

## TRANSKRYPTOM I PROTEOM PYŁKOWY: ANALIZA MOLEKULARNA I FUNKCJONALNA

### POLLEN TRANSCRIPTOME AND PROTEOME: MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSIS

Katarzyna RAFIŃSKA, Krzysztof ZIENKIEWICZ, Elżbieta BEDNARSKA

Zakład Biologii Komórki UMK w Toruniu

*Streszczenie:* Ziarno pyłku, z uwagi na swoją wyjątkową organizację strukturalną, stanowi niezwykle dogodny model badawczy zarówno w badaniach cytologicznych, molekularnych, jak i genetycznych. Łatwość ich izolacji, a także ekstrakcji pyłkowego DNA, RNA oraz białek spowodowała, iż komórki męskiego gametofitu roślin okrytonasiennych są obecnie jednymi z najintensywniej badanych struktur roślinnych. Niezwykle intensywny w ostatnich latach rozwój narzędzi badawczych służących eksplorowaniu genomu zaowocował licznymi pracami na temat różnorodnych aspektów ekspresji genów podczas mikrosporogenezy oraz mikrogametogenezy u roślin okrytonasiennych. W niniejszej pracy przedstawiono syntezę aktualnie dostępnej wiedzy na temat transkryptomu oraz proteomu pyłkowego podczas różnicowania się męskiego gametofitu, szczególnie u *Arabidopsis thaliana*. Zdecydowana większość prezentowanych doniesień omawia wyniki badań prowadzonych z wykorzystaniem mikromacierzy, które skonstruowano wykorzystując poznaną sekwencję genomu rzodkiewnika pospolitego.

*Słowa kluczowe:* pyłek, transkryptom, proteom, *Arabidopsis*.

*Summary:* Pollen grain, because of its unique structural organization, is extremely useful experimental model, both in cytological, molecular as well as in genetic studies. Easiness of pollen grains isolation, their sorting as well as simple extraction of their DNA, RNA and proteins, caused that male gametophyte cells of angiosperms are presently one of the most intensively studied among different plant cells. A strong and rapid progress in development of experimental tools dedicated for exploration genome caused significant increase in the number of reports concerning on different aspects of gene expression during microsporogenesis and microgametogenesis in angiosperm plants. In the present review we synthesized the actual knowledge of pollen transcriptome and proteome during different stages of male gametophyte development, specially in *Arabidopsis thaliana*. Most of results presented here was obtained basing on experiments carried out using microarrays, which were designed basing on known sequence of *Arabidopsis* genome.

*Key words:* pollen, transcriptome, proteome, *Arabidopsis*.

## WSTĘP

Ziarno pyłku jest męskim gametofitem i stanowi generatywną fazę w cyklu życiowym roślin wyższych. Na jego rozwój składają się dwa procesy: mikrosporo- geneza oraz mikrogametogeneza. Mikrosporo- geneza obejmuje mejozę zachodzącą w komórkach macierzystych mikrospor (mikrosporocytach). W jej wyniku powstaje tetrad haploidalnych mikrospor, które po uwolnieniu z niej powiększają swoją objętość i różnicują się w ziarna pyłku. Mikrogametogeneza rozpoczyna się asymet- rycznym podziałem mikrospory (I podział mitotyczny). Efektem jest wytworzenie dwukomórkowego ziarna pyłku. Komórki pyłkowe różnią się pod względem morfologicznym i fizjologicznym – duża komórka wegetatywna, która zajmuje większość objętości ziarna pyłku, jest przez cały okres jego rozwoju zdecydowanie bardziej aktywna transkrypcyjnie aniżeli mała komórka generatywna [87]. W końcowym etapie rozwoju gametofitu komórka generatywna dzieli się na dwie komórki plemnikowe (II podział mitotyczny). W trójkomórkowych ziarnach pyłku drugi podział mitotyczny ma miejsce podczas rozwoju pyłku w pylniku, natomiast w dwukomórkowych – w okresie wzrostu łagiewki pyłkowej w słupku. Przed uwol- nieniem ziaren pyłku z pylników następuje ich odwodnienie, któremu towarzyszy hamowanie aktywności transkrypcyjnej komórek pyłkowych. Po zapyleniu ziarno pyłku ulega uwodnieniu i kiełkuje w łagiewkę pyłkową. Wyrastająca z apertury łagiewka pyłkowa jest najszybciej rosnącą komórką roślinną i służy do przeniesienia męskich gamet do woreczka zalążkowego.

Ziarno pyłku oraz łagiewka pyłkowa ze względu na łatwość izolacji oraz hodowli *in vitro*, stanowią doskonały model badawczy wielu podstawowych procesów biologicznych, takich jak: polaryzacja komórki, determinacja rozwoju, regulacja cyklu komórkowego, sygnalizacja komórkowa, kierunkowy wzrost oraz regulacja ekspresji genów. Podsta- wowym krokiem w zrozumieniu mechanizmów rządzących tymi procesami jest poznanie transkryptomu oraz proteomu męskiego gametofitu. Względnie prosta izolacja RNA oraz białek z czystej populacji ziaren pyłkowych umożliwia wyczerpującą analizę ekspresji genów właściwie pojedynczej komórki, tj. komórki wegetatywnej.

Rozwój męskiego gametofitu znajduje się pod kontrolą dwu różnych, następujących po sobie programów rozwojowych. W zależności od tego, w którym stadium rozwojowym geny ulegają transkrypcji, podzielono je na dwie klasy: geny wczesne i geny późne. Transkrypty genów wczesnych pojawiają się tuż po mejozie, a ich poziom znacznie spada w dojrzałym ziarnie pyłku. Natomiast transkrypty genów późnych, które są wykrywane dopiero po pierwszym podziale mitotycznym, ulegają akumulacji w czasie dojrzewania ziarna pyłku, aż do jego pełnej dojrzałości. Te transkrypty stanowią pulę tzw. długowiecznego mRNA, która nie ulega translacji aż do momentu kiełkowania łagiewki pyłkowej [9,77]. Pula ta, magazynowana w cytoplazmie głównie komórki wegetatywnej w formie poli(A)RNA [86], jest zdolna do przetrwania odwodnienia i ponownego uwodnienia podczas zapylenia słupka. Stanowi gotową matrycę do syntezy białek podczas kiełkowania łagiewki pyłkowej. Dojrzałe ziarno pyłku wyposażone jest zatem w program genetyczny realizowany podczas zapylenia i wczesnych etapów wzrostu łagiewki [77].

Komórka generatywna oraz komórki plemnikowe charakteryzują się małą objętością cytoplazmy oraz silnie skondensowaną chromatyną w jądrze. Wykazują niski poziom ekspresji, chociaż w dwukomórkowych ziarnach pyłku także w komórce generatywnej mogą być przechowywane transkrypty poli(A)RNA [86]. Komórki plemnikowe syntetyzują przede wszystkim białka wydzielnicze lub błonowe, które jak się przypuszcza są związane z rozpoznaniem na poziomie komórka-komórka podczas zapłodnienia [24].

## TRANSKRYPTOM ZIARNA PYŁKU *ARABIDOPSIS THALIANA*

Dogodnym modelem do badania genetycznych podstaw różnicowania ziarna pyłku oraz kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej jest *Arabidopsis*, roślina produkująca trójkomórkowe ziarna pyłku zbudowane z dużej komórki wegetatywnej i dwu małych komórek plemnikowych. Poznaniu całego genomu tego gatunku towarzyszył rozwój technik genetyki molekularnej. Prowadzone badania umożliwiły zidentyfikowanie genów, które w ziarnie pyłku ulegają ekspresji na wysokim poziomie oraz tych, które są pyłkowo specyficzne, co z kolei pozwoliło na lepsze zrozumienie mechanizmów włączonych w proces rozwoju męskiego gametofitu u roślin okrytonasiennych.

Wielkoskalową analizę transkryptomu ziarna pyłku *A. thaliana* przeprowadzono za pomocą dwóch metod: SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) i mikromacierzy. Początkowo ta pierwsza miała przewagę, ponieważ do jej zastosowania niepotrzebna była znajomość sekwencji genomowej danego organizmu. Metoda ta pozwala wykryć ekspresję genu, który nie jest poznany. Za jej pomocą w ziarnie pyłkowym wykazano ekspresję 4211 genów i porównano je z genami ulegającymi ekspresji w tkankach somatycznych [45]. Okazało się, że ponad 40% ujawnionych transkryptów koduje geny zaangażowane w biosyntezę ściany komórkowej. Niski poziom ekspresji w porównaniu z liśćmi wykazują natomiast geny włączone w syntezę innych białek, w tym związanych z podstawowym metabolizmem energetycznym. Liczba cząsteczek transkryptów genów o wysokim poziomie ekspresji w męskim gametoficie okazała się bardzo wysoka. Oszacowano, że geny ulegające ekspresji w liczbie kopii większej niż 100 w jednej komórce stanowią aż 58% całkowitej liczby transkryptów [45].

Poznanie genomu *A. thaliana* oraz wprowadzenie techniki mikromacierzy, na których każdy gen jest prezentowany przez zestaw sond molekularnych, umożliwiło poznanie transkryptomu pyłkowego tego gatunku [69]. Do tej pory cztery grupy badawcze podjęły się tego zadania (tab. 1).

Pierwsze przeprowadzone badania na mikromacierzy *Affymetrix Gene Chip* – AG, która reprezentuje sekwencję prawie 1/3 genomu *Arabidopsis* (8200 genów) przyniosły znaczne rozbieżności co do ilości genów, których transkrypty są obecne w dojrzałym ziarnie pyłku. Jedna z grup badawczych zidentyfikowała transkrypty 992 genów, z których prawie 40% określono jako specyficzne dla pyłku [35]. Natomiast druga wykryła transkrypty 1584 genów i ustaliła że aż 90% z nich

TABELA 1. Liczba genów, których transkrypty występują w dojrzałym ziarnie pyłku *A. thaliana*

Grupa badawcza	Rok	Gatunek (ekotyp)	Zastosowana mikromacierz	Liczba genów
Honys i Twell [36]	2003	<i>Arabidopsis</i> (Landsberg erecta)	Affymetrix AG	992
Becker i wsp. [5]	2003	<i>Arabidopsis</i> (Columbia)	Affymetrix AG	1584
Honys i Twell [37]	2004	<i>Arabidopsis</i> (Landsberg erecta)	Affymetrix ATH1	7235
Pina i wsp. [59]	2005	<i>Arabidopsis</i> (Columbia)	Affymetrix ATH1	6587

wykazuje ekspresję także w tkankach sporofitu, co stanowi ponad 60% genów ulegających stałej ekspresji w sporoficie [5]. Spośród 469 genów mających wysoki poziom ekspresji w gametoficie, 162 zaklasyfikowano jako specyficzne dla pyłku. Przyczyną rozbieżności w liczbie specyficznych dla pyłku genów [9] jest porównywanie transkryptomu pyłkowego z transkryptem pojedynczych organów, takich jak: liście, korzenie, siewki [5] lub transkryptem całej rośliny w kolejnych stadiach rozwoju [36], a także porównywanie transkryptomów różnych ekotypów *A. thaliana*. Na podstawie przeprowadzonych badań oszacowano, że liczba genów ulegających ekspresji w ziarnie pyłku jest od 30 do 60% niższa niż w tkankach sporofitu [5,77]. Zwrócono uwagę na różnice pomiędzy wzorcem ekspresji genów w gametoficie męskim a w tkankach wegetatywnych [5]. Większość genów o średnim lub wysokim poziomie ekspresji w siewkach wykazała niski poziom ekspresji w ziarnie pyłku i odwrotnie – te o niskim poziomie ekspresji w siewkach wykazały wysoki poziom ekspresji w gametoficie. W ziarnie pyłku ulegało ekspresji 3 razy mniej genów niż w jakiegokolwiek tkance sporofitu [5]. Opierając się na tych analizach oszacowano, że liczba genów ulegających ekspresji w ziarnie pyłku waha się pomiędzy 3 500 a 5 500 [77].

Zastosowanie nowszych mikromacierzy ATH1, które obejmują 80% genomu *A. thaliana*, umożliwiło bardziej szczegółowe poznanie wzorca ekspresji oraz bliższe oszacowanie liczby genów ulegających ekspresji w dojrzewającym ziarnie pyłkowym. Za pomocą tej mikromacierzy wykazano obecność transkryptów 6587 genów, co stanowiło 29% znajdujących się na niej sekwencji [58]. Jednakże transkrypty różnych tkanek wegetatywnych stanowiły istotnie wyższy procent mikromacierzy (np. kwiaty 68%, liście 62%, kielki 68%, siewki 69%), co oznacza, że w gametoficie męskim ekspresji ulega mniej niż 50% genów w porównaniu z tkankami wegetatywnymi. Badania dowiodły, iż 11% genów (739) ulegających ekspresji w gametoficie męskim jest specyficznych dla pyłku [58]. To o wiele więcej niż w organach wegetatywnych, takich jak: liście, kielki i siewki, gdzie procent specyficznych genów wynosi odpowiednio: 2, 4 i 6%. Z 26% genów w pyłku, które określono jako bardzo aktywne, aż 1/3 stanowiły geny specyficzne, a więcej niż 3/4 tych specyficznych genów wykazywało wysoki poziom ekspresji. Na podstawie uzyskanych wyników oraz przy założeniu, że genom *A. thaliana* koduje 28 000 genów, oszacowano, że w ziarnie pyłku ulega ekspresji około 8200 genów [58].

