

## SYMPLASTOWY TRANSPORT BIAŁEK I RNA U ROŚLIN

### SYMPLASMIC TRANSPORT OF PROTEINS AND RNA IN PLANTS

Paulina NOWAKOWSKA, Jan KOPCEWICZ

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

**Streszczenie:** Symplastowy transport białek i RNA jest wciąż dopiero poznawanym mechanizmem przekazywania informacji między komórkami roślin. Transport ten może zachodzić w sposób selektywny bądź też nieselektywny, w obrębie sąsiadujących komórek, tkanek lub całej rośliny. Proces ten regulowany jest podczas życia rośliny oraz w odpowiedzi na warunki środowiskowe. Wciąż zwiększa się liczba opisywanych białek i cząsteczek RNA transportowanych między komórkami przez plazmodesmy i w obrębie całej rośliny za pośrednictwem floemu. Znane są przykłady transportu mRNA genów *KN1* czy *CmNCAP1*. Ostatnio scharakteryzowano szereg małych RNA obecnych we floemie kilku gatunków roślin odpowiadających zarówno si-, jak i miRNA. Opisano także 27 kDa białko CmPSRP1 wiążące specyficznie małe, jednoniciowe RNA i umożliwiające ich przenikanie przez plazmodesmy z komórek towarzyszących do komórek sitowych floemu. Coraz więcej wiadomo również o mechanizmie rozprzestrzeniania się sygnału wyciszenia w procesie systemowego PTGS (ang. *Post Transcriptional Gene Silencing*). Sygnał wyciszenia transportowany jest w postaci 21 nt siRNA amplifikowanego co 10–15 komórek i następnie przenoszony do kolejnych komórek.

**Słowa kluczowe:** transport symplastowy, NCAP (*Non-Cell-Autonomous Protein*), transport RNA.

**Summary:** The symplasmic transport of protein and RNAs has emerged as a novel mechanism of cell to cell communication in plant. This movement can occur in selective or a non-selective way between neighbouring cells, tissues or in whole plant. The symplasmic transport is under control both during plant development and in response to environmental conditions. The knowledge about RNAs and proteins that move from cell to cell through plasmodesmata and in the whole plant though phloem is still growing. The transport of mRNA such genes like *KN1* or *CmNCAP1*, has been also described. Recently, it has been shown that phloem sap of some plants species contains an endogenous population of small RNAs corresponding to si- and miRNAs. Additionally, it has been identified 27 kDa phloem protein CmPSRP1 which binds selectively small, single stranded RNAs which penetrate from companion cells to sieve tubes of phloem system. Recent advances have also increased our understanding of mechanism of spreading through the plant a mobile silencing signal associated with PTGS (*Post Transcriptional Gene Silencing*). This signal is transported as 21 nt siRNA which is amplified every 10–15 cells and then delivered to neighboring cells.

*Key words:* symplasmic transport, NCAP (*Non-Cell-Autonomous Protein*), RNA transport.

