



Ściany komórkowe jako źródło sygnałów regulujących procesy rozwojowe komórek roślin

Ewelina Rodakowska¹, Anna Kasprowicz¹, Agnieszka Łapa²,
Magdalena Łuczak^{1,2}, Marta Derba¹, Przemysław Wojtaszek^{1,2}

¹ Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

² Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Cell walls as a source of signals regulating fate and development of plant cells

Summary

Cell walls are the outermost functional zone of plant cells. Although they surround individual cells, at the same time they form a part of supracellular structure – the apoplast. On the other hand, they are also an indispensable component of the structural and functional continuum formed between cell wall, plasma membrane, and cytoskeleton (WMC continuum), and spanning the whole cell. Thus, cell walls are crucial for the communication of cells with their surrounding.

This paper constitutes a short review of the importance of plant cell walls as a source of signalling molecules. Particular attention is paid to: 1) cell walls as a kind of mechanical system characteristic to plants; 2) generation and transport of extracellular signalling molecules, such as signalling peptides and oligosaccharins; 3) apoplastic source of reactive oxygen species and nitric oxide. The review is supplemented with the description of selected results coming from our research group.

Key words:

cell wall, cytoskeleton (interactions with cell walls), mechanical stimuli, nitric oxide, oligosaccharins, reactive oxygen species, signalling peptides.

Adres do korespondencji

Przemysław Wojtaszek,
Zakład Biologii
Molekularnej
i Komórkowej,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań;
e-mail:
przemow@ibch.poznan.pl

1. Wstęp

Komunikacja między komórkami jest jednym z najważniejszych czynników zapewniających wzrost i rozwój organizmu oraz jego przetrwanie w środowisku. Aby komórka mogła zareagować na bodziec, musi on do niej dotrzeć i zostać rozpoznany. Ta informacja zostaje następnie przekazana do wnętrza komórki, która uruchamia odpowiednie mechanizmy wykonawcze. Klasyczne modele szlaków sygnalizacyjnych oparte są na wynikach badań komórek zwierzęcych. Zgodnie z nimi, początek szlaku wyznaczony jest najczęściej przez powstanie błonowego kompleksu receptor-ligand, a jego końcem jest aktywacja właściwych czynników transkrypcyjnych kontrolujących ekspresję genów. Organizacja komórek zwierząt i roślin jest jednak nieco odmienna, a to przekłada się na inny sposób funkcjonowania obu grup organizmów, w tym na komunikację międzykomórkową.

Ściany komórkowe stanowią najbardziej zewnętrzną, integralną część komórki roślinnej, niezbędną do jej prawidłowego funkcjonowania (1). Z racji swojego umiejscowienia, ściany są strukturą dość szczególną. Z jednej strony, są one trwale wbudowane w swoiste kontinuum ściana komórkowa-błona komórkowa-cytoskielet (WMC, ang. *cell wall-plasma membrane-cytoskeleton*), przenikające każdą komórkę rośliny. Z drugiej strony, ściany stanowią część apoplastu, otaczającego i przenikającego całą roślinę. Z tego względu, ściany są łącznikiem pomiędzy światem komórek a światem układów ponadkomórkowych. Od pewnego czasu wiadomo, że protoplasty komórek roślinnych są połączone plazmodesmami, które stanowią szlak przekazywania nie tylko substancji drobnocząsteczkowych, ale również białek i kwasów nukleinowych. Regulacja stopnia otwarcia plazmodesm umożliwia wyodrębnianie wielokomórkowych domen symplastowych o swoistym programie rozwojowym (2). Coraz lepiej badacze zdają sobie jednak sprawę, że same ściany komórkowe mogą odgrywać ważną rolę w komunikacji międzykomórkowej, nie tylko jako szlak transportu cząsteczek sygnałowych, czy jako obszar komórki, w którym działają domeny receptorowe białek błonowych, lecz również jako źródło sygnałów, które wpływają na funkcjonowanie otoczonych ścianami protoplastów (3).

2. Budowa i funkcje ścian komórkowych

Obecność ścian komórkowych lub innych form wzmocnienia czy ochrony zewnętrznych warstw komórki jest prawdopodobnie jedną z najstarszych zdobyczy ewolucyjnych żywych komórek. Powstały one niezależnie u różnych grup organizmów (4). Ściany komórkowe roślin, w odróżnieniu od matryks zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) zwierząt, zbudowane są w ok. 90% z polisacharydów, a białka stanowią jedynie 2-10% suchej masy ścian. Na podstawie istniejących modeli sugeruje się, że ściany są kompleksem wzajemnie przenikających się sieci, połączonych mnogością wiązań kowalencyjnych, wodorowych, jonowych i hydrofo-

bowych (5). Główny element strukturalny stanowi sieć celulozowo-hemicelulozowa, zanurzona w amorficznej matriks, którą tworzy sieć pektynowa, wzbogacona w białka i związki fenolowe. Te ostatnie, w stanie spolimeryzowanym jako ligniny, budują ważną sieć strukturalną ścian komórkowych wtórnych. Dla dalszych rozważań istotne jest wspomnienie dwóch dalszych cech budowy ścian. Powiązania między polimerami ścian są dość precyzyjnie kontrolowane. To sprawia, że ściany stanowią swoiste sito molekularne o określonej wielkości „oczek”. Co więcej, w uwodnionym żelu pektynowym dominują reszty kwasów uronowych, dzięki czemu ściany naładowane są zwykle ujemnie. Te właściwości sprawiają, że apoplastem może swobodnie przemieszczać się dość ograniczone spektrum cząsteczek, zarówno pod względem wielkości, jak i ich wypadkowego ładunku elektrycznego.

Współczesny ogląd ścian odbiega niezwykle mocno od obrazu martwej „skrzynki” otaczającej żywy protoplast. Ściany to raczej niezwykle aktywne organelle, współpracujące z innymi przedziałami komórki i zmieniające się dynamicznie przez całe życie komórki i rośliny. Przypisuje się im wiele ważnych funkcji (6). Najlepiej rozpoznaną jest rola podstawowego elementu szkieletowego, która ściśle wiąże się z udziałem ścian w kontroli kształtu i wzrostu komórek, a dalej całych roślin. Ściany, jako składnik apoplastu, biorą udział w transporcie substancji; tą drogą wędruje przynajmniej pewna część fitohormonów. Dzięki przenikającym je plazmodesmom, ściany uczestniczą też w komunikacji międzykomórkowej. Ponieważ ściany są wyeksponowane na zewnątrz, stanowią pierwszą strefę kontaktu komórek z otoczeniem, w tym ze środowiskiem zewnętrznym. To one stanowią element stref przejściowych w układach symbiotycznych – z grzybami mikoryzowymi czy bakteriami wiążącymi azot. W kontaktach z mikroorganizmami patogennymi ściany są miejscem powstawania elicytorów – cząsteczek, które aktywują skoordynowany zespół reakcji obronnych, takich jak wybuch oksydacyjny, depozycja kalozy, lignin, czy białek strukturalnych. Wreszcie, jak to zostanie przedstawione, ściany stanowią źródło sygnałów regulujących procesy rozwojowe komórek roślin.

