародышу (за исключением части меристемы корня), в то время как базальная путем горизонтальных делений – суспензору (Jürgens, 2001). Самая

апикальная клетка суспензора впоследствии станет гипофизой. В образовании меристемы корня участвуют как потомки апикальной клетки (они дают начало верхнему ярусу меристемы), так и гипофиза, из которой происходят покоящийся центр и нижний ярус. PIN гены экспрессируются уже на стадии двуклеточного предзародыша (Friml *et al.*, 2003). PIN1 белок не полярно, равномерно распределен по мембране в апикальной клетке, в то время как PIN7 локализован на верхней плазматической мембране базальной клетки и проводит ауксин из базальной клетки в апикальную. На стадии восьми клеток PIN7 локализован на верхних плазматических мембранах клетки гипофизы и клетки под ней, снабжая развивающийся зародыш ауксином. На глобулярной стадии, в апикальной части эмбриона, в области будущих семядолей начинается биосинтез ауксина и PIN1 локализуется базально в инициалах сосудистых клеток в нижней части зародыша перед гипофизой. Также на глобулярной стадии впервые в гипофизе и инициалах сосудистых клеток корневой меристемы начинает экспрессироваться PIN4, а локализация PIN7 в клетках суспензора меняется с апикальной на базальную. PIN7-зависимый транспорт ауксина в суспензор функционирует с меньшей скоростью, чем транспорт, опосредованный PIN1 и PIN4. В результате градиент ауксина меняет направление на противоположное, с новым максимумом в гипофизе. С вступлением в сердечковидную стадию в этом районе формируется меристема корня. Синтез ауксина в семядолях усиливается, и PIN1 и PIN4 обеспечивают приток ауксина к меристеме. В это время начинается экспрессия PIN3 на базальном полюсе эмбриона в предшественниках колумеллы. Таким образом, по мере хода эмбриогенеза ауксин начинает накапливаться в развивающемся корне, что, в свою очередь, приводит к формированию покоящегося центра. На торпедной стадии максимум ауксина устанавливается под покоящимся центром в инициалах колумеллы. Правильная локализация PIN-белков, обеспечивающая правильное распределение ауксина, является ключевым фактором в этом процессе. Например, при мутации белка GNOM/EMB30, необходимого для правильной локализации PIN-белков в мембране (Steinmann *et al.*, 1999),

нарушается клеточная локализация PIN1, что, в свою очередь, приводит к летальному фенотипу эмбриона.

Таким образом, во время эмбриогенеза PIN-белки арабидопсиса начинают экспрессироваться с первого деления зиготы и способствуют через образование градиентов ауксина формированию апикально-базальной оси зародыша.

Роль экспрессии PIN генов для поддержания функционирования АМК у арабидопсиса. Сформированный в конце эмбриогенеза в зачатке первичного корня за счет активности PIN транспортеров максимум ауксина в инициалах колумеллы сохраняется при прорастании и поддерживается в главном корне. В растущем корне после прорастания семян PIN1 в основном локализуется на базальной стороне сосудистых клеток меристематической зоны корня, но он также может быть локализован на базальной стороне эндодермиса и кортекса (рис. 3) (Friml *et al.*, 2002a; Vieten *et al.*, 2005). В покоящемся центре наблюдается неполярная локализация PIN1 белка, но значительно слабее, чем в клетках сосудистой системы. PIN2 расположен на апикальной (верхней) стороне клеток эпидермиса и боковых клетках корневого чехлика, а также на базальной, а затем апикальной стороне клеток кортекса в меристематической зоне и зоне элонгации соответственно (рис. 3) (Friml *et al.*, 2003; Vieten *et al.*, 2005). PIN3 экспрессируется без выраженной полярности в двух или трех рядах клеток колумеллы, на базальной стороне клеток сосудов и боковой стороне клеток перицикла в зоне элонгации (рис. 3) (Friml *et al.*, 2002b). PIN4 локализуется на всех сторонах вокруг клеток покоящегося центра, а также базально в инициалах сосудистых клеток и в сосудистых клетках в зоне элонгации (рис. 3) (Friml *et al.*, 2002b). PIN7 находится на боковых и базальных мембранах инициалей сосудистых клеток в меристематической зоне и зоне элонгации, тогда как в клетках колумеллы он совпадает с областью PIN3 (рис. 3) (Blilou *et al.*, 2005).