## WSTĘP

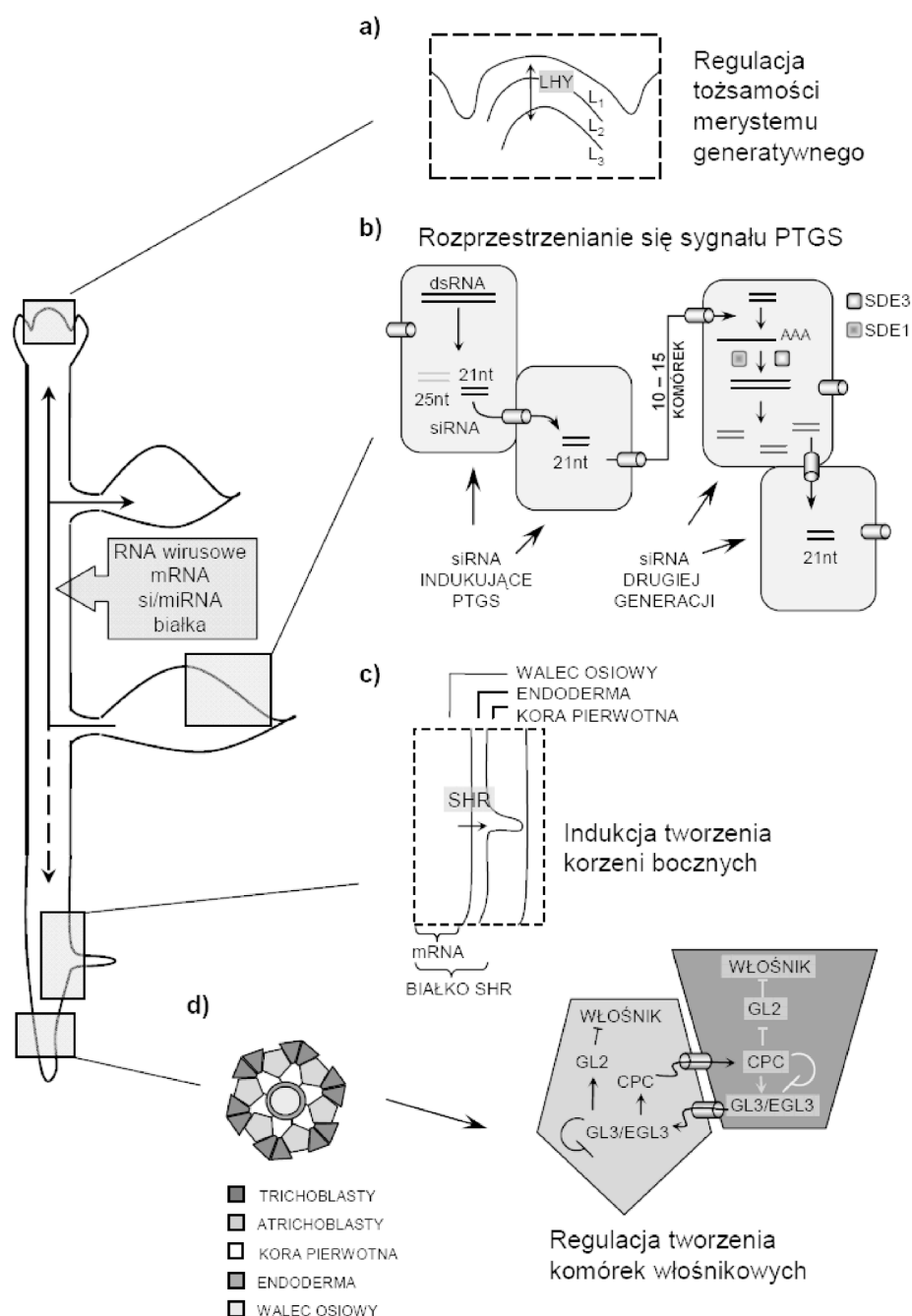
Komunikacja międzykomórkowa jest niezmiernie ważna u organizmów wielokomórkowych, dla koordynacji ekspresji genów odpowiedzialnych za podziały komórkowe i różnicowanie, a co za tym idzie właściwą morfogenezę całej rośliny i jej funkcjonowanie. W związku z tym, rośliny wytworzyły unikalną, cytoplazmatyczną (symplastową) sieć, tworzoną z komórek połączonych plazmodesmami i elementami floemu, która pozwala na bezpośrednią komunikację i transport międzykomórkowy [11, 14, 17, 46, 54, 63, 75].

Plazmodesmy (PD) są to cytoplazmatyczne połączenia międzykomórkowe otoczone plazmolemą, przechodzące w poprzek wspólnej ściany [73]. W centrum kanału PD znajduje się cylinder zespolonego retikulum endoplazmatycznego (ER), tzw. desmotubula. Na powierzchni cylindra ER ułożone są białka globularne. Desmotubula połączona jest z plazmolemą więzadłami białkowymi, a w przestrzeni, w której znajdują się więzadła, w tzw. rękawie plazmodesmy, powstają kanały transportowe [68, 69]. Wielkość cząsteczek zdolnych do przejścia przez PD określa tzw. specyficzny przekrój czynny plazmodesm SEL (ang. *Size Exclusion Limit*). Przekrój ten nie jest stały i zależy zarówno od rodzaju komórek, stadium rozwojowego rośliny, jak i innych specyficznych czynników, takich jak: wapń (reguluje zamykanie plazmodesm przez polisacharyd – kalozę [73]), transportowe białka wirusowe MP (ang. *Movement Protein*), a także różnego rodzaju białka endogenne [69].