3. Ściany komórkowe jako układ mechaniczny

Aby dobrze funkcjonować w swoim środowisku, organizmy lądowe musiały rozwiązać dwa podstawowe problemy: 1) utrzymać właściwe środowisko wodne (osmotyczne), oraz 2) pokonać lub przynajmniej zrównoważyć działanie siły grawitacji. Różne grupy organizmów poradziły z tym sobie w różny sposób. Zwierzęta wykształciły bardzo efektywne systemy przenoszenia w poprzek błony komórkowej jonów osmotycznie czynnych, takich jak Na^+ i K^+ . To umożliwiło utrzymanie zmienności kształtów komórek oraz ich zdolności do migracji. Ponieważ jednak takie „nagie” komórki są dość wrażliwe na uszkodzenie i podatne na siły grawitacji, rozwój lądowych organizmów wielokomórkowych wymagał również wykształcenia wyspecjalizowanego systemu szkieletu zewnętrznego lub wewnętrznego (7). U roślin

ewolucja przebiegała inną drogą. Otoczone błoną protoplasty zostały zamknięte we wnętrzu otoczki utworzonej przez ściany komórkowe, przeciwdziałającej ciśnieniu turgorowemu powstającemu w wyniku napływu wody do wnętrza komórki. Komórka staje się w ten sposób stabilnym mechanicznie układem tensegralnym (8), w swej postaci nieco podobnym do balonu lub dętki rowerowej. Siły generowane w takim układzie są na tyle duże, że możliwe staje się pokonanie siły grawitacji i wzrost roślin, przy równoczesnym utrzymaniu zaopatrzenia w wodę (9).

Konsekwencje zamknięcia protoplastów w ścianach komórkowych są jednak bardziej dalekosiężne. Usunięcie ścian komórkowych powoduje, że protoplasty nieodmiennie przybierają kształt sferyczny, co wskazuje na podstawowe znaczenie ścian w determinacji kształtu i stopnia wzrostu anizotropowego komórek (10). Ściany komórkowe działają zatem jak gorset, ściskając protoplast i nadając mu określony kształt. Jednocześnie ciśnienie turgorowe protoplastu powoduje, że ściany komórkowe znajdują się w stanie stałego naprężenia. To oraz fakt, że komórki są ściśle połączone ze sobą ścianami komórkowymi, sprawiają, że zdecydowana większość komórek roślinnych nie ma możliwości migracji. U roślin wyróżnia się zwykle około 40 różnych typów komórek, a każdy z nich cechują takie właściwości, jak rozmiar, kształt, położenie w obrębie rośliny, a także swoiste skład i konstrukcja ściany komórkowej. Tak zatem, połączenie protoplastów ścianami sprawia, że komórki odbierają bodźce mechaniczne docierające od komórek bezpośrednio je otaczających, ale również, za pośrednictwem apoplastu, z miejsc bardziej odległych. Morfogenezą, a zatem formowanie kształtu roślin, jest w tym układzie wynikiem zlokalizowanych podziałów komórek i ich selektywnego, nieodwracalnego powiększania się zależnego od właściwości ścian komórkowych (11).

Znaczenie właściwości mechanicznych ścian i przekazywania bodźców fizycznych nie jest jeszcze najlepiej rozpoznane. Problem ten badany jest na kilku poziomach organizacji biologicznej, od pojedynczych komórek poczynając, poprzez nieorganizowane systemy wielokomórkowe (zawiesiny komórkowe i kalus), a na tkankach, organach i całych roślinach kończąc. Wyniki badań układów mniej zorganizowanych wskazują, że do podziału komórki niezbędna jest obecność funkcjonalnej ściany komórkowej (12), zaś skład ścian w istotny sposób wpływa na przyszły los komórek (13). Przykładowo, powstała po zapłodnieniu zygota morskoczynu (*Fucus* sp.) natychmiast otacza się ścianą komórkową. Ściana komórkowa współdziała następnie w procesie determinacji polarnej osi komórki oraz służy jako rezerwuuar informacji morfogenetycznej, przekazywanej aktywnie na powrót do protoplastu regulując jego rozwój (14). Ściany komórkowe są zatem nie tylko źródłem, ale także drogą przekazywania sygnałów mechanicznych do wnętrza i pomiędzy komórkami (15,16).

W układach jednokomórkowych lub w zawiesinach komórek, bodziec mechaniczny nie jest przekazywany na sąsiednie komórki. Tymczasem w układach wielokomórkowych zmiany w mechanice ścian i/lub ciśnieniu turgorowym indywidualnej komórki wpływają na kształt otaczających komórek i, w konsekwencji, na niektóre

procesy rozwojowe. Wspomniano, że zorganizowanie tkanek w roślinach jest m.in. rezultatem skoordynowanego ukierunkowania płaszczyzn podziałów komórkowych. Ta koordynacja zostaje utracona w tkankach rosnących w formie kalusa. Można ją jednak przywrócić poprzez przyłożenie zewnętrznej siły mechanicznej, co pokazuje wyraźnie, że nieuporządkowany wzrost kalusa jest spowodowany utratą przez komórki właściwego środowiska mechanicznego *in planta* (17,18). Jednym z najważniejszych „integratorów” mechanicznych w roślinach są, jak się wydaje, zewnętrzne ściany komórkowe komórek epidermy, które wywieść można ze ścian komórkowych otaczających jednokomórkową zygotę. Ściany te są 5-10 razy grubsze, a zarazem znacznie bardziej wytrzymałe mechanicznie od ścian innych komórek. To sprawia, że komórki leżące w głębi organów osiowych są jak gdyby opasane rurą (10,19). Owo ściśnięcie komórek sprawia, że wyczuwają one swoje bezpośrednie środowisko mechaniczne i dostosowują się do niego. Usunięcie laserem części komórek merystemu korzeniowego *Arabidopsis thaliana* sprawia, że pozostałe zmieniają swe płaszczyzny podziału tak, by zająć wolną przestrzeń. Co więcej, komórki potomne zmieniają swój wcześniejszy kierunek rozwoju i różnicują się zgodnie z nową pozycją w korzeniu (20,21).

Wzrost i nabywanie kształtu przez komórki zależne są od właściwości mechanicznych ścian komórkowych. Przyjmuje się, że siłą napędową wzrostu jest turgor generowany wewnątrz protoplastu, natomiast kierunek wzrostu wyznaczany jest przez lokalizację najsłabszych mechanicznie domen ścian przy współdziałaniu zarówno cytoszkieletu mikrotubulowego, jak i aktynowego (22). Można zatem powiedzieć, że wzrost roślin i osiągnięta przez nie forma są optymalnie dostosowane do warunków środowiska, a to przystosowanie znajduje swe najdobitniejsze odzwierciedlenie w zmienności właściwości biomechanicznych ścian komórkowych (23). Zmiany tych właściwości mogą być osiągnięte poprzez ukierunkowaną depozycję składników wzmacniających ściany lub też na skutek aktywności białek prowadzącej do lokalnego zwiększenia rozciągliwości ściany komórkowej. Najlepiej poznanymi białkami są ekspansyny (przegląd w [24-26]). Są to dość swoiste białka, które, na drodze nieenzymatycznej, zrywają odwracalnie wiązania wodorowe między mikrofibrilami celulozowymi a glikanami, które z nimi oddziałują. W ten sposób ekspansyny zaangażowane są nie tylko we wzrost roślin, ale również w dojrzewanie owoców, tworzenie włosków nasiennych bawełny, czy wreszcie w regulację morfogenezy (24,25). Szczególnie ważna jest ich rola właśnie w ścianach zewnętrznych, gdzie lokalne osłabienie struktury ścian zmienia naprężenia w obrębie pojedynczej komórki lub całego organu, a reakcją komórek jest inicjacja formowania swoistych struktur, jak włosniki korzeniowe (27), czy zawiązki liściowe (28,29).

Rośliny są wyjątkowo wrażliwym detektorem bodźców mechanicznych, gdyż nawet delikatny, krótkotrwały dotyk uruchamia mechanizm transdukcji sygnału (30,31). Co ciekawe, jeden z genów indukowanych dotykiem, *TCH4* koduje endotransglikozylazę ksyloglukanu (XTH) – enzym biorący udział w rearanżacji łańcuchów hemiceluloz w ścianach. Na podstawie analizy mutantów *acaulis A. thaliana* wy-

kazano, że geny z rodziny XTH ulegają swoiście ekspresji w różnych etapach rozwoju organów roślin (32).

