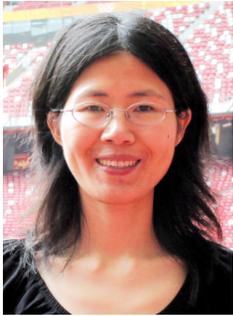


特约综述



我们实验室以模式植物拟南芥为材料, 利用细胞生物学、分子生物学和植物生理学等手段, 研究生长素的极性运输及其与油菜素甾醇的相互作用。目前我们的研究重点包括: 种子发育过程中生长素的分布模式及其建立机制; 油菜素甾醇在根向重力生长中的作用及其与生长素的关系; 植物固醇的合成、运输及其在植物发育中的功能。

<http://sky.nankai.edu.cn/teacher.asp?id=mensz>

生长素的外输载体PIN蛋白家族研究进展

邹纯雪 门淑珍*

(南开大学生命科学学院植物生物学和生态学系, 天津 300071)

摘要 生长素作为第一个被发现的植物激素, 在植物许多发育过程中扮演着重要角色, 如顶端优势、花序和叶序的发育、胚的发育、主根的发育、侧根和不定根的发生、向性生长以及维管组织的分化等。这些过程都依赖于生长素浓度梯度的建立。生长素的浓度梯度是由生长素的合成和极性运输共同建立的。生长素极性运输依赖于内输载体AUX/LAX家族、外输载体PIN蛋白家族和ABCB/PGP蛋白家族。该文将主要综述PIN蛋白家族的研究进展, 介绍PIN蛋白的定位和功能研究、转录和转录后调控研究以及其胞内循环运输过程等方面的研究进展。

关键词 生长素; PIN 蛋白; 生长素外输蛋白; 极性定位; 胞内运输

Research Advances in Auxin Efflux Carrier PIN Proteins

Zou Chunxue, Men Shuzhen*

(Department of Plant Biology and Ecology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Auxin as the first found phytohormone plays critical roles in a variety of physiological and developmental processes of plants, such as apical dominance, inflorescence and phyllotaxis development, embryogenesis, root development, lateral root and adventitious root initiation, tropism and vascular differentiation. These processes depend on the establishment of the auxin concentration gradients coordinated by auxin biosynthesis and directional transport. The polar auxin transport is mediated by auxin influx carriers from the AUX/LAX protein family, and by auxin efflux proteins from the PIN family and from the ABCB/PGP family. This review focuses on

国家自然科学基金(批准号: 91017009)、教育部博士点基金新教师项目(批准号: 20090031120026)和天津市自然科学基金(批准号: 12JCZDJC23200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 91017009), the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No. 20090031120026) and the Natural Science Foundation of Tianjin (Grant No. 12JCZDJC23200)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

the progress made on the study of PIN proteins, includes PIN proteins' subcellular localization and function, the regulation of PIN proteins' expression, as well as PIN proteins' intracellular trafficking.

Key words auxin; PIN protein; auxin efflux protein; polar localization; intracellular trafficking

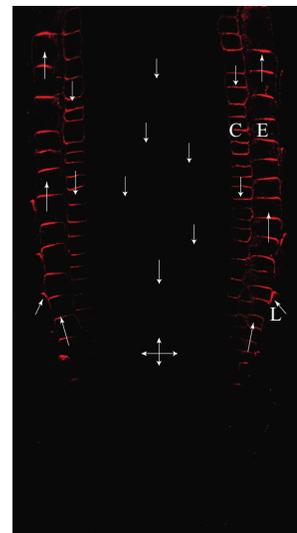
19世纪德国植物学家Julis von Sachs提出一个假设,在高等植物体内存在移动的化学信号参与调控植物的代谢、生长和形态建成。19世纪下半叶,Charles Darwin和他的儿子Francis Darwin研究了植物的向光生长,推测产生于胚芽鞘顶端的某种信号被向下运输到生长区从而引起背光侧比向光侧生长迅速,产生向光的生长^[1]。随后,Frits Went在1926年证明了燕麦胚芽鞘尖端存在促进生长的化学物质,他把这种物质命名为“auxin”,这是取自希腊语“auxein”,意思是“to grow”。因此,中文将“auxin”翻译为“生长素”^[1]。直到20世纪30年代,人们才确定生长素是吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)。生长素参与调控顶端优势、花序和叶序发育、侧根和不定根的形成、维管组织的分化、果实成熟以及向光性和向重力性等植物的生长发育过程。生长素广泛存在于所有植物中,包括低等的绿藻和蓝细菌。

生长素一直是植物学研究的热点,研究内容包括生长素的生物合成、生长素的运输、生长素的信号通路以及生长素与其他激素的相互作用。有关生长素信号转导方面的研究进展可以参考Chapman等^[2]的综述。生长素与受体TIR1/AFBs(TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT/AUXIN SIGNALING F-box)结合后,使TIR1易于结合AUX/IAA(AUXIN/INDOLE ACETIC ACID)蛋白,通过26S蛋白酶体途径降解Aux/IAA蛋白,从而解除了对转录因子ARF(AUXIN RESPONSE FACTOR)的抑制,使ARF可以调控生长素早期响应基因的表达。Jurado等^[3]的研究发现,参与调控细胞周期的F-box蛋白SKP2A能与生长素结合,可能参与了生长素对细胞分裂的调控。自1972年发现ABP1(AUXIN BINDING PROTEIN 1)蛋白具有结合生长素的活性以来,大家已普遍接受ABP1是生长素受体。ABP1参与了调控细胞的延展和细胞周期,但是,其作用机制一直未被阐明。最近几年,ABP1蛋白重新受到生长素学家的重视,研究发现其通过依赖于ROP(Rho-GTPase)途径参与细胞骨架的重排以及调控网格蛋白介导的胞吞作用^[4-7]。