Kolejnym elementem organizmalnej sieci transportowej jest floem. Budują go żywe komórki rurek sitowych i ściśle do nich przylegające komórki towarzyszące. Komórki sitowe podzielone są strukturalnie na dwie części: światło, w którym przebiega transport oraz warstwę przyścienną zawierającą białka, mitochondria, plastydy i retikulum endoplazmatyczne. Dojrzałe rurki sitowe nie mają jądra komórkowego, tak więc obecne w nich białka i kwasy nukleinowe muszą być transportowane z komórek towarzyszących [71].

System symplastowy roślin służy transportowi asymilatów, hormonów i różnych metabolitów. Jednakże, plazmodesmy i floem są także miejscem transportu wielu białek, wirusowego RNA, RNA wywołującego wyciszenie genów (PTGS), a także specyficznych endogennych cząsteczek mRNA (ryc. 1) [47, 54, 61].

Ostatnimi laty pojawiło się kilka prac przeglądowych poświęconych modelom transportu, mechanizmom regulacyjnym i biologicznemu znaczeniu transportu białek i RNA przez plazmodesmy oraz floem [14, 30, 36, 40, 46, 55, 61]. Na łamach *Postępów Biologii Komórki* również pojawiły się publikacje o budowie i funkcjonowaniu plazmodesm [69], rurek sitowych [70] oraz o regulacji łączności symplastowej [41, 68]. Obecna praca ma na celu przybliżenie czytelnikom aktualnej wiedzy na temat białek i cząsteczek RNA transportowanych między komórkami w obrębie tkanek oraz na znaczne odległości poprzez floem, ze szczególnym uwzględnieniem krótko i długodystansowego transportu RNA.



RYCINA 1. Udział międzykomórkowego i systemowego transportu białek regulatorowych oraz RNA w rozwoju roślin. (a) Transport białka LHY w obrębie merystemu generatywnego. (b) Mechanizm rozprzestrzeniania się sygnału wyciszania pomiędzy komórkami. (c) Transport białka SHR do komórek endodermi indukuje powstawanie korzeni bocznych. (d) Transport białek CPC i GL3/EGL3 reguluje tworzenie komórek włosnikowych. Szczegóły w tekście (za [30, 40] zmienione)

## 1. SYMPLASTOWY TRANSPORT BIAŁEK

Białka transportowane między komórkami określa się angielskim skrótem NCAP (ang. *Non-Cell-Autonomous Protein*). Można wyróżnić trzy klasy białek NCAP: wirusowe, floemowe i regulatorowe [30].