Pozostaje jeszcze pytanie, w jaki sposób bodziec mechaniczny jest przekazywany do wnętrza komórki? U ssaków kontakt komórek z ECM wpływa na regulację procesu programowanej śmierci komórek, co pośrednio wiąże się z rozwojem nowotworów (33). Sygnały mechaniczne z lub do ECM są tu przekazywane za pośrednictwem białek transbłonowych i cytoszkieletu. Kontrola mechaniczna komórek zwierząt jest na tyle precyzyjna, że zmiany właściwości mechanicznych ECM mogą być bezpośrednio przełożone na zmiany w organizacji chromatyny (34). Podstawowym elementem połączeń są integryny, które z jednej strony oddziałują z białkami ECM, a z drugiej z białkami wiążącymi się z cytoszkieletem. Mimo że białka cytoszkieletu cechują się wysokim stopniem zachowawczości ewolucyjnej, w genomie *Arabidopsis thaliana* nie zidentyfikowano genów kodujących integryny, czy białka podobne do nich, ani też genów dla większości białek oddziałujących z integrynami (35). Różnice konstrukcyjne pomiędzy bogatą w kolagen ECM a zbudowaną głównie z celulozy ścianą komórkową, jak się wydaje, mogły wpłynąć na rozwój innych typów połączeń w liniach rozwojowych roślin i zwierząt (1). Paradoksalnie też, połączenia typu zwierzęcego, jak się wydaje, są zbyt sztywne, by umożliwić dynamiczną zmienność objętości protoplastów roślin przy równoczesnym utrzymaniu zakotwiczenia cytoszkieletu w ścianach (36-39). U roślin kontinuum WMC jest jednak jak najbardziej funkcjonalne (40) i zawdzięcza to białkom, które wypełniają rolę łączników pomiędzy wnętrzem i zewnętrzną stroną komórki. Choć dowody są na razie jeszcze dość słabe, to uważa się, że rolę tę mogą pełnić kinazy, takie jak WAK (ang. *wall-associated kinase*), czy kinazy z zewnątrzkomórkową domeną receptorową, np. LRK z domeną podobną do lektyn lub LRX z domeną podobną do ekstensyn. Wskazywane są również takie białka, jak forminy, a nawet syntazy celulozy i kalozy. Ponadto, nie wyklucza się uczestnictwa niektórych glikoprotein, zwłaszcza białek arabinogalaktanowych, które znajdują się w komórkach w strefie pomiędzy błoną a ścianą komórkową (przegląd w [37,41]). Wiadomo też, że selektywne trawienie polisacharydów ścian lub zrywanie wiązań kowalencyjnych pomiędzy elementami ściany komórkowej prowadzi do zaburzenia równowagi mechanicznej całej komórki i zmienia architekturę i dynamikę cytoszkieletu. Obserwowane zmiany nie są izotropowe, co sugeruje, że w obrębie ścian komórkowych wyróżnić można domeny charakteryzujące się swoistym składem i organizacją makrocząsteczek (A. Kasprovicz, P. Wojtaszek, dane nie publikowane).

4. Oligosacharyny

Łańcuchy polisacharydowe są połączone w ścianach w różny sposób ze sobą, a częstość i zasięg tych połączeń mają główne znaczenie dla właściwości ścian. Stąd, funkcjonują tu białka enzymatyczne, których zadaniem jest m.in. kontrolowa-

ne cięcie polisacharydów, prowadzące do powstania krótkich fragmentów cukrowych. Oligosacharydami nazywa się takie oligosacharydy, które w niskich stężeniach wpływają na funkcjonowanie komórek na drodze innej niż służąc jako źródło węgla lub azotu (42). Choć wywodzą się one głównie ze ścian komórkowych roślin, to ich źródłem mogą być również ściany grzybów lub bakterii. Do niedawna uważano, że są to cząsteczki sygnałowe charakterystyczne wyłącznie dla roślin. Dziś już jednak wiadomo, że oligosacharyny mogą również występować w organizmach zwierząt.

4.1. Oligosacharyny wywodzące się z ksyloglukanów i pektyn

W trakcie wydłużania komórek największe zmiany wśród polisacharydów obserwuje się we frakcji hemiceluloz, zwłaszcza w ksyloglukanie. Ulega on przebudowie katalizowanej przez endotransglikozylazę ksyloglukanu, a także kontrolowanej degradacji przez endo- β (1 \rightarrow 4)-glukanazę. W wyniku jej aktywności powstają oligomery o różnej długości i składzie, a zatem i zróżnicowanej aktywności biologicznej. Najczęściej, oligosacharyny te działają antagonistycznie do auksyn, np. fragment określany jako XG9 w stężeniu 1nM hamuje indukowany auksyną wzrost eksplantatów grochu (43,44). Sądzi się, że fragmenty ksyloglukanu operują w obrębie swojej pętli sprzężenia zwrotnego, kontrolując wraz z auksynami tempo wzrostu organów osiowych roślin.

Pektyny również mogą być źródłem krótkich oligosacharydów, określanych mianem oligogalakturonidów (OGA, ang. *oligogalacturonides*), których długość waha się najczęściej pomiędzy 2 a 20 jednostkami kwasu galakturonowego. W zależności od długości pełnią one zróżnicowane funkcje. Niektóre, uwolnione przez endopoligalakturonazy, działają jak elicytory, uruchamiając reakcje obronne roślin na infekcję patogenną, zwłaszcza grzybową. Inne spełniają rolę sygnałów w morfogenezie i rozwoju roślin. Najlepiej scharakteryzowane OGA o takiej aktywności mają długość od 10 do 17 jednostek. Podobnie jak fragmenty ksyloglukanu, również OGA są zwykle antagonistami auksyn. W kulturach *in vitro*, OGA w stężeniach nanomolarnych hamują indukowaną auksyną elongację eksplantatów z pędu grochu, czy ukorzenianie eksplantatów liściowych, oraz zależną od auksyn embriogenezę somatyczną marchwi. OGA regulują również morfogenezę eksplantatów w postaci cienkiej warstwy komórek liścia tytoniu, indukując powstawanie kwiatów lub hamując tworzenie korzeni, w zależności od ich długości (przegląd w [45]). Wciąż jednak pozostaje niejasne, czy OGA są funkcjonalnymi cząsteczkami sygnałowymi *in planta*? Dodanie OGA do pożywek, w których hodowano całe siewki ogórka powodowało szybką alkalizację podłoża hodowlanego, a nie zmiany morfogenetyczne. Stwierdzono natomiast, że zahamowany auksyną wzrost korzenia może być szybciej przywrócony, jeśli do podłoża dodano OGA (46).

4.2. Oligomery zawierające N-acetyloglukozaminę

Chityna – polimer N-acetyloglukozaminy – jest drugim najobficiej występującym polisacharydem na Ziemi. W roślinach wyższych nie stwierdzono nigdy obecności chityny, czy chitozanu. Stąd dziwić mogą wyniki badań ostatnich lat, na podstawie których wskazuje się, że fragmenty zawierające N-acetyloglukozaminę mają duże znaczenie w sygnalizacji międzykomórkowej u roślin. Grupa tych cząsteczek jest niezwykle zróżnicowana, zarówno pod względem budowy chemicznej, jak i ich pochodzenia. Znaleźć wśród nich można fragmenty chityny – chitoooligosacharydy, jak i wolne N-glikany, uwolnione najprawdopodobniej z glikoprotein. To zróżnicowanie strukturalne znajduje swoje odbicie funkcjonalne. Chitoooligosacharyny spełniają funkcje sygnałowe zarówno w reakcji roślin na atak patogena, jak i w procesach wzrostu i rozwoju (47).