Używając macierzy Affymetrix ATH1 zbadano kolejne stadia rozwoju męskiego gametofitu i zidentyfikowano aż 13 977 genów ulegających ekspresji przynajmniej w jednym stadium, z czego 9,7% było specyficznych dla pyłku [37]. Większość genów ulegała ekspresji w dwu najmłodszych stadiach – 11565 w mikrosporze i 11909 w dwukomórkowym ziarnie pyłku. Po podziale komórki generatywnej na dwie komórki plemnikowe w ziarnie pyłku ujawniono transkrypty 8788 genów, a w dojrzałym ziarnie pyłku już tylko 7235 genów. Duża liczba genów, które ulegają ekspresji we wczesnej i późnej fazie rozwoju gametofitu męskiego, należy prawdopodobnie do genów metabolizmu podstawowego [77]. Liczba genów specyficznych dla pyłku wahała się od 857 w dwukomórkowym stadium do 625 w dojrzałym ziarnie pyłku. Pomimo spadku liczby różnych cząsteczek mRNA, procentowy udział specyficznych dla gametofitu męskiego transkryptów wzrastał z 6,9% w mikrosporze do 8,6% w dojrzałym ziarnie pyłku. Według szacunków całkowita liczba genów ulegających ekspresji w dojrzewającym ziarnie pyłku *A. thaliana* może dochodzić nawet do 17 000 [36].

W miarę poznawania transkryptomów coraz to nowych typów tkanek i komórek *Arabidopsis* liczba genów specyficznych dla ziarna pyłku zmalała do 5,6% i jest o wiele niższa niż pierwotnie przypuszczano. Ulegają one w większości ekspresji na bardzo wysokim poziomie i stanowią grupę tzw. późnych genów pyłkowych. Średni poziom ekspresji późnych genów pyłkowych jest wyższy niż genów konstytutywnych. Rozpatrując wzorzec transkrypcji ziarna pyłku należy także zwrócić uwagę na niespecyficzne geny ulegające ekspresji na wysokim poziomie. Do tej grupy zaliczono geny, których maksimum ekspresji w męskim gametoficie jest przynajmniej pięciokrotnie wyższe od maksimum ekspresji w tkankach sporofitu [77]. Zidentyfikowano 1364 takie geny, tj. 9,7% genów ulegających ekspresji podczas rozwoju męskiego gametofitu. Spośród genów niespecyficznych dla pyłku 1084 ulegało ekspresji jako wczesne geny pyłkowe, natomiast 1014 jako późne geny pyłkowe.

Zidentyfikowana przez różne grupy badawcze liczba genów ulegających transkrypcji w ziarnie pyłku *A. thaliana* różni się dość znacznie. Prawdopodobnie wynika to z zastosowania do badań różnych ekotypów, innych warunków wzrostu roślin oraz metod izolacji i sortowania ziaren pyłku, a także z odmiennych warunków eksperymentu oraz sposobu analizy danych [19]. Mikromacierz ATH1 zaprojektowano na podstawie sekwencji genomu ekotypu Columbia. Wydaje się więc, że badania transkryptomu ziarna pyłku Columbia najwierniej odzwierciedlają stan rzeczywisty. Z badań porównawczych proteomów ośmiu ekotypów *A. thaliana* wynika, że różnią się one dość znacznie między sobą. Po części może to być efektem modyfikacji potranslacyjnych, a po części występowania różnych alleli tego samego genu [18]. Genetyczne różnice między różnymi ekotypami *A. thaliana* potwierdziły badania transkryptomu wierzchołka wzrostu ekotypu Columbia i Landsberg, wykonane również na mikromacierzy ATH1 [69].

Dzięki zastosowaniu metody FACS (sortowanie komórek aktywowanych fluorescencyjnie) możliwe było także przeprowadzenie analizy transkryptomu komórek plemnikowych *Arabidopsis thaliana*. Na mikromacierzy ATH1 wykazano, że obecne są tam transkrypty 5829 genów, z czego 2400 wykazuje wysoką ekspre-

sję. Badania porównawcze wykazały, że transkrypty 4757 genów były wspólne dla komórek plewnikowych oraz siewek [12].

Na obecnym etapie badań, pomimo znacznych rozbieżności wyników, można naszkicować ogólny wzorzec ekspresji genów w różnicującym się i dojrzałym gametoficie męskim *A. thaliana*. Badania porównawcze ujawniły, że transkryptom mikrospory bardziej przypomina transkryptom niezróżnicowanych komórek somatycznych hodowanych w zawiesinie (współczynnik korelacji –  $R = 0,474$ ) niż transkryptom dojrzałego ziarna pyłku ( $R = 0,194$ ) [37]. Świadczy to o zmianie programu genetycznego komórek różnicującego się gametofitu męskiego i przejściu od programu genów wczesnych do programu genów późnych. Rzeczywiście po stadium dwukomórkowego ziarna pyłku następuje spadek różnorodności transkryptów. Zjawisko to związane jest z jego końcowym różnicowaniem. Towarzyszy mu aktywacja nowych grup genów, które prawdopodobnie funkcjonują podczas dojrzewania ziarna pyłku i później w trakcie kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej [37]. Ostatecznie transkryptom dojrzałego ziarna pyłku wykazuje znacznie mniejszą złożoność w porównaniu z transkryptomem tkanek sporofitu. Jednocześnie duży udział mają w nim geny specyficzne dla pyłku oraz wykazujące wysoki poziom ekspresji. Wydaje się, że transkrypty tych genów odgrywają kluczową rolę w rozwoju pyłku, a także w jego kiełkowaniu w łagiewkę pyłkową.

Przeprowadzone analizy pokazują, że u *A. thaliana* przejście pomiędzy wczesnym a późnym programem rozwojowym męskiego gametofitu następuje przed drugą mitozą w pyłku. Centralnym elementem regulującym ten proces są czynniki transkrypcyjne. Analiza klasterowa czynników transkrypcyjnych pozwoliła podzielić je na ulegające ekspresji: (1) we wczesnych etapach rozwoju pyłku, (2) w późniejszym okresie jego rozwoju oraz (3) konstytutywnie. Z blisko 1350 przypuszczalnych czynników transkrypcyjnych *A. thaliana* 612 ulegało ekspresji w dojrzewającym ziarnie pyłku, w tym 542 w początkowych stadiach jego rozwoju, natomiast 405 w okresie późniejszym [37]. Wśród nich 49 wykazało wysoki poziom ekspresji, ale tylko 27 było specyficznych dla pyłku [77]. Do wczesnych genów pyłkowych zaliczono czynniki transkrypcyjne z takich rodzin, jak: *NAC*, *WRKY*, *TCP*, *ARF*, *Aux/IAA*, *HMG-box* oraz *Alfin-like* [37]. Przejście pomiędzy dwoma programami rozwojowymi dokumentuje też ekspresja genów związanych z syntezą białek. Początkowo stanowią one aż 15% grupy genów o najwyższym poziomie ekspresji w ziarnie pyłku. Podczas przejścia pomiędzy dwoma programami genetycznymi następuje spadek aktywności tych genów i włączenie ekspresji zupełnie innych [77].

Do badania przejścia pomiędzy dwoma programami rozwojowymi posłużono się analizą klasterową [37]. Pozwala ona badać zmiany poziomu ekspresji zbioru genów w czasie. Jak przypuszczano klasterzy zawierające geny ważne podczas kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej oraz w procesie zapłodnienia ulegały ekspresji na wysokim poziomie w stadium dwu- i trójkomórkowego ziarna pyłku.

Transkryptom dojrzałego ziarna pyłku odzwierciedla jego przygotowanie do kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej, co szczególnie widać w jego analizie funkcjonalnej. Niski poziom transkryptów odnotowano dla genów kodujących czynniki

transkrypcyjne, genów metabolizmu podstawowego oraz genów kodujących białka niezbędne do translacji, natomiast szczególnie wysoki – dla genów związanych z metabolizmem ściany komórkowej, sygnalizacją komórkową, cytoszkieletem, a także czynnikami translacji. W każdej z tych grup zidentyfikowano konkretne geny, których poznanie przybliży zrozumienie mechanizmów kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej. Wysoki poziom ekspresji występuje zatem w tych grupach genów, których produkty są niezbędne w początkowych etapach wzrostu łagiewki pyłkowej, tj. podczas syntezy błony i ściany komórkowej, egzocytozie jej składników budulcowych oraz w odbiorze i przekazywaniu sygnałów pochodzących ze słupka. Transkrypty tych genów są zmagazynowane w dojrzałym ziarnie pyłku i tuż po zapyleniu mogą ulegać translacji. W dojrzałym ziarnie pyłku w cytoplazmie komórki wegetatywnej wykazano obecność dużej ilości poli(A)mRNA [86]. Część z tych transkryptów może być przechowywana w postaci cząsteczek mRNP zwanych EPP (*ribonucleoprotein particle*) [35]. Stosując inhibitory transkrypcji i translacji u *A. thaliana* potwierdzono [36] znane od lat 60. ub. wieku zjawisko [51], że kiełkowanie i początkowy wzrost łagiewki pyłkowej nie są zależne od syntezy nowego RNA, wymagają natomiast wznowienia translacji. Wydaje się, że nie tylko gotowe transkrypty są przechowywane w gametoficie męskim, ale także maszyna do syntezy białek [35]. Już wcześniejsze biochemiczne i fizjologiczne eksperymenty dowiodły, iż w dojrzałym ziarnie pyłku magazynowana jest duża pula tRNA oraz rybosomów koniecznych do translacji podczas szybkiego wzrostu łagiewki pyłkowej [51]. Ostatnie badania proteomu ziarna pyłku *A. thaliana* potwierdziły występowanie w jego cytoplazmie szeregu białek rybosomalnych (At2g36160, At1g07770, At2g41840, At3g09200, At1g33140, At5g45775, At2g37190, At2g20450) [32].

## CHARAKTERYSTYKA PROTEOMU ZIARNA PYŁKOWEGO

Badania nad proteomem pyłkowym *A. thaliana* uzupełniły wiedzę na temat ekspresji genów w ziarnie pyłku oraz pozwoliły odpowiedzieć na pytanie, czy translacja transkryptów potrzebnych podczas kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej odbywa się w okresie dojrzewania ziarna pyłku czy dopiero podczas jego kiełkowania [34]. Okazało się, że w dojrzałym ziarnie pyłku produkty białkowe genów o wysokim poziomie transkrypcji występują na niskim poziomie i odwrotnie – poziom białek kodowanych przez geny o niskim poziomie transkrypcji jest wysoki. Uważa się, iż białka obecne na wysokim poziomie są zaangażowane przede wszystkim w metabolizm energetyczny, podczas gdy te na niskim poziomie – w budowę struktury komórkowej. Wykazano, że w dojrzałym ziarnie pyłku występuje duża pula białek odpowiedzialnych za metabolizm energetyczny (21%) w porównaniu z ilością kodujących je transkryptów (1%) [55]. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że nagromadzone są tam enzymy odpowiadające za szybkie uwalnianie energii podczas kiełkowania łagiewki pyłkowej. Potwierdzają ją badania przeprowadzone na ziarnach pyłku *Lycopersicon esculentum* [72] oraz *Oryza sativa* [20]. Wydaje się więc, że

dojrzałe ziarno pyłku magazynuje białka, które będą potrzebne do natychmiastowego wyzwolenia energii podczas kiełkowania łagiewki pyłkowej oraz transkrypty kodujące białka strukturalne i włączone w sygnalizację komórkową. Transkrypty te mogą ulec translacji już podczas kiełkowania łagiewki pyłkowej.

Wśród białek zidentyfikowanych jako specyficzne dla pyłku w proteomie występują przede wszystkim białka odpowiedzialne za strukturę komórki oraz jej wzrost i podział [34]. U *Lilium longiflorum* wykazano, iż kiełkowanie ziaren pyłkowych poddanych działaniu temperatury  $-20^{\circ}\text{C}$  przez 2 miesiące jest wyraźnie opóźnione. Badania ich transkryptomu oraz proteomu wskazują, iż jest to spowodowane częściową degradacją przechowywanych w ziarnie pyłku białek oraz mRNA, których stabilność może być różna [83]. Ponadto aktynomycyna D (inhibitor transkrypcji) znacznie hamowała kiełkowanie oraz wzrost łagiewki pyłkowej ziaren pyłku przechowywanych w chłodzie w porównaniu ze świeżymi ziarnami pyłku. Świadczy to o konieczności wznowienia transkrypcji pyłkowej i uzupełnieniu zdegradowanych działaniem niskiej temperatury cząsteczek mRNA.