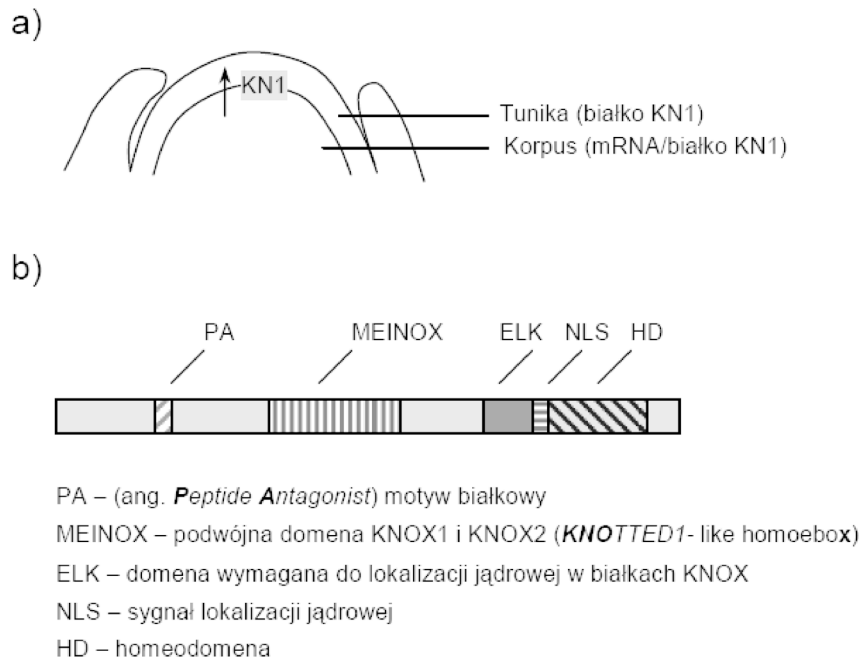
Wirusowe białka transportowe są jedną z najlepiej scharakteryzowanych rodzin białkowych NCAP [13, 78, 83]. Zidentyfikowano kilka typów tych białek. Białko transportowe kodowane przez genom mozaiki tytoniu TMV ma zdolność do takiej modyfikacji struktury plazmodesm, dzięki której możliwy się staje transport tego białka, jak i wirusowego RNA. Inna grupa wirusów, taka jak PVX (ang. *Potato Viruse X*) zawiera potrójny zestaw genów tzw. TGB (ang. *Triple Gene Block*). Geny te kodują białka, które razem z białkiem płaszczka wirusa koordynują transport wirusowego RNA przez plazmodesmy [64].

Drugą grupę białek NCAP stanowią białka floemowe. Sok floemowy zawiera zaskakująco dużą ilość białek endogennych [4, 62, 63, 70, 75, 79]. Tylko kilka z nich może wpływać na strukturę PD. Część stanowią białka konstytutywne związane z funkcjonowaniem rurek sitowych. Najlepiej z tej grupy scharakteryzowane są białka fibrylarne PP1 i PP2 [72], mające zdolność m.in. do wiązania cząsteczek RNA i mogące pośredniczyć w ich transporcie floemowym [56]. Jednakże, rola większości białek floemowych jest wciąż w dużej mierze nieznana.

Kolejną grupę białek NCAP tworzą białka regulatorowe, będące czynnikami transkrypcyjnymi, pełniącymi ważną funkcję w determinowaniu losu komórek. Pierwszym opisanym endogennym białkiem transportowanym między komórkami było KNOTTED1 (KN1), białko kukurydzy zaangażowane w utrzymywanie merystemu wierzchołkowego w stanie nieodróżnionym [24, 28, 40, 61, 84]. Liczba poznanych białek regulatorowych transportowanych między komórkami wciąż się powiększa. Najlepiej opisane są białka związane z rozwojem merystemu wierzchołkowego, tworzeniem korzeni bocznych oraz powstawaniem komórek włósnikowych. Ruch tych białek odbywa się zazwyczaj pomiędzy kilkoma komórkami, ma więc tylko lokalne znaczenie sygnałowe.

### Białka transportowane między komórkami związane z rozwojem merystemu wierzchołkowego

Merystem wierzchołkowy pędu roślin okrytonasiennych zbudowany jest z komórek korpusu otoczonych warstwą komórek tuniki. Tunika u roślin dwuliściennych tworzona jest z dwóch warstw komórek L1 i L2, natomiast u jednoliściennych z pojedynczej warstwy komórek. Korpus określany jest również jako warstwa L3. Z warstwy zewnętrznej L1 powstaje epiderma, zaś z warstw wewnętrznych L2 i L3 kora pierwotna i walec osiowy. Gdy merystem wierzchołkowy pędu przekształca się z wegetatywnego w generatywny, powstaje płaszcz merystematyczny i trzon parenchymatyczny. Płaszcz, w skład którego wchodzi zarówno tunika, jak i zewnętrzne warstwy korpusu, daje początek podkładowi i zawiązkom kwiatów [33, 34]. Na każdym etapie rozwoju wierzchołek pędu jest specyficzną domeną symplastową, w obrębie której przemieszczają się regulatorowe białka NCAP.