Jednymi z lepiej poznanych cząsteczek tego typu są lipochitooligosacharydy, znane bardziej jako czynniki Nod. Są to oligosacharyny lipochitynowe syntezowane i wydzielane przez bakterie z grupy rizobiów, które, po wnikięciu do komórek korzeni roślin motylkowych, pełnią rolę sygnałów – mitogenów, indukujących u roślin podziały komórkowe prowadzące do wykształcenia brodawki korzeniowej (przeгляд w [48]). Ich szkielet stanowi kilka cząsteczek GlcNAc, do których przyłączone są różne podstawniki boczne. Te ostatnie decydują o swoistości rozpoznania gospodarz-symbiont, a także o czasie życia czynników Nod. Stężenie czynników Nod na powierzchni i we wnętrzu korzeni zależne jest od aktywności roślinnych hydrolaz (np. 49,50). Takimi enzymami są chitynazy (EC 3.2.1.14), które katalizują rozrywanie wiązań β -1,4-glikozydowych w polimerach GlcNAc, w tym czynników Nod (51,52). Chitynazy zwykle klasyfikuje się jako białka PR (ang. *pathogenesis-related*), jednak coraz częściej zwraca się również uwagę na ich rolę w procesach wzrostu i rozwoju u roślin (53-55). Ponieważ główny substrat chitynaz – chityna – nie występuje u roślin, dlatego też badacze wciąż poszukują endogennych substratów dla chitynaz. Najbardziej owocne pod tym względem okazały się badania embriogenezy somatycznej marchwi. W linii mutantu *ts11*, charakteryzującego się zatrzymaniem embriogenezy w stadium globularnym, zidentyfikowano swoistą chitynazę zewnątrzkomórkową EP3, której działanie znosiło skutek mutacji (53). Podobny efekt wywierało dodanie do medium hodowlanego czynnika NodRlv-V z *Rhizobium leguminosarum* (56). Zatem w ścianie komórkowej roślin istnieją cząsteczki, których hydroliza z udziałem chitynaz prowadzi do uwolnienia sygnału regulującego embriogenezę. W ostatnich latach wykryto potencjalne endogenne substraty dla chitynaz, którymi okazały się, zawierające GlcNAc, oligosacharydowe łańcuchy boczne białek arabinogalaktanowych (57).

Niewiele wiadomo na temat percepcji chitoooligosacharydów przez komórki roślinne. Stwierdzono, że w błonach komórkowych roślin istnieją białka wiążące chitoooligosacharydy (58). Ponieważ znanych jest coraz więcej chitynaz, które nie mają głównej reszty kwasu glutaminowego w miejscu katalitycznym, wydaje się, że takie

białka mogą uczestniczyć w detekcji takich oligosacharyn. Przykładem niech będzie SrChi24 z *Sesbania rostrata*, która najprawdopodobniej wiąże czynniki Nod (59). U tytoniu zidentyfikowano błonowe białko receptorowe *NtCHRK1* (ang. *chitinase-related receptor-like kinase*), którego domena cytoplazmatyczna jest funkcjonalną kinazą serynowo-treoninową, a domena zewnątrzkomórkowa wykazuje podobieństwo do chitynaz klasy V (60).

5. Peptydy sygnałowe

Peptydy, obok steroidów i innych małych cząsteczek, są najważniejszymi mediatorami komunikacji między komórkami zwierząt. Zwykle mają długość od kilkunastu do 300 aminokwasów. Peptydy mogą dysponować ogromnym zasobem informacji sygnałowej, ze względu na duże zróżnicowanie struktury łańcucha peptydowego i jego ewentualne modyfikacje potranslacyjne, oraz na szeroki wachlarz możliwości regulacji ich syntezy i aktywności (61). Do niedawna wydawało się, że rośliny w ogóle nie korzystają z tej drogi komunikacji międzykomórkowej, co tłumaczono głównie trudnościami w transporcie stosunkowo dużych i obdarzonych ładunkiem cząsteczek. Dziś wiadomo, że sygnalizacja z udziałem peptydów sygnałowych ma miejsce również u roślin. Znanych jest kilka ligandów peptydowych, uczestniczących w sygnalizacji komórkowej w procesach wzrostu i rozwoju roślin i wciąż odkrywane są nowe (przegląd w [62-64]). Co ważne, zdecydowana większość aktywnych peptydów roślinnych powstaje w przedziale zewnątrzkomórkowym. Peptydy nie są jedynym elementem szlaku sygnałowego. Cząsteczki peptydów są polarne i nie przenikają przez błony komórkowe. Muszą zatem być rozpoznane przez receptory w błonie komórkowej. Utworzenie kompleksu ligand-receptor wywołuje właściwą kaskadę sygnałową. Bardzo interesującym obszarem badań jest też poszukiwanie u roślin proteaz aktywujących cząsteczki prekursorowe peptydów.

5.1. Systeminy

Pierwszym peptydem sygnałowym odkrytym u roślin była systemina. Zidentyfikowano ją u pomidora podczas poszukiwania sygnałów regulujących systemiczną odpowiedź roślin na zranienie wywołane żerowaniem larw owadów. Systemina (nazywana również TomSys; ang. *tomato systemin*) okazała się krótkim, 18-aminokwasowym peptydem, bogatym w reszty prolinowe (65), który powstaje poprzez kontrolowaną proteolizę dłuższego 200-aminokwasowego prekursora. Jako jeden z wielu peptydów sygnałowych prosystemina pomidora nie ma sekwencji sygnałowej, umożliwiającej wejście na szlak sekrecyjny (66) i nie jest glikozylowana. Prosysteminę wykryto technikami immunolokalizacji w cytozolu komórek parenchymy wiązek przewodzących (67), natomiast wolną systeminę, uwolnioną z prosysteminy, wykry-

wa się we floemie. Systemina wiązana jest przez receptor SR160 na powierzchni komórek docelowych (68), a skutkiem uruchomienia kaskady sygnałowej we wnętrzu komórki jest przede wszystkim synteza kwasu jasmonowego, który jest najprawdopodobniej sygnałem długodystansowym aktywującym systemiczną odpowiedź na zranienie.

Występowanie systeminy i peptydów do niej podobnych jest dość ograniczone, gdyż wykryto je jedynie u roślin z rodziny *Solanaceae*. Co ciekawe, TomSys jest nieaktywna w tytoniu, nie wykryto tu również ortologów systeminy. Z liści tytoniu wyizolowano za to dwa inne peptydy 18-aminokwasowe uwalniane podczas zranienia (69). Choć nie wykazują one podobieństwa do systeminy, to wykazują podobną do niej aktywność biologiczną: indukują aktywność inhibitorów proteaz i aktywują kinazy MAP. Stąd, te bogate w hydroksyprolinę peptydy nazwano TobHypSys I i II (ang. **tobacco hydroxyproline-rich systemin**). Obie systeminy tytoniu powstają z jednego prekursora o długości 165 aminokwasów, który zawiera N-końcowy peptyd sygnałowy wprowadzający na szlak sekrecyjny (69). Z kolei dalsze poszukiwania peptydów u pomidora doprowadziły do identyfikacji trzech, bogatych w hydroksyprolinę, glikopeptydów o długości 20, 18 i 15 aminokwasów. Ze względu na podobieństwo do systemin tytoniu, nazwano je TomHypSys I, II i III. Powstają one poprzez cięcie proteolityczne jednego prekursora o długości 146 aminokwasów (70). W tym przypadku wykazano, że prekursor jest wydzielany do ścian komórkowych, choć nie zidentyfikowano jeszcze proteazy generującej właściwe peptydy (71).