Белки PIN1, PIN3, PIN4 и PIN7 обеспечивают в корне постоянный акропетальный (направленный к кончику корня) поток ауксина из побега через сосудистую систему к покоящемуся центру (Blilou *et al.*, 2005; Friml *et al.*, 2002a). PIN3 и PIN7 также способствуют перераспределению

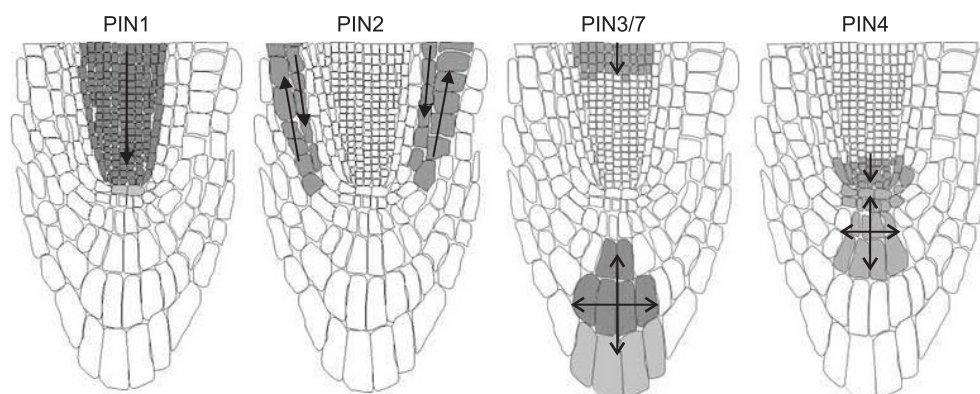


Рис. 3. Экспрессия PIN-белков в корне.

Стрелки указывают направление потоков ауксина.

ауксина в корневом чехлике. PIN2 формирует базипетальный поток ауксина из кончика корня через эпидермис, а также акропетальный поток через кортекс. Кроме того, белки PIN семейства локализованы на латеральной стороне мембраны в периклике и эндодермисе, что опосредует латеральное перераспределение ауксина из базипетального потока обратно в акропетальный и формирует так называемую структуру «обратного фонтана» (Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007).

Аналогичная локализация PIN-белков обнаружена в формирующихся боковых корнях. Локальные максимумы ауксина формируются *de novo* и затем поддерживаются во всех придаточных и боковых корнях.

Компенсаторные изменения экспрессии PIN генов в случае мутаций одного из них. В *pin* мутантах наблюдается изменение доменов экспрессии других PIN генов, которые компенсируют потерю белка мутантного гена, экспрессируясь в его домене и беря на себя его функции (Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005). Например, в мутанте *pin1*, PIN2 начинает экспрессироваться в инициалах сосудистых клеток, частично компенсируя функцию недостающего белка PIN1. В мутанте *pin3pin4pin7* экспрессия белка PIN1 была обнаружена на латерально-базальной стороне мембраны клеток эндодермиса. Кроме того, белок PIN2 был обнаружен на базальной стороне инициалей сосудистых клеток, в которых обычно экспрессируются PIN3 и PIN7. Это явление называют функциональной избыточностью (Blilou *et al.*, 2005). Таким

образом, дефекты *pin* мутантов маскируются эктопической экспрессией оставшихся PIN генов (Blilou *et al.*, 2005; Vieten *et al.*, 2005). В корне фенотипические дефекты были выявлены только у одного одиночного мутанта – *pin2*, который имеет аgravитропический фенотип. Этот дефект может быть объяснен отсутствием компенсации функции PIN2 другими белками PIN. Также фенотипические аномалии в корне были обнаружены у некоторых множественных мутантов, например, тройной мутант *pin1pin3pin4* имеет очень короткий корень, а *pin1pin3pin4pin7* мутанты, в зависимости от экотипа, являются летальными с ярко выраженными аномалиями полюса корня или нефункциональным корнем у развивающихся растений (Friml *et al.*, 2003).

В заключение отметим, что дополнительные доказательства о решающем вкладе PIN-белков в формирование паттерна распределения ауксина в корне были получены из данных о слабом влиянии нуль-мутантов ABC или AUX/LAX транспортеров на ранние процессы развития растения (Ugartechea-Chirino *et al.*, 2010; Zazimalová *et al.*, 2010).

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АУКСИНА PIN ТРАНСПОРТЕРАМИ

Выше были приведены доказательства того, что PIN-белки способствуют формированию распределения ауксина во время эмбрионального и постэмбрионального развития растения. Поскольку транспорт ауксина является динамич-

ческим процессом, то его исследование с использованием математического моделирования позволяет более детально понять механизмы формирования градиента концентрации ауксина и подтвердить основную роль PIN-белков в этом процессе.