RYCINA 2. (a) Transport białka KNOTTED1 z komórek korpusu do tuniki kontroluje utrzymanie merystemu wierzchołkowego w stanie nieodróżnionym. (b) Schemat budowy białka KN1. Szczegóły w tekście (za [40, 52] zmienione)

Białko homeotyczne kukurydzy KN1 kontroluje utrzymanie merystemów wierzchołkowych w stanie nieodróżnionym [24, 28]. Białko to przemieszcza się z komórek korpusu do komórek tuniki merystemu [36] (ryc. 2). Wykazano, że KN1 ma zdolność do zwiększania SEL plazmodesm i indukuje transport kompleksu KN1 białko - *KN1* mRNA [28, 36]. U *Arabidopsis thaliana* występują dwa białka rodziny KNOX, w której skład wchodzi białko KN1, a mianowicie STM (*Shoot Meristemless*) i KNAT1 (*Knotted1-like homeoboxprotein1*) [29]. Mutantom *stm A. thaliana* wprowadzano geny kodujące białka fuzyjne GUS:KN1 (*β-Glucuronidase* – białko reporterowe) pod kontrolą promotora specyficznego dla komórek L1 bądź silnego promotora 35S CMV. Okazało się, że białko fuzyjne GUS:KN1 nie jest zdolne do ruchu ze względu na duży rozmiar i nie kompensuje mutacji *stm* (nie przywraca fenotypu typu dzikiego), niezależnie czy jego ekspresja następuje w komórkach L1, czy też w całej roślinie (użycie promotora 35S CMV). Natomiast wprowadzenie genu kodującego białko fuzyjne zdolne do ruchu GFP:KN1 (*Green Fluorescent Protein* – białko reporterowe) powodowało zniesienie efektu mutacji. Można zatem stwierdzić, że międzykomórkowy transport KN1 jest konieczny do właściwego funkcjonowania tego białka [29].

W fazie generatywnej roślin właściwy rozwój wierzchołka generatywnego kontrolowany jest przez inne białka NCAP.

*LEAFY (LFY)* jeden z genów tożsamości merystemu *A. thaliana* koduje czynnik transkrypcyjny aktywujący geny homeotyczne kwiatu. Badania wykazały, że białko LFY przemieszcza się w obrębie warstw merystemu w sposób nieukierunkowany w drodze dyfuzji [83] (ryc. 1a). Wskazuje na to silna korelacja między lokalizacją cytoplazmatyczną a zdolnością transportową białka. Obecność białka na terenie cytoplazmy jest niezbędna do ruchu dyfuzyjnego [12, 30, 66]. Wydaje się także, że białko LFY nie ma specyficznych motywów transportowych, ponieważ wszystkie białka fuzyjne GFP z różnymi fragmentami LFY są zdolne do ruchu. Jednakże oparty na dyfuzji ruch LFY wydaje się być regulowany w obrębie tkanki, prawdopodobnie przez PD. Na przykład, konstrukt GFP:LFY porusza się znacznie łatwiej pomiędzy komórkami w kierunkach apikalno-bazalnych niż w kierunku lateralnym oraz nie może wyjść poza merystem kwiatowy do komórek pędu kwiatostanowego. Tak więc, niektóre plazmodesmy nie pozwalają na swobodny ruch białka LFY, a jego transport zachodzi w ograniczonej przestrzeni symplastu tworzącego symplastyczną domenę merystemu kwiatowego [66, 68, 84]. Badania prowadzono również na homologue białka LFY, FLORICAULA (FLO) u *Antirrhinum*. Białko to reguluje ekspresję genów *DEFICIENT (DEF)* i *PLENA (PLE)*. Wykazano, że ekspresja *FLO* ograniczona do komórek L1 powoduje aktywację genów *DEF* i *PLE* we wszystkich warstwach merystemu i kompensację mutacji *flo*, natomiast specyficzna ekspresja w komórkach warstw L2 i L3 nie daje takich efektów. Brak jest jednak dowodów na międzykomórkowy transport białka FLO, tak więc nie wiadomo, w jaki sposób wpływa ono na regulację ekspresji powyższych genów [84].