5.2. Fitosulfokiny

Jednym z krytycznych parametrów wzrostu zawiesin komórkowych jest minimalna gęstość komórek, powyżej której możliwa jest proliferacja. Zawiesiny o niskiej gęstości wykazują małą aktywność mitotyczną. Można ją zwiększyć dodając do kultury medium z zawiesiny intensywnie dzielącej się. Żaden hormon roślinny nie jest w stanie zastąpić takiego przesączu, a czynnikami mitogennymi w medium hodowlanym są, jak się okazuje, małe peptydy. Z zawiesiny komórek mezofilu *Asparagus officinalis* wyizolowano dwa peptydy, nazwane fitosulfokinami (PSK- α i PSK- β) ze względu na występowanie w nich sulfonowanej tyrozyny (72). PSK- α i PSK- β są odpowiednio penta- i tetrapeptydami powstającymi ze wspólnego prekursora. Na podstawie analizy genomowej wykazano, że u *Arabidopsis* znajduje się 5 genów kodujących preprofitosulfokiny. Geny te znajdują się również w innych grupach roślin wyższych (przegląd w [64]). Prekursor PSK u ryżu składa się z 89 aminokwasów, przy czym początek sekwencji stanowi odcinany peptyd sygnałowy o długości 22 aminokwasów, natomiast sekwencja dojrzałego PSK umiejscowiona jest na C-końcu prekursora i uwalniana jest na drodze cięcia proteolitycznego (73). Na podstawie analizy profilu ekspresji genów PSK można sądzić, że fitosulfokiny mogą uczestniczyć w regulacji podziałów komórkowych nie tylko kultur komórkowych, ponieważ

ich ekspresję stwierdzono również w siewkach ryżu (73) i rzodkiewnika (74). Udowodniono udział fitosulfokin w embriogenezie somatycznej, odróżnicowaniu komórek zawiesziny komórkowej cynii w człony naczyniowe, a także w tworzeniu korzeni przybyszowych z hipokotyli ogórka (przegląd w [63,64]). W błonach komórkowych ryżu zidentyfikowano receptory dla fitosulfokin, należące do grupy receptorów LRR o aktywności kinazy serynowo-treoninowej (75). W wielu przypadkach działanie fitosulfokin uzależnione jest od auksyn i cytokinin (76). Ta obserwacja stanowi dogodne pole do spekulacji, że być może w szlakach sygnalizacyjnych aktywowanych przez klasyczne hormony roślinne biorą też udział małe hormony peptydowe.

5.3. Clavata 3

Clavata3 (CLV3) jest polipeptydem uczestniczącym w determinacji losu komórek merystemu wierzchołkowego *Arabidopsis thaliana*. Równowaga pomiędzy podziałami komórek w centralnej strefie merystemu a różnicowaniem komórek strefy periferycznej musi być zachowana podczas całego życia rośliny. Analiza mutantów rzodkiewnika z zaburzoną morfologią merystemu wierzchołkowego umożliwiła identyfikację trzech genów CLAVATA (CLV1, CLV2, CLV3), których uszkodzenie powoduje przerost merystemu (77-79). Produkty wszystkich trzech genów funkcjonują w tym samym szlaku sygnałowym mającym za zadanie utrzymanie stałej wielkości populacji komórek merystemu. Każdy ze składników szlaku CLV jest członkiem dużej rodziny genowej u *A. thaliana*. Istnieje 25 genów kodujących białka podobne do CLV3 (białka CLE) (80). CLV3 koduje polipeptyd o długości 96 aminokwasów (81) z 18-aminokwasowym peptydem sygnałowym na N-końcu. Funkcjonalny polipeptyd ma długość 78 aminokwasów. W wyniku analizy sekwencji potencjalnych prekursorów CLV3 wykazano, że kilkunastoaminokwasowy rejon na C-końcu łańcucha jest wysoce konserwatywny zarówno u rzodkiewnika jak i u kukurydzy (80,82). Najnowsze dane pozwalają sądzić, że proteoliza CLV3 może prowadzić do powstania aktywnego peptydu na C-końcu, ponieważ okazuje się, że sama C-końcowa domena CLV3 jest w stanie pełnić funkcję CLV3 *in vivo* (83). Gen CLV1 koduje receptor LRR o aktywności kinazy (84). Białko CLV2 jest podobne do CLV1, lecz nie zawiera domeny kinazowej. Clavata3 stanowi ligand dla receptora CLV1, po jego związaniu dochodzi do aktywacji kompleksu CLV1/CLV2 i dalej do aktywacji kaskady sygnałowej prowadzącej do zahamowania podziałów komórkowych (85,86). Wytwarzany w warstwach L1 i L2 CLV3 wydzielany jest do matriks zewnątrzkomórkowej i wiązany przez receptor w warstwie L3, stanowi zatem sygnał zewnątrzkomórkowy o niewielkim zasięgu.

5.4. Peptydy SCR

U wielu roślin funkcjonuje mechanizm samoniezgodności zabezpieczający przed samozapyleniem i krzyżowaniem wsobnym. Najlepiej jest on poznany u roślin z rodziny Brassicaceae, gdzie kontrolowany jest przez pojedynczy locus S (ang. *sterility*) (przegląd w [87]). Żeńską determinantą samoniezgodności są dwa białka zlokalizowane w epidermie znamienia: SRK (ang. *S-locus receptor-like kinase*) oraz SLG (ang. *S-locus glycoprotein*). SLG jest białkiem ścian komórkowych (88), natomiast SRK jest kinazą serynowo-treoninową zawierającą domenę zewnątrzkomórkową podobną do SLG (89). Męską determinantę samoniezgodności stanowią małe polipeptydy o długości od 74 do 83 aminokwasów łącznie z peptydem sygnałnym. Dojrzałe peptydy mają 8 konserwatywnych reszt cysteinowych tworzących mostki disiarczkowe, stąd peptydy te nazywane są SCR (ang. *S-locus cysteine-rich proteins*) (90). SCR są wytwarzane przez mikrospory i komórki tapetum (91), skąd trafiają do otoczki egzynowej pyłku. Podczas zapylenia SCR przemieszcza się do ścian komórkowych komórek epidermy znamienia, gdzie zostaje związane przez receptor (92). Utworzenie pary ligand-receptor uruchamia kaskadę prowadzącą do samoniezgodności. Procesy zachodzące po rozpoznaniu i odrzuceniu zgodnego pyłku nadal pozostają niejasne.

5.5. Inne potencjalne peptydy sygnałowe u roślin

Z różnych badań wiadomo, że istnieje jeszcze co najmniej kilka mało poznanych peptydów zewnątrzkomórkowych, dla których postuluje się funkcję sygnałową w procesach wzrostu, różnicowania i rozwoju roślin. Jednym z nich jest RALF (ang. *rapid alkalization factor*), który swą nazwę zawdzięcza temu, że dodany do zawiesiny komórkowej tytoniu powoduje gwałtowną alkalizację medium hodowlanego (93). RALF, podobnie jak systeminy, indukuje kinazy MAP, ale nie uruchamia ekspresji inhibitorów proteaz i nie uczestniczy w odpowiedzi na zranienie. Dojrzały polipeptyd liczy 49 aminokwasów i powstaje poprzez proteolizę 115-aminokwasowego prekursora obdarzonego N-końcowym peptydem sygnałnym. Występowanie homologów RALF stwierdzono u wielu gatunków roślin w różnych tkankach i organach, jednak ich rola nie została dotąd wyjaśniona. U *A. thaliana* zidentyfikowano gen, którego uszkodzenie wywołuje zaburzenia abscysji organów kwiatowych już po zapłodnieniu. Mutanty *ida* (ang. *inflorescence deficient in abscission*) utrzymują okwiat nawet po wysypaniu dojrzałych nasion. Zidentyfikowany gen koduje 77-aminokwasowe białko z peptydem sygnałnym na N-końcu, które najprawdopodobniej należy do nowej grupy ligandów peptydowych. Homologi genu *IDA* stwierdzono zarówno w genomie rzodkiewnika, jak i roślin innych gatunków (94). Kolejnym przykładem może być białko POLARIS (36 aminokwasów), które jest wytwarzane w siewkach i wierzchołku wzrostu korzenia *A. thaliana* i jest niezbędne do prawidłowej regulacji wzrostu korzenia poprzez etylen i cytokininy (95).

