

## NUKLEOTYDY POZAKOMÓRKOWE W ŚWIECIE ROŚLIN\*

### EXTRACELLULAR NUCLEOTIDES IN PLANTS

Marek MARZEC

Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski  
w Katowicach

*Streszczenie:* Pozakomórkowe nukleotydy (eNTP), czyli nukleotydy występujące poza obszarem cytoplazmy, w matriks pozakomórkowej, zostały odkryte prawie 100 lat temu w komórkach zwierzęcych. Okazało się, że nukleotydy nie tylko mogą budować nić DNA/RNA czy być rezerwuarem energii dla różnych procesów biochemicznych (jak np. ATP czy GTP), ale również mogą pełnić istotną funkcję w koordynacji wzrostu i rozwoju komórek. Dodatkowo zaangażowane są one w zachowanie homeostazy całego organizmu zwierzęcego przez utrzymywanie odpowiedniego ciśnienia krwi czy odpowiedź immunologiczną. Scharakteryzowanie receptorów (purynoceptorów) rozpoznających pozakomórkowe nukleotydy oraz enzymów (apyraz), które działając w matriks pozakomórkowej mogą przeprowadzać hydrolizę eNTP, pozwoliło na lepsze poznanie roli, jaką nukleotydy te pełnią w komórkach. Nukleotydy pozakomórkowe syntetyzowane są w obrębie cytoplazmy komórki, a następnie transportowane do matriks pozakomórkowej. Wskazano trzy różne drogi sekrecji nukleotydów obejmujące: stopniową – polegającą na wydzielaniu ich przez egzocytozę pęcherzyków; szybką – wydzielanie przez kanały jonowe i trzecią przy udziale transporterów oporności wielolekowej. Powszechność występowania eNTP oraz istotna rola, jaką pełnią u zwierząt, kazała przypuszczać, iż podobny system regulacji wzrostu i rozwoju komórek czy odbierania sygnałów ze środowiska może być obecny w świecie roślin. Pierwsze doniesienia o możliwości występowania pozakomórkowych nukleotydów u roślin pochodzą z lat 70. ubiegłego wieku, z badań nad wpływem egzogennie podawanego ATP na zamknięcie pułapki mucholówki, działanie aparatu szparkowego komeliny czy szybkość podziałów komórkowych pylnika lili. Jednak dowody na to, że pozakomórkowe nukleotydy mogą pełnić funkcje równie ważne, jak w komórkach zwierzęcych, pojawiły się na przestrzeni kilku ostatnich lat. Wyniki badań wskazują, że eNTP mogą być zaangażowane w odpowiedzi roślin na stres biotyczny i abiotyczny czy udział w rozwoju oraz wroście komórek. Zaczęto poznawać mechanizmy odbioru i inaktywacji sygnału wzbudzanego przez nukleotydy pozakomórkowe, m.in. u coraz większej liczby gatunków roślin są identyfikowane białka z rodziny apyraz przeprowadzających hydrolizę eATP (pozakomórkowego ATP). Wykazano, iż mutacja tego enzymu u *Arabidopsis thaliana* skutkuje zaburzeniem wzrostu siewek oraz sterylnością roślin powodowaną niekielkowaniem ziaren pyłku. Badania nad rozwojem włośników ryżu, gdzie zachodzi wzrost szczytowy, wskazały na istotną rolę apyraz w wydłużaniu wypustki włośnikowej.

\*Praca współfinansowana w ramach projektu COTS FA0604, badań własnych Katedry Genetyki (1R-0110-009) oraz projektu UPGOW współfinansowanego przez Unię Europejską (zadanie 55, podzadanie 482- stypendia dla doktorantów).

Udowodniono również występowanie większych stężeń nukleotydów pozakomórkowych w obszarach dynamicznego wzrostu czy różnicowania komórek. Badania komórek roślinnych pokazały, iż pozakomórkowe nukleotydy są cząsteczkami sygnałowymi indukującymi zmiany stężenia jonów wapnia w cytoplazmie lub wytwarzanie reaktywnych form tlenu. Mechanizmy te należą do jednych z najbardziej uniwersalnych i podstawowych w świecie roślin. Dodatkowo wykazano wzrost stężenia eATP w miejscu zranienia bądź w odpowiedzi na atak patogennych grzybów czy w warunkach stresu osmotycznego. Oznacza to, że pozakomórkowe nukleotydy odgrywają ważną rolę w aktywowaniu roślinnych mechanizmów obronnych oraz umożliwiają dostosowanie się organizmu do nowych warunków środowiska. Występowanie pozakomórkowych nukleotydów może być bardzo stare ewolucyjnie i towarzyszyć roślinom już od milionów lat. U zielenic odkryto białka homologiczne do apyrazy, jak również receptory częściowo podobne do purynoceptorów. Ponieważ rośliny już we wczesnym dewonie narażone były na kontakt z grzybami, początków powstania mechanizmu obrony przed tymi patogenami należy szukać w tak odległych czasach. Badania nad reakcją glonów na fragmenty ścian komórkowych grzybów wykazały, że jest ona oparta na zwiększeniu sekrecji ATP na zewnątrz cytoplazmy. Podobne wyniki otrzymano dla odpowiedzi komórek glonu na zranienie. Połączenie informacji o powszechnym występowaniu nukleotydów pozakomórkowych, ich wczesnym pochodzeniu ewolucyjnym, udziale w koordynacji wzrostu i rozwoju komórek oraz pełnieniu ważnej funkcji w odpowiedzi na stresy biotyczne oraz abiotyczne wskazuje na eNTP, jako kluczowe cząsteczki sygnałowe w świecie roślin. W pracy przedstawiono przegląd artykułów potwierdzających tę hipotezę.

*Słowa kluczowe:* nukleotydy pozakomórkowe (eNTP), apyrazy, purynoceptory, sygnalizacja, odpowiedź na stres.

*Summary:* Extracellular nucleotides (eNTP) occur outside the cytoplasm in the extracellular matrix, were discovered almost 100 years ago in animal cells. These studies showed that the nucleotides are not only building a strand of DNA/RNA or constitute reservoir of energy (eg ATP or GTP) for various biochemical processes, but also may play role in cell growth and development. Extracellular nucleotides are also involved in maintaining homeostasis in the whole animal organism by maintaining adequate blood pressure and immune response. Characterization of receptors that recognize extracellular nucleotides (purynoceptors) and enzymes that act in the extracellular matrix caring out the hydrolysis of eNTP, and thus regulating their levels, made possible a better understanding of the role of extracellular nucleotides play in cells. Extracellular nucleotides are synthesized within the cytoplasm of the cell and then secreted into the extracellular matrix. Three different ways of eNTP transferring were identified, including their gradual secretion by exocytosis of secretory vesicles, rapid – by the ion channels or in the association with multidrug resistance transporters. The prevalence of eNTP and the important role they play in animals allowed for assumption that a similar system of regulation of cell growth and development may occur in plants. First reports about the possibility of the presence of extracellular nucleotides in plants were given in the 70's last century. First studies were focused on the effect of exogenously administered ATP on closure of the trap flycatchers, on the modulation of stomatal guard cell aperture and on the cell division. However, evidences that they may serve as important function as in the animal cells appeared recently. Botanists have only just started to explore the mechanisms underlying their actions. This paper presents results of the researches that show the importance of the eNTP in plant response to biotic and abiotic stresses and on cell development and growth. The family of proteins called apyrases are identified in increasing number of plant species. Their mutations cause disruption in *Arabidopsis* seedling growth, and plants are sterile due to lack of germination of pollen grains. Studies on development of rice root hairs (that also show a tip growth as in a case of germination of pollen grains) revealed a major role of apyrases. Studies carried out on plant cells showed that extracellular nucleotides are signaling molecules inducing cell response – production of reactive oxygen species or changes in calcium ion concentration in the cytoplasm. These mechanisms are the most universal and fundamental in the world of plants. Additionally, they proved to increase the concentration of eATP in wounding tissues or in a response to the attack of fungal pathogens and to osmotic stress. This means that extracellular nucleotides play an important role in plant defense and in the adaptation to new environmental conditions. The publications in recent years also suggest that extracellular nucleotides may be evolutionally very old and accompanied plants for millions of years. Some fungal elicitors induce an uptake of  $Ca^{2+}$  in plant cells, and this could be a mechanism for release of ATP from cells under the attack of fungal pathogens. Similar results were

obtained for cells of algae in response to wounding. It is not known how ancient the reactive oxygen species strategy of plant pathogen defense is, but the fossil record indicates that plants had already developed fungal defense mechanisms in the Devonian era a billion years ago. Assembling information about the prevalence of extracellular nucleotides, their participation in the coordination of growth and development of plant cells, early evolutionary origin of eNTP and important functions in response to stress indicated that there are a key signal molecules in the plant world. The paper presents a review of articles supporting this claim.