Гипотеза о достаточности PIN-белков для формирования максимума концентрации ауксина в меристеме корня в развитии впервые была проверена в математической модели (Grieneisen *et al.*, 2007). В этой работе авторы предложили механизм «обратного фонтана», согласно которому суперпозиция паттернов экспрессии PIN-белков обеспечивает формирование и сохранение в развитии максимума концентрации ауксина (рис. 1, б). В математической модели «обратного фонтана» кончик корня был представлен в виде клеточного ансамбля с прямоугольными клетками, которые различаются по размеру в зависимости от их положения в меристематической зоне или зоне элонгации. В модели был рассмотрен один PIN-белок, который обобщает функции PIN1, PIN2, PIN3, PIN7. Полярная локализация PIN задавалась в соответствии с экспериментальными данными для этих четырех белков, а именно: центральная область клеточного ансамбля моделирует сосудистую ткань с базально расположенными PIN; периферийные регионы, в которых PIN экспрессируются преимущественно апикально, соответствуют ткани эпидермиса, между этими тканями расположены «пограничные» клетки сосудистого слоя, которые имеют базально-боковую локализацию PIN; в клетках, соответствующих клеткам колумеллы, PIN-белки локализуются на всех сторонах. Таким образом, механизм обратного фонтана предполагает наличие акропетального и базипетального потоков ауксина, которые координируются боковым перераспределением ауксина, чтобы сгенерировать градиент ауксина в корне. Максимум концентрации ауксина генерировался в модели непосредственно над клетками колумеллы, что соответствует экспериментально наблюдаемому максимуму в клетках покоящегося центра (рис. 1, б).

Более детальный анализ формирования распределения ауксина в клеточном ансамбле с фиксированным паттерном экспрессии PIN-белков был проведен в работе Band с соавт. (2014). В данной работе распределение аук-

сина моделировалось в клеточном ансамбле, имитирующем реальную клеточную структуру продольного среза кончика корня, полученную из конфокальных изображений DII-VENUS *A. thaliana*. В отличие от работы Grieneisen с соавт. (2007) авторы работы Band с соавт. (2014) анализировали распределение ауксина с помощью более чувствительного сенсора DII-VENUS (рис. 1, в). В модели Band с соавт. (2014), так же, как и в модели Grieneisen с соавт. (2007), распределение PIN-белков в тканях корня было фиксированным в процессе расчета. В результате в данной работе было показано, что одних PIN-белков недостаточно для формирования экспериментально наблюдаемого распределения ауксина. Авторы пришли к выводу, что AUX1/LAX транспортеры также значительно влияют на распределение ауксина, а именно они контролируют, какие именно ткани имеют высокий уровень ауксина.

Описанные выше модели исследуют, как паттерн экспрессии PIN-белков генерирует градиент ауксина. Совершенно другой подход используется в модели «отраженной волны» (Likhoshvai *et al.*, 2007; Mironova *et al.*, 2010, 2012), в которой исследуется вопрос, как ауксин через регуляцию экспрессии PIN-белков влияет на свое распределение. В моделях используются экспериментальные данные о том, что низкие концентрации ауксина активируют транскрипцию генов PIN1–4 и PIN7, тогда как высокие концентрации вызывают деградацию этих белков (Vieten *et al.*, 2005). В модели Мироновой с соавт. (Mironova, 2012) рассматривается ауксин-зависимая экспрессия трех белков PIN: PIN1 создает акропетальный поток ауксина через сосудистые клетки, PIN2 – базипетальный и боковой потоки через эпидермис, PIN3 – неполярный поток. В численном расчете модели паттерн распределения ауксина самоорганизовывался одновременно с паттерном распределения PIN-белков. Кроме того, механизмы обратного фонтана и отраженной волны являются взаимодополняющими в процессах развития корня. В частности, механизм отраженной волны осуществляется на самых ранних стадиях развития корневой системы. На более поздних стадиях развития сформированная анатомическая структура обеспечивает функционирование механизма обратного фонтана, который

позволяет более надежно поддерживать максимум ауксина в меристеме корня. Однако механизм отраженной волны не исчезает, он снова начинает работать, если структура меристемы корня нарушается (Mironova *et al.*, 2012). Стоит отметить, что взаимодействие этих механизмов происходит через ауксин-зависимую регуляцию экспрессии PIN генов.