O występowaniu niektórych zewnątrzkomórkowych hormonów peptydowych można wnioskować jedynie pośrednio. Najlepszym tego przykładem jest układ kontrolujący rozmieszczenie aparatów szparkowych na powierzchni blaszki liściowej. Z trzech elementów układu znane są potencjalne receptory sygnału zewnątrzkomórkowego oraz proteaza serynowa typu subtilizyny, która ten sygnał generuje. Obecne poszukiwania koncentrują się na wykryciu białka ścian, które jest substratem subtyliazy (przegląd w [96]).

6. Tlenek azotu i reaktywne formy tlenu

Wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) jest nieuniknioną konsekwencją funkcjonowania organizmów żywych w określonych warunkach fizykochemicznych otaczającego je środowiska (97,98). Pod względem metabolizmu RFT i RFA rośliny są jednak dość szczególną grupą organizmów. Z jednej strony, chyba jako jedyne celowo wytwarzają i zużywają duże ilości RFT w normalnych procesach rozwojowych (99). Z drugiej zaś, rośliny, jako organizmy osiadłe, żyją w „otwartym systemie azotowym” i wykorzystują co najmniej kilka różnych, znacząco innych niż u zwierząt, dróg wytwarzania NO i kontrolowania jego zawartości (100-103).

Ponieważ RFT czy RFA są związkami bardzo reaktywnymi, zwykle są one uznawane za substancje szkodliwe dla komórek. Dopiero niedawno zauważono, że w organizmach żywych mogą one m.in. wypełniać funkcje sygnałowe w komunikacji międzykomórkowej. W tym względzie szczególną rolę należy przypisać tlenkowi azotu i nadtlenkowi wodoru (H₂O₂) (104,105).

6.1. Biosynteza

Wspomniano, że tlenek azotu u roślin pochodzi z wielu źródeł i może być generowany zarówno na drodze enzymatycznej, jak i nieenzymatycznej. Tu zwrócimy uwagę jedynie na dwa źródła, które dostarczają NO do apoplastu (przegląd w [106]). Jednym z nich jest nieenzymatyczne przekształcenie azotynu do tlenku azotu w ciągu reakcji według schematu:



Reakcja ta, jak się wydaje, występuje swoiście w apoplaście roślin, gdzie panują odpowiednie warunki pH, dostępne są dość duże ilości azotynów docierających ze środowiska, jak również związków redukujących, takich jak kwas askorbinowy (107).

Tlenek azotu może również powstawać z udziałem enzymów występujących we wnętrzu komórek roślinnych. Jako związek drobnocząsteczkowy o charakterze lipofilowym, NO łatwo przenika przez błony, stąd rola enzymów cytoplazmatycznych warta jest rozpatrzenia. Tu wspomnieć należy syntazę tlenku azotu (AtNOS1 u *A. thaliana*),

czy reduktazę azotanową (NR, ang. *nitrate reductase*). NR występuje m.in. w błonie komórkowej komórek ryzodermy, gdzie tworzy kompleks z reduktazą azotynową (NI-NOR, ang. *NO-reductase*) i jako enzym błonowy uwalnia NO do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (108).

H₂O₂ jest najbardziej stabilną spośród powszechnie występujących RFT. W odróżnieniu też od pozostałych nie jest rodnikiem. Ponieważ jest obojętny elektrycznie, z łatwością przenika przez błony komórkowe. Biosynteza H₂O₂ nie będzie tu omawiana, gdyż możliwości jego wytwarzania w warunkach normalnych i w reakcji na stres zostały szczegółowo opisane w wielu pracach przeglądowych (99,104,109, 110).

6.2. Udział H₂O₂ oraz NO w szlakach sygnałowych

Ze względu na swoje właściwości chemiczne, H₂O₂ oraz NO mogą brać udział w komunikacji wewnątrz- i międzykomórkowej przynajmniej na dwa sposoby, które najprawdopodobniej nie są rozdzielne. Jedną z dróg jest aktywacja szlaków sygnałowych przez utworzenie kompleksów receptor-ligand, najczęściej z białkami rezydującymi w błonie komórkowej. Intrygującą jest obserwacja z badań komórek zwierząt, że również formowanie białkowych kompleksów receptor-ligand może prowadzić do wytwarzania RFT, które dalej stymulują szlaki sygnałowe (111). W przypadku obu związków możliwa jest również zmiana funkcjonowania komórki na drodze modyfikacji chemicznej makrocząsteczek biologicznych na drodze innej niż ich zniszczenie. Tu znaczenie ma zdolność obu cząsteczek do przenikania przez błony komórkowe, gdyż oznacza to możliwość modyfikacji celów wewnątrz komórki. Badania procesów sygnałowych są jeszcze dodatkowo utrudnione z tego powodu, że wytworzonym RFT często towarzyszy NO, a siła i skuteczność przekazywanych sygnałów zależne są od stężeń i wzajemnego współdziałania obu typów cząsteczek (104,112). Co więcej, sygnalizacja z udziałem, np. NO, spleta się ściśle w reakcjach obronnych ze szlakami sygnałowymi aktywowanymi innymi cząsteczkami, np. kwasami salicylowym czy jasmonowym (113).

Nadtlenek wodoru jest główną RFT odpowiedzialną za aktywację szlaków sygnalizacyjnych w komórce (104). Właściwie jedynym udokumentowanym przykładem działania innych form tlenu jest wykorzystanie anionorodnika ponadtlenkowego jako sygnału uruchamiającego przejście z fazy wzrostu jednokomórkowego do tworzenia agregatów wielokomórkowych u śluzowca *Dictyostelium discoideum* (114). Nad-tlenek wodoru jest cząsteczką mobilną, a z powodu swojej względnej trwałości może dyfundować na znaczne odległości od miejsca wytworzenia i uruchamiać szlaki sygnałowe w innych komórkach (115,116). Chociaż w reakcjach obronnych często jest generowany $\bullet\text{O}_2^-$, to właśnie H₂O₂, powstający na drodze dysmutacji $\bullet\text{O}_2^-$, jest główną obserwowaną cząsteczką aktywną (99,109). W tym kontekście interesująca jest jednak obserwacja, że u mutantu *rhd2* (ang. *root hair defective 2*) *A. thaliana*,

z uszkodzonym genem gp91^{phox} kodującym podjednostkę katalityczną oksydazy NADPH – enzymu generującego $\bullet\text{O}_2^-$, dochodzi do zaburzenia formowania włóśniaków. Nie rozstrzygając, która z RFT odgrywa główną rolę w procesie wydłużania włóśniaków korzeniowych, sądzi się, że rola regulatorowa RFT w tym procesie polega na zmianie aktywności kanałów jonowych, głównie wapniowych i dalej aktywacji białek zależnych od Ca^{+2} (117).

Jedną z możliwych dróg działania RFT jest modyfikacja makrocząsteczek biologicznych. Nadtlenek wodoru może utleniać i tym samym modulować aktywność innych składników szlaków sygnałowych, takich jak fosfatazy, czy kinazy białkowe, a wśród nich również kinazy MAPK czy CDPK (104). Dalsze reakcje komórek mogą być uruchamiane poprzez np. bezpośrednie działanie czynników transkrypcyjnych (109).

Choć szlak sygnałowy tlenu azotu nie jest jeszcze do końca rozpoznany u roślin, to na podstawie uzyskanych wyników badań sugeruje się, że niektóre istotne jego elementy, znane z komórek zwierząt, również i tu funkcjonują. NO może modyfikować niektóre białka enzymatyczne. Addycja NO do jonów metali przejściowych – częstych kofaktorów białek – prowadzi do gwałtownych zmian aktywności. Na przykład, aktywność cyklazy guanylanowej, wytwarzającej cAMP, wzrasta ponad 300-krotnie po przyłączeniu się NO do jonu żelaza w grupie hemowej. Tak rozpoczyna się jeden z najważniejszych szlaków sygnałowych NO: addycja NO prowadzi do wzrostu stężenia cGMP, a dalej cADPR i aktywacji zależnych od nich kinaz białkowych, fosfodiesteraz, czy kanałów jonowych (118).