U *Antirrhinum* dwa inne czynniki transkrypcyjne, zaangażowane w rozwój kwiatu, zdolne są do przemieszczania się między komórkami. Są to *DEF* i *GLOBOSA (GLO)*. Białka te biorą udział w regulacji rozwoju płatków korony i transportowane są z komórek L3 i L2 do komórek warstwy L1. Aktywność homologue białka *DEF*, tzw. *APETALA3 (AP3)* u *A. thaliana* także jest szersza niż obszar ekspresji kodującego go genu, jednakże badania immunologiczne nie wykazały transportu tego białka między komórkami. Tak więc wydaje się, że białko AP3 działa na sąsiednie komórki w odmienny sposób [57, 84].

Przedstawione przykłady sugerują, że zdolność białek do przemieszczania się między komórkami może być cechą gatunkowo specyficzną.

#### Białka transportowane między komórkami związane z rozwojem korzenia

Opisywane w literaturze białka transportowane między komórkami w korzeniu związane są z tworzeniem komórek włosnikowych oraz korzeni bocznych.

O rozwoju komórek epiblemy decyduje ich położenie w korzeniu. Komórki epiblemy umiejscowione między komórkami kory pierwotnej tworzą często komórki włosnikowe (trichoblasty). U *A. thaliana* małe 94-aminokwasowe białko Myb-podobne *CAPRICE (CPC)* jest pozytywnym regulatorem formowania komórek włosnikowych. Stwierdzono, że akumulacja mRNA *CPC* jest ograniczona do komórek epiblemy nietworzących włosników (atrichoblasty). Jednakże, białko fuzyjne *CPC:GFP* znajduje się na terenie jądra wszystkich komórek skórki, co wskazuje na transport tego białka z atrichoblastu [77].

Zidentyfikowano także dwa kolejne białka regulatorowe zaangażowane w rozwój komórek epiblemy, a mianowicie GLABRA3 (GL3) i ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3), zawierające domenę bHLH (ang. *basic-Helix-Loop-Helix*) charakterystyczną dla czynników transkrypcyjnych. Białka te pełnią istotną rolę w określaniu tożsamości komórek atrichoblastu. Co ciekawe, choć funkcja tych białek jest specyficzna dla komórek nietworzących włosników, ekspresja genów *GL3* i *EGL3* zachodzi w komórkach włosnikowych. Białko GL3 akumulowane jest w jądrze komórek atrichoblastu, co wskazuje na transport tego białka, jak i prawdopodobnie również EGL3, z komórek włosnikowych, gdzie zachodzi ekspresja kodujących je genów [61]. Kurata i wsp. [61] sugerują, że białko CPC transportowane jest z komórek bez włosników do trichoblastu, gdzie aktywuje ekspresję genów *GL3/EGL3* oraz hamuje aktywność kolejnego białka GL2. Białko to ogranicza tworzenie włosników. W przeciwieństwie do CPC, białka EGL3/GL3 transportowane są do komórek nietworzących włosników aktywując w nich ekspresję genów *CPC* i *GL2* [61] (ryc. 1d).