Analiza proteomu ujawniła, że w ziarnie pyłku wszystkich zbadanych gatunków największą pulę stanowią białka odpowiedzialne za metabolizm węglowodanów. Wyniki te pomogły także w zrozumieniu procesów hydrolizy i metabolizowania skrobi podczas kiełkowania pyłku. Wydaje się, że kwaśna invertaza wakuolarna, której obecność wykazano w ziarnach pyłku *A. thaliana* [34,55], ryżu [20] oraz pomidora [72], rozkłada sacharozę na glukozę i fruktozę. W następnym etapie fruktoza jest fosforylowana przez fruktokinazę. Ten fosforan heksozy jest substratem do szeregu dalszych przemian węglowodanów, m.in. do glikolizy i cyklu kwasów trójkarboksylowych. Kluczowe enzymy tych szlaków przemian oraz łańcucha przenoszenia elektronów występują w dojrzałych ziarnach pyłku wszystkich gatunków poddanych analizie proteomu. Kwaśna invertaza może brać udział we wzroście komórki roślinnej oraz osmoregulacji, co wydaje się mieć kluczowe znaczenie podczas elongacji łagiewki pyłkowej. Dodatkowo może to potwierdzić fakt, iż poziom zarówno odwrotnej invertazy, jak i fruktokinazy rośnie podczas dojrzewania pylników i osiąga maksimum w momencie, gdy ziarno pyłku jest dojrzałe [2].

Dotychczasowe analizy proteomu ujawniły, że ponad 20% białek występujących w dojrzałym ziarnie pyłku ma dwojaki rodzaj izoformy: gdy ten sam gen koduje białka zmienione na skutek modyfikacji potranslacyjnych np. poprzez fosforylację lub glikozylację lub gdy białka kodowane są przez różne geny. Zdecydowanie więcej jest izoform białek pierwszego typu, co prawdopodobnie służy dywersyfikacji białek haploidalnego genomu. Takie potranslacyjne modyfikacje mogą odgrywać ważną rolę podczas rozwoju ziarna pyłku [55,72].

Obecne w dojrzałym ziarnie pyłku transkrypty oraz białka można podzielić na następujące kategorie funkcjonalne: (1) uczestniczące w budowie ściany komórkowej, (2) biorące udział w regulacji transkrypcji i translacji, (4) regulujące transport transbłonowy, (5) regulatory cyklu komórkowego.

## GENY ZAANGAŻOWANE W BUDOWĘ ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

Dojrzałe ziarno pyłku otacza sporoderma zbudowana z zewnętrznej sporopoleninowej egzyny i wewnętrznej pektocelulozowej intyny. Egzyna syntetyzowana jest zarówno w gametoficie, jak i w somatycznym tapetum z prekursorów fenylopropanoidowych, które razem z acylowanymi lipidami tworzą sporopoleninę. W szlak syntezy prekursorów fenylopropanoidowych włączone są specyficzne czynniki transkrypcyjne. W transkryptomie ziarna pyłku *A. thaliana* najbardziej reprezentatywną grupę wśród czynników transkrypcyjnych stanowiły czynniki typu C<sub>3</sub>H [37]. Różnorodność gametofitowych czynników transkrypcyjnych C<sub>3</sub>H sugeruje, że odgrywają one ważną rolę w syntezie białek koniecznych do regulacji chemicznych interakcji pomiędzy prekursorami fenylopropanoidowymi [37].

Kielkowanie ziarna pyłku wymaga modyfikacji sporodermi, a szybki wzrost łagiewki pyłkowej – intensywnej syntezy nowej ściany komórkowej o specyficznej budowie. Wewnętrzna warstwa ściany łagiewki zbudowana jest głównie z homogennej kalozy (polimer 1,3-β-glukanu), natomiast w skład zewnętrznej fibrylarniej warstwy wchodzi celuloza (polimer 1,4-β-glukanu) i pektyny (polimery kwasu poligalakturonowego). Nie dziwi więc obecność w transkryptomie pyłkowym dużej ilości genów odpowiedzialnych za syntezę oraz przebudowę ściany komórkowej.

Transkrypty genów włączonych w metabolizm sporodermi oraz ściany łagiewki pyłkowej stanowią znaczny procent zarówno ze względu na jakość, jak i ilość w transkryptomie pyłkowym *A. thaliana*. Pięć z sześciu najobficiej występujących w dojrzałym ziarnie pyłku cząsteczek mRNA koduje białka zaangażowane w metabolizm ściany komórkowej, takie jak: poligalakturonazy i pektynoesterazy. Wśród pięciu rodzin hydrolaz glukozydowych ulegających ekspresji w ziarnie pyłku *GHF1* (β-glukozydaza), *GHF16* (endotransglukozyłaza ksyloglukanu), *GHF28* (poligalakturonaza), *GHF35* (β-galaktozydaza) i *CHF9* (glukonaza/celulaza) nie ulegają ekspresji w tkankach sporofitu. Czterech przedstawicieli rodziny poligalakturonaz *GHF28* jest specyficzna dla pyłku. Geny tych poligalakturonaz ulegają ekspresji na wysokim (*At3g07820*, *At3g07850*, *At2g23900*) bądź średnim (*At4g33440*) poziomie. Wśród genów kodujących glukozylotransferazy zidentyfikowano 11 ulegających ekspresji w pyłku, sześć z nich wykazywało wysoki poziom ekspresji i było specyficznych dla pyłku. Cztery z tych transkryptów należą do rodziny GAF2, w tym dwa kodują syntazę celulozową (*At4g11050* i *At4g38190*) [37]. Analiza transkryptomu pyłkowego na mikromacierzy ATH1 uzupełniła tę listę transkryptów o syntazę kalozy *AtGsl2* (*At2g13675*) oraz *AtCslD1* – przypuszczalnie syntazę celulozy (*At2g33100*) [4]. Obserwując kielkowanie i jedynie spowolniony wzrost łagiewki pyłkowej mutantów *A. thaliana* genu *AtCSLA7* (β-glukozylotransferazy czyli syntazy celulozy) stwierdzono, że w syntezę celulozowej ściany łagiewki zaangażowane jest co najmniej kilka enzymów należących do tej samej rodziny GT2 [31].

Badanie proteomu dojrzałego ziarna pyłkowego *A. thaliana* ujawniło, że ilość białek odpowiedzialnych za przebudowę ściany komórkowej nie jest duża w

porównaniu z innymi funkcjonalnymi grupami białek [34,55]. Wskazuje to, iż kodujące je transkrypty ulegają translacji dopiero podczas wzrostu łagiewki pyłkowej.

Ściana wierzchołka rosnącej łagiewki pyłkowej musi być na tyle wytrzymała, by sprostać wysokiemu turgorowi, a jednocześnie na tyle plastyczna, by było możliwe włączanie nowych błon oraz materiałów budulcowych potrzebnych do jej budowy. Jednym z ważniejszych składników ściany komórkowej łagiewki pyłkowej są pektyny. Związki te są wydzielane jako metylowane estry, a następnie deestryfikowane przez enzym pektynmetylesterazę (PME). Powstałe w ten sposób wolne grupy karboksylowe mogą krzyżowo wiązać  $\text{Ca}^{2+}$ , co strukturalnie wzmacnia ścianę poniżej jej rosnącego wierzchołka. Efektem podania egzogennej PME rosnącym *in vitro* łagiewkom jest pogrubienie ściany komórkowej na wierzchołku i zahamowanie jej wzrostu [14]. Zjawisko to ujawnia, że ścisła kontrola aktywności PME wydaje się być niezbędnym warunkiem prawidłowego wzrostu łagiewki pyłkowej. Faktycznie w proteomie dojrzałego ziarna pyłku wszystkich zbadanych do tej pory gatunków [20,34,55,72] wykryto zarówno obecność enzymu PME, jak i jego inhibitora PME1, który potranslacyjnie moduluje działanie PME [29]. Zidentyfikowany u *A. thaliana* inhibitor PME1 (At4g24640) uznany został za specyficzny dla pyłku [34].

W dojrzałym męskim gametoficie wysoki poziom ekspresji wykazują białka zakotwiczone w błonie komórkowej za pomocą GPI (glikozylofosfatydilinozytolu), nazywane GAP. Białka te są zaangażowane w syntezę i przebudowę ściany komórkowej łagiewki, sygnalizację międzykomórkową, adhezję oraz kierunkowy wzrost. Za pomocą GPI w błonie komórkowej mogą być zakotwiczone takie białka, jak: 1,3- $\beta$ -glukanazy, glicerofosfodiesterazy, ekspansyny, klasyczne białka AG, peptydy AG, COBRA i potencjalne peptydy sygnałowe GAPEP [13]. Badania za pomocą mikromacierzy oraz PCR ujawniły obecność transkryptów 47 genów kodujących białka GAP w ziarnie pyłku *A. thaliana*. W jego proteomie wykryto 11 białek związanych z błoną plazmatyczną przez GPI [43]. Kotwiczenie białek za pomocą GPI jest przypuszczalnym mechanizmem kierowania ich do błony oraz ściany komórkowej i pozwala na spolaryzowaną lokalizację białek związanych z sygnalizacją [43].

Białka GAP są włączane w wierzchołkowy region rosnącej łagiewki pyłkowej [43]. W miarę jej wzrostu i oddalania się od szczytu ulegają one recyklingowi za pomocą wyspecjalizowanych endosomów. Za kierowanie białek zakotwiczonych za pomocą GPI w odpowiednie miejsca błony odpowiada cytoszkielet aktynowy [62]. U mutantów *seth1* i *seth2* *A. thaliana*, które mają zaburzoną biosyntezę kotwicy GPI, obserwowano zahamowanie kiełkowania oraz wzrostu łagiewki pyłkowej, co było spowodowane nieprawidłowościami w syntezie ściany kalozowej [43]. Za pomocą GPI w błonie łagiewki może być kotwiczona 1,3- $\beta$ -glukanaza, która prawdopodobnie zapobiega odkładaniu kalozy na wierzchołku łagiewki pyłkowej.

Analiza proteomu ziarna pyłku *A. thaliana* wykazała obecność jedynie dwóch białek związanych z błoną komórkową za pomocą kotwicy GPI [34]. Są to: At1g29250, które jest specyficzne tylko dla roślin, oraz białko GAP At5g20230 wiążące i transportujące jony miedzi, będące kofaktorami wielu enzymów m.in. biorących udział w syntezie ATP.

W błonie łagiewki pyłkowej zakotwiczona za pomocą GPI jest ekspansyna, której obecność stwierdzono zarówno w proteomie, jak i transkryptomie pyłku. Białko to rozrywa niekowalencyjne wiązania między mikrofibrylami celulozowymi, rozluźnia strukturę ściany celulozowej, co pozwala na jej szybszy wzrost [43]. Może także odpowiadać za rozluźnianie ściany komórkowej znamienia oraz tkanki transmisyjnej słupka podczas penetracji łagiewki [41,74].

Analiza transkryptomu pyłkowego za pomocą mikromacierzy ujawniła obecność transkryptów genu kodującego białko COBL11 (At4g27110), które kotwiczone jest w błonie za pomocą GPI i jest członkiem rodziny COBRA. Liczne badania na mutantach *A. thaliana* wykazały udział białek z rodziny COBRA w regulacji elongacji i kierunku wzrostu komórek korzenia, prawdopodobnie poprzez pośredni lub bezpośredni wpływ na syntezę łańcuchów celulozowych. Białka COB są kierowane do podłużnych ścian komórek korzenia i rekrutują w odpowiednie miejsca kompleksy odpowiedzialne za syntezę celulozy [64]. Na tej podstawie sugeruje się, że białko COBL11 może pełnić podobną rolę podczas wzrostu łagiewki pyłkowej [5].

Białka zakotwiczone za pomocą GPI mogą być odcinane od części lipidowej błony i funkcjonować jako rozpuszczalne cząstki sygnalizacyjne [67]. Analiza transkryptomu pyłkowego ujawniła wysoki poziom ekspresji genu kodującego ten rodzaj białka, mianowicie AGP23 (At3g57690). Chociaż funkcja białek AGP w łagiewkach pyłkowych oraz słupku jest nieznana, to wydaje się interesujące, że AGP23 koduje peptyd AG o długości 61 aminokwasów, który po odcięciu od części lipidowej może stanowić rozpuszczalną cząstkę sygnalizacyjną [5].

U ssaków wykazano, że białka zakotwiczone za pomocą GPI są niezbędne do adhezji plemnik-jajo [1]. Mysie oocyty, ze znokautowanym genem kodującym enzym biorący udział w biosyntezie kotwicy GPI, nie są zdolne do fuzji z męską gametą. Sugeruje się, że podobne mechanizmy mogą istnieć podczas zapłodnienia u roślin okrytozalążkowych [59].