Tlenek azotu jest cząsteczką niezwykle reaktywną. Jednak w fizjologicznym stężeniu może być istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie modyfikacji białek uznawanych za modyfikacje sygnałowe. Poza aktywacją cyklazy, najistotniejsze, jak się wydaje, są: S-nitrozylacja reszt cysteiny oraz nitracja reszt tyrozyny (103,119,120). Szczególne znaczenie może mieć modyfikacja białek cytoszkieletu, która może bezpośrednio wpływać na organizację strukturalną komórki (A. Łapa, P. Wojtaszek, dane nie publikowane). Ponieważ S-nitrozylacji ulegać może również glutation, sugeruje się, że niskocząsteczkowe S-nitrozotiole (tu nitrozoglutation) mogą być jednym z sygnałów przenoszących informację o ataku patogena do sąsiednich komórek, a co za tym idzie biorących udział w aktywacji nabytej odporności systemicznej roślin (121).

Często obserwowanym zjawiskiem jest synergizm działania H_2O_2 i NO. Takie krzyżowanie szlaków ma miejsce w trakcie takich procesów fizjologicznych, jak: lignifikacja tkanki naczyniowej (122), odpowiedź grawitropowa korzenia (123), regulacja stopnia otwarcia aparatów szparkowych (104), czy programowana śmierć komórki, zwłaszcza zachodząca w trakcie reakcji obronnych roślin na infekcję patogenną (124).

Wyniki badań własnych uzyskano w ramach projektów badawczych finansowanych przez granty Ministerstwa Edukacji i Nauki: 3 P04C 011 22, PBZ-KBN 089/P06/2003, 2 P04C 040 26, PBZ-KBN-110/P04/2004 i 2 P04C 055 29.

Literatura

1. Wojtaszek P., (2000), *Biol. Rev. (Cambridge)*, 75, 437-475.
2. Lucas W. J., Lee J.-Y., (2004), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 712-726.
3. Fleming A. J., (2005), *Intercellular Communication in Plants*, Ed. Fleming A. J., 85-108, Blackwell Publishing, Oxford.
4. Niklas K. J., (2004), *BioScience*, 54, 831-841.
5. Somerville C., Bauer S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredes A., Persson S., Raab T., Vorwerk S., Youngs H., (2004), *Science*, 306, 2206-2211.
6. Wojtaszek P., (2000), *Post. Biol. Kom.*, 27, 315-324.
7. Peters W. S., Hagemann W., Tomos D. A., (2000), *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 125, 151-167.
8. Ingber D. E., (2003), *J. Cell Sci.*, 116, 1157-1173.
9. Niklas K. J., (1992), *Plant Biomechanics. An Engineering Approach to Plant Form and Function*, University of Chicago Press, Chicago, Londyn.
10. Kutschera U., (2001), *Plant Biol.*, 3, 466-480.
11. Cosgrove D. J., (2005), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 850-861.
12. Meyer Y., Abel W. D., (1975), *Planta*, 123, 33-40.
13. Barthou H., Petitprez M., Briere C., Souvre A., Alibert G., (1999), *Protoplasma*, 206, 143-151.
14. Brownlee C., Bouget F.-Y., (1998), *Semin. Cell Dev. Biol.*, 9, 179-185.
15. Brownlee C., (2002), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 396-401.
16. Pilling E., Hofte H., (2003), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 611-616.
17. Lintilhac P. M., Vesecky T. B., (1984), *Nature*, 307, 363-364.
18. Lynch T. M., Lintilhac P. M., (1997), *Dev. Biol.*, 181, 246-256.
19. Kutschera U., (1995), *J. Plant Physiol.*, 146, 126-132.
20. van den Berg C., Willemsen V., Hage W., Weisbeek P., Scheres B., (1995), *Nature*, 378, 62-65.
21. van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P., Scheres B., (1997), *Nature*, 390, 287-289.
22. Panteris E., Galatis B., (2005), *New Phytol.*, 167, 721-732.
23. Green P. B., (1999), *Am. J. Bot.*, 86, 1059-1076.
24. McQueen-Mason S. J., Rochange F., (1999), *Plant Biol.*, 1, 19-25.
25. Łuczak M., Wojtaszek P., (2002), *Biotechnologia*, 4(59), 176-190.
26. Sampedro J., Cosgrove D. J., (2005), *Genome Biol.*, 6, 242.1-242.11.
27. Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N.-H., Barlow P. W., Volkmann D., (2000), *Dev. Biol.*, 226, 618-632.
28. Fleming A. J., McQueen-Mason S., Mandel T., Kuhlemeier C., (1997), *Science*, 276, 1415-1418.
29. Pien S., Wyrzykowska J., McQueen-Mason S., Smart C., Fleming A., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11812-11817.
30. Braam J., Davies R. W., (1990), *Cell*, 60, 357-364.
31. Braam J., (2005), *New Phytol.*, 165, 373-388.
32. Akamatsu T., Hanzawa Y., Ohtake Y., Takahashi T., Nishitani K., Komeda Y., (1999), *Plant Physiol.*, 121, 715-721.
33. Yamada K. M., Clark K., (2002), *Nature*, 419, 790-791.
34. Maniotis A. J., Valyi-Nagy K., Karavitis J., Moses J., Boddipali V., Wang Y., Nuñez R., Setty S., Arbieva Z., Bissell M. J., Folberg R., (2005), *Am. J. Pathol.*, 166, 1187-1203.
35. Hussey P. J., Allwood E. G., Smertenko A. P., (2002), *Phil. Trans. R. Soc. London B*, 357, 791-798.
36. Pont-Lezica R. F., McNally J. G., Pickard B. G., (1993), *Plant Cell Environ.*, 16, 111-123.
37. Baluška F., Šamaj J., Wojtaszek P., Volkmann D., Menzel D., (2003), *Plant Physiol.*, 133, 482-491.
38. Wojtaszek P., Volkmann D., Baluška F., (2004), *Polarity in Plants*, Ed. Lindsey K., 72-121, Blackwell Publishing Ltd., Sheffield.
39. Wojtaszek P., Anielska-Mazur A., Gabryś H., Baluška F., Volkmann D., (2005), *Funct. Plant Biol.*, 32, 721-736.
40. Wyatt S. E., Carpita N. C., (1993), *Trends Cell Biol.*, 3, 413-417.
41. Kohorn B. D., (2000), *Plant Physiol.*, 124, 31-38.