*Key words:* extracellular nucleotides (eNTP), apyrases, purinoceptors, signaling, response to stress.

## 1. WSTĘP

Najbardziej znane funkcje nukleotydów znajdujących się w obrębie komórki to magazynowanie i uwalnianie energii w szeregu procesów biochemicznych oraz budowa łańcuchów DNA i RNA. Jednak oprócz puli nukleotydów wewnątrz komórki opisano nukleotydy pozakomórkowe (ang. *extracellular nucleotides*) oznaczane w literaturze skrótowo eNTP lub xNTP, występujące w matriksie pozakomórkowej – ECM (ang. *ExtraCellular Matrix*), którym przypisuje się m.in. pełnienie funkcji sygnałowych. Nukleotydy pozakomórkowe zostały dobrze poznane i opisane dla świata zwierząt, o czym najlepiej świadczy ponad 12 000 publikacji na ten temat w bazie PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O ile już w latach 90. ubiegłego wieku postulowano obecność eNTP także u roślin, to brakowało eksperymentalnych dowodów potwierdzających te założenia. Dopiero badania ostatnich lat dostarczyły przekonujących argumentów nie tylko na obecność pozakomórkowych nukleotydów w świecie roślin, ale wskazały, iż mogą one pełnić ważne funkcje w sygnalizacji, koordynacji wzrostu i rozwoju komórek czy utrzymaniu ich żywotności. Zwierzęce nukleotydy pozakomórkowe są lepiej poznane i często stanowią odniesienie do rozpatrywania tego zagadnienia u roślin, dlatego w pracy przedstawiono podstawowe informacje o zwierzęcych eNTP i roli, jaką one pełnią.

## 2. NUKLEOTYDY POZAKOMÓRKOWE JAKO CZĄSTECZKI SYGNAŁOWE

Nukleotydy są syntetyzowane w obrębie komórki, a następnie mogą być wydzielane na zewnątrz błony komórkowej, gdzie trafiają do ECM. Udowodniono trzy możliwe drogi takiego wydzielania: przez kanały przepuszczalne dla ATP [66], przez egzocytozę [7] lub z wykorzystaniem transporterów oporności wielolekowej – MDR (ang. *Multidrug Resistance Transporters*) [8]. W przypadku sekrecji przez egzocytozę, pęcherzyk po połączeniu się z błoną komórkową, uwalnia swoją zawartość do matriksu pozakomórkowego, przyczyniając się do wzrostu stężenia nukleotydów poza obrębem komórki [38, 85].

Przypuszczenia, że pozakomórkowe nukleotydy mogą pełnić funkcje sygnałowe pojawiły się już w latach 20. ubiegłego wieku, a ostatecznie potwierdzono odgrywanie takiej roli przez nukleotydy purynowe: ATP (2'-deoksyadenozyno-5'-trifosforan), ADP (2'-deoksyadenozyno-5'-difosforan) [67], GTP (2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan) [4], a także nukleotydy piramidowych: UTP (2'-deoksyurydino-5'-trifosforan) [63], UDP (2'-deoksyurydino-5'-difosforan) [31] oraz CTP (2'-deoksycytozyno-5'-trifosforan) [5]. Po raz pierwszy nukleotydy pozakomórkowe zostały opisane w 1929 roku na podstawie doświadczeń nad wpływem podawania mieszanin różnych związków zawierających adeniny na częstotliwość skurczów mięśnia sercowego ssaków. W badaniach tych wykazano, że roztwory z różnymi stężeniami adenin, którymi traktowano serca, wywoływały zróżnicowane zmiany w częstotliwości skurczów mięśnia [22].

Jednak dopiero 50 lat po odkryciu eNTP u zwierząt poznano receptory dla tych cząsteczek, umożliwiające im pełnienie funkcji sygnałowej, tzw. purynoceptory (ang. *purinoceptors*) [9, 10]. Wyróżniono trzy ich typy, w zależności od rozpoznawanej cząsteczki sygnałowej: P1, P2Y i P2X podzielone na wiele podtypów [11]. Receptory P1 wiążące adenozyne zostały odkryte jako pierwsze. Wyróżniono cztery ich podtypy jednak wszystkie są białkami podobnymi do rodopsyny, należącymi do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G – GPCR (ang. *G Protein-Coupled Receptor*) [49]. Receptory P2 aktywowane są z kolei przez puryny i pirymidyny, przy czym PX2 zaliczono do rodziny kanałów jonowych bramkowanych ligandem, a P2Y do receptorów sprzężonych z białkami G [1]. Nie wyklucza się jednak istnienia innego rodzaju receptorów eNTP mogących występować u bakterii, drożdży czy prymitywnych bezkręgowców [32]. Opisano także enzymy przeprowadzające hydrolizę nukleotydów pozakomórkowych, a zatem regulujących ich stężenie w EMC i w ten sposób wpływających na odpowiedź komórki, przez inaktywację sygnału niesionego przez nukleotydy pozakomórkowe. Są to tak zwane apyrazy opisane szerzej w dalszej części artykułu.

Od czasu odkrycia eNTP dobrze poznano procesy, w których biorą one udział w świecie zwierząt, a także opisano mechanizmy ich działania. Udowodniono, iż nukleotydy pozakomórkowe uczestniczą w procesach neuroprzebieżności [11, 52], odpowiedzi immunologicznej, regulowania wzrostu komórek czy utrzymania odpowiedniego ciśnienia krwi [23, 79]. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej informacji o pozakomórkowych nukleozydach, czyli zasadach azotowych połączonych z pierścieniem cukru. Badacze postulują m.in. obecność jednego rodzaju receptorów odbierających sygnał z pozakomórkowych nukleotydów i nukleozydów adeninowych, niemniej większość prowadzonych badań jak na razie skupia się na eNTP [67].

Obecność nukleotydów pozakomórkowych u zwierząt i ważna rola, jaką pełnią u tych organizmów, pozwalała przypuszczać, że będzie można je znaleźć również w świecie roślin. Pierwsze doniesienia potwierdzające tą teorię pojawiły się ponad 30 lat temu – okazało się, że egzogenne podawanie ATP powodowało szybkie zamknięcie pułapki u mucholówki (*Dionaea muscipula*) [35]. W innych badaniach, jako reakcję na zwiększenie stężenia ATP w EMC, zaobserwowano wzrost szybkości mitotycznych podziałów komórek pylników lili (*Lilium longiflorum*) [39] czy zmianę średnicy otworu aparatu szparkowego komeliny (*Commelina communis*) [54]. Kolejnych dowodów świadczących o znaczeniu związków chemicznych budujących pozakomórkowe

nukleotydy, dostarczyły badania z użyciem kofeiny (pochodnej puryny), które wykazały hamowanie cytokinezy [6], spowolnienie różnicowania elementów trachealnych *Zinnia elegans* [60] czy podziałów komórkowych w pylniku lili [57].