采用同位素标记和分子遗传学方法,发现了植

物和细菌中三种主要的依赖色氨酸的IAA合成途径:TAM(tryptamine,色胺)途径、IPA(indole-3-pyruvate,吲哚-3-丙酮酸)途径和IAN(indole-3-acetonitrile,吲哚-3-乙腈)途径。前两种途径是植物中最常见的IAA合成途径。2011年,几个实验室的研究发现:在拟南芥中,TAA(TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE ARABIDOPSIS)催化色氨酸生成IPA,而YUCCA催化IPA生成IAA,修改了之前的生长素生物合成路径^[8-11]。

极性运输是生长素的一个重要特征。传统意义上的生长素极性运输是指生长素从植株的茎尖生长点和幼叶等组织向下部组织的单向运输。近十几年来,对生长素的极性运输有了更深入的研究,已知植物中不仅存在着从茎尖向根的极性运输,还具有在组织局部的极性运输。例如,在根尖存在着生长素的环流,从地上部分通过维管组织运输来的生长素经过根尖中柱细胞间的单向运输,向根尖静止中心聚集,然后又通过表皮细胞和侧根冠细胞向根尖的伸长区运输,再通过皮层细胞向根尖分生区回流(图1)。生长素发挥调控作用,主要是通过植物组织或器官建立



白色箭头指示生长素的运输方向,红色的信号为PIN2抗体标记的PIN2蛋白。L:侧根冠细胞;E:表皮细胞;C:皮层细胞。

White arrows indicate auxin flow mediated by transporter. Red are PIN2 signals visualized by TRITC-conjugated antibody. L: lateral root cap; E: epidermis; C: cortex.

图1 根尖中生长素环流的示意图

Fig.1 Auxin transport routes in the root tip

不对称分布, 生长素的极性运输在生长素浓度梯度的建立和维持中具有重要的作用。生长素在细胞间的运输依赖于细胞膜定位的载体: 向细胞内运输生长素的载体为AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1(AUX/LAX)蛋白家族, 该家族在模式植物拟南芥中有四个成员: AUXIN1(AUX1)、LIKE AUX1(LAX1)、LAX2和LAX3; 向细胞外运输生长素的载体为PIN-FORMED(PIN)蛋白家族和ATP-Binding Cassette subfamily B/P-glycoprotein(ABCB/PGP)蛋白家族。PIN蛋白家族在拟南芥中有8个成员, 分别命名为PIN1-8。拟南芥ABCB家族的五个成员已有报道能介导细胞间生长素的运输, 分别为PGP1, 2, 4, 10和19^[12-14]。本文将主要综述PIN蛋白家族的研究进展, 介绍PIN蛋白的定位和功能研究、转录和转录后调控研究以及其胞内循环运输过程等方面的研究进展。

1 PIN蛋白家族简介

1.1 PIN蛋白的发现

*PIN1*基因是PIN家族第一个被克隆的基因。*pin1*突变体最早是由Kappert在1959年筛选到的, 1976年, Kranz在第二届国际拟南芥研讨会上展示了该突变体^[15]。*pin1*突变体花序发育缺陷, 表型严重的只有花序茎, 没有茎生叶和花器官, 形态很像大头针, 因此命名为pin-formed^[15-17]。Okada等^[17]研究发现, 将野生型拟南芥培养在添加了生长素极性运输的抑制剂1-N-naphthylphthalamic acid(NPA)和9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid(HFCA)的培养基上, 能模拟*pin1*突变体的表型。而且, 同位素标记的测定显示*pin1*突变体中生长素的极性运输减弱。因此, 推测*PIN1*基因的主要作用是参与生长素的极性运输。随后, Bennett等^[18]对*PIN1*基因进行了图位克隆, 将*PIN1*基因定位在1号染色体*CRABS CLAW*分子标记的下游距离 3.0 ± 0.4 个作图单位(map units)。1998年是PIN基因家族研究具有里程碑意义的一年, 在这一年Klaus Palme实验室克隆了*PIN1*基因。分析表明, *PIN1*基因编码一个67 kDa的蛋白质, 具有8-12个跨膜结构域和一个中央亲水环, 与细菌和真核生物的载体蛋白类似。对数据库进行搜索和筛选拟南芥cDNA文库, 发现拟南芥中还有几个与*PIN1*相似的基因。他们进一步利用PIN1蛋白的抗体进行了蛋白质免疫荧光原位杂交实验, 发现PIN1蛋白定位于维管组织细胞的底部细胞膜上, PIN1蛋白的这种极性

定位符合以前对生长素外输载体在细胞中分布的推测^[19]。在同一年克隆了*PIN2*基因, 并对其功能和亚细胞定位进行了研究, 发现PIN2蛋白参与根的向重力生长, 同样是在细胞膜上极性定位的^[20-23]。目前已知模式植物拟南芥中PIN蛋白家族有8个成员, 分别命名为PIN1-PIN8。Barbez等^[24]通过序列分析, 发现了类似PIN蛋白的家族, 命名为PILS(PIN-LIKES, PILS)。该家族有7个成员, 其拓扑结构与PIN蛋白类似, 但是序列与PIN蛋白的相似度非常低(10%~18%)。PILS蛋白定位于内质网(PILS1-3、PILS5-7定位于内质网; PILS4与荧光蛋白的融合蛋白没有检测到信号), 参与生长素的胞内运输。