Białko SHR (*SHort-Root*) należy do rodziny czynników transkrypcyjnych GRAS (nazwa pochodzi od pierwszych opisanych białek **GAI**, **RGA**, **SCR**). Jest to niedawno scharakteryzowana grupa roślinnych czynników transkrypcyjnych, zawierających dwie domeny bogate w leucynę i kilka krótkich konserwatywnych motywów aminokwasowych o bliżej nieznanym znaczeniu. Białka GRAS biorą udział m.in. w szlaku transdukcji sygnału fitochromowego (białko PAT1) i giberelinowego (GAI, RGA) [7]. Białko SHR transportowane jest między komórkami korzenia, promując powstawanie korzeni bocznych [53, 65]. Immunolokalizacja białka SHR oraz badania z użyciem białek fuzyjnych SHR:GFP wykazały, że SHR przemieszcza się z komórek walca osiowego do endodermy, lecz nie przechodzi do komórek kory pierwotnej. W komórkach endodermy białko SHR indukuje podziały komórkowe i różnicowanie [53] (ryc. 1c). Co ciekawe, białko SHR jest obecne zarówno na terenie jądra, jak i cytoplazmy, jednak zablokowanie lokalizacji cytoplazmatycznej hamuje transport międzykomórkowy. Może to wskazywać na dyfuzyjny charakter ruchu białka SHR. Obecność tego białka na terenie cytoplazmy nie wystarcza jednak do transportu przez plazmodesmy. Opisano mutację punktową niezmieniającą umiejscowienia białka fuzyjnego SHR:GFP, jednakże prowadzącą do utraty zdolności przemieszczania się konstruktu z komórek walca osiowego do endodermy [53]. Dodatkowo transport SHR uzależniony jest od specyficznego czynnika tkankowego. Za taki uważa się białko SCR (SCARE-CROW) również należące do rodziny GRAS. Badania mutantów *scr* transformowanych genem fuzyjnym *SHR:GFP* pod kontrolą promotora aktywnego tylko w komórkach epidermy wykazały, że białko SHR:GFP jest zdolne do swobodnego ruchu między komórkami [65]. Można z tego wnioskować, że SCR ogranicza transport SHR tylko do specyficznych komórek.

### Mechanizm międzykomórkowego transportu białek

Proponowane są dwa modele transportu przez PD. Selektywny transport angażujący specyficzne oddziaływania między motywem sygnałowym NCAP i czynnikiem wewnętrznym powiązanym ze zwiększeniem przekroju czynnego PD. Model alterna-

tywny przewiduje transport nieselektywny, oparty na dyfuzji i zależny od endogenego SEL plazmodesm [11].

Najlepiej poznanym przypadkiem selektywnego transportu jest ruch wirusowych białek transportowych, mających zdolność otwierania PD [9, 78]. Wirusowe MP współdziałają z białkami opiekuńczymi, takimi jak HSP70 (mającymi zdolność do zmiany struktury przestrzennej białka, co ułatwia ich przechodzenie przez kanał plazmodesmy), czy DNAJ (białko związane z importem białek do retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów i peroksysomów, regulator aktywności ATP-zowej białka HSP70). Wirusowe białka transportowe współdziałają również z białkami cytoszkieletu, a także z białkiem PME (*Pectin Metyl Esterase*). PME zaangażowane jest w modyfikację pektyn ścian komórkowych i zlokalizowane jest w ścianie komórkowej blisko plazmodesm. Wiąże ono specyficzny fragment wirusowego białka transportowego TMV, a delecja tego regionu hamuje międzykomórkowy ruch wirusa. PME uważane jest więc za hipotetyczny receptor MP [10, 35, 49, 67].

Wirusowe białka transportowe wykorzystują endogenną maszynę transportową komórek roślinnych. Zidentyfikowano białko floemowe *Cucurbita maxima* CmPP16, podobne do wirusowych MP. CmPP16 może przemieszczać się samo bądź też z RNA poprzez PD [86]. Ostatnio Lee i wsp. [43] wyizolowali białko NCAPP1 (*Non Cell Autonomous Pathway Protein 1*) wiążące się z CmPP16. NCAPP1 prawdopodobnie funkcjonuje jako ruchomy receptor, który porusza się wzdłuż błony retikulum endoplazmatycznego do PD [43]. Mutacje genu *NCAPP1* wskazują na jego znaczącą rolę w rozwoju roślin. Nadekspresja niefunkcjonalnej formy białka NCAPP1 $\Delta_{1-22}$  (delecja domeny transmembranowej) bądź jego brak powoduje podobne efekty. Zahamowany zostaje międzykomórkowy transport białek CmPP16 i MP wirusa mozaiki tytoniu oraz ich zdolność do otwierania PD, a rośliny wykazują szereg zmian fenotypowych. Następuje utrata symetrii organów oraz ich zrastanie się, a także zaburzenia w różnicowaniu się komórek epidermy oraz brak podziału na miękisz palisadowy i gąbczasty w blaszkach liści. Nieprawidłowo uformowane są również kwiaty. Mutacje te nie wpływają jednak na międzykomórkowy transport oraz aktywność otwierającą plazmodesmy białek KN1 oraz MP wirusa mozaiki ogórka. Dane te potwierdzają model selektywnego transportu przez plazmodesmy i sugerują istnienie wielu czynników pośredniczących w tym ruchu [43]. NCAPP1 jest spokrewnione z białkiem GP40 (*GlycoProtein 40*), które lokalizowane jest na peryferiach jądra komórkowego i pełni rolę w imporcie białek jądrowych [19]. Tak więc, transport przez plazmodesmy może funkcjonować na podobnej zasadzie jak jądrowo-cytoplazmatyczny transport przez pory jądrowe [42].