## CYTOSZKIELET

Cytoszkielelet wraz z aparatem wydzielniczym jest w łagiewce pyłkowej systemem efektorowym odpowiadającym na czynniki determinujące kierunek jej wzrostu [49]. Specyficzna polaryzacja wiązek filamentów aktynowych w łagiewce pyłkowej [46] stanowi mechanizm ukierunkowanego przepływu cytoplazmy – w strefie podbłonowej w kierunku wierzchołka, natomiast w części centralnej ku jej podstawie [33]. Funkcjonowanie cytoszkieletu aktynowego odpowiedzialne jest też za miejsce budowy wierzchołka łagiewki pyłkowej. Dzięki współdziałaniu z miozyną włókna aktynowe mogą ustawiać w odpowiednim miejscu oraz pozycji pęcherzyki wydzielnicze uczestniczące w rozbudowie błony i ściany komórkowej łagiewki, a także ograniczać do konkretnych rejonów błony miejsca występowania kanałów jonowych. Wydłużenie filamentów aktynowych w pobliżu wierzchołka stanowi część siły odpowiedzialnej za popychanie go do przodu [80]. W warunkach *in vivo* reorganizacja F-aktyny, które

mogą być indukowane w odpowiedzi na bodźce pochodzące z tkanki transmisyjnej słupka, wyznaczają nowe miejsca egzocytozy pęcherzyków wydzielniczych, czego skutkiem będzie zmiana kierunku wzrostu łagiewki pyłkowej [49].

Analiza transkryptomu i proteomu dojrzałych ziaren pyłkowych *A. thaliana* ujawniła, że obecne są tam zarówno transkrypty genów kodujących białka cytoszkieletu, jak i gotowe białka uczestniczące w jego funkcjonowaniu. W dojrzałym ziarnie pyłkowym obserwuje się bardzo wysoki poziom transkryptów genów kodujących białka cytoszkieletu. Cztery spośród pięciu genów aktyny, które ulegają ekspresji w tkankach generatywnych, należały do grupy o najwyższym poziomie transkryptów [36]. W pyłku wykryto transkrypty aktyny 4 i 12 oraz małego białka profiliny 4, które uczestniczy w regulacji polimeryzacji włókien aktynowych. Zidentyfikowano też wcześniej niescharakteryzowany gen kodujący białko, które również odpowiedzialne jest za depolimeryzację aktyny (At4g25590). Badania proteomu pyłku *A. thaliana* wykazały obecność dwóch specyficznych dla pyłku czynników odpowiedzialnych za depolimeryzację aktyny [34].

Wysoki poziom transkryptów wykazywały również geny kodujące białka motoryczne współpracujące z cytoszkieletem. W dojrzałym ziarnie pyłku ujawniono obecność transkryptów kodujących miozynę (AtVIIIID i AtXID), która uczestniczy w transporcie pęcherzyków wzdłuż filamentów aktynowych oraz transkrypt kodujący białko kinezy-no-podobne (At1g09170), które jest prawdopodobnie zaangażowane w ruch wzdłuż mikrotubul [5].

Analiza proteomu ziarna pyłkowego *A. thaliana* [56], ryżu [20] oraz pomidora [72] potwierdziła znane z innych badań dane o obecności w ziarnie pyłkowym takich białek cytoszkieletu, jak: aktyny, tubuliny oraz profiliny.

## SYGNALIZACJA

Łagiewka pyłkowa uznawana jest za jeden z najlepszych roślinnych modeli do badania transdukcji sygnałów. W komórce tej zidentyfikowano wiele ścieżek sygnalizacji, m.in.  $Ca^{2+}$ , kalmodulinę, fosfoinozytole, kinazy białkowe, cykliczne AMP i GTPazy. Stanowią one dużą i złożoną sieć sygnalizacji komórkowej, która krzyżuje się na różnych poziomach, takich jak: kontrola kierowania i fuzji pęcherzyków stanu cytoszkieletu aktynowego [49].

Kiełkowanie ziarna pyłku oraz wzrost łagiewki w ściśle określonym kierunku wymagają odbioru specyficznych sygnałów wysyłanych z tkanek słupka. Przypuszcza się, że za ich odbiór oraz transdukcję do wnętrza męskiego gametofitu odpowiadają receptorowe kinazy białkowe. Analizy transkryptomu ziarna pyłku *A. thaliana* ujawniły wysoki poziom transkryptów związanych z sygnalizacją komórkową, a w szczególności kinaz receptorowych. 25% genów ulegających selektywnej ekspresji należy do kategorii: sygnalizacja. Większość z nich (26 z 37) koduje przypuszczalnie kinazy receptorowe – RLK (*receptor-like kinases*). Prawie wszystkie kinazy receptoropodobne (21 z 23) ulegają ekspresji jedynie w ziarnie pyłku, czyli są dla

niego specyficzne [36]. Tę specyficzność obserwowano nie tylko na poziomie poszczególnych genów, ale także na poziomie podrodzin RLK. Z 9 podrodzin RLK, ulegających ekspresji w ziarnie pyłku, 4 nie wykazały ekspresji w tkankach sporofitu. Wśród nich były kinazy receptorowe ekstensynopodobne, bogate w prolinę, podrodzina IX cytoplazmatycznych RLK, *Crinckly4-like* oraz podrodzina VI bogata w powtórzenia leucynowe [36]. Kinaza RKF1 (At1g29750) *A. thaliana* [75], podobnie jak receptoropodobna kinaza pomidora LePRK1-3 [54] oraz kukurydzy ZmPRK1 [42], jest specyficzna dla pyłku.

Badania u pomidora (*Lycopersicon esculentum*) ujawniły, że specyficzne dla pyłku kinazy receptoropodobne wiążą kilka różnych ligandów i mogą uczestniczyć w regulacji takich procesów, jak: uwodnienie i kiełkowanie ziarna pyłku oraz wzrost łagiewki w szlaku transmisyjnym słupka. W błonie dojrzałego pyłku kinazy LePRK21 i LePRK2 tworzą kompleks, który wiąże się z pyłkowym ligandem (białkiem) LAT52, co prowadzi do fosforylacji kinazy LePRK2. Uważa się, że kompleks ten aktywuje kaskadę sygnalizacyjną konieczną do inicjacji kiełkowania pyłku [85]. Po wykiełkowaniu ekspresja białka LePRK2 silnie wzrasta i, jak się sądzi, receptor ten może uczestniczyć w dalszych etapach sygnalizacji podczas interakcji z tkankami słupka. Prawdopodobnie LAT52 zostaje zastąpiony przez ligand obecny w ekstrakcie znamienia słupka, który zidentyfikowano jako białko LeSTIG1 [76]. Związanie LeSTIG1 powoduje dysocjację kompleksu LePRK1 i LePRK2 i defosforylację LePRK2. Nie wyklucza się, iż podczas dalszego wzrostu łagiewki pyłkowej w kierunku załązni białko LeSTIG1 może ulec wymianie na inny obecny w słupku ligand [76].

U *L. esculentum* zidentyfikowano białko KPP, które oddziałując z cytoplazmatyczną domeną kinaz LePRK1 oraz LePRK2 jest fosforylowane przez LePRK2 [40]. Warto wspomnieć, że geny podobne do KPP obecne są jedynie w królestwie roślin. Fakt ten może wskazywać na obecność w komórkach roślinnych unikalnej ścieżki transdukcji sygnału biorącej udział w wierzchołkowym wroście łagiewki oraz komórek włóśniowych korzenia [40].

W ziarnach pyłku wykryto także obecność transkryptu peptydu RALF-LIKE 10, który należy do rodziny białek RALFL. Członkowie tej rodziny prawdopodobnie funkcjonują jako międzykomórkowe cząsteczki sygnalizacyjne wiążące się z różnymi kinazami receptorowymi. Transkrypt RALF-LIKE 10 koduje peptyd o długości 73 aminokwasów, z potencjalną N-końcową sekwencją odpowiedzialną za jego eksport. Przypuszcza się, że peptyd ten może być ligandem rozpoznawanym przez bogatą w reszty leucynowe kinazę receptoropodobną obecną w błonie ziarna pyłku lub komórek słupka [5].

Kolejnym elementem szlaku sygnalizacji poprzez kinazy receptoropodobne, których transkrypty ujawniono w ziarnie pyłku oraz łagiewce pyłkowej *A. thaliana*, są GTPazy typu Rop/Rac. Funkcjonują one jako przełączniki molekularne sprzęgające reakcję aktywacji receptora z kaskadą wewnątrzkomórkowych fosforylacji przy udziale kinaz MAP. W dojrzałym ziarnie pyłku były obecne transkrypty takich GTPaz, jak: AtRac1, AtRac6 oraz Rop1At. Rac oraz Rop należą do rodziny Rho GTPaz, które w łagiewce pyłkowej prawdopodobnie odpowiadają za organizację cytoszkieletu

aktywnego oraz jej rozwój, odbierają sygnały od receptorów błonowych i przekazują je dalej do białek i struktur docelowych. GTPazy Rop odgrywają kluczową rolę w fuzji pęcherzyków wydzielniczych oraz endocytozie [49]. W łagiewce pyłkowej cząsteczkami docelowymi dla Rop1At są dwa białka – RIC3 oraz RIC4. RIC3 poprzez wtórny przekąźnik, jakim są jony  $Ca^{2+}$ , prowadzi do depolimeryzacji aktyny, natomiast RIC4 wykazuje antagonistyczne działanie – polimeryzację aktyny [65].

W ziarnie pyłku obserwuje się ekspresję transkryptu małej GTPazy, AtRab2. Białka Rab to największa rodzina małych GTPaz, które kontrolują fuzję specyficznych pęcherzyków transportujących. GTPaza RAB2 jest odpowiedzialna za transport pęcherzyków pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego. Występowanie tego białka jest charakterystyczne dla komórek o dużej aktywności wydzielniczej, a szczególnie dla rosnącej łagiewki pyłkowej. Obecność białka RAB wykazano w rosnącej łagiewce pyłkowej tytoniu [17]. Stosując konstrukt białko RAB2-GFP ujawniono, że to fuzyjne białko jest specyficznie zlokalizowane w aparacie Golgiego. Było ono natomiast nieobecne w łagiewkach pyłkowych roślin o zmutowanym genie *Rab2*. Brak białka RAB powodował zaburzenia w dostarczaniu błon oraz białek do wierzchołka łagiewki pyłkowej, czego efektem było hamowanie jej wzrostu.

Jak wiadomo, szlak sygnalizacyjny przez kinazy receptorowe prowadzi do aktywacji kinaz białkowych typu MAP. W pyłku *A. thaliana* wykazano obecność transkryptów kinazy atMAP3Ky (At5g66850) [49], natomiast w ziarnach pyłku tytoniu wykazano ekspresję dwóch kinaz MAP: p45<sup>Ntf4</sup> i SIPK. Kinazy te są aktywowane po jego uwodnieniu i jak się sądzi, są odpowiedzialne za fosforylację profiliny – białka włączonego w regulację procesu polimeryzacji aktyny [47].

Ważną rolę ROP GTPazy w szlaku sygnalizacyjnym podczas kiełkowania ziarna pyłkowego i wzrostu łagiewki pyłkowej potwierdziły badania eksperymentalne. Zarówno w rosnącej łagiewce pyłkowej rzodkiewnika i tytoniu, jak i komórkach włośnikowych korzenia GTPazy ROP zostały zlokalizowane w wierzchołku. Z ziaren pyłkowych mutantu *A. thaliana* mającego stale aktywną formę Rop1At kiełkowały nienormalne, bulwiaste łagiewki pyłkowe, natomiast u mutantu ze stale nieaktywną formą tej GTPazy wzrost łagiewek wkrótce ulegał zahamowaniu. Uważa się, że białko ROP aktywuje fosfolipazę C (kinazę fosfatydyloinozytolową), co prowadzi do powstania cząsteczki sygnałowej drugiego rzędu ( $IP_3$ ), która odpowiada za uwalnianie  $Ca^{2+}$  [49]. Byłaby to zatem cząsteczka, która w łagiewce pyłkowej wiąże dwa różne szlaki sygnalizacji: przez kinazy receptoropodobne oraz fosfatydyloinozytol.

Udział szlaku fosfoinozytolowego w kierunkowym wzroście łagiewki pyłkowej jest wciąż dyskusyjny [49], aczkolwiek w ziarnie pyłku *A. thaliana* ujawniono wysoki poziom transkryptów genów zaangażowanych w ten proces: At2g18180 (*phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein*) białko transportujące fosfolipidy z miejsca ich syntezy w ER i AG do innych błon komórkowych, At2g43900 (*inositol polyphosphate 5'-phosphatase*) i At2g31830 (*inositol polyphosphate 5'-phosphatase*) – enzymy hydrolizujące  $IP_3$  i w ten sposób kończące ten szlak sygnalizacji [15] oraz At2g41210 (*phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase*) – enzym

biorący udział w syntezie PIP2 [5]. Fosfoinozytolowa ścieżka sygnalizacyjna polega na produkcji wtórnych przekazników, którymi są m.in. jony  $\text{Ca}^{2+}$ .