1.2 PIN蛋白的特征及其生长素外输载体功能的确定

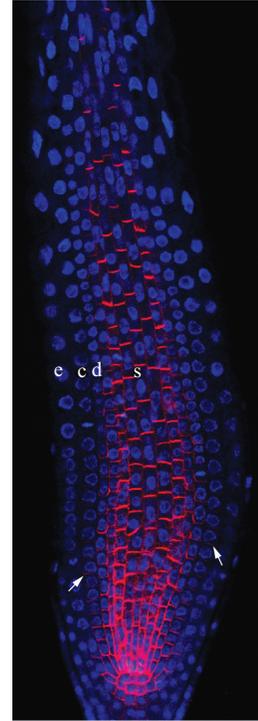
PIN蛋白均为膜蛋白, 具有两个疏水区域(每个有3-5次跨膜结构域)和一个中央的亲水环, 亲水环位于胞内。根据亲水环的长度, 将PIN蛋白家族分成两个亚家族: 一个亚家族包括PIN1、PIN2、PIN3、PIN4和PIN7, 具有一个长的亲水环, 定位在细胞膜上, 且在细胞膜上的分布是不对称的, 负责向细胞外运输生长素; 另一个亚家族包括PIN5、PIN6和PIN8, 具有较短的亲水结构域, 定位在内质网上, 介导胞浆和内质网的生长素交流^[25-28]。确定PIN蛋白是生长素的外输载体是通过以下几方面的证据: (1)PIN蛋白的结构与细菌的运输蛋白(transporter)类似; (2)PIN蛋白定位在细胞膜上, 且是极性定位的, 其定位与生长素极性运输的方向一致; (3)其突变体的表型与生长素运输缺陷类似, 而且同位素标记的测定表明突变体中生长素的运输受到影响; (4)有些*pin*突变体的表型可以用生长素极性运输的抑制剂处理野生型模拟; (5)在植物细胞(烟草的BY-2细胞或者拟南芥悬浮细胞)或者异源表达系统(酵母、爪蟾卵母细胞和Hela细胞)中表达PIN, 证明了其能向细胞外运输生长素, 这为PIN蛋白是生长素外输载体提供了最直接的有力证据。目前, PIN家族成员中的PIN1、PIN4、PIN6和PIN7已经通过在植物细胞中表达, 证明能向细胞外运输生长素^[29]; PIN1、PIN2和PIN7在异源表达系统中证明有外输生长素的活性, 而且不需要其他的植物因子参与^[21-22, 29-32]。PIN蛋白对生长素的运输不同于PGP蛋白, 是生长素特异的, 有一定的运输容量(saturable), 而且对生长素极性运输抑制剂敏感, 是生长素极性运输的限制因素^[29]。Yang和

Murphy^[32]在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中建立了比较植物运输蛋白的实验系统,他们在裂殖酵母类生长素外输载体*aell1*突变体中表达拟南芥*PIN1*、*PIN2*和*PIN7*基因,筛选了三个基因表达一致的株系进行比较,结果表明三者都能运输生长素,*PIN1*和*PIN7*的运输活性高于*PIN2*。

2 PIN家族成员的表达模式、蛋白亚细胞定位及其在植物发育中的功能

拟南芥基因组中有8个PIN编码基因, PIN蛋白在细胞水平上的生物学功能相同,即将生长素从胞内输出胞外或输入某种细胞器内。*PIN*基因的表达既具有组织和器官特异性,又有重叠。*PIN*的组织特异性表达决定了其在发育中扮演了特定的角色。下面分别介绍各个*PIN*蛋白编码基因的表达模式、蛋白质的亚细胞定位和在植物发育中的功能。

*PIN1*是PIN家族中研究最多的一个成员, *pin1*突变体的表型是PIN基因家族成员突变体表型最严重的。Northern杂交结果显示, *PIN1*基因在拟南芥的各个器官均有转录^[19]。利用PIN1蛋白的特异抗体进行蛋白质免疫荧光原位杂交(immunolocalization),结果显示在根尖的中柱组织和内皮层细胞能检测到PIN1蛋白的信号, PIN1蛋白定位于这些细胞的底部细胞膜上;另外,在表皮细胞和皮层细胞的底部细胞膜上也有微弱的信号^[27,33-34](图2)。因此,在根中PIN1介导生长素向根尖的运输。在花序茎中, PIN1蛋白定位于木质部薄壁组织细胞的底部细胞膜上^[19]。PIN1蛋白是PIN家族中唯一在茎尖生长点能检测到的,其在茎顶端分生组织中在朝向高浓度生长素的细胞膜上极性定位,增强生长素在集合点的积累,在初期膨胀的原基和其邻近的区域形成一个生长素释放区,诱导出的新原基只能在距已经存在的原基一定距离的地方形成^[35-37]。在胚发育过程中PIN1蛋白的定位存在动态变化,从1细胞期到16细胞期PIN1蛋白定位于胚体内部细胞的所有膜上,没有极性;在32细胞期PIN1在将来发育成维管组织的细胞中呈不对称分布,定位在靠近胚柄一侧的细胞膜上。PIN1蛋白的这种分布与胚中生长素的流向改变相一致^[38]。综上所述, PIN1蛋白在植物发育中具有重要的作用,主要参与胚的发育、叶序和叶脉的形成以及维管组织的分化,并负责生长素在茎尖分生组织的环流和从地上部分到根的运输。



蓝色的为DAPI染的细胞核;红色的为PIN1抗体标记的PIN1蛋白;箭头指示皮层细胞中弱的PIN1信号。e: 表皮细胞; c: 皮层细胞; d: 内皮层细胞; s: 中柱细胞。

Blue signals are DAPI stained nuclei; red are immunofluorescence labelling of PIN1; arrows indicate weak PIN1 signals in cortex cell. e: epidermis; c: cortex; d: endodermis; s: steel.