Badania prowadzone w trakcie ostatnich kilku lat potwierdziły występowanie oraz udział pozakomórkowych nukleotydów u roślin w regulacji takich procesów, jak: wzrost, rozwój i sygnalizacja [64, 65]. Przede wszystkim udowodniono obecność eNTP w matriks pozakomórkowej [42]. Przypuszcza się, że wydostają się one na zewnątrz cytoplazmy tą samą drogą jak w komórkach zwierzęcych, czego dowodem może być akumulacja eATP (ang. *extracellular ATP*) w szczytowej części rosnącej wypustki włósnikowej, gdzie następuje zwiększona egzocytoza pęcherzyków [16, 42] czy odkrycie u *Arabidopsis* homologa transportera MDR – glikoproteiny P (AtPGP1) mającej zdolność zwiększania koncentracji eATP w matriks pozakomórkowej [42]. Wykazano także, że kontakt epidermy korzenia z roztworem zawierającym nukleotydy zmienia potencjał błonowy komórek włósnikowych *Arabidopsis*. Błyskawiczna depolaryzacja błony komórkowej włósników następowała po podaniu 1 mM roztworu ATP, ADP lub GTP. Natomiast żadnej reakcji nie obserwowano po podaniu fosforu, TTP (2'-deoksytymidyno-5'-trifosforan) bądź CTP [46]. Oznacza to, że nie wszystkie nukleotydy zaangażowane są w te same reakcje komórki, a ponadto że eNTP może być pierwszorzędową cząsteczką sygnałową wywołującą reakcję różnych elementów szlaku transdukcji sygnału, jak np. polaryzacja błony komórkowej. Dodatkowo, różne stężenia ATP i ADP wywoływały podobną reakcję, wskazuje to na różnice w odbiorze sygnału cząsteczek zbudowanych z tej samej zasady azotowej [37, 46]. Jednakże próby znalezienia roślinnych homologów purynoceptorów nie zakończyły się powodzeniem (z wyjątkiem jednego białka u zielenic), stąd można przypuszczać, iż rośliny musiały wykształcić receptory innego typu dla odbioru sygnałów eNTP, tak jak postuluje się to dla bakterii, drożdży i prymitywnych bezkręgowców [32].

Kolejnym etapem badań było wykazanie, że egzogennie podane różne nukleotydy wywołują zmiany poziomu jonów wapnia w cytoplazmie ( $[Ca^{2+}]_{\text{cyt.}}$ ) komórek korzenia [20] i siewek *Arabidopsis* [36]. Także w tych eksperymentach zaobserwowano różne zmiany w gradiencie  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt.}}$  w zależności od zastosowanego nukleotydu – wyraźną odpowiedź w wypadku ATP i ADP, nieznaczną po zastosowaniu UTP, jak i brak reakcji na AMP (2'-deoksyadenozyno-5'-monofosforan) [20]. Potwierdza to przypuszczenia o występowaniu receptorów specyficznych dla konkretnych nukleotydów. Dodatkowo, badania prowadzone na protoplastach wykazały, iż receptory dla pozakomórkowych nukleotydów występują w błonie komórkowej, a nie w EMC [21]. Natomiast zastosowanie blokera kanałów wapniowych – gadoliny ( $Gd^{3+}$ ) czy antagonistów receptorów P2 (np. suraminy) zniosło działanie pozakomórkowych nukleotydów, co jasno dowodzi, że wcześniejsze zmiany stężenia  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt.}}$  spowodowane były aktywacją kanałów wapniowych przez eATP/eADP [20, 36].

Wykazano również, że eATP powoduje w komórkach wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu – ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*) [2, 70]. Ciekawym aspektem prowadzonych prac było odkrycie działania adenozyiny, która hamowała powstawanie ROS. Skoro adenozyina jest produktem rozkładu eATP, zapropono-

wano mechanizm hamowania zwrotnego – rozkład pozakomórkowego ATP, wywołującego wytwarzanie ROS, jest jednocześnie sygnałem dla komórki, iż zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu nie są już potrzebne i można je wstrzymać [37, 70].

Dodatkowo stwierdzenie wysokiego stężenia ATP w wodzie morskiej, sięgającego 1 nM [3], stało się podstawą hipotezy, iż także prymitywne komórki glonów bądź innych organizmów już od początków ewolucji mogły wykorzystywać pozakomórkowe nukleotydy jako cząsteczki sygnałowe [17]. Jak wspomniano wcześniej, nukleotydy syntetyzowane są wewnątrz komórek i aby mogły służyć jako cząsteczki sygnałowe w EMC, muszą zostać przetransportowane na zewnątrz błony komórkowej. Uważa się, że ATP w wodzie morskiej pochodzi z uszkodzonych komórek fitoplanktonu [3], tak jak jest to w przypadku wypływu ATP ze zranionych komórek lądowych roślin wyższych [70]. Dowodem na zdolność reagowania prostych organizmów morskich na sygnał niesiony przez eNTP było odkrycie u zielenicy *Ostreococcus tauri* czy śluzowca *Dictyostelium discoideum* białka podobnego do zwierzęcych purynoceptorów [25, 26]. Co prawda zgodność sekwencji aminokwasowych wynosi tylko 28%, jednak udowodniono, że wytypowane białko wykazuje wysokie powinowactwo do ATP; dodatkowo pośredniczy także w zmianach transportu jonów przez błonę komórkową, tak jak zwierzęce receptory typu P2X [26]. Receptor ten jest zlokalizowany po wewnętrznej stronie błony komórkowej, co można tłumaczyć koniecznością odgradzenia go od środowiska zewnętrznego o wysokim i zmiennym stężeniu nukleotydów, jednak nie można wykluczyć, iż jest on połączony z innymi białkami znajdującymi się po przeciwnej stronie plazmolemy.

Badania makroalg *Dasycladus vermicularis* ujawniły, że po zranieniu komórki następuje uwolnienie ATP [78], które z kolei może indukować produkcję monotlenku azotu (NO) i nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ). Udział NO i  $H_2O_2$  w procesie odpowiedzi obronnej na zranienie został udowodniony u *Dasycladus* [62]. Po odebraniu przez organizm sygnału o uszkodzeniu komórki, aktywacji ulegają białka działające przeciwnie względem purynoceptorów, które powodują zmniejszenie produkcji NO i  $H_2O_2$ . Przeprowadzone badania ujawniły zjawisko indukowania produkcji NO przez eNTP także u *Acetabularia acetabulum* [78]. Jest to reakcja analogiczna do odpowiedzi *Arabidopsis* na zranienie [70]. Wyniki te mogą sugerować, iż przedostanie się pozakomórkowego ATP do cytoplazmy jest wykorzystywane jako sygnał uszkodzenia komórki już od kilkuset milionów lat [17], czyli odkąd pojawiły się zielenice [47].

Innego ciekawego dowodu na to, że pozakomórkowe nukleotydy towarzyszą organizmom roślinnym od początków ewolucji, dostarczyły analizy skamieniałości pochodzących z wczesnego dewonu. Wykazały one, że już wtedy komórki glonów i psylofitów narażone były na atak patogennych grzybów [76]. Stąd konieczne było wypracowanie reakcji obronnej na kontakt z grzybowymi elicytorami. Odpowiedź na kontakt z elicytorami polega na uwolnieniu z cytoplazmy eATP i zwiększeniu wytwarzania reaktywnych form tlenu [42]. Stąd można przypuszczać, że mechanizmy obrony wykorzystujące eNTP zaczęły się kształtować we wczesnym dewonie, czyli 416–397 mln lat temu [29, 76].

Należy zaznaczyć, że zmiany poziomu zawartości jonów wapnia w cytoplazmie, wywołane przez eNTP, należą do najstarszych mechanizmów regulacji procesów komórkowych. Dowodem na to jest fakt, iż wszystkie przebadane fotosyntetyzujące komórki w swoich szlakach transdukcji sygnału wykorzystują zmiany stężenia jonów wapnia oraz aktywacji białek wiążących  $\text{Ca}^{2+}$  (np. kalmoduliny) i CDPK (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinase*) [43]. A te z kolei mogą być aktywowane przez eNTP. Także wytwarzanie reaktywnych form tlenu wywołane przez obecność eATP [21, 42, 70, 78] została wykazana u najstarszych ewolucyjnie roślin [62, 78] m.in. w odpowiedzi na stres metali ciężkich u mchów [72] czy na zranienie u glonów [62].