Znaczenia precyzyjnej regulacji cytozolowego poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w kontroli wzrostu łagiewki pyłkowej dowiodły liczne badania z lat 90. ubiegłego wieku. Utrzymanie tzw. gradientu *tip-to-base*  $\text{Ca}^{2+}$  jest konieczne do jej prawidłowego wzrostu [7]. Obniżony poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w strefie podwierzchołkowej łagiewki pyłkowej umożliwia prawidłowe funkcjonowanie cytoszkieletu, natomiast jego wyraźne podwyższenie na szczycie powoduje fragmentację filamentów aktyny. Za proces fragmentacji filamentów aktynowych odpowiedzialne jest białko vilina. Najwyższą aktywność białko to wykazuje na szczycie łagiewki, a więc w rejonach cytoplazmy o najwyższym stężeniu wapnia [26]. Sensorem  $\text{Ca}^{2+}$  jest cytozolowe białko kalmodulina (CaM), które po związaniu jonów wapniowych aktywuje specyficzne kinazy białkowe, co prowadzi do odpowiedzi komórkowej. Analiza transkryptomu ziarna pyłku *A. thaliana* ujawniła występowanie transkryptów kodujących dwie przypuszczalne kalmoduliny (At4g03290, At4g12860), które ulegały selektywnej ekspresji w gametoficie [5]. Badania proteomu potwierdziły obecność w ziarnie pyłkowym zarówno kalmoduliny, jak też innych białek wiążących  $\text{Ca}^{2+}$ , takich jak: kalretikulina oraz aneksyny [34,55]. Stwierdzono tam także obecność transkryptów pięciu kinaz białkowych zależnych od wapnia: CPK14, -18, -20, -24 i -26 (At2g41860, At4g36070, At2g38910, At2g31500 i At4g38230)[5].

Kalmodulina obecna w łagiewce pyłkowej jest przypuszczalnym integratorem sygnałów pomiędzy  $\text{Ca}^{2+}$  a takimi elementami cytoszkieletu, jak: miozyna i vilina [49]. Wykazano, że spadek poziomu kalmoduliny po jednej stronie łagiewki powoduje obniżenie aktywności sekrecyjnej w tym rejonie i zmianę kierunku jej wzrostu [60]. Podobny efekt na kierunek wzrostu łagiewki wywołuje obniżenie poziomu cAMP. Dowiedziono, że traktowanie łagiewek pyłkowych związkami zwiększającymi poziom cAMP (forskolina) lub analogiem cAMP powoduje przejściowy wzrost aktywności kalmoduliny [60]. Natomiast zastosowanie inhibitora cyklazy adenylanowej powoduje spadek jej aktywności. Na tej podstawie autorzy sugerują, że kalmodulina łączy ścieżkę sygnalizacyjną fosfoinozytolową ze ścieżką cAMP [60].

## TRANSKRYPCJA

Poznanie ekspresji czynników transkrypcyjnych pozwoli znaleźć odpowiedź na pytanie, czy transkrypcja *de novo* jest niezbędna do kiełkowania ziarna pyłku i czy jest potrzebna w późniejszych etapach wzrostu łagiewki [6].

Analizy mikromacierzy potwierdzają, że poziom ekspresji czynników transkrypcyjnych oraz odpowiedzialnych za dojrzewanie mRNA w dojrzałym ziarnie pyłku jest niski w porównaniu z innymi genami pyłkowymi. Jedynym wyjątkiem są geny MADS. Członkowie rodziny bloku MADS są zaangażowani w kontrolę procesów rozwojowych, takich jak: organogeneza, czas kwitnienia, tworzenie owoców i rozwój endotelium [57]. Podobną rolę, czyli kontrolę procesów rozwojowych, mogą odgrywać podczas dojrzewania ziarna pyłku oraz wzrostu łagiewki pyłkowej. Ze 110

znanych genów bloku MADS, 79 jest obecnych na macierzy Affymetrix ATH1, 17 genów ulega ekspresji w ziarnie pyłku, a 9 z nich wykazuje wysoki poziom ekspresji, co świadczy o dużym udziale tej rodziny w transkryptomie ziarna pyłku. Należą one do nieklasycznych genów bloku MADS typu I oraz MIKC, których rola jest jeszcze nieznaną. W dojrzałym ziarnie pyłku obecne są transkrypty rodziny MIKC, takie jak: AGL104, AGL66, AGL30, AGL65, oraz typu I AGL29, AGL84, At4g14530 i AGL49 [59]. Białka MIKC oddziałują ze sobą tworząc pięć heterodimerskich kompleksów czynników transkrypcyjnych, które wiążą DNA z wysoką specyficznością *in vitro*: AGL30/66, AGL 65/66, AGL 94/66, AGL 30/104 i AGL 65/104 [82]. Potwierdzono występowanie licznych miejsc wiązania białek MIKC w promotorach wielu specyficznych późnych genów pyłkowych *Arabidopsis thaliana* [82]. Ponadto wykazano, iż brak lub mała ilość białek MIKC i ich kompleksów hamuje kiełkowanie *in vitro* łagiewek pyłkowych. W dojrzewającym ziarnie pyłku brak kompleksów MIKC wpływał znacząco na ekspresję ponad 1300 genów, a w szczególności biorących udział w głównych ścieżkach działania hormonów, procesach metabolicznych oraz w regulacjach potranslacyjnych białek. W dojrzewającym ziarnie pyłku kompleksy AtMIKC hamują ekspresję wczesnych genów pyłkowych i aktywują transkrypcję genów charakterystycznych dla dojrzałego ziarna pyłku [82].

W transkryptomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano też obecność czynnika DUO1, który jest nowym członkiem podrodziny specyficznych dla pyłku czynników transkrypcyjnych MYB. DUO1 ulega specyficznej ekspresji w linii komórek męskich, w ziarnie pyłku, a w szczególności w komórce generatywnej oraz komórkach plemnikowych. Mutacja genu *duo1* powoduje brak podziału komórki generatywnej. Na tej podstawie sądzi się, że czynnik ten może odpowiadać za rozpoczęcie podziału komórki dzięki aktywacji genów cykliny [63].

Wydaje się, że transkrypcja podczas kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej ma większe znaczenie niż początkowo przypuszczano, bowiem przynajmniej jeden transkrypt z każdej rodziny czynników transkrypcyjnych wykazuje ekspresję na dość wysokim poziomie [5,58]. Obserwowano również hamujący wpływ inhibitora transkrypcji (aktynomycyny D) na kiełkowanie i wzrost łagiewki pyłkowej *A. thaliana* [37,84]. Wznowienie aktywności transkrypcyjnej podczas wzrostu łagiewki pyłkowej wykazały badania u *Hyacinthus orientalis* [87]. Analiza transkryptomu ziarna pyłkowego oraz rosnącej *in vitro* łagiewki pyłkowej *A. thaliana*, która wykazała wzrost ilości transkryptów w okresie kiełkowania pyłku [84], wydaje się potwierdzać, że pomimo obecności w ziarnie pyłku długowiecznego mRNA, jądro łagiewki może być aktywne transkrypcyjnie.

## TRANSLACJA

W ziarnie pyłkowym wzorec ekspresji genów kodujących czynniki inicjacji translacji jest podobny do tego, jaki występuje w tkankach sporofitu. Jedynym wyjątkiem są tu białka PAB (*poly(A) binding protein*) [36]. U *A. thaliana* siedem

z ośmiu genów *PAB* wykazuje ekspresję w dojrzewającym ziarnie pyłku. Trzy białka PAB są specyficzne dla pyłku (PAB3, PAB6, PAB7), zaś PAB5 ulega wybiórczej, wysokiej ekspresji w pyłku. *PAB6* i *PAB7* należą do późnych podstawowych genów inicjacji translacji [37]. Rola białek PAB jest dwojaka: uczestniczą one w inicjacji translacji oraz mają wpływ na stabilność poli(A)mRNA [48]. Obecność ogona poli(A), do którego wiążą się białka PAB, nie jest konieczna do translacji, jednak mające go transkrypty charakteryzują się znacznie większą wydajnością tego procesu. Białka PAB oddziałują z czynnikiem inicjacji translacji eIF4G. Jednocześnie ich interakcja z białkiem wiążącym czapkę eIF4E powoduje cyrkularyzację mRNA, co ułatwia rybosomom recykling [8]. Z drugiej strony taka cyrkularyzacja zapobiega deadenylacji poprzez poli(A)rybonukleazy (PARN). Deadenylacja jest pierwszym krokiem prowadzącym do degradacji transkryptu [30]. Białka PAB ponadto mogą być zaangażowane w regulację czasu półtrwania cząsteczek mRNA zawierających specjalne sekwencje decydujące o ich stabilności, takie jak elementy bogate w AU (ARE) oraz mCRD [30]. Jest to szczególnie ważne dla ziaren pyłku, w których magazynowana jest duża pula długowiecznego mRNA, a kiełkowanie i wzrost łagiewki pyłkowej związane są z globalną inicjacją syntezy białek niezależnej od procesu transkrypcji. W związku z tym moment rozpoczęcia translacji oraz okres półtrwania mRNA musi podlegać ścisłej kontroli.

Badania u *A. thaliana* [55], ryżu [20] oraz pomidora [72] wykazały, że ponad 9% proteomu ziarna pyłku uczestniczy w dojrzewaniu białek, z tego aż 75% bierze udział w określaniu ich przeznaczenia (np. chaperoniny, cyklofiliny). Pozostaje to w zgodzie z hipotezą, że dojrzałe ziarno pyłku ma gotową maszynę niezbędną do syntezy i dojrzewania białek zaraz po jego uwodnieniu [55].

## TRANSPORT BŁONOWY

Liczne badania eksperymentalne dowiodły, że decydujące znaczenie dla wzrostu łagiewki pyłkowej mają gradienty takich jonów, jak:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  oraz  $\text{H}^+$ . Molekularna tożsamość transporterów odpowiedzialnych za ich utrzymanie pozostawała długo nieznana. Dopiero badania transkryptomu ziarna pyłku za pomocą mikromacierzy pozwoliły na zidentyfikowanie genów kodujących białka uczestniczące w transporcie jonów. W genomie *A. thaliana* wykryto 1269 genów kodujących transportery, z tego 757 transkryptów znajdowało się w transkryptomie męskiego gametofitu. 16% tej liczby, czyli 124 geny, w tym *AHA6*, *CNGC18*, *TIP1.3* i *CHX08* są specyficzne dla pyłku lub ulegają ekspresji na wysokim poziomie [10].

Wzrost łagiewki pyłkowej zachodzi w sposób pulsacyjny, towarzyszą mu oscylacyjne zmiany w stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  i protonów. Transport jonów i metabolitów w ziarnie pyłku konieczny jest nie tylko do pobierania składników odżywczych, utrzymania metabolizmu oraz produkcji energii podczas wzrostu, ale jest także związany z sygnalizacją komórkową, rozwojem oraz odpornością na stres [27]. Sieć sygnalizacyjna moduluje pompy, przENOŚniki i kanały w czasie i przestrzeni tak, aby

zgrać napływ jonów, ich gradient oraz oscylacje. Poziom transkryptów genów kodujących znane i przypuszczalne transportery błonowe osiąga znacznie wyższy poziom w dojrzałym ziarnie pyłku aniżeli w mikrosporze. Podkreśla to ich znaczenie podczas wzrostu łagiewki pyłkowej [10].

W utrzymaniu gradientu  $\text{Ca}^{2+}$  oraz jego oscylacjach przypuszczalnie ważną rolę odgrywają kanały wapniowe, takie jak: CNGC oraz pompy wapniowe ACA (*autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPases*) [10]. Genom *Arabidopsis* koduje 14 takich pomp, 10 z nich jest kontrolowana przez  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinę. Geny *ACA10* oraz *ACA13* ulegają ekspresji we wczesnych etapach dojrzewania ziarna pyłku [37]. Do późnych genów pyłkowych należą *ACA2*, *ACA7* oraz *ACA9*. Gen *ACA9* ulega ekspresji w ziarnie pyłku na bardzo wysokim poziomie, a jego produkt jest zlokalizowany w błonie plazmatycznej [68]. Uważa się, że kodowana przez gen *ACA9* pompa wapniowa w rosnącej łagiewce pyłkowej może brać udział w utrzymaniu homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$ , uczestniczyć w powstawaniu oscylacji wapniowych na wierzchołku, a także zapobiegać wzrostowi poziomu tych jonów do poziomu cytotoksyczności poprzez wypompowywanie na zewnątrz jonów  $\text{Ca}^{2+}$  pobieranych przez kanały wapniowe. Homozygotyczne mutanty genu *aca9* (tab. 2) miały obniżoną płodność, ziarna pyłku słabo kiełkowały, a wzrost łagiewek ulegał zahamowaniu [68].