图2 根尖中PIN1蛋白的定位情况

Fig.2 Localization of PIN1 protein in Arabidopsis root tips

PIN2蛋白的功能主要是参与根的向重力生长, *pin2*突变体只在根中产生明显的表型,其向重力生长缺陷。研究表明: *PIN2*基因特异性在根尖的分生区和伸长区表达,在伸长区的表达较强, PIN2蛋白特异性地定位于表皮细胞的顶部细胞膜、侧根冠细胞的顶侧向细胞膜和皮层细胞的底部细胞膜^[20-23,27,33-34,39](图1)。Chen等^[22]利用Northern杂交实验发现在黄化苗中能在根、下胚轴和子叶中检测到*PIN2*基因的转录,但是,根中的表达要比下胚轴和子叶中的表达高10倍。Guenot等^[37]利用PIN2-GFP融合蛋白检测了PIN2在茎尖的表达,发现在幼叶边缘的一排细胞中能检测到PIN2蛋白,其极性定位于朝向叶尖端的细胞膜上。在水稻中的研究发现,过表达*OsPIN2*基因能促进水稻分蘖,使株高降低和分蘖的角度增大。进一步研究发现,过表达*OsPIN2*基因能增强生长素从茎向根的运输^[40]。

*PIN3*基因主要参与植物的向性生长。利用*PIN3*基因的启动子与*GUS*报告基因融合,获得

*PIN3::GUS*转基因株系, 组织化学染色结果表明 *PIN3* 基因在维管组织表达, 在黄化苗的顶端弯钩处有表达。蛋白质免疫荧光原位杂交结果显示: 在根中, *PIN3* 蛋白在根尖柱状细胞的L2和L3层细胞的膜上均匀分布, 在维管组织细胞的底部细胞膜上和中柱鞘细胞的内侧面细胞膜上极性定位; 在茎中, 在淀粉鞘细胞的内侧面细胞膜上极性定位^[41]。重力改变刺激时, *PIN3* 可以在30分钟内L2和L3层细胞的定位发生改变, 极性定位在近地一侧的细胞膜上, 促进生长素在根两侧的不对称运输, 使根产生向重力弯曲^[41-43]。*PIN3* 也参与植物的荫蔽反应和向光生长。当红光/远红光的比值降低时, *PIN3* 在下胚轴内皮层细胞的定位从原先的底部细胞膜定位改变为在外侧膜上定位, 暗示生长素流向茎的外层细胞, *pin3* 突变体荫蔽反应缺陷^[44]。Ding等^[45]研究发现, 给与植物单侧光照, 使 *PIN3* 在背光侧内皮层细胞的侧向膜定位增强, 造成响应生长素的分子标记 *DR5::GFP* 在背光一侧表达增强。在胚发育过程中, 最早在心型胚时期检测到 *PIN3* 的表达, 其在根冠柱状细胞的前体细胞中有定位^[38]。

PIN4 蛋白定位在根尖静止中心 (quiescent center, QC) 及其周围的干细胞及初始细胞中, 在 QC 和根尖根冠的干细胞中的定位没有极性, 分布在整个膜上; 在内皮层、皮层和维管组织的干细胞及初始细胞中极性定位在底部细胞膜上, 参与生长素向 QC 的运输^[46]。*PIN4* 参与胚根的发育和维持根尖分生组织的发育模式。

PIN5 蛋白不介导细胞间的生长素运输, 其定位在内质网, 负责生长素从胞质到内质网腔中的运输, 参与调控细胞内生长素的动态平衡^[47]。*pin5* 突变体表现出侧根发生有问题、根和下胚轴变短, 但是表型不严重; 过表达 *PIN5* 使转基因植株根和下胚轴生长有缺陷, 子叶伸展也有问题, 叶片细长皱缩、植株矮小、分枝较多, 表型比 *pin5* 突变体严重^[47]。

PIN6 基因的研究较少, Benková等^[48]在对侧根发育过程中生长素浓度梯度建立机制的研究中检测了 *PIN6::GUS* 的表达, 其在侧根发育过程中均有表达, 在侧根发育的 I 时期, 其在四个侧根原基细胞中均有表达, 后期其只在侧根原基的外围细胞有表达。

PIN7 在胚发育早期就有表达, 在胚发育的 1 细胞期至 16 细胞期, *PIN7* 蛋白极性定位在胚柄细胞的顶部细胞膜上; 在 16/32 细胞期, *PIN7* 的极性定位发

生逆转而定位于胚柄细胞的底部细胞膜上。*PIN7* 极性定位的逆转与利用 *DR5::GFP* 检测到胚发育过程中生长素浓度梯度的逆转相一致^[38]。*PIN7* 在根尖柱状细胞中的定位与 *PIN3* 的定位有部分重叠, 参与根的向重力生长^[42]。