Jeżeli pozakomórkowe nukleotydy są pierwotnymi cząstkami sygnałowymi, to także u glonów powinny znajdować się apyrazy umożliwiające regulację stężenia eNTP w matriksie pozakomórkowej. Analiza zsekwencjonowanego genomu glonu *Ostreococcus lucimarinus* [56] ujawniła trzy prawdopodobne sekwencje białek apyraz nazwane: OIAPY1, OIAPY2 i OIAPY3 [17]. Co prawda analizy filogenetyczne wykazały większe podobieństwo apyraz glonów do enzymów drożdży niż roślin naczyniowych, niemniej wytypowane sekwencje zawierają regiony konserwatywne, charakterystyczne dla apyraz. Z analiz sekwencji aminokwasowych wynika, że OIAPY1 i OIAPY2 mogą pełnić swoje funkcje w matriksie pozakomórkowej. Warto podkreślić, że także w genomie *Ceratopteris richardii* (modelowego gatunku paproci jednozarodkowych) [41] znaleziono sekwencję wykazującą homologię z apyrazami *Arabidopsis* (AtAPY1 i AtAPY2) [17].

### 3. APYRAZY – ENZYMY REGULUJĄCE STĘŻENIE POZAKOMÓRKOWYCH NUKLEOTYDÓW

Jak w każdym ze szlaków transdukcji sygnału, tak w przypadku tych aktywowanych przez eNTP konieczne było poznanie mechanizmu inaktywacji cząsteczki sygnałowej. Postuluje się, że rolę taką mogą pełnić enzymy powodujące rozkład pozakomórkowych nukleotydów, a przez to spadek ich stężenia w EMC. W komórkach zwierzęcych scharakteryzowano grupę enzymów zdolnych do hydrolizy trójfosforanowych i/lub dwufosforanowych nukleotydów, nazwanych apyrazami bądź fosfohydrolazami nukleotydów – NTPazy (ang. *apyrase, nucleotide phosphohydrolases*) [1, 44]. Wykazano, że nie są one ATPazami, ze względu na niską specyficzność substratową, nieczułość na klasyczne inhibitory ATPaz, mniejszą liczbę domen transmembranowych [44, 61] oraz obecność czterech konserwatywnych regionów dla apyraz – ACR (ang. *Apyrase Conserved Regions*) [30, 45]. Wyróżniono dwie klasy apyraz: ekto-apyrazy – aktywne katalitycznie w EMC oraz endo-apyrazy – zlokalizowane wewnątrz komórki [44]. Przy czym obie klasy mogą być połączone z błoną komórkową przy pomocy jednej bądź kilku domen błonowych bądź też rozproszone w cytoplazmie czy EMC [1, 30]. Regiony transmembranowe najczęściej występują blisko N-końca, rzadziej przy C-końcu białka [44]. W komórkach zwierzęcych ekto-apyrazy odgrywają rolę w hydrolizie eNTP zaangażowanej w inicjację transdukcji sygnału [11].

Homologi apyraz zwierzęcych odnaleziono już u szeregu roślin: ziemniaka (*Solanum tuberosum*) [30], grochu (*Pisum sativum*) [33], fasoli (*Vigna unguiculata*) [73], *Arabidopsis thaliana* [71], soi (*Glycine soja*) [19], ryżu (*Oryza sativa*) [84] czy bawełny (*Gossypium hirsutum*) [18]. Najlepiej poznane i scharakteryzowane są 2 z 7 [37] apyraz *Arabidopsis* (AtAPY1 i AtAPY2), które wykazują 87% podobieństwo sekwencji aminokwasowej [71]. O tym, jak te dwa białka są ważne dla rośliny, najlepiej świadczą analizy mutantów *Arabidopsis*. Mianowicie, mutant *apy1apy2* jest sterylny, ponieważ jego ziarna pyłku nie kiełkują [83]. Natomiast wprowadzenie do mutantów *apy1apy2* genu apyrazy pod promotorem *SPIK* (*SHAKER POLLEN INWARD K<sup>+</sup> CHANNEL*) specyficznym dla pyłku, umożliwiło otrzymanie nasion i siewek, które były jednak karłowate [82]. Także mutanty insercyjne T-DNA *apy2*, u których dodatkowo wyciszono ekspresję genu *AtAPY1* przy użyciu RNAi wykazywały fenotyp karłowaty [83].

Analizy filogenetyczne roślinnych apyraz nie wykazały ich podziału na dwa kłady obejmujące ekto-apyrazy i endo-apyrazy [17]. Enzymy pochodzące z jednego organizmu znajdują się blisko siebie na drzewie filogenetycznym, niezależnie od swojego zlokalizowania w komórce. Przykładem mogą być: endo-apyraza soi Gs50 [19] i ekto-apyraza soi Gs52 [28] pełniące różne funkcje, ale znajdujące się na jednej gałęzi filogramu [17].

W literaturze pojawia się coraz więcej informacji odnośnie roli apyraz we wzroście, rozwoju oraz sygnalizacji komórek roślinnych, które pośrednio wskazują na udział nukleotydów pozakomórkowych w tych procesach.

#### 4. NUKLEOTYDY POZAKOMÓRKOWE W REAKCJACH OBRONNYCH ROŚLIN

Wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu czy wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie jest jedną z odpowiedzi roślin na różnego rodzaju stresy biotyczne i abiotyczne. Stąd przypuszczenia, iż pozakomórkowe nukleotydy mogą pełnić ważną rolę w reakcjach obronnych.

Wykazano, że pozakomórkowe ATP jest wydzielane przez komórki podczas stresu osmotycznego oraz mechanicznego, np. wywołwanego przez dotyk [36, 80]. Analizy z wykorzystaniem lucyferyny-lucyferazy (ang. *Luciferin-Luciferase*) bioluminescencyjnego znacznika ATP, wykazały zwiększoną o 350% obecność pozakomórkowego ATP u siewek *Arabidopsis* poddanych stresowi mechanicznemu, w porównaniu z kontrolą nienarażoną na stres. Brak jednak nadal było odpowiedzi na pytanie, czy sekrecja ATP do ECM jest skutkiem reakcji na stres, czy też może cząsteczki te pełnią funkcję sygnału wywołującego reakcje obronne [36]. Ponieważ wiadomo, że jednym z elementów odpowiedzi roślin na stres osmotyczny czy dotyk jest zwiększenie poziomu transkrypcji genów z rodziny kinaz aktywowanych mitogenami – MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*) sprawdzono poziom aktywności genów z rodziny MAPK po podaniu egzogenego ATP. Kultury zawieszinowe komórek *Arabidopsis* potraktowane roztworem o stężeniu 500 mM wykazywały podwyższoną liczbę cząsteczek mRNA następujących genów kodujących białka



rodziny MAPK: *ATMEKK1* (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase1*), *ATMPK3* (*Mitogen-Activated Protein Kinase3*) oraz *ATPK19* (*Ribosomal Protein S6 Kinase*). Doświadczenia przeprowadzone na siewkach dały podobny wynik. Są to bezpośrednie dowody potwierdzające, iż pozakomórkowe nukleotydy są ważną cząsteczką sygnałową wydzielaną do ECM w odpowiedzi na stres osmotyczny, mechaniczny czy zranienie, a także, że pełnią funkcje wzmagające reakcję obronną roślin przez regulację poziomu transkrypcji odpowiednich genów [14, 15, 21, 36, 69]. Udział eATP w reakcji obronnej na zranienie *Arabidopsis* potwierdziły pomiary stężenia tego nukleotydu w miejscu uszkodzenia rośliny. Ponadto, rośliny z nadekspresją genów apyraz wykazywały zmniejszony poziom wytwarzania reaktywnych form tlenu w odpowiedzi na zranienie, co powiązano z szybszą hydrolizą eATP w matriks pozakomórkowej [70].