Innym transporterem jonowym, którego transkrypty ujawniono w ziarnie pyłku *A. thaliana*, jest białko MIA (At5g23630), funkcjonujące jako P5 ATPaza [38]. Mutacje w genie *MIA* powodują brak rozpadu tetrad na pojedyncze mikrospory, które pozostają otoczone grubą, elektronowo gęstą ścianą. Błona komórkowa mikrospor często odrywa się od ściany, co prawdopodobnie jest spowodowane zaburzoną gospodarką kationową i problemami z utrzymaniem turgoru. Analiza mikromacierzy u takich mutantów ujawniła spadek ekspresji genów zaangażowanych w ścieżkę wydzielniczą, metabolizm ściany komórkowej i sygnalizację komórkową. Białko MIA obecne było w retikulum endoplazmatycznym oraz małych pęcherzykach pochodzenia retikularnego. Przypuszcza się, że białko to bierze udział w kontroli szlaku wydzielniczego. Prawdopodobnie wpływa na biogenezę białek oraz transport poprzez regulację homeostazy jonowej w kompartmentach ścieżki wydzielniczej [38].

W utrzymaniu oscylacji protonów w rosnącej łagiewce pyłkowej biorą prawdopodobnie udział pompy  $\text{H}^+$  (np. *AHA3*, *AHA6*, *AHA8* i *AHA9*), kotransportery  $\text{H}^+$  (np. *CHX*) oraz kanały anionowe (np. *CLC*), które zmieniają potencjał błonowy i pH [10]. Gen *AHA3* ulega transkrypcji na wysokim poziomie podczas wczesnych etapów rozwoju męskiego gametofitu. Natomiast geny *AHA6*, *AHA8* i *AHA9* należą do specyficznych późnych genów pyłkowych. Geny *AHA* kodują  $\text{H}^+$ -ATPazy typu P. Powstały gradient protonowy wykorzystywany jest do pobierania składników odżywczych. Nie można też wykluczyć udziału  $\text{H}^+$ -ATPazy typu P w odkładaniu składników ściany komórkowej oraz w sygnalizacji międzykomórkowej [61]. U obserwowanych mutantów *aha3 Arabidopsis thaliana* dochodziło do obumierania męskiego gametofitu już we wczesnych etapach jego rozwoju (tab. 2).

W dojrzałym ziarnie pyłku występuje wysoki poziom transkryptów kodujących kanały  $\text{K}^+$ -SPIK (AKT6) oraz SKOR [10]. Wydaje się, że dla wzrostu łagiewki pyłkowej ważny

jest kanał  $K^+$  AKT6, którego gen ulega w ziarnie pyłku specyficznej transkrypcji. Udowodniono, że jony potasu mogą odpowiadać za elongację komórek oraz transdukcję różnych sygnałów [16], a także wraz z innymi osmoprotektantami za utrzymanie turgoru [53]. W rosnącej łagiewce pyłkowej potencjałozależny kanał SPIK odpowiada za napływ do jej wnętrza jonów  $K^+$ . Analiza mutantu *spik-1* (tab. 2) wykazała, że wzrost rosnących *in vitro* łagiewek pyłkowych ulegał zahamowaniu, pomimo obecności w pożywce fizjologicznej ilości  $K^+$ . Natomiast w warunkach *in vivo* mutacja uniemożliwiała im konkutowanie w słupku z łagiewkami typu dzikiego [53]. Kanał SKOR jest przepuszczalny zarówno dla kationów jednowartościowych, takich jak  $K^+$ , jak i dwuwartościowych jonów  $Ca^{2+}$ . Jego aktywność regulowana jest cytoplazmatycznym pH – obniżenie pH powoduje hamowanie jego przepuszczalności [4].

Innymi ważnymi dla wzrostu łagiewki pyłkowej kanałami są kanały jonowe regulowane cyklicznymi nukleotydami, np. AtCNGC16 (At3g480110). Prawdopodobnie są one zaangażowane w kontrolę cytozolowego poziomu  $Ca^{2+}$ . Podniesienie poziomu cAMP lub cGMP powoduje napływ jonów  $Ca^{2+}$ , czego efektem jest wzrost poziomu wapnia w cytoplazmie łagiewki pyłkowej. Sugeruje się, że kanały AtCNGC są regulowane zarówno poprzez cykliczne nukleotydy, jak i kalmodulinę, bowiem mają miejsca wiązania dla obu tych molekuł. Ponieważ wiadomo, że cAMP ma wpływ na wzrost oraz orientację łagiewki pyłkowej, uważa się, że kanał AtCNGC16 pełni rolę łącznika pomiędzy wzrastającym poziomem cAMP i  $Ca^{2+}$  [5,10].

Kielkowanie, a w szczególności wzrost łagiewki pyłkowej wymagają dostarczania dużej ilości cukrów. U *A. thaliana* zidentyfikowano ekspresję kilku genów, należących do rodziny STP oraz SUC, których produkty białkowe mogą uczestniczyć w tym procesie. Białka należące do rodziny STP funkcjonują jako transportery  $H^+$ /monocukier. W dojrzewającym ziarnie pyłku wykryto transkrypty 5 transporterów monosacharydowych podlegające odmiennej regulacji podczas jego rozwoju. Gen *AtSTP2* ulega transkrypcji we wczesnych etapach dojrzewania ziarna pyłku. Transkrypty genów *AtSTP9*, *-4*, *-6* oraz *-11* są obecne w dojrzałym ziarnie pyłku, natomiast ich produkty białkowe pojawiają się dopiero po wykiełkowaniu łagiewki pyłkowej [70,71]. Poziom transkryptów genów *AtSTP* w dojrzałym pyłku jest bardzo wysoki, a *AtSTP11* (tab. 2) należy do 50 genów o najwyższym poziomie ekspresji w uwodnionym ziarnie pyłku [5]. Stąd wydaje się, że jest on w głównej mierze odpowiedzialny za dostarczanie monosacharydów do rosnącej łagiewki pyłkowej.

Niespecyficzne geny pyłkowe ulegające selektywnej ekspresji w ziarnie pyłku w stosunku do innych członków tej samej rodziny także odgrywają ważną rolę podczas wzrostu łagiewki. Przykładem tego rodzaju białka jest symporter  $H^+$ /sacharoza (At1g71880). Jest jedynym przedstawicielem rodziny SUC ulegającym ekspresji na wysokim poziomie w trójkomórkowym ziarnie pyłku. Mutanty *hap3* (genu *SUC1*) kiełkują, ale jego łagiewki pyłkowe są krótkie i nie przerastają tkanek słupka. Sugeruje to ważną rolę *SUC1* (tab. 2) w pobieraniu sacharozy podczas wzrostu łagiewki pyłkowej [39].

W ziarnie pyłku *A. thaliana* wykryto również transkrypty transporterów ABC, AGAP (aminokwasów), oligopeptydów oraz grup nitrowych (OPT i POT) [10].

TABELA. 2. Charakterystyka funkcjonalna białek zaangażowanych w transport błonowy w dojrzewającym ziarnie pyłku *A. thaliana* (wg [43], zmienione)

ACA9	Błona łagiewki pyłkowej	Pompa Ca <sup>2+</sup> ważna dla utrzymania homeostazy Ca <sup>2+</sup>	[68]
AHA3	Późna mikrospora i komórka przechodząca mitozę	Pompa H <sup>+</sup> generująca siłę do pobierania składników odżywczych	[61]
SPIK	Ziarno i łagiewka pyłkowa	Pobieranie jonów K <sup>+</sup> potrzebnych do wzrostu łagiewki pyłkowej	[53]
STP11	Białko występuje wyłącznie w łagiewce pyłkowej	Dostarczanie monosacharydów do rosnącej łagiewki pyłkowej	[70]
SUC1	Błona łagiewki pyłkowej	Pobieranie sacharozy przez rosnącą łagiewkę pyłkową	[73]

## CYKL KOMÓRKOWY

U większości zbadanych gatunków jądro komórki wegetatywnej zatrzymane jest w fazie G1 cyklu komórkowego. Analiza mikromacierzy ATH1, która zawiera sondy dla około 90% podstawowych genów cyklu komórkowego *A. thaliana*, pozwoliła na hipotetyczne wyjaśnienie mechanizmu zatrzymania cyklu komórkowego dojrzalego ziarna pyłku [58]. W transkryptomie ziarna pyłku całkowicie brak mRNA czynnika transkrypcji E2F-DP, który jest konieczny do przejścia cyklu komórkowego oraz cyklin typu D3, w tym cykliny CYCD3;1 promującej wejście w fazę S [21]. Cyklina D w komórkach somatycznych tworzy kompleks z zależną od cyklin kinazą typu A (CDKA), która fosforyluje białko retinoblastoma (Rb). Ufosforylowana forma Rb oddysocjowuje od kompleksu E2F/DP1, co umożliwia transkrypcję genów niezbędnych do przejścia z fazy G1 do S [79]. W przypadku braku cykliny D, czynnik transkrypcyjny E2F tworzy kompleks z nieufosforylowaną formą Rb. Kompleks ten wiążąc się z odpowiednimi genami hamuje ich ekspresję.

Ponadto w dojrzłym ziarnie pyłku odnotowano wysoki poziom transkryptów białek DEL (*DP-E2F-like*), podobnych do białek E2F, ale niemających domeny odpowiedzialnej za aktywację transkrypcji. Mogą one łączyć się z miejscami wiązania E2F. Wiązanie to jednak nie aktywuje transkrypcji odpowiednich genów [50]. W ziarnie pyłku *A. thaliana* ujawniono wysoki poziom ekspresji białek CKS1 oraz CKS2, o których wiadomo, że oddziałują z CDK i powodują zatrzymanie cyklu komórkowego [58].

Komórka generatywna ziarna pyłku przechodzi pełny cykl komórkowy, bowiem dzieli się mitotycznie na dwie komórki plemnikowe. Cykl komórkowy komórek plemnikowych jest bardzo słabo poznany. Najbardziej prawdopodobne wydaje się, iż – podobnie jak u innych organizmów rozmnażających się płciowo – do zapłodnienia pozostają w fazie G1. Natomiast badania wykazały, że jądra komórek plemnikowych *A. thaliana* w czasie pylenia znajdują się już w fazie S i tuż przed zapłodnieniem osiągają fazę G2 [28]. Informacja ta wydaje się pozostawać w zgodzie z wynikami badań transkryptomu dojrzalego ziarna pyłkowego *A. thaliana*. W dojrzłym ziarnie pyłku w przeważającej ilości występują transkrypty dużej

komórki wegetatywnej, ale są tam również obecne transkrypty dwu małych komórek plemnikowych. W ziarnie pyłku wśród transkryptów cyklu komórkowego wykryto wiele charakterystycznych dla przejścia z fazy G2 do M m.in. CDKA/B, CYCA, CYCB, CDKD, CYCH. Niektóre z nich np. CYCA2;1, CYCB3;1 [5] oraz CYCA1;2 mają liczne transkrypty [58]. Ponadto wykryto transkrypt AtMYB3R-4, którego najbliższymi homologami są geny tytoniu *NtmybA1* oraz *NtmybA2*. Produkty białkowe tych genów stanowią elementy aktywatorowe roślinnych promotorów cyklin typu B, które towarzyszą przejściu G2/M [3]. W ziarnie pyłku kompleksy cyklina-cyklinozależna kinaza, które odpowiadają za wejście w mitozę, są prawdopodobnie utrzymywane w formie nieaktywnej (pre-MPF). Zidentyfikowano tam bowiem transkrypty genu *WEE1*, kodującego kinazę utrzymującą tzw. fosforylację hamującą pre-MPF. Bardzo niski poziom transkrypcji wykazuje natomiast gen fosfatazy *CDC25*, którego białkowy produkt mógłby uaktywniać kompleksy cyklin z kinazami. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że komórki plemnikowe mogą być źródłem transkryptów lub białek odpowiedzialnych za wejście zygoty w mitozę [58]. Badania u *Zea mays* wykazały jednakże, że tuż po zapłodnieniu gwałtownie wzrasta ilość transkryptów genów, których produkty uczestniczą w replikacji [22], a ponadto jeszcze przed pierwszym podziałem zygoty *de novo* transkrybowane są geny regulatorowe cyklu komórkowego [66].

Interesujący wydaje się fakt, że podczas analizy transkryptomu dojrzałego ziarna pyłkowego *A. thaliana* nie wykazano w nim transkryptów zaangażowanych w ścieżkę smallRNA. Jeśli zostanie to potwierdzone poprzez badania funkcjonalne, komórka wegetatywna ziarna pyłku będzie pierwszą znaną strukturą niemającą potranskrypcyjnego mechanizmu wyciszającego [6,58].

## TRANSKRYPTOM KOMÓRKI GENERATYWNEJ ORAZ KOMÓREK PLEMNIKOWYCH

Analiza transkryptomu komórki generatywnej *Lilium longiflorum* za pomocą znaczników EST dowiodła, iż większość jej transkryptomu stanowią geny zaangażowane w naprawę DNA, aktywację cyklin oraz ubikwitynizację [56]. Na obecnym etapie badań wydaje się, że żadna inna komórka roślinna nie wykazuje tak wysokiego stopnia specyficzności transkryptów jak komórka generatywna. Podobnie wysoki poziom specyficzności obserwowany jest w komórkach spermatogennych myszy oraz jądrach *Drosophila* [56].