Результаты математического моделирования подтверждают основную роль PIN транспортеров в формировании градиента ауксина, а также важность обратных связей в регуляции данного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ауксин – гормон растений, который влияет на деление, рост и дифференцировку клеток, он также играет важную роль в развитии корневой системы. Распределение ауксина обеспечивается за счет его активного транспорта (белками семейств AUX/LAX, PIN и ABCB) и диффузии. Семейство генов PIN арабидопсиса кодирует трансмембранные белки, которые транспортируют ауксин из клетки. PIN-белки расположены асимметрично в плазматической мембране клеток, благодаря чему формируют в ткани градиенты и максимумы концентрации ауксина, влияющие на развитие. В данной статье мы привели как экспериментальные доказательства ключевой роли PIN-белков в формировании этого распределения, так и результаты исследования транспорта ауксина с помощью математического моделирования.

К числу экспериментальных доказательств относятся следующие. 1. PIN-белки начинают экспрессироваться сразу после деления зиготы и в процессе всего эмбриогенеза направляют потоки ауксина, которые в свою очередь влияют на дифференцировку клеток, в том числе способствуют формированию и развитию корня. 2. В зрелом растении паттерн экспрессии PIN генов обеспечивает непрерывный поток ауксина из побега, необходимый для поддержания функционирования меристемы корня. Кроме того, большинство одиночных и некоторые множественные мутанты *pin* не показывают фенотипических аномалий в корне, что объясняется функциональной избыточностью генов PIN. Однако стоит отметить, что механизмы,

объясняющие данное явление, в настоящее время недостаточно исследованы.

In silico подход имеет особые преимущества для изучения динамики таких сложных систем, к которым относится транспорт ауксина. Методами математического моделирования было исследовано, как паттерн экспрессии PIN-белков формирует распределение ауксина в кончике корня (Grieneisen *et al.*, 2007; Band *et al.*, 2014). В то же время стоит подчеркнуть, что важным регулятором экспрессии генов PIN является сам ауксин, эта регуляция позволяет образовывать обратную связь между концентрацией ауксина в клетке и скоростью его оттока из клетки. Математические модели, механизм работы которых основан на наличии положительной и отрицательной обратной связи между ауксином и экспрессией его транспортеров, не только воспроизводят самоорганизацию наблюдаемого распределения ауксина в корне, но и могут объяснить соответствующее ему формирование различных клеточных типов (Likhoshvai *et al.*, 2007; Mironova *et al.*, 2010; Mironova *et al.*, 2012). В дальнейшем в математических моделях необходимо учесть влияние других транспортеров ауксина, AUX/LAX и ABCB. Кроме того, важно использовать такой инструмент, как математическое моделирование для выявления механизмов полярной локализации PIN-белков. Таким образом, системная интеграция экспериментальных и компьютерных подходов впоследствии позволит добиться более детального и реалистичного понимания механизмов, лежащих в основе транспорта ауксина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом фонда «Династия» для молодых биологов и Российским научным фондом 14-14-00734.

ЛИТЕРАТУРА

- Band L.R., Wells D.M., Fozard J. *et al.* Systems analysis of auxin transport in the Arabidopsis root apex // *Plant Cell*. 2014. V. 26. No. 3. P. 862–875.
- Benfey P.N., Schiefelbein J.W. Getting to the root of plant development: the genetics of Arabidopsis root formation // *Trends Genet.* 1994. V. 10. No. 3. P. 84–88.
- Bennett M.J., Marchant A., Green H.G. *et al.* Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism // *Science*. 1996. V. 273. P. 948–950.