Innym stresem powodującym szybką odpowiedź roślin jest atak patogenów. Reakcja obronna obejmuje wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu i poziomu transkrypcji genów kodujących m.in. inhibitory proteaz [55]. Badania nad odpowiedzią komórek na atak patogenów prowadzono z użyciem elicytorów, czyli fragmentów ścian komórkowych roślin bądź grzybów, które po związaniu się z odpowiednim receptorem indukują reakcję obronną [81]. Zastosowanie drożdżowych elicytorów skutkowało uwolnieniem przez komórki ATP z cytoplazmy i zwiększonym wytwarzaniem ROS [42, 83]. Przypuszcza się, że eATP indukuje zmiany ilości wytwarzanych reaktywnych form tlenu za pośrednictwem oksydaz NADPH. Dowodów na to dostarczyły wyniki eksperymentów z podwójnymi mutantami *Arabidopsis* w genach podjednostek dwóch oksydaz NADPH: *AtrbohD* i *AtrbohF*. Rośliny z mutacjami nie wykazywały wzrostu akumulacji ROS po potraktowaniu roztworem zawierającym ATP, podczas gdy u typu dzikiego nastąpił ponad czterokrotny wzrost stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach pod wpływem egzogenego ATP [70]. Wysoki poziom reaktywnych form tlenu jest skuteczną obroną przed patogenami, ponieważ ROS są cytotoksyczne dla patogenów, a dodatkowo wywołują dalsze etapy odpowiedzi na atak m.in. zagęszczenie łańcuchów polimerów ścian czy produkcję przeciwbakteryjnych związków chemicznych [42, 55]. Natomiast fumonizyna B, inny silny grzybowy elicytor, również indukowała sekrecję ATP, ale jednocześnie powodowała śmierć komórki [13]. Śmierć komórki w odpowiedzi na infekcję jest dobrze opisaną strategią obronną roślin, uniemożliwiająca rozprzestrzenianie się patogenów w całym organizmie. Interesujące, że podobny efekt (śmierć komórki) można wywołać przez podanie apyraz hydrolizujących eATP w matriks pozakomórkowej. Co ważne, do pewnego momentu procesy prowadzące do śmierci komórki można było cofnąć przez podanie egzogenego ATP [13]. Zaproponowano model zakładający istnienie klasy białek podlegających kontroli eATP nazwanych: eARP (ang. *extracellular ATP Regulated Proteins*), które dzielą się na dwie kategorie: eARP<sup>via</sup> (ang. *viability*) odpowiedzialną za utrzymanie komórki przy życiu oraz eARP<sup>def</sup> (ang. *defense*) powodującą śmierć komórki w odpowiedzi na atak patogenów. W zwyczajnych warunkach wzrostu i rozwoju rośliny pozakomórkowe ATP aktywuje geny eARP<sup>via</sup> uniemożliwiające uruchomienie procesów prowadzących do śmierci komórki. Jednak usunięcie pozakomórkowego ATP z EMC komórek skutkowało aktywacją genów z zestawu eARP<sup>def</sup>, a to powodowało śmierć komórek [14, 15].

## 5. POZAKOMÓRKOWE NUKLEOTYDY W KOORDYNACJI WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN

Pierwszych dowodów na to, że nukleotydy pozakomórkowe mogą wpływać na wzrost i rozwój roślin dostarczyły badania siewek *Arabidopsis* hodowanych na pożywkach z różnym stężeniem ATP. W przypadku pożywki o stężeniu 1 mM ATP korzenie rosły poziomo, co oznacza zaburzenie ich grawitropizmu, 2 mM stężenie powodowało zawijanie się korzeni, a 3 mM hamowało ich wzrost, jednocześnie pobudzając rozwój korzeni bocznych [74]. Próby kontrolne przeprowadzone z egzogennym fosforem lub AMP nie wykazały żadnych zmian w morfologii i wroście korzenia wskazując, że wcześniej opisane efekty wywoływało ATP, a nie np. zmiany pH pożywki [74]. Ponieważ wzrost i rozwój korzenia *Arabidopsis* jest pod wieloma względami koordynowany przez auksynę, zaproponowano, że eATP może wpływać na dystrybucję tego hormonu roślinnego w tkankach korzenia. Potwierdzono to analizując rośliny z konstruktem DR5::GUS, u których, w przypadku hodowli w obecności podwyższonych stężeń ATP, widoczne było zahamowanie transportu auksyny w korzeniu [74]. Natomiast w doświadczeniach, w których zastosowano ATP $\gamma$ S (nieulegający hydrolizie analog ATP z atomem siarki zamiast tlenu w miejscu połączenia drugiej i trzeciej reszty fosforanowej) [40] otrzymano taki sam efekt, jednak przy zastosowaniu 10–20-krotnie mniejszego stężenia [75]. Jest to pośredni dowód na występowanie w matryks pozakomórkowej apyraz hydrolizujących ATP i osłabiających efekt jego działania. Odpowiedzią na to, w jaki sposób pozakomórkowe nukleotydy mogą wpływać na transport auksyny, może być odkrycie mechanizmu hamowania przez eATP aktywności białka MDR1. Białko to pośredniczy w wypływie auksyny z komórek [48, 51], dlatego w przypadku ograniczenia jego aktywności następuje gromadzenie się hormonu w komórkach, co zaburza transport auksyny w tkankach [27, 50].

Z kolei analizy karłowatych mutantów ryżu, u których rozwój włośników zatrzymuje się w stadium tworzenia wypustki włośnikowej – *rhl1* (ang. *root hairless1*), pozwoliły na zidentyfikowanie białka nazwanego OsAPY [84]. Jego sekwencja wykazuje podobieństwo na poziomie 78% względem podobnego do apyrazy białka ryżu (OsAPYL), a ponadto analizy filogenetyczne wykazały przynależność tego białka do kladu zawierającego apyrazy *Arabidopsis*, tytoniu i roślin strączkowych [84]. Potwierdzono funkcję OsAPY jako apyrazy przez pomiary zawartości ATP w korzeniach siewek ryżu. Stężenie ATP było prawie dwukrotnie większe u mutantów względem odmiany wyjściowej 'Oochikara' (22,8 ng/mg *versus* 12,1 ng/mg), co wskazuje na udział OsAPY w hydrolizie ATP. Skoro rozwój włośników roślin z mutacją w genie *OsAPY* zatrzymuje się w stadium inicjacji, oznacza to, że działalność apyraz konieczna jest do rozpoczęcia wzrostu szczytowego przez wypustkę włośnikową [84]. Porównanie zawartości ATP w ziarnach obu roślin przed kiełkowaniem, nie wykazało znaczących ilościowych różnic w obecności puli „inicjalnego” ATP ziarniaka ryżu u odmiany wyjściowej i mutantu. Dowodzi to, iż większa zawartość ATP w rosnącym korzeniu *rhl1* może być wynikiem braku działalności apyraz [84].

Zaburzenie wzrostu całego korzenia mutanta ryżu względem odmiany wyjściowej potwierdza wyniki dla *Arabidopsis*, której hodowla na bogatej w ATP pożywce prowadziła do skrócenia korzeni [74, 75].