Dzięki zastosowaniu metody FACS udało się wyizolować komórki plemnikowe *A. thaliana*, powstałe po podziale komórki generatywnej oraz przeprowadzić analizę transkryptomu na mikromacierzy ATH1 [12]. Najwyższy poziom ekspresji zaobserwowano w kategoriach: metabolizm DNA (w szczególności replikacja oraz naprawa), programowana destrukcja białek poprzez ubikwitynizację i cykl komórkowy. Proces degradacji białek przez ubikwitynizację odgrywa ważną rolę podczas spermatogenezy ssaków, w zastępowaniu histonów protaminami oraz w innych kluczowych procesach gametogenezy oraz zapłodnienia [12]. U roślin proces zamiany histonów na protaminy podczas spermatogenezy obserwowano u niektórych gatunków glonów [59].

W transkryptomie komórek plemnikowych *A. thaliana* wykryto też obecność czynników transkrypcyjnych. Są to trzy czynniki typu Dof (At3g47500, At5g39660, At5g62430) [12], prawdopodobnie wiążące pyłkowo specyficzne promotory *AtGEX1* i *AtGEX2* [25]. Najwyższy poziom wśród czynników transkrypcyjnych wykazują czynniki MYB. Zdecydowanie mniej liczne są natomiast czynniki transkrypcyjne *scarecrow* należące do rodziny GRAS [11]. Ich rola w komórkach plemnikowych pozostaje nieznana. Natomiast w komórkach merystemu korzenia *A. thaliana* biorą udział w asymetrycznym podziale i tworzeniu radialnego (promienistego) wzorca różnicowania [32].

Geny o wysokim poziomie ekspresji w komórkach plemnikowych prawdopodobnie odgrywają ważną rolę w rozwoju męskich gamet oraz zapłodnieniu. Do tej grupy genów można zaliczyć geny kodujące białko (*At1g23210*) należące do rodziny hydrolaz glikozylowych. U ssaków hydrolaza glikozyłowa PH-20 zlokalizowana jest w błonie akrosomalnej, gdzie odgrywa ważną rolę podczas adhezji plemnika do osłony przejrzystej jaja [44]. Przed zapłodnieniem plemniki ssaków przechodzą proces kapacytacji polegający na wewnątrzkomórkowej alkalizacji oraz zmianie potencjału błonowego. Zachodzi on wskutek napływu do wnętrza komórki jonów  $Ca^{2+}$  i wypływu z komórki jonów  $K^+$ . Sugeruje się, że w męskich gametach roślin może zachodzić proces podobny do kapacytacji plemników, bowiem w komórkach plemnikowych *Arabidopsis thaliana* występuje wysoki poziom transkryptów genu *AtTPK2* (*KCO2*), którego produkt odpowiada za homeostazę  $K^+$  [12]. Inne białka kanałowe ulegające ekspresji na wyższym poziomie w komórkach plemnikowych aniżeli w ziarnie pyłku prawdopodobnie odpowiadają za utrzymanie turgoru (MSL2\At5g10490, MSL3\At1g58200) [12].

W komórkach plemnikowych wydaje się też funkcjonować system sygnalizacji, aczkolwiek niektóre skomplikowane kaskady przekazywania sygnału wydają się być uproszczone i specyficzne. Jak wykazały badania, geny kodujące białka biorące udział w sygnalizacji mają ograniczoną ekspresję, np. ekspresji ulega tylko kilku przedstawicieli z rodziny kinaz receptorowych lektyn, jeden przekaźnik auksyn oraz jeden przedstawiciel rodziny kinaz MAPKK3 [12]. Geny kinaz MAPKKK19-\At3g50310 oraz MAPKKK20\At5g40440 ulegają ekspresji na bardzo wysokim poziomie, a zarazem są specyficzne dla komórek plemnikowych.

Jednym z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów jest metylacja chromatyny. Poziom ekspresji genu związany jest ze stopniem metylacji DNA w sekwencji promotora, im jest on większy, tym słabsza ekspresja danego genu. U Eukariota mamy do czynienia z dwoma typami metylacji: symetryczną CG lub CNG oraz niesymetryczną (non-CG). Poprzez metylację kontrolowane są istotne procesy związane z rozwojem organizmu [52]. Wiadomo, że podczas wczesnych faz rozwoju u ssaków dochodzi do zmiany wzorca metylacji.

Analiza transkryptomu komórek plemnikowych *A. thaliana* ujawniła obecność transkryptów genów odpowiedzialnych za epigenetyczną kontrolę genomu (tab. 3). Wśród nich najwyższy poziom ekspresji wykazywały: AGO9, DDM1, DRB4, MET1 oraz SUVH5 [12]. Odpowiadają one za RdDM – metylację DNA kontrolowaną

TABELA 3. Geny zaangażowane w RdDM, których ekspresję wykazano w komórkach plemnikowych *A. thaliana* (wg [12, 53])

Gen	Numer AGI	Aktywność	Funkcja
<i>NRDP1b</i>	At2g40030	Podjednostka polimerazy IVb	Metylacja DNA <i>de novo</i>
<i>DDMI</i>	At5g66750	SWI2/SNF2-czynnik remodelujący chromatynę	Utrzymanie metylacji CG
<i>HEN1</i>	At4g20910	Metylaza RNA	Metylacja 21-24 nt siRNA
<i>MET1</i>	At5g49160	Metylotransferaza DNA	Utrzymanie metylacji CG
<i>SUVH5</i>	At2g35160	Metylotransferaza lizyny 9 histonu H3	Metylacja histonu, utrzymanie metylacji non-CG przez CMT3 [23]

przez siRNA [81]. Jednakże brak części transkryptów biorących udział w ścieżce siRNA, np. CMT3 i CL3 może świadczyć o innym jej przebiegu w komórkach plemnikowych [12]. Niewykrycie transkryptów szlaku siRNA w transkryptomie całych ziaren pyłkowych mogło być efektem „rozcieńczenia”, wynikającego z bardzo niskiego ich poziomu w porównaniu z transkryptami charakterystycznymi dla komórki wegetatywnej [58]. W tej sytuacji transkrypty plemnikowe mogły być traktowane przez oprogramowanie do sczytywania mikromacierzy jako tło.

W epigenetyczną kontrolę genomu komórek plemnikowych prawdopodobnie zaangażowana jest także cząsteczka Morpheus' 1 (MOM1), która odpowiada za niezależne od metylacji DNA wyciszanie wysoce powtarzalnych sekwencji [78].

Najwyższy poziom ekspresji w komórkach plemnikowych *A. thaliana* wykazywał gen *At3g62230* kodujący białko F-box. Ponadto w transkryptomie stwierdzono obecność wielu innych białek z grupy F-box. C-koniec białka F-box zawiera domeny odpowiedzialne za specyficzną wiązanie substratu, który jest później celem degradacji poprzez kompleks SCF ubikwityna-ligaza. Tak duża ilość i różnorodność transkryptów odpowiedzialnych za degradację białek jest niezbędna do rozkładu molekuł potrzebnych podczas wczesnych etapów mikrogametogenezy, np. regulatorów cyklu komórkowego [12]. Wydaje się również, że transkrypty lub białka przechowywane w komórkach plemnikowych mogą być przenoszone do komórki jajowej oraz centralnej, a po zapłodnieniu odgrywać ważną rolę podczas wczesnego rozwoju embrionalnego.

## ZAKOŃCZENIE

Przetawione przez nas wyniki badań transkryptomu i proteomu pyłkowego stanowią niewątpliwie ogromny krok naprzód w zrozumieniu genetycznych mechanizmów rozwoju i różnicowania się męskiego gametofitu roślin okrytonasiennych. Na uwagę zasługuje fakt, iż badania proteomu pyłkowego takich gatunków, jak

*Arabidopsis* czy *Oryza*, w dużym stopniu potwierdzają i uzupełniają wyniki badań prowadzonych przy użyciu mikromacierzy. Uzyskane informacje nie tylko znacznie powiększają obecną wiedzę na temat molekularnych podstaw płciowego rozmnażania roślin, ale także stawiają szereg nowych pytań i problemów, z którymi zmierzą się embriologowie roślin. Przykładem jest choćby niezwykle ciekawa kwestia niewykrycia w komórce wegetatywnej ziarna pyłku *A. thaliana* aktywności genów związanych ze szlakiem małych RNA odpowiedzialnych za wyciszanie genów, czy też wybiórcza ekspresja specyficznych czynników transkrypcyjnych z rodziny bloku MADS. Nie jest wykluczone, że regulacja ekspresji genów w komórkach męskiego gametofitu roślin okrytonasiennych przebiega w odmienny sposób aniżeli w tkankach wegetatywnych. Niewątpliwie kolejna dekada badań transkryptomu i proteomu pyłkowego pozwoli odpowiedzieć na stawiane obecnie pytania.

## LITERATURA

- [1] ALFIERI JA, MARTIN AD, TAKEDA J, KONDOH G, MYLES DG, PRIMAKOFF P. Infertility in female mice with an oocyte-specific knock-out of GPI-anchored proteins. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2149–2155.
- [2] ALVES-FERREIRA M, WELLMER F, BANHARA A, KUMAR V, RIECHMANN JL, MEYEROWITZ EM. Global expression profiling applied to the analysis of *Arabidopsis* stamen development. *Plant Physiol* 2007; **145**: 745–762.
- [3] ARAKI S, ITO M, SOYANO T, NISHIHAMA R, MACHIDA Y. Mitotic cyclins stimulate the activity of c-myc-like factors for transactivation of G<sub>2</sub>/M phase-specific genes in tobacco. *J Biol Chem* 2004; **279**: 32979–32988.
- [4] BECKER D, GEIGER D, DUNKEL M, ROLLER A, BERTELA, LATZ A, CARPANETO A, DIETRICH P, ROELFSEMA MRG, VOELKER C, SCHMIDT D, MUELLER-ROEBER B, CZEMPIŃSKI K, HEDRICH R. AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 15621–15626.
- [5] BECKER JD, BOAVIDA LC, CARNEIRO J, HAURY M, FEIJÓ JA. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristic of the pollen transcriptome. *Plant Physiol* 2003; **133**: 713–725.
- [6] BECKER JD, FEIJÓ JA. How many genes are needed to make pollen tube? Lessons from transcriptomics. *Ann Bot* 2007; **100**: 1117–1123.
- [7] BEDNARSKA E, LENARTOWSKA M. Rola wapniowego systemu przekazywania sygnałów w regulacji wzrostu łagiewek pyłkowych. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 467–479.
- [8] BELOSTOTSKY DA. Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants: three conserved lineages that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics* 2003; **163**: 311–319.
- [9] BOAVIDA LC, BECKER JD, FEIJÓ JA. The making of gametes in higher plants. *Int J Dev Biol* 2005; **49**: 595–614.
- [10] BOCK KW, HONYS D, WARD JM, PADMANABAM S, NAWROCKI EP, HIRSCHI KD, TWELL D, SZE H. Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. *Plant Physiol* 2006; **140**: 1151–1168.
- [11] BOLLE C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 2004; **218**: 683–692.
- [12] BORGES F, GOMES G, GARDNER R, MORENO N, McCORMICK S, FEIJÓ JA, BECKER JD. Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells. *Plant Physiol* 2008; **148**: 1168–1181.
- [13] BORNER GH, SHERRIER DJ, STEVENS TJ, ARKIN IT, DUPREE P. Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A genomic analysis. *Plant Physiol* 2002; **129**: 486–499.
- [14] BOSCH M, CHEUNG AY, HEPLER PK. Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol* 2005; **138**: 1334–1346.