- Blakeslee J.J., Ann W., Angus P. *et al.* MDR/PGP auxin transport proteins and endocytic cycling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. No. 5. P. 494–500.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V. *et al.* The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots // *Nature*. 2005. V. 433. P. 39–44.
- Brunoud G., Wells D.M., Oliva M. *et al.* A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution // *Nature*. 2012. V. 482. P. 103–106.
- De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B. *et al.* Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis* // *Development*. 2007. V. 134. No. 4. P. 681–690.
- Dhonukshe P., Huang F., Galvan-Ampudia C.S. *et al.* Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling // *Development*. 2010. V. 137. No. 19. P. 3245–3255.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V. *et al.* Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root // *Development*. 1993. V. 119. No. 1. P. 71–84.
- Friml J., Benkova E., Blilou I. *et al.* AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis* // *Cell*. 2002a. V. 108. No. 5. P. 661–673.
- Friml J., Wiśniewska J., Benková E. *et al.* Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis* // *Nature*. 2002b. V. 415. P. 806–809.
- Friml J., Vieten A., Sauer M. *et al.* Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* // *Nature*. 2003. V. 426. P. 147–153.
- Geisler M., Murphy A.S. The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. No. 4. P. 1094–1102.
- Geldner N., Friml J., Stierhof Y.D. *et al.* Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking // *Nature*. 2001. V. 413. P. 425–428.
- Grieneisen V.A., Xu J., Marée A.F. M. *et al.* Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth // *Nature*. 2007. V. 449. P. 1008–1013.
- Habets M.E., Offringa R. PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals // *New Phytol.* 2014. V. 203. No. 2. P. 362–377.
- Jürgens G. Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis // *EMBO J.* 2001. V. 20. No. 14. P. 3609–3616.
- Kleine-Vehn J., Wabnik K., Martinière A. *et al.* Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane // *Mol. Systems Biol.* 2011. V. 7. P. 540.
- Kreczek P., Skupa P., Libus J. *et al.* Protein family review The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters // *Genome Biol.* 2009. V. 10. No. 12. P. 249.
- Likhoshvai V.A., Omelyanchuk N.A., Mironova V.V. *et al.* Mathematical model of auxin distribution in the plant root // *Russ. J. of Developm. Biol.* 2007. V. 38. No. 6. P. 374–382.
- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth // *Plant J.* 2002. V. 28. No. 4. P. 465–474.
- Medvedev S.S. Mechanisms and physiological role of polarity in plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. No. 4. P. 502–514.
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Yosiphon G. *et al.* A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root // *BMC Syst. Biol.* 2010. V. 4. No. 1. P. 98.
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Novoselova *et al.* Combined *in silico/in vivo* analysis of mechanisms providing for root apical meristem self-organization and maintenance // *Ann. Bot.* 2012. V. 110. No. 2. P. 349–60.
- Mravec J., Skupa P., Bailly A. *et al.* Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter // *Nature*. 2009. V. 459. P. 1136–1140.
- Petrasek J., Mravec J., Bouchard R. *et al.* PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux // *Science*. 2006. V. 312. P. 914–918.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H. *et al.* An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root // *Cell*. 1999. V. 99. No. 5. P. 463–472.
- Steinmann T., Geldner N., Grebe M. *et al.* Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF // *Science*. 1999. V. 286. P. 316–318.
- Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer P.B., Friml J. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development // *Cell. Mol. Life Sci.: CMLS.* 2006. V. 63. No. 23. P. 2738–2754.
- Tejos R., Sauer M., Vanneste S. *et al.* Bipolar plasma membrane distribution of phosphoinositides and their requirement for auxin-mediated cell polarity and patterning in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2014. V. 26. No. 5. P. 2114–2128.
- Ugartechea-Chirino Y., Swarup R., Swarup K. *et al.* The AUX1 LAX family of auxin influx carriers is required for the establishment of embryonic root cell organization in *Arabidopsis thaliana* // *Ann. Bot.* 2010. V. 105. No. 2. P. 277–289.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements // *Plant Cell Online*. 1997. V. 9. No. 11. P. 1963–1971.
- Vanneste S., Friml J. Auxin: a trigger for change in plant development // *Cell*. 2009. V. 136. No. 6. P. 1005–1016.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P.B., Friml J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development // *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. No. 4. P. 160–168.
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J. *et al.* Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression // *Development*. 2005. V. 132. No. 20. P. 4521–4531.
- Wisniewska J., Xu J., Seifertová D. *et al.* Polar PIN localization directs auxin flow in plants // *Science*. 2006. V. 312. P. 883.
- Zazimalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K., Hosek P. Auxin transporters -why so many? // *Cold Spring Harbor Persp. Biol.* 2010. V. 2. No. 3. P. a001552.

THE KEY ROLE OF PIN PROTEINS IN AUXIN TRANSPORT IN *ARABIDOPSIS THALIANA* ROOTS

V.V. Kovrizshnykh¹, N.A. Omelyanchuk¹, T. Pasternak², V.V. Mironova^{1,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: kviki@bionet.nsc.ru;

² Institute of Biology II/Molecular Plant Physiology, Freiburg, Germany;

³ Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The phytohormone auxin is the key factor in plant morphogenesis. Being unevenly distributed in plant tissues, it forms gradients and concentration maxima, according to which cells grow, divide, and differentiate. The family of PIN-FORMED (PIN) proteins, transmembrane transporters of auxin, play the key role in the formation of auxin gradients. The plant root is the most appropriate model for studying the regulation of morphogenesis, because of its relatively simple cellular organization. This review concerns the expression patterns of PIN transporters and their contribution to auxin distribution in the root of *Arabidopsis*. Mathematical models that prove the relationship between the expression pattern of PIN proteins and auxin distribution in the root meristem are discussed.

Key words: auxin, active transport, *Arabidopsis thaliana*, mathematical modeling, meristem, root.