最近的研究发现, *PIN8* 基因在花药中特异表达, 参与调控花粉的发育。*PIN8* 蛋白与 *PIN5* 蛋白共定位在内质网上, 二者在调控细胞内生长素的平衡以及配子体和孢子体的发育中具有拮抗作用^[49]。

3 PIN基因家族成员的表达调控

生长素是重要的植物激素, 能调控植物的生长发育及对环境信号的响应。生长素特定的分布模式决定着植物组织器官的发育模式。*PIN* 基因家族在生长素分布模式的建立过程中具有重要的作用, 其表达是受到严格的调控的。*PIN* 基因家族成员的表达受到转录水平和翻译后水平的调控。生长素、乙烯、油菜素内酯、细胞分裂素、赤霉素以及黄酮类物质都影响 *PIN* 基因的转录。Vieten等^[33]的研究发现, 生长素通过 Aux/IAA 信号转导途径组织特异性地正反馈调控 *PIN* 基因的表达, 并且与处理的时间和浓度有关, 但高浓度的生长素会使 *PIN2* 和 *PIN7* 降解。Ruzicka等^[50]的研究发现, 用乙烯合成的前体 ACC 进行处理能增强 *PIN1*、*PIN2* 和 *PIN4* 基因的表达, 但是, 对 *PIN7* 的表达没有影响。细胞分裂素通过抑制 *PIN1*、*PIN2* 和 *PIN3* 的表达, 调节生长素的极性运输进而调节根的分生区的活性^[51]。在以下胚轴为外植体进行器官再生的实验中同样发现细胞分裂素通过调控 *PIN* 基因的转录来影响生长素的分布^[52]。黄酮类物质突变体中 *PIN1* 和 *PIN4* 的转录水平下降, *PIN2* 的转录水平上升^[53]。外源施加油菜素内酯会使 *PIN1* 和 *PIN2* 的转录水平上升, BR 合成突变体中 *PIN1* 和 *PIN2* 的转录水平下降^[54]。其他小分子物质如 NO 会使 *PIN1* 表达减弱, 向根尖运输的生长素减少, 造成根分生组织发育缺陷^[55]。

MOP2 (MODULATOR OF PIN 2) 和 *MOP3* (MODULATOR OF PIN 3) 突变后, *PIN* 基因的转录水平未受影响, 但蛋白质水平明显下降, 表明 MOP 是通过转录后调控维持 *PIN* 蛋白水平的^[56]。

此外, *PIN* 蛋白在顶端细胞膜或者底部细胞膜的定位受丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PINOID (PID) 和蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 的调控,

二者起拮抗作用, PID过表达或PP2A缺失会导致PIN的向顶定位, PID功能缺陷会使PIN在基部定位^[57]。研究发现, PIN1蛋白中央亲水环内保守的丝氨酸位点能被PID磷酸化, 将该位点定点突变为Glu/Asp或者Ala, 模拟磷酸化或去磷酸化能分别使PIN1蛋白定位在顶部细胞膜或者底端细胞膜^[58-59]。有关PIN的转录后调控此处不再赘述, 可以参考 Löffke等^[60]的综述。

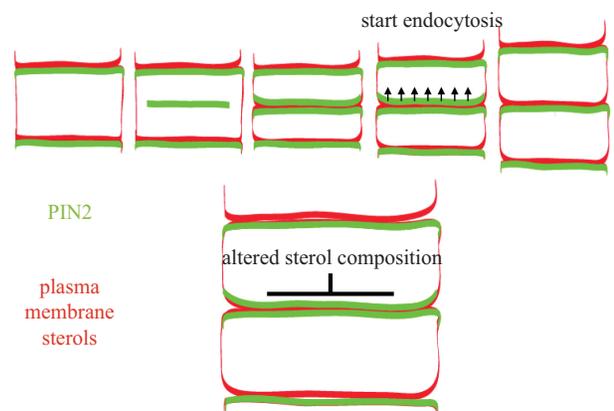
4 PIN蛋白的胞内循环及其调控

从第2部分的讲述可知, PIN蛋白的极性定位不是一成不变的, 而是根据内源发育信号(胚发育、侧根发育等)或外界环境信号(如光照、重力方向等)快速改变。这就需要PIN蛋白有一套快速响应内源或环境信号而改变定位的机制。经过近十几年的研究, 目前已知细胞膜定位的PIN蛋白不是在膜上固定不动的, 而是在不断地通过胞吞作用(endocytosis)进入内吞小泡(endosome), 然后再通过循环小泡(recycling endosome, RE)回到膜上。这种循环运输对PIN蛋白快速改变定位是非常有利的。Geldner等^[61]于2001年首先利用囊泡运输的抑制剂BFA(Brefeldin A)阐明了PIN1具有从细胞膜到胞内、再回到细胞膜上的循环。随后, Geldner等^[62]证明ARF小G蛋白的GDP/GTP交换因子GNOM定位于内吞小泡, 调控PIN1蛋白的囊泡运输。生长素对PIN蛋白的循环运输具有反馈调节作用, 用生长素短时间处理促进PIN蛋白在膜上的定位, 抑制其进入内吞小泡, 长时间处理时则促进PIN蛋白的降解, PIN蛋白的降解是通过蛋白酶体(proteasome)途径进行的^[63-64]。进一步研究发现, 生长素对PIN蛋白进入内吞小泡的抑制作用依赖于其位于细胞核内的受体TIR1介导的信号转导途径^[65-66]。与动物中的胞吞作用类似, PIN蛋白的胞吞作用也依赖于网格蛋白(clathrin), 网格蛋白是内吞小泡的包被蛋白^[67-68]。生长素位于胞外的受体ABP1蛋白促进网格蛋白介导的胞吞作用, 生长素与ABP1结合干扰其对胞吞作用的促进作用从而抑制PIN蛋白进入内吞小泡^[69]。