Trwają poszukiwania motywu sygnałowego potrzebnego do efektywnego transportu międzykomórkowego. Jednak dotychczas nie zidentyfikowano tego rodzaju peptydu. Badana z użyciem Thioredoksyny H (białko floemowe związane z regulacją potencjału oksydo-redukcyjnego [70]) czy różnych wirusowych białek transportowych sugerują, że motyw sygnałowy jest tworzony przez struktury trzeciorzędowe białka lub jest kompilacją pierwszorzędowej sekwencji i trzeciorzędowej struktury [15, 23, 78]. Wiadomo, że C-koniec 99-aminokwasowej domeny białka transportowego TMV jest potrzebny do

zwiększenia przekroju czynnego plazmodesm [78]. Potencjalny sygnał został zidentyfikowany w białku dyni CmHSP70. Jednakże ten 25-aminokwasowy motyw (a przede wszystkim jego struktura) nie jest uniwersalnym sygnałem transportu międzykomórkowego i działa tylko w kontekście opiekuńczych białek HSP70. Motyw ten indukuje zwiększenie SEL plazmodesm i transport ludzkiego białka HSP70, lecz nie dotyczy innych białek, np. GFP [3]. Kim i wsp. [27] zidentyfikowali sekwencję białkową umożliwiającą międzykomórkowe przemieszczanie się białka KN1. Eksperyment ich polegał na użyciu białek fuzyjnych KN1:GL1 (*GLabral*). Białko GL1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych typu Myb i nie jest transportowane międzykomórkowo. Mutanty *gll* nie tworzą włosków na liściach. Transformacja tych roślin genem fuzyjnym *GL1:KN1* z promotorem aktywnym specyficznym w komórkach mezofilu powodowała kompensację mutacji *gll*. Świadczy to o transporcie białka fuzyjnego do komórek epidermy. W układzie tym białko KN1 umożliwia transport połączonego z nim GL1 do komórek epidermy, gdzie GL1 powoduje tworzenie włosków. Seria transformacji genami kodującymi białka fuzyjne zawierające fragmenty białka KN1 pozwoliła określić domenę HD (homeodomena) tego białka jako niezbędną i wystarczającą do transportu międzykomórkowego [27]. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze dane wskazujące, że wymiana aminokwasu w obrębie prawdopodobnego sygnału lokalizacji jądrowej znajdującej się w obszarze domeny HD zaburza ruch KN1. Jednakże wykazano także niezbędność motywu PA (ang. *Peptide Antagonists*), leżącego poza domeną HD, do zwiększenia SEL plazmodesm i transportu KN1 [37]. Wydaje się, że w celu jednoznacznego określenia charakteru domeny białkowej odpowiedzialnej za transport międzykomórkowy białek niezbędne są dalsze badania.

Oprócz transportu selektywnego białek, przemieszczanie się ich pomiędzy komórkami roślinnymi może być nieselektywne, oparte na procesie dyfuzji. Badania z użyciem białka GFP przyczyniły się do opisanego modelu nieselektywnego transportu międzykomórkowego [11, 22]. Ponieważ GFP nie jest endogennym białkiem roślinnym, musi poruszać się poprzez mechanizmy nieselektywne. We floemie transport GFP zachodzi razem z asymilatami przemieszczając się do tkanek docelowych [36]. W starszych liściach (stanowiących źródło asymilatów) i starszych częściach korzenia nie występuje transport białka GFP poza obręb tkanek przewodzących [36]. Wyniki te sugerują dynamiczną