42. Aldington S., Fry S. C., (1993), *Adv. Bot. Res.*, 19, 1-101.
43. York W. S., Darvill A. G., Albersheim P., (1984), *Plant Physiol.*, 75, 295-297.
44. McDougall G. J., Fry S. C., (1988), *Planta*, 175, 412-416.
45. Creelman R. A., Mullet J. E., (1997), *Plant Cell*, 9, 1211-1223.
46. Spiro M. D., Bowers J. F., Cosgrove D. J., (2002), *Plant Physiol.*, 130, 895-903.
47. Ebel J., (1998), *BioEssays*, 20, 569-576.
48. Geurts R., Bisseling T., (2002), *Plant Cell*, 14, S239-S249.
49. Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaik H. P., van Kammen A., Bisseling T., (1994), *Plant Physiol.*, 105, 787-797.
50. Staehelin C., Schultze M., Kondorosi E., Mellor R. B., Boller T., Kondorosi A., (1994), *Plant J.*, 5, 319-330.
51. Goormachtig S., Lievens S., van de Velde W., van Montagu M., Holsters M., (1998), *Plant Cell*, 10, 905-915.
52. Schultze M., Staehelin C., Brunner F., Genetet I., Legrand M., Fritig B., Kondorosi E., Kondorosi A., (1998), *Plant J.*, 16, 571-580.
53. de Jong A. J., Cordevener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., van Kammen A., de Vries S. C., (1992), *Plant Cell*, 4, 425-433.
54. van Hengel A. J., Guzzo F., van Kammen A. B., de Vries S. C., (1998), *Plant Physiol.*, 117, 43-53.
55. Zhong R., Kays S. J., Schroeder B. P., Ye Z.-H., (2002), *Plant Cell*, 14, 165-169.
56. de Jong A. J., Heidstra R., Spaik H. P., Hartog M. V., Meijer E. A., Hendriks T., Lo Schiavo F., Terzi M., Bisseling T., van Kammen A., de Vries S. C., (1993), *The Plant Cell*, 5, 615-620.
57. van Hengel A. J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., van Kammen A., de Vries S. C., (2001), *Plant Physiol.*, 125, 1880-1890.
58. Baureithel K., Felix G., Boller T., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 17931-17938.
59. Goormachtig S., van de Velde W. V., Lievens S., Verplancke C., Herman S., de Keyser A., Holsters M., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 78-89.
60. Kim Y. S., Lee J. H., Yoon G. M., Cho H. S., Park S.-W., Suh M. C., Choi D., Ha H. J., Liu J. R., Pai H.-S., (2000), *Plant Physiol.*, 123, 905-915.
61. Bisseling T., (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 365-368.
62. Kowalczyk S., Maciejewska B., (2002), *Post. Biol. Kom.*, 29, 181-201.
63. Matsubayashi Y., (2003), *J. Cell Sci.*, 116, 3863-3870.
64. Matsubayashi Y., Sakagami Y., (2006), *Annu Rev Plant Biol.*, 57, 649-674.
65. Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C. A., (1991), *Science*, 253, 895-898.
66. McGurl B., Pearce G., Orozco-Cardenas M., Ryan C. A., (1992), *Science*, 255, 1570-1573.
67. Narvaez-Vasquez J., Ryan C. A., (2004), *Planta*, 218, 360-369.
68. Scheer J. M., Ryan C. A., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9585-9590.
69. Pearce G., Moura D. S., Stratmann J., Ryan C. A., (2001), *Nature*, 411, 817-820.
70. Pearce G., Ryan C. A., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 30044-30050.
71. Narvaez-Vasquez J., Pearce G., Ryan C. A., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 12974-12977.
72. Matsubayashi Y., Sakagami Y., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7623-7627.
73. Yang H., Matsubayashi Y., Nakamura K., Sakagami Y., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13560-13565.
74. Yang H., Matsubayashi Y., Nakamura K., Sakagami Y., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 842-851.
75. Matsubayashi Y., Ogawa M., Morita A., Sakagami Y., (2002), *Science*, 296, 1470-1472.
76. Matsubayashi Y., Morita A., Matsunaga E., Fruya A., Hanai N., Sakagami Y., (1999), *Planta*, 207, 559-565.
77. Clark S. E., Running M. P., Meyerowicz E. M., (1993), *Development*, 119, 397-418.
78. Clark S. E., Running M. P., Meyerowicz E. M., (1995), *Development*, 121, 2057-2067.
79. Kayes J. M., Clark S. E., (1998), *Development*, 125, 3843-3851.
80. Cock J. M., McCormick S., (2001), *Plant Physiol.*, 126, 939-942.
81. Fletcher J. C., Brand U., Running M. P., Simon R., Meyerowitz E. M., (1999), *Science*, 283, 1911-1914.
82. Opsahl-Ferstad H. G., LeDeunff E., Dumas C., Rogowsky P. M., (1997), *Plant J.*, 12, 235-246.
83. Ni J., Clark S. E., (2006), *Plant Physiol.*, 140, 726-733.

84. Clark S. E., Williams R. W., Meyerowicz E. M., (1997), *Cell*, 89, 575-585.
85. Clark S. E., (2001), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 276-284.
86. Trotochaud A. E., Jeong S., Clark S. E., (2000), *Science*, 289, 613-617.
87. Takayama S., Isogai A., (2005), *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 467-489.
88. Kandasamy M. K., Paolillo D. J., Faraday C. D., Nasrallah J. B., Nasrallah M. E., (1989), *Dev. Biol.*, 134, 462-472.
89. Stein J., Howlett B., Boyes D., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8816-8820.
90. Schopfer C. R., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B., (1999), *Science*, 286, 1697-1700.
91. Takayama S., Shiba H., Iwano M., Shimosato H., Che F. S., Kai N., Watanabe M., Suzuki G., Hinata K., Isogai A., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1920-1925.
92. Kachroo A., Schopfer C. R., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B., (2001), *Science*, 293, 1824-1826.
93. Pearce G., Moura D. S., Stratmann J., Ryan C. A., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 12843-12847.
94. Butenko M. A., Patterson S. E., Grini P. E., Stenvik G.-E., Amundsen S. S., Mandal A., Aalen R. B., (2003), *Plant Cell*, 15, 2296-2307.
95. Lindsey K., (2001), *Curr. Biol.*, 11, R741-R743.
96. Ingram G. C., (2005), *Curr. Biol.*, 15, R663-R665.
97. Halliwell B., Gutteridge J. M., (1998), *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford.
98. Bartosz G., (2003), *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
99. Wojtaszek P., (1997), *Biochem. J.*, 322, 681-692.
100. Wojtaszek P., (2000), *Phytochemistry*, 54, 1-4.
101. Wendehenne D., Pugin A., Klessig D., Durner J., (2001), *Trends Plant Sci.*, 6, 177-183.
102. Yamasaki H., (2005), *Plant Cell Environ.*, 28, 78-84.
103. Łapa A., Wojtaszek P., (2005), *Na pograniczu chemii i biologii*, red. Koroniak H., Barciszewski J., XII, 369-392, Wyd. Nauk. UAM, Poznań.
104. Neill S., Desikan R., Hancock J., (2002), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 388-395.
105. Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T., (2002), *J. Exp. Bot.*, 53, 1237-1247.
106. Stohr C., Ullrich W. R., (2002), *J. Exp. Bot.*, 53, 2293-2303.
107. Bethke P. C., Badger M. R., Jones R. L., (2004), *Plant Cell*, 16, 332-341.
108. Crawford N. M., Guo F.-Q., (2005), *Trends Plant Sci.*, 10, 194-200.
109. Bolwell G. P., Wojtaszek P., (1997), *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 51, 347-366.
110. Łuczak M., Derba M., Wojtaszek P., (2003), *Na pograniczu chemii i biologii*, red. Koroniak H., Barciszewski J., VIII, 69-99, Wyd. Nauk. UAM, Poznań.
111. DeYulia G. J., Cárcamo J. M., Bórquez-Ojeda O., Shelton C. C., Golde D. W., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 5044-5049.
112. Neill S. J., Desikan R., Hancock J. T., (2003), *New Phytol.*, 159, 11-35.
113. Wendehenne D., Durner J., Klessig D. F., (2004), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 449-455.
114. Bloomfield G., Pears C., (2003), *J. Cell Sci.*, 116, 3387-3397.
115. Chappell J., Levine A., Tenhaken R., Lusso M., Lamb C., (1997), *Plant Physiol.*, 113, 621-629.
116. Alvarez M. E., Pennell R. I., Meijer P. J., Ishikawa A., Dixon R. A., Lamb C., (1998), *Cell*, 92, 773-784.
117. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H. F., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D. G., Davies J. M., Dolan L., (2003), *Nature*, 422, 442-446.
118. Denninger J. W., Marletta M. A., (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 334-350.
119. Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stamler J. S., (2005), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 150-166.
120. Lindermayr C., Saalbach G., Durner J., (2005), *Plant Physiol.*, 137, 921-930.
121. Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10328-10333.
122. Gabaldon C., Ros L. V. G., Pedreno M. A., Barcelo R. A., (2005), *New Phytol.*, 165, 121-130.
123. Hu X., Neill S. J., Tang Z., Cai W., (2005), *Plant Physiol.*, 137, 663-670.
124. Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13454-13459.