- [15] CARLAND FM, NELSON T. Cotyledon vascular pattern2-mediated inositol (1,4,5) triphosphate signal transduction is essential for closed venation patterns of *Arabidopsis* foliar organs. *Plant Cell* 2004; **16**: 1263–1275.
- [16] CHÉREL I. Regulation of K<sup>+</sup> channel activities in plants: from physiological to molecular aspects. *J Exp Bot* 2004; **55**: 337–351.
- [17] CHEUNG AY, CHEN CY, GLAVEN RH, DE GRAAF BH, VIDALI L, HEPLER PK, WU HM. Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth. *Plant Cell* 2002; **14**: 945–962.
- [18] CHEVALIER F, MARTIN O, ROFIDAL V, DEVAUCHELLE AD, BARTEAU S, SOMMERER N, ROSSIGNOL M. Proteomic investigation of natural variation between *Arabidopsis* ecotypes. *Proteomics* 2004; **4**: 1372–1381.
- [19] DA COSTA-NUNES JA, GROSSNIKLAS U. Unveiling the gene-expression profile of pollen. *Genome Biol* 2003; **5**: 205.
- [20] DAI S, CHEN T, CHONG K, XUE Y, LIU S, WANG T. Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. *Mol Cell Proteomics* 2007; **6**: 207–230.
- [21] DEWITTE W, MURRAY JA. The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 235–264.
- [22] DRESSELHAUS T, SRILUNCHANG KO, LELJAK-LEVANIC D, SCHREIBER DN, GARG P. The fertilization induced-DNA replication factor MCM6 of maize shuttles between cytoplasm and nucleus, and is essential for plant growth and development. *Plant Physiol* 2006; **140**: 512–527.
- [23] EBBS ML, BENDER J. Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* 2006; **18**: 1166–1176.
- [24] ENGEL ML, CHABOUD A, DUMAS C, McCORMICK S. Sperm cells of *Zea mays* have a complex complement of mRNAs. *Plant J* 2003; **34**: 697–707.
- [25] ENGEL ML, HOLMES-DAVIS R, McCORMICK S. Green sperm. Identification of male gamete promoters in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2005; **138**: 2124–2133.
- [26] FAN X, HOU J, CHEN X, CHAUDHRY F, STAIGER CJ, REN H. Identification and characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent actin filament-severing protein from lily pollen. *Plant Physiol* 2004; **136**: 3979–3989.
- [27] FEIJÓ JA, SAINHAS J, HOLDAWAY-CLARKE T, CORDEIRO MS, KUNKEL JG, HEPLER PK. Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube paradigm. *Bioessays* 2001; **23**: 86–94.
- [28] FRIEDMAN WE. Expression of the cell cycle in sperm of *Arabidopsis*: implications for understanding patterns of gametogenesis and fertilization in plants and other eukaryotes. *Development* 1999; **126**: 1065–1075.
- [29] GIOVANE A, SERVILLO L, BALESTRIERI C, RAIOLAA, D'AVINO R, TAMBURRINI M, CIARDIELLO MA, CAMARDELLA L. Pectin methyltransferase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1696**: 245–252.
- [30] GORGONI B, GRAY NK. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2004; **3**: 125–141.
- [31] GOUBET F, MISRAHI A, PARK SK, ZHANG Z, TWELL D, DUPREE P. AtCSLA7, a cellulose synthase-like putative glycosyltransferase, is important for pollen tube growth and embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **131**: 547–557.
- [32] HEIDSTRA R, WELCH D, SCHERES B. Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev* 2004; **18**: 1964–1969.
- [33] HEPLER PK, VIDALI L, CHEUNG AY. Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 159–187.
- [34] HOLMES-DAVIS R, TANAKA CK, VENSEL WH, HURKMAN WJ, McCORMICK S. Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 2005; **5**: 4864–4884.
- [35] HONY D, COMBE JP, TWELL D, ČAPKOVÁ V. The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during maturation. *Sex Plant Reprod* 2000; **13**: 135–144.
- [36] HONY D, TWELL D. Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiol* 2003; **132**: 640–652.
- [37] HONY D, TWELL D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 2004; **5**: R85.
- [38] JAKOBSEN MK, POULSEN LR, SCHULZA, FLEURAT-LESSARD P, MØLLERA, HUSTED S, SCHIØTT M, AMTMANN A, PALMGREN MG. Pollen development and fertilization in *Arabidopsis* is dependent on the male gametogenesis impaired anthers gene encoding a type V P-type ATP-ase. *Genes Dev* 2005; **19**: 2757–2769.

- [39] JOHNSON MA, VON BESSER K, ZHOU Q, SMITH E, AUX G, PATTON D, LEVIN JZ, PREUSS D. *Arabidopsis* hapless mutations define essential gametophytic functions. *Genetics* 2004; **168**: 971–982.
- [40] KAOTHEN P, OK SH, SHUAI B, WENGIER D, COTTER R, KELLEY D, KIRIAKOPOLOS S, MUSCHIETTI J, McCORMICK S. Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. *Plant J* 2005; **42**: 492–503.
- [41] KERIM T, IMIN N, WEINMAN JJ, ROLFE BG. Proteome analysis of male gametophyte development in rice anthers. *Proteomics* 2003; **3**: 738–751.
- [42] KIM HU, COTTER R, JOHNSON S, SENDA M, DODDS P, KULIKAUSKAS R, TANG W, EZCURRA I, HERZMARK P, McCORMICK S. New pollen-specific receptor kinases identified in tomato, maize and *Arabidopsis*: the tomato kinases show overlapping but distinct localization patterns on pollen tubes. *Plant Mol Biol* 2002; **50**: 1–16.
- [43] LALANNE E, HONYSD, JOHNSON A, BORNER GH, LILLEY KS, DUPREE P, GROSSNIKLAUS N, TWELL D. SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **16**: 229–240.
- [44] LATHROP WF, CARMICHAEL PE, MYLES DG, PRIMAKOFF P. cDNA cloning reveals the molecular structure of sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol* 1990; **111**: 2939–2949.
- [45] LEE JY, LEE DH. Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol* 2003; **132**: 517–529.
- [46] LENARTOWSKA M, MICHALSKAA. Actin filament organization and polarity in pollen tubes revealed by myosin II subfragment 1 decoration. *Planta* 2008; **228**: 891–896.
- [47] LIMMONGKON A, GIULIANI C, VALENTA R, MITTERMANN I, HEBERLE-BORS E, WILSON C. MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **324**: 382–386.
- [48] LUO K, DENG W, XU S, PEI Y. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* poly(A)binding protein PAB5 gene promoter in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Rep* 2008; **27**: 1811–1819.
- [49] MALHÓ R, LIU Q, MONTEIRO D, RATO C, CAMACHO L, DINIS A. Signalling pathways in pollen germination and tube growth. *Protoplasma* 2006; **228**: 21–30.
- [50] MARICONTIL, PELLEGRINI B, CANTONIR, STEVENS R, BERGOUNIOUX C, CELLA R, ALBANI D. The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9911–9919.
- [51] MASCARENHAS JP. The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* 1989; **1**: 657–664.
- [52] MATZKE M, KANNO T, HUETTEL B, DAXINGER L, MATZKE AJ. Targets of RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 512–519.
- [53] MOULINE K, VÉRY AA, GAYMARD F, BOUCHEREZ J, PILOT G, DEVIC M, BOUCHEZ D, THIBAUD JB, SENTENAC H. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K<sup>+</sup> channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2002; **16**: 339–350.
- [54] MUSCHIETTI J, EYAL Y, MCCORMICK S. Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *Plant Cell* 1998; **10**: 319–330.
- [55] NOIR S, BRÄUTIGAMA, COLBY T, SCHMIDT J, PANSTRUGA R. A reference map of the *Arabidopsis thaliana* mature pollen proteome. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **337**: 1257–1266.
- [56] OKADA T, SINGH MB, BHALLA PL. Transcriptome profiling of *Lilium longiflorum* generative cells by cDNA microarray. *Plant Cell Rep* 2007; **26**: 1045–1052.
- [57] PARENICOVÁ L, DE FOLTER S, KIEFFER M, HORNER DS, FAVALLI C, BUSSCHER J, COOK HE, INGRAM RM, KATER MM, DAVIES B, ANGENENT GC, COLOMBO L. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 2003; **15**: 1538–1551.
- [58] PINA C, PINTP F, FEIJO JA, BECKER JD. Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol* 2005; **138**: 744–756.
- [59] POPŁOŃSKA K, WOJTCZAK A, KWIATKOWSKA M, KAŻMIERCZAK A. Cytochemical and immunocytochemical studies of the localization of histones and protamine-type proteins in spermatids of *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; **45**: 367–374.
- [60] RATO C, MONTEIRO D, HEPLER PK, MALHÓ R. Calmodulin activity and cAMP signalling modulate growth and apical secretion in pollen tubes. *Plant J* 2004; **38**: 887–897.

- [61] ROBERTSON WR, CLARCK K, YOUNG JC, SUSSMAN MR. An *Arabidopsis thaliana* plasma membrane proton pump is essential for pollen development. *Genetics* 2004; **168**: 1677–1687.
- [62] RODRIGUEZ-PENA JM, RODRIGUEZ C, ALVAREZ A, NOMBELA C, ARROYO J. Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarized growth sites. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2549–2558.
- [63] ROTMAN N, DURBARRY A, WARDLE A, YANG WC, CHABOUDA, FAURE JE, BERGER F, TWELL D. A novel class of MYB factors controls sperm cell formation in plants. *Curr Biol* 2005; **15**: 244–248.
- [64] ROUDIER F, FERNANDEZ AG, FUJITA M, HIMMELSPACH R, BORNER GH, SCHINDELMAN G, SONG S, BASKIN TI, DUPREE P, WASTENEYS GO, BENFEY PN. COBRA, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *Plant Cell* 2005; **17**: 1749–1763.
- [65] ŠAMAJ J, MÜLLER J, BECK M, BÖHM N, MENZEL D. Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 594–600.
- [66] SAUTER M, VON WIEGEN P, LÖRZ H, KRANZ E. Cell cycle regulatory genes from maize are differentially controlled during fertilization and first embryonic cell division. *Sex Plant Reprod* 1998; **11**: 41–48.
- [67] SCHINDELMAN G, MORIKAMIA, JUNG J, BASKIN TI, CARPITA NC, DERBYSHIRE P, MCCANN MC, BENFEY PN. COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2001; **15**: 115–1127.
- [68] SCHICHT M, ROMANOWSKY SM, BAEKGAARD L, JAKOBSEN MK, PALMGREN MG, HARPER JF. A plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump is required for normal tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 9502–9507.
- [69] SCHMID M, UHLENHAUT NH, GODARD F, DEMAR M, BRESSAN R, WEIGEL D, LOHMANN JU. Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 2003; **130**: 6001–6012.
- [70] SCHNEIDEREIT A, SCHOLZ-STARKE J, BÜTTNER M. Functional characterization and expression analyses of the glucose-specific AtSTP9 monosaccharide transporter in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **133**: 182–190.
- [71] SCHNEIDEREIT A, SCHOLZ-STARKE J, SAUER N, BÜTTNER M. AtST11, a pollen tube specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Planta* 2005; **221**: 48–55.
- [72] SHEORAN IS, ROSS AR, OLSON DJ, SAWHNEY VK. Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *J Exp Bot* 2007; **58**: 3525–3535.
- [73] SIVITZ AB, REINDERS A, WARD JM. *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiol* 2008; **147**: 92–100.
- [74] SUEN DF, WU SSH, CHANG CHANG H, DHUGGA KS, HUANG AHC. Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen. *J Biol Chem* 2003; **278**: 43673–43681.
- [75] TAKAHASHI T, MU JH, GASCH A, CHUA NH. Identification by PCR of receptor-like protein kinases from *Arabidopsis* flower. *Plant Mol Biol* 1998; **37**: 587–596.
- [76] TANG W, KELLEY D, EZCURRA I, COTTER R, MCCORMICK S. LeSTIG1, an extracellular binding partner for the pollen receptor kinases LePRK1 and LePRK2, promotes pollen tube growth *in vitro*. *Plant J* 2004; **39**: 343–353.
- [77] TWELL D, OH SA, HONY S. Pollen development, a genetic and transcriptomic review. W: Malhó R (red.) The pollen tube. A cellular and molecular perspective. Berlin, Springer-Verlag, *Plant Cell Monographs* 2006; **3**: 15–45.
- [78] VAILLANT I, SCHUBERT I, TOURMENTE S, MATHIEU O. MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequence in *Arabidopsis*. *EMBO Rep* 2006; **7**: 1273–1278.
- [79] VANDEPOELE K, RAES J, DE VEYLDER L, ROUZÉ P, ROMBAUTS S, INZÉ D. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2002; **14**: 903–916.
- [80] VANTARD M, BLANCHOIN L. Actin polymerization processes in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 502–506.
- [81] VAZQUEZ F. *Arabidopsis* endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 460–468.
- [82] VERELST W, TWELL D, DE FOLTER S, IMMINK R, SAEDLER H, MÜNSTER T. MADS-complexes regulate transcriptome dynamics during pollen maturation. *Genome Biol* 2007; **8**: R249.
- [83] WANG ML, HSU CM, CHANG LC, WANG CS, SU TH, HUANG YJ, JIANG L, JAUH GY. Gene expression profiles of cold-stored and fresh pollen to investigate pollen germination and growth. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 1519–1528.

- [84] WANG Y, ZHANG WZ, SONG LF, ZOU JJ, SU Z, WU WH. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008; **148**: 1201–1211.
- [85] WENGIER D, VALSECCHI I, CABANAS ML, TANG WH, McCORMICK S, MUSCHIETTI J. The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 6860–6865.
- [86] ZIENKIEWICZ K, SMOLIŃSKI DJ, BEDNARSKA E. Distribution of poly(A)RNA and splicing machinery elements in *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains and pollen tubes growing *in vitro*. *Protoplasma* 2006; **227**: 95–103.
- [87] ZIENKIEWICZ K, ZIENKIEWICZA A, SMOLIŃSKI DJ, RAFIŃSKA K, ŚWIDZIŃSKI M, BEDNARSKA E. Transcriptional state and distribution of poly(A) RNA and RNA polymerase II in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains. *Sex Plant Rep* 2008; **21**: 233–245.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 11.03. 2009 r.*

*Przyjęto: 30.04. 2009 r.*

*Katarzyna Rafińska*

*Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,*

*Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika*

*Toruń, 87-100, ul. Gagarina 9,*

*e-mail: katraf@umk.pl*