Udziału enzymów hydrolizujących ATP we wzroście szczytowym włośnika potwierdziły wyniki Kim i współpracowników [42]. Zastosowali oni reporter CBD-lucyferazę, czyli białko z domeną wiążącą celulozę – CBD (ang. *Cellulose-Binding Domain*) połączone ze znacznikiem fluorescencyjnym aktywowanym obecnością ATP – lucyferazą, dzięki czemu możliwa była wizualizacja eATP. Wyznakowanie pozakomórkowego ATP było możliwe dzięki zakotwiczeniu całej cząstki reportera do włókien celulozy w ścianie komórkowej, a następnie aktywacji lucyferazy. W korzeniach lucerny (*Medicago truncatula*) zaobserwowano akumulację eATP w przestrzeniach pomiędzy komórkami epidermy oraz w części szczytowej włośników. Można przyjąć, iż ten sposób rozmieszczenia pozakomórkowego ATP w matriks pozakomórkowej komórek epidermy korzenia jest uniwersalny dla roślin, ponieważ został potwierdzony u *Arabidopsis* (ekotyp Columbia), pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) i komonicy (*Lotus japonicus*) [42, 53]. Sugeruje to, że eATP może uczestniczyć w procesie związanym z polarnym wzrostem włośnika, uzależnionym od gradientu jonów wapnia w cytoplazmie. Aby potwierdzić tę hipotezę, określono różnice w ilości eATP na powierzchni włośników w obecności inhibitorów przepływu jonów wapnia bądź w podwyższonych stężeniach tego pierwiastka podawanego egzogenicznie. W pierwszym przypadku zaobserwowano redukcję ilości eATP w obrębie EMC, a w drugim – wzrost jego stężenia [42]. Jednak stężenie jonów wapnia w obrębie cytoplazmy jest również zależne od obecności pozakomórkowego ATP [20, 36]. Sugeruje to występowanie nieznanych jeszcze mechanizmów oddziaływania i wzajemnej regulacji stężeń jonów wapnia i eATP.

Warto zwrócić uwagę na jeszcze jeden aspekt badań dotyczących obecności eATP w matriks pozakomórkowej włośników. Jak wspomniano wcześniej, u zwierząt jedną z dróg wypływu ATP z komórki jest sekrecja w drodze egzocytozy [7]. Ponieważ transport pęcherzykowy w kierunku szczytu włośnika leży u podstaw jego wzrostu, akumulacja eATP w tej części rosnącej wypustki włośnikowej jest dowodem na to, że również u roślin właśnie tą drogą zachodzi wydzielanie ATP do ECM [42]. Potwierdzają to eksperymenty z zastosowaniem brefeldyny A (silnego inhibitora transportu pęcherzykowego), po podaniu której nastąpiło drastyczne zmniejszenie ilości eATP w części szczytowej włośnika. W świetle dotychczasowych wyników można uznać, iż udział pozakomórkowego ATP we wzroście wydłużeniowym jest uniwersalny w świecie roślin. Potwierdzają to badania nad wzrostem łagiewki pyłkowej *Arabidopsis* [58, 82, 83], wydłużaniem bulwy ziemniaka [59] czy włókna bawełny [18].

Dodatkowo wspomniane w poprzednim rozdziale reaktywne formy tlenu biorą nie tylko udział w reakcjach obronnych roślin, ale także są zaangażowane w proces wydłużania komórek i ich wzrost szczytowy [12, 68]. Wskazuje to na dodatkowy aspekt koordynowania wzrostu i rozwoju komórek roślinnych przez nukleotydy pozakomórkowe, regulujące stężenie ROS [70]. Jednakże nadmierny wzrost stężenia eATP powoduje wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu, prowadząc do zaburzenia wzrostu rośliny, przy czym przypuszcza się, iż w tym wypadku jest to wpływ

produkowanego tlenu azotu [77]. Również obserwowane zaburzenia grawitropizmu przy hodowli *Arabidopsis* w wyższych stężeniach ATP w pożywce mogą być powiązane ze zwiększoną produkcją tlenu azotu, który pośredniczy w mechanizmach grawitropizmu korzeni [34]. Udowodniono również, iż pozakomórkowe ATP odpowiada za aktywację wytwarzania tlenu azotu zaangażowanego w wydłużanie wieszadełka u pomidora [24].

Przedstawione wyniki badań wskazują, że brak enzymów hydrolizujących eATP, a przez to wzrost stężenia tego nukleotydu w matriks pozakomórkowej bądź hodowla roślin w środowisku bogatym w ATP powodują zahamowanie wzrostu korzenia, zaburzenia w grawitropizmie oraz uniemożliwiają wzrost szczytowy wypustek włośnikowych [42, 74, 75]. Dodatkowo sterylność roślin *Arabidopsis* z mutacjami w genach *AtAPY1* i *AtAPY2* z powodu braku kiełkowania ziarna pyłku dowodzi, że zbyt duże stężenia eATP hamuje wzrost szczytowy komórek roślinnych [83]. Z drugiej strony, udowodniono wpływ eATP na wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu [2, 70] lub stężenia jonów wapnia w cytoplazmie [20, 36], a także akumulację pozakomórkowego ATP w szczytowej części rosnącej wypustki włośnikowej [42]. Wyjaśnieniem tego dwoistego wpływu eATP na wzrost i rozwój komórek roślinnych może być założenie, że pozakomórkowe ATP w odpowiednim stężeniu w matriks pozakomórkowej jest niezbędne do prawidłowego wzrostu komórek, jednakże jakiegokolwiek odchylenie od tego stężenia (zarówno zwiększenie, jak i zmniejszenie) prowadzić może do zaburzenia obu tych procesów.

## 6. PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat wyraźnie wskazują na udział eNTP w reakcji roślin na zranienie, atak patogenów czy stresy abiotyczne i biotyczne. Nukleotydy pozakomórkowe, jako cząsteczki sygnałne, indukują odpowiedź komórki m.in. poprzez wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu bądź zmiany w poziomie jonów wapnia w cytoplazmie. Obie te reakcje należą do najważniejszych elementów szlaku transdukcji sygnału i leżą u podstaw reakcji obronnych komórek roślinnych. Ponieważ ROS i jony  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  zaangażowane są w wiele procesów fizjologicznych komórek, nukleotydom pozakomórkowym można także przypisać rolę regulatorów tych procesów.

Nukleotydy pozakomórkowe pełnią ważną funkcję we wzroście i rozwoju komórek roślinnych. Poprzez zmiany stężenia w matriks pozakomórkowej eNTP mogą regulować szybkość podziałów komórkowych. Udowodniono, iż odpowiednie rozmieszczenie nukleotydów pozakomórkowych w EMC jest niezbędne do wzrostu szczytowego komórek roślinnych. W przypadku zaburzenia tego rozmieszczenia następowało zahamowanie wzrostu szczytowego wypustek włośnikowych czy niekiełkowanie ziaren pyłku.

Badania nad pozakomórkowymi nukleotydami wykazały, że mogą one towarzyszyć roślinom od milionów lat. Już we wczesnym dewonie, rośliny były narażone na atak patogenicznych grzybów i to wtedy zaczęły się kształtować mechanizmy obrony przed

nimi indukowane przez uwolnienie ATP z cytoplazmy. Odkrycie u glonów reakcji na zranienie podobnych do tych u roślin naczyniowych, obejmujących wykorzystanie pozakomórkowych nukleotydów potwierdza tę hipotezę. Ponadto, wykazano obecność u glonów białek pełniących funkcję apyraz – przeprowadzających hydrolizę eNTP, a także receptora podobnego do purynoceptorów zwierzęcych.

Te wszystkie informacje wskazują na duże możliwości nukleotydów pozakomórkowych jako regulatorów oraz cząsteczek sygnałowych w świecie roślin i zwierząt, co wynikać może z wczesnego ewolucyjnie pochodzenia eNTP. O ile jednak dobrze poznano i opisano rolę zwierzęcych nukleotydów pozakomórkowych, o tyle u roślin dopiero rozpoczęto badania prowadzące do dokładnego poznania mechanizmów ich działania.