植物固醇对PIN蛋白的循环运输及极性定位是非常重要的。Willemsen等^[70]发现在固醇合成途径的突变体*smt1^{orc}*中PIN1和PIN3蛋白的定位发生改变, 但是, 未揭示其定位改变的机制。Grebe等^[71]的研究表明用BFA进行处理时, PIN2和植物固醇都被

限制在细胞内的囊泡聚集体(BFA compartment)中, 暗示固醇与PIN2具有相似的胞内运输途径。Men等^[39]研究发现, 在固醇合成途径关键基因*CPII*的突变体*cpi1-1*中PIN2蛋白的极性定位发生改变, 进一步研究发现在细胞分裂过程中PIN2蛋白的极性是在胞质分裂结束后建立的, 在胞质分裂刚结束时PIN2位于两个新生的子细胞膜上, 而后PIN2从上部子细胞的底部细胞膜上消失, 这个过程依赖于胞吞作用, 而*cpi1-1*突变体中胞吞作用受到抑制, 从而影响了PIN2蛋白极性定位的建立(图3)。固醇在生长素对PIN蛋白循环的反馈调控中也起重要作用, 用固醇合成途径的抑制剂处理可以抑制生长素对PIN2蛋白胞吞作用的抑制作用, 而且在生长素信号途径的突变体中固醇的含量明显降低^[66]。

从上面的叙述可知, 胞吞作用在PIN蛋白的极性建立及其从膜上到胞内再到膜上的循环中具有重要作用。利用荧光淬灭后的恢复实验(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)发现, PIN1蛋白极性定位的恢复是分两步完成的, 新合成的PIN1蛋白首先出现在整个细胞膜上, 没有极性, 随后PIN1蛋白从其他的膜上消失, 只定位在底部细胞膜上, 这个过程同样依赖于胞吞作用^[73]。Kleine-Vehn等^[73]利用EosFP荧光蛋白标签(该荧光蛋白在给与紫外激发



在细胞分裂过程中PIN2蛋白定位于细胞板上, 在胞质分裂刚结束时PIN2位于两个新生的子细胞膜上, 其后PIN2从上部子细胞的底部细胞膜上被移除, 这个过程依赖于胞吞作用。红色表示细胞膜, 绿色表示PIN2蛋白。

PIN2 localizes at the forming cell plate during telophase, PIN2 presents at both newly formed plasma membranes derived from the cell plate during late cytokinesis, then PIN2 is removed from the basal membrane, which is endocytosis-dependent. Plasma membrane(red); PIN2(green).

图3 细胞分裂过程中PIN2蛋白极性定位建立机制的示意图

Fig.3 Schematic overview of PIN2 polarity establishment during cell division

光时荧光可从绿色转变为红色)观察到, 用BFA进行处理时PIN2蛋白从底部细胞膜进入BFA小体(BFA compartment), 然后出现在顶部细胞膜上, 表明植物中也存在类似于动物中的蛋白质改变定位的机制(transcytosis)。

其他植物激素如细胞分裂素、茉莉酸甲酯以及赤霉素也参与调控PIN蛋白的胞吞循环过程。例如, 细胞分裂素促进PIN1蛋白从细胞膜到液泡的降解, 这个过程依赖于细胞分裂素的受体CRE1(CYTOKININ RESPONSE 1)^[74]。茉莉酸甲酯影响PIN2蛋白的亚细胞定位, 低浓度的茉莉酸甲酯抑制PIN2的内吞, 其抑制作用依赖于TIR1介导的生长素信号途径和生长素合成途径的*ASA1*基因(ANTHRANILATE SYNTHASE A1); 高浓度茉莉酸甲酯减弱PIN2蛋白的水平, 此过程与TIR1无关^[75]。用GA合成的抑制剂处理, 或者在GA生物合成途径的突变体*gal*中PIN1、PIN2和PIN3蛋白的水平降低。进一步研究发现GA合成缺陷促进PIN2蛋白进入液泡进行降解^[76]。

5 总结和展望

生长素参与植物生长发育的各个过程, 生长素浓度梯度的建立依赖于PIN对生长素的极性运输。PIN蛋白的研究一直是生长素研究领域的热点, 近十几年有了很大的进展。但是还有许多问题悬而未决。PIN蛋白是生长素的运输载体已是没有争议的定论, 但是, 其运输生长素的机制还是一片空白, PIN蛋白结构的解析将为我们提供有力的线索。关于PIN家族中PIN6的定位和功能还没有被阐明。PIN家族转录水平的调控研究相对薄弱, 其转录后水平的调控还有许多问题不清楚。对于PIN极性定位的调控机制也不是十分清楚, 除了GNOM参与PIN的运输, 还有哪些因子参与调控PIN的胞吞循环过程, 这些因子是作用于所有的PIN蛋白, 还有作用于某一个/类PIN蛋白? 从前面的介绍已知, 胞质分裂结束后PIN2蛋白被从上部子细胞的底部细胞膜上移除, 建立起只在顶部细胞膜定位的极性, 该过程依赖于胞吞作用。但是, 哪些信号起始了这一过程, 细胞通过何种机制识别哪个膜上的PIN蛋白需要去除? PIN蛋白响应发育或环境信号而改变其极性定位, 除了生长素的反馈调控, 是否还有其他的细胞因子或信号分子参与调控? 这些问题, 都有待我们的进一步探索。

参考文献 (References)

- 1 Taiz L, Zeiger E. 植物生理学. 第四版. 宋纯鹏, 王学路, 等译. 北京: 科学出版社(Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology. 4th ed. Song Chunpeng, Wang Xuelu, et al. Beijing: Science Press), 2009: 385-6.
- 2 Chapman EJ, Estelle M. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annu Rev Genet 2009; 43: 265-85.
- 3 Jurado S, Abraham Z, Manzano C, López-Torrejón G, Pacios LF, Del Pozo JC, et al. The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. Plant Cell 2010; 12(22): 3891-904.
- 4 Sauer M, Kleine-Vehn J. AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. Plant Cell 2011; 23(6): 2033-43.
- 5 Shi JH, Yang ZB. Is ABP1 an auxin receptor yet? Mol Plant 2011; 4(4): 635-40.
- 6 Scherer GF. AUXIN-BINDING-PROTEIN1, the second auxin receptor: What is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction? J Exp Bot 2011; 62(10): 3339-57.
- 7 Chen X, Naramoto S, Robert S, Tejos R, Löffke C, Lin D, et al. ABP1 and ROP6 GTPase signaling regulate clathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis* roots. Curr Biol 2012; 22(14): 1326-32.
- 8 Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, et al. The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. Plant Cell 2011; 23(11): 3961-73.
- 9 Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, et al. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(45): 18518-23.
- 10 Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, et al. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(45): 18512-7.
- 11 Zhao Y. Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. Mol Plant 2012; 5(2): 334-8.
- 12 Peer WA, Blakeslee JJ, Yang H, Murphy AS. Seven things we think we know about auxin transport. Mol Plant 2011; 4(3): 487-504.
- 13 Wabnik K, Govaerts W, Friml J, Kleine-Vehn J. Feedback models for polarized auxin transport: an emerging trend. Mol Biosyst 2011; 7(8): 2352-9.
- 14 Cho M, Cho HT. The function of ABCB transporters in auxin transport. Plant Signal Behav 2012; 8(2): doi.org/10.4161/psb.22990.
- 15 Goto N, Starke M, Kranz AR. Effect of gibberellins on flower development of the *pin*-formed mutant of *Arabidopsis thaliana*. Arabidopsis Inf Ser 1987; 23: 66-71.
- 16 Goto N, Ketoh N, Kranz AR. Morphogenesis of floral organs in *Arabidopsis*: Predominant carpel formation of the *pin*-formed mutant. Jap J Genet 1991; 66(5): 551-67.
- 17 Okada K, Uede J, Komeki MK, Bell CJ, Shimura Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. Plant Cell 1991; 3(7): 677-84.
- 18 Bennett SRM, Alvarez J, Bossinger G, Smyth DR. Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 1995; 8: 505-20.

- 19 Gälweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, *et al.* Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 1998; 282(5397): 2226-30.
- 20 Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, *et al.* *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* 1998; 17(23): 6903-11.
- 21 Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR. EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 1998; 12(14): 2175-87.
- 22 Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson PH. The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(25): 15112-7.
- 23 Utsuno K, Shikanai T, Yamada Y, Hashimoto T. *AGR*, an agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane-protein family member. *Plant Cell Physiol* 1998; 39(10): 1111-8.
- 24 Barbez E, Kubeš M, Rolčík J, Béziat C, Pěňčík A, Wang B, *et al.* A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* 2012; 485(7396): 119-22.
- 25 Zazimalová E, Krecek P, Skůpa P, Hoyerová K, Petrásek J. Polar transport of the plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(13): 1621-37.
- 26 Petrásek J, Friml J. Auxin transport routes in plant development. *Development* 2009; 136(16): 2675-88.
- 27 Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I, Palme K. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci* 2005; 10(4): 170-7.
- 28 Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, *et al.* The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* 2009; 10(12): 249.
- 29 Petrásek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertová D, *et al.* PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 2006; 312(5775): 914-8.
- 30 Titapiwatanakun B, Murphy A. Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J Exp Bot* 2008; 60(4): 1093-107.
- 31 Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, *et al.* Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; 19(1): 131-47.
- 32 Yang H, Murphy AS. Functional expression and characterization of *Arabidopsis* ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant J* 2009; 59(1): 179-91.
- 33 Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, *et al.* Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 2005; 132(20): 4521-31.
- 34 Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, *et al.* The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 2005; 433(7021): 39-44.
- 35 Bayer EM, Smith RS, Mandel T, Nakayama N, Sauer M, Prusinkiewicz P, *et al.* Integration of transport-based models for phyllotaxis and midvein formation. *Genes Dev* 2009; 23(3): 373-84.
- 36 Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, *et al.* Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 2003; 426(6964): 255-60.
- 37 Guenot B, Bayer E, Kierzkowski D, Smith RS, Mandel T, Zádňíková P, *et al.* PIN1-independent leaf initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2012; 159(4): 1501-10.
- 38 Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, *et al.* Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 2003; 426(6963): 147-53.
- 39 Men S, Boutte Y, Ikeda Y, Li X, Palme K, Stierhof YD, *et al.* Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol* 2008; 10(2): 237-44.
- 40 Chen Y, Fan X, Song W, Zhang Y, Xu G. Over-expression of *OsPIN2* leads to increased tiller numbers, angle and shorter plant height through suppression of *OsLAZY1*. *Plant Biotechnol J* 2012; 10(2): 139-49.
- 41 Friml J, Wiśniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 2002; 415(6873): 806-9.
- 42 Kleine-Vehn J, Ding ZJ, Jones AR, Tasaka M, Morita MT, Friml J. Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(51): 22344-9.
- 43 Harrison BR, Masson PH. ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant J* 2008; 53(2): 380-92.
- 44 Keuskamp DH, Pollmann S, Voesenek LACJ, Peeters AJM, Pierik R. Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(52): 22740-4.
- 45 Ding Z, Galván-Ampudia CS, Demarsy E, Langowski Ł, Kleine-Vehn J, Fan Y, *et al.* Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* 2011; 13(4): 447-52.
- 46 Friml J, Benková E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, *et al.* *AtPIN4* mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 2002; 108(5): 661-73.
- 47 Mravec J, Skupa P, Bailly A, Hoyerova K, Krecek P, Bielach A, *et al.* Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* 2009; 459(25): 1136-40.
- 48 Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, *et al.* Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 2003; 115(5): 591-602.
- 49 Ding Z, Wang B, Moreno I, Simon S, Carraro N, Reemmer J, *et al.* ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nature Commun* 2012; 3: 941.
- 50 Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorska R, Beeckman T, Friml J, *et al.* Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 2007; 19(7): 2197-212.
- 51 Ruzicka K, Simaskova M, Duclercq J, Petrasek J, Zazimalova