## LITERATURA

- [1] ALVARADO-CASTILLO C, HARDEN TK, BOYER JL. Regulation of P2Y(1) receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol Pharmacol* 2005; **67**: 114–122.
- [2] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004; **55**: 373–399.
- [3] AZAM F, HODSON RE. Dissolved ATP in the sea and its utilisation by marine bacteria. *Nature* 1977; **267**: 696–698.
- [4] BARTHOLOMEW J, REICHART J, MUNDY R, RECKTENWALD J, KEYSER S, RIDDLE M, KURUVILLA H. GTP avoidance in *Tetrahymena thermophila* requires tyrosine kinase activity, intracellular calcium, NOS, and guanylyl cyclase. *Purinergic Signal* 2008; **4**: 171–181.
- [5] BENITEZ-RAJAL J, LORITE MJ, BURT AD, DAY CP, THOMPSON MG. Phospholipase D and extracellular signal-regulated kinase in hepatic stellate cells: effects of platelet-derived growth factor and extracellular nucleotides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **291**: 977–986.
- [6] BONSIGNORE CA, HEPLER PK. Caffeine inhibition of cytokinesis: Dynamics of cell plate formation - deformation *in vivo*. *Protoplasma* 1985; **129**: 28–35.
- [7] BOWLER WB, BUCKLEY KA, GARTLAND A, HIPSKIND RA, BILBE G, GALLAGHER JA. Extracellular nucleotide signaling: A mechanism for integrating local and systemic responses in the activation of bone remodeling. *Bone* 2001; **28**: 507–512.
- [8] BOYUM R, GUIDOTTI G. Effect of ATP binding cassette/multidrug resistance proteins on ATP efflux of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **230**: 22–26.
- [9] BURNSTOCK G. Purinergic receptors. *J Theor Biol* 1976; **62**: 491–503.
- [10] BURNSTOCK G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 1471–1483.
- [11] BURNSTOCK G. Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 2009; **42**: 3–8.
- [12] CARDENAS L, MARTINEZ A, SANCHEZ F, QUINTO C. Fast, transient and specific intracellular RPS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J* 2008; **56**: 802–803.
- [13] CHIVASA S, NDIRIMBA B, SIMON W, LINDSEY K, SLABAS A. Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. *Plant Cell* 2005; **17**: 3019–3034.
- [14] CHIVASA S, MURPHY AM, HAMILTON JM, LINDSEY K, CARR JP, SLABAS AR. Extracellular ATP is a regulator of pathogen defense in plants. *Plant J* 2009; **60**: 436–448.
- [15] CHIVASA S, TOMÉ DFA, MURPHY AM, HAMILTON JM, LINDSEY K, CARR JP, SLABAS AR. Extracellular ATP a modulator of cell death and pathogen defense in plants. *Plant Signal Behav* 2009; **11**: 1078–1080.
- [16] CLARK G, LEE D, DAUWALDER M, ROUX SJ. Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different *Arabidopsis* annexins with secretion during early seedling growth and development. *Planta* 2005; **220**: 621–631.
- [17] CLARK G, ROUX SJ. Extracellular nucleotides: Ancient signaling molecules. *Plant Sci* 2009; **177**: 239–244.

- [18] CLARK G, TORRES J, FINLAYSON S, GUAN X, HANDLEY C, LEE J, KAYS JE, CHEN ZJ, ROUX SJ. Apyrase (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolase) and extracellular nucleotides regulate cotton fiber elongation in cultured ovules. *Plant Physiol* 2010; **152**: 1073–1083.
- [19] AY RB, McALVIN CB, LOH JT, DENNY RL, WOOD TC, YOUNG ND, STACEY G. Differential expression of two soybean apyrases, one of which is an early nodulin. *Mol Plant Microbe Interact* 2000; **13**: 1053–1070.
- [20] DEMIDCHIK V, NICHOLS C, OLIYNYK M, DARK A, GLOVER BJ, DAVIES JM. Is ATP a signaling agent in plants? *Plant Physiol* 2003; **133**: 456–461.
- [21] DEMIDCHIK V, SHANG Z, SHIN R, THOMPSON E, RUBIO L, LAOHAVISIT A, MORTIMER J, CHIVASA S, SLABAS A, GLOVER B, SCHACHTMAN D, SHABALA S, DAVIES J. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca<sup>2+</sup> channels. *Plant J* 2009; **58**: 903–913.
- [22] DRURY AN, SZENT-GYÖRGYI A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 1929; **68**: 213–237.
- [23] DWYER KM, DEAGLIO S, GAO W, FRIEDMAN D, STROM TB, ROBSON SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 2007; **3**: 171–180.
- [24] FORESI NP, LAXALT AM, TONÓN CV, CASALONGUÉ CA, LAMATTINA L. Extracellular ATP induces nitric oxide production in tomato cell suspensions. *Plant Physiol* 2007; **145**: 589–592.
- [25] FOUNTAIN S, PARKINSON K, YOUNG MT, CAO L, THOMPSON CRL, NORTH R. An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 2007; **488**: 200–203.
- [26] FOUNTAIN S, CAO L, YOUNG M, NORTH R. Permeation properties of a P2X receptor in the green algae *Ostreococcus tauri*. *J Biol Chem* 2008; **283**: 15122–15126.
- [27] GEISLER M, MURPHY AS. The ABC of auxin transport: the role of glycoproteins in plant development. *FEBS Lett* 2006 **580**: 1094–1102.
- [28] GOVINDARAJULU M, KIM SY, LIBAULT M, BERG RH, TANAKA K, STACEY G, TAYLOR CG. GS52 Ecto-Apyrase plays a critical role during soybean nodulation. *Plant Physiol* 2009; **149**: 994–1004.
- [29] GRADSTEIN FM, OGG JG. Geologic Time Scale 2004 – why, how, and where next! *Cambridge University Press* 2004; **37**: 1502–3931.
- [30] HANDA M, GUIDOTTI G. Purification and cloning of a soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 916–923.
- [31] HARDEN TK, SESMAJI, FRICKS IP, LAZAROWSKI ER. Signalling and pharmacological properties of the P2Y<sub>14</sub> receptor. *Acta Physiol* 2010; **199**: 149–160.
- [32] HENNESSEY TM. Responses of the ciliates *Tetrahymena* and *Paramecium* to external ATP and GTP. *Purinergic Signal* 2005; **1**: 101–110.
- [33] HSIEH H, TONG C, THOMAS C, ROUX SJ. Light-modulated abundance of an mRNA encoding a calmodulin-regulated, chromatin-associated NTPase in pea. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 135–147.
- [34] HU XY, NEILL SJ, TANG ZC, CAI WM. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* 2007; **137**: 663–670.
- [35] JAFFE MJ. The role of ATP in mechanically stimulated rapid closure of the Venus's Flytrap. *Plant Physiol* 1973; **51**: 17–18.
- [36] JETER CR, TANG W, HENAFF E, BUTTERFIELD T, ROUX SJ. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **16**: 2652–2664.
- [37] JETER CR, ROUX S. Plant responses to extracellular nucleotides: Cellular processes and biological effects. *Purinergic Signal* 2006; **2**: 443–449.
- [38] JOSEPH SM, BUCHAKJIAN MR, DUBYAK GR. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* 2003; **278**: 23331–23342.
- [39] KAMIZYO A, TANAKA N. Studies on the generative nuclear divisions: III. Effects of exogenous ATP on the generative nuclear divisions in *Lilium longiflorum*. *Cytologia* 1982; **47**: 195–205.
- [40] KATAYAMA T, ITO M, KANEKO S, SATOH M, UEHARA T, MINAMI M. Reciprocal regulation of ATPgammaS-induced monocyte chemoattractant protein-1 production by ERK and p38 MAP kinases in rat corticostriatal slice cultures. *J Neurosci Res* 2009; **87**: 1573–1581.
- [41] KAŻMIERCZAK A. Determinacja płci u paproci jednakożarodnikowych. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 103–122.
- [42] KIM SY, SIVAGURU M, STACEY G. Extracellular ATP in plants: visualization, localization and physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol* 2006; **142**: 984–992.
- [43] KLIMECKA M, MUSZYŃSKA G. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol* 2007; **54**: 219–233.

- [44] KOMOSZYŃSKI M, WOJTCZAK A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1310**: 233–241.
- [45] KOZAKIEWICZ A, NEURNANNP, BANACH M, KOMOSZAŃSKI M, WOJTCZAK A. Modeling studies of potato nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase1: an insight into the catalytic mechanism. *Acta Biochim Pol* 2008; **55**: 141–150.
- [46] LEW RR, DEARNALEY JDW. Extracellular nucleotide effects on the electrical properties of growing *Arabidopsis thaliana* root hairs. *Plant Sci* 2000; **153**: 1–6.
- [47] LEWIS LA, McCOURT RM. Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot* 2004; **91**: 1535–1556.
- [48] LEWIS DR, MILLER ND, SPLITT BL, WU G, SPALDING EP. Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis Multidrug Resistance-Like ABC transporter genes*. *Plant Cell* 2007; **19**: 1838–1850.
- [49] LIBERT F, PARMENTIER M, LEFORT A, DINSART C, VAN SJ, MAENHAUT C, SIMONS MJ, DUMONT JE, VASSART G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* 1989; **244**: 569–572.
- [50] LIN RC, WANG HY. Two homologous ATP-binding cassette transporter proteins, AtMDR1 and AtPGP1, regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis and root development by mediating polar auxin transport. *Plant Physiol* 2005; **138**: 949–964.
- [51] LJUNG K, HULLAK, CELENZA J, YAMADAM, ESTELLE M, NORMANLY J, SANDBERG G. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 2005; **17**: 1090–1104.
- [52] MACHIDA T, HEERDT PM, REID AC, SCHÄFER U, SILVER RB, BROEKMAN MJ, MARCUS AJ, LEVI R. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase1/CD39, localized in neurons of human and porcine heart, modulates ATP-induced norepinephrine exocytosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **313**: 570–577.
- [53] McALVIN CB, STACEY G. Transgenic expression of the soybean apyrase in *Lotus japonicus* enhances nodulation. *Plant Physiol* 2005; **137**: 1456–1462.
- [54] NEJIDAT A, ITAI C, ROTH-BEJERANO N. Stomatal response to ATP mediated by phytochrome. *Physiol Plant* 1983; **57**: 367–370.
- [55] OROZCO-CARDENAS ML, NARVAEZ-VASQUEZ J, RYAN CA. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, methyl jasmonate. *Plant Cell* 2001; **13**: 179–191.
- [56] PALENIK B, GRIMWOOD J, AERTS A, ROUZE P, SALAMOV A, PUTNAM N, DUPONT C, JORGENSEN R, DERELLE E, ROMBAUTS S, ZHOU K, OTILLAR R, MERCHANT SS, PODELL S, GAASTERLAND T, NAPOLI C, GENDLER K, MANUELL A, TAI V, VALLON O, PIGANEAU G, JANCEK S, HEIJDE M, JABBARI K, BOWLER C, LOHR M, ROBBENS S, WERNER G, DUBCHAK I, PAZOUR GJ, REN Q, PAULSEN I, DELWICHE C, SCHMUTZ J, ROKHSARD, VAN DE PEER Y, MOREAU H, GRIGORIEV IV. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 7705–7710.
- [57] PIERSON ES, SMITH PJS, SHIPLEY AM, JUFLE LF, CRESTI M, HEPLER PK. Ca<sup>2+</sup> fluxes around pollen grains and pollen tubes of lily; normal development and effect of temperature shock, BAPTA-type buffer microinjection and depletion of boric acid from the medium. *Biol Bull* 1993; **185**: 302–303.
- [58] REICHLER SA, TORRES J, RIVERA AL, CINTOLESI VA, CLARK G, ROUX JR. Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. *J Exp Bot* 2009; **60**: 2129–2138.
- [59] RIEWE D, GROSMAN L, FERNIE AR, WUCKE C, GEIGENBERGER P. The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth, and development. *Plant Physiology* 2008; **147**: 1092–1109.
- [60] ROBERTS AW, HAIGLER CH. Methylxanthines reversibly inhibit tracheary element differentiation in suspension cultures of *Zinnia elegans*. *Planta* 1992; **186**: 586–592.
- [61] ROBINSON SC, SÉVIGNY J, ZIMMERMANN H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; **2**: 409–430.
- [62] ROSS C, KUPPER F, JACOBS R. Evidence of a latent oxidative burst in relation to wound repair in the giant unicellular chlorophyte *Dasycladus vermicularis*. *J Phycol* 2005; **41**: 531–541.
- [63] ROSSI L, MANFREDINI R, BERTOLINI F, FERRARI D, FOGLI M, ZINI R, SALATI S, SALVESTRINI V, GULINELLI S, ADINOLFI E, FERRARI S, DI VIRGILIO F, BACCARANI M, LEMOLI RM. The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood* 2007; **109**: 533–542.

- [64] ROUX SJ, SONG C, JETER C. Regulation of plant growth and development by extracellular nucleotides. W: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D [ed] Communication in Plants. 2006 Springer, Berlin: 221–234.
- [65] ROUX SJ, STEINEBRUNNER I. Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends Plant Sci* 2007; **12**: 522–527.
- [66] SAUER H, HESCHELER J, WARTENBERG M. Mechanical strain-induced  $\text{Ca}^{2+}$  waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2000; **279**: 295–307.
- [67] SCHICKER K, HUSSL S, CHANDAKA GK, KOSENBURGER K, YANG JW, WALDHOER M, SITTE HH, BOEHM S. A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochem Biophys Acta* 2009; **1793**: 325–334.
- [68] CHOPFER P, LISZKAY A. Plasma membrane-generated reactive oxygen intermediates and their role in cell growth of plants. *Biofactors* 2006; **28**: 73–81.
- [69] SHANG Z, LAOHAVISITA, DAVIES JM. Extracellular ATP activates an *Arabidopsis* plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable conductance. *Plant Signal Behav* 2009; **10**: 989–991.
- [70] SONG C, STEINEBRUNNER I, WANG X, STOUT S, ROUX S. Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; **140**: 1222–1232.
- [71] STEINEBRUNNER I, JETER CR, SONG C, ROUX SJ. Molecular and biochemical comparison of two different apyrases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 2000; **38**: 913–922.
- [72] SUN S, HE M, CAO T, ZHAN Y, HAN W. Response mechanisms of antioxidants in bryophyte (*Hypnum plumaeforme*) under the stress of single or combined Pb and/or Ni. *Environ Monit Assess* 2009; **149**: 291–302.
- [73] TAKAHASHI H, TOYODA K, HIRAKAWA Y, MORISHITA K, KATO T, INAGAKI Y, ICHINOSE Y, SHIRAIISHI T. Localization and responsiveness of a cowpea apyrase VsNTPase1 to phytopathogenic microorganisms. *J Gen Plant Pathol* 2006; **72**: 143–151.
- [74] TANG W, BRADY SR, SUN Y, MUDAY GK, ROUX S. Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport. *Plant Physiol* 2003; **131**: 147–154.
- [75] TANG W. Effects of extracellular ATP and ADP on growth and development of *Arabidopsis* seedlings. Rozprawa doktorska 2004; University of Texas at Austin.
- [76] TAYLOR T, KLAVINS S, KRINGS M, TAYLOR E, KERP J, HASS H. Fungi from the Rhynie chert: a view from the dark side. *Trans Royal Soc Edinburgh Earth Sci* 2004; **94**: 457–473.
- [77] THOMAS DD, RIDNOUR LA, ESPEY MG, DONZELLI S, AMBS S, HUSSAIN SP, HARRIS CC, DEGRAFF W, ROBERT DD, MITCHELL JB, WINK DA. Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling. *J Biol Chem* 2006; **281**: 25984–25993.
- [78] TORRES J, RIVERA A, CLARK G, ROUX S. Participation of extracellular nucleotides in the wound response of *Dasycladus vermicularis* and *Acetabularia acetabulum* (*Dasycladales*, *Chlorophyta*). *J Phycol* 2008; **44**: 1504–1511.
- [79] VOLONTÉ C, AMANIO S, D'AMBROSINI, COLPI M, BURNSTOCK G. P2 receptor web: Complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther* 2006; **112**: 264–280.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 09.05.2010 r.

Przyjęto: 02.10. 2010 r.

Marek Marzec, mgr

Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Śląski

ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

e-mail: marek.marzec@us.edu.pl