- E, Simon S, *et al.* Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(11): 4284-9.
- 52 Pernisová M, Klíma P, Horák J, Válková M, Malbeck J, Soucek P, *et al.* Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(9): 3609-14.
- 53 Peer WA, Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Makam SN, Chen RJ, Masson RH, *et al.* Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2004; 16(7): 1898-911.
- 54 Li L, Xu J, Xu ZH, Xue HW. Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; 17(10): 2738-53.
- 55 Fernandez-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 48(45): 18506-11.
- 56 Malenica N, Abas L, Benjamins R, Kitakura S, Sigmund HF, Jun KJ, *et al.* *MODULATOR OF PIN* genes control steady-state levels of Arabidopsis PIN proteins. *Plant J* 2007; 51(4): 537-50.
- 57 Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, *et al.* Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 2007; 130(6): 1044-56.
- 58 Huang F, Kemel ZM, Abas L, van Marion A, Galván-Ampudia CS, Offringa R. Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell* 2010; 22(4): 1129-42.
- 59 Zhang J, Nodzynski T, Pencík A, Rolcík J, Friml J. PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(2): 918-22.
- 60 Löffke C, Luschnig C, Kleine-Vehn J. Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. *Mech Dev* 2013; 130(1): 82-94.
- 61 Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jürgens G, Palme K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 2001; 413(6854): 425-8.
- 62 Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, *et al.* The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 2003; 112(2): 219-30.
- 63 Paciorek T, Zazimalová E, Ruthardt N, Petrásek J, Stierhof YD, Kleine-Vehn J, *et al.* Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 2005; 435(7046): 1251-6.
- 64 Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wiśniewska J, Moulinier-Anzola JC, *et al.* Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* 2006; 8(3): 249-56.
- 65 Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wisniewska J, Reinöhl V, Friml J, *et al.* Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev* 2006; 20(20): 2902-11.
- 66 Pan J, Fujioka S, Peng J, Chen J, Li G, Chen R. The E3 ubiquitin ligase SCFTIR1/AFB and membrane sterols play key roles in auxin regulation of endocytosis, recycling, and plasma membrane accumulation of the auxin efflux transporter PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2009; 21(2): 568-80.
- 67 Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof Y-D, *et al.* Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2007; 17(6): 520-7.
- 68 Kitakura S, Vanneste S, Robert S, Löffke C, Teichmann T, Tanaka H, *et al.* Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* 2011; 23(5): 1920-31.
- 69 Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, *et al.* ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 2010; 143(1): 111-21.
- 70 Willemsen V, Friml J, Grebe M, van den Toorn A, Palme K, Scheres B. Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell* 2003; 15(3): 612-25.
- 71 Grebe M, Xu J, Möbius W, Ueda T, Nakano A, Geuze HJ, *et al.* *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* 2003; 13(16): 1378-87.
- 72 Dhonukshe P, Tanaka H, Goh T, Ebine K, Mahonen AP, Prasad K, *et al.* Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 2008; 456(7224): 962-6.
- 73 Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Sauer M, Brewer PB, Wiśniewska J, Paciorek T, *et al.* ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2008; 18(7): 526-31.
- 74 Marhavý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, *et al.* Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev Cell* 2011; 21(4): 796-804.
- 75 Sun J, Chen Q, Qi L, Jiang H, Li S, Xu Y, *et al.* Jasmonate modulates endocytosis and plasma membrane accumulation of the *Arabidopsis* PIN2 protein. *New Phytol* 2011; 191(2): 360-75.
- 76 Willige BC, Isono E, Richter R, Zourelidou M, Schwechheimer C. Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2011; 23(6): 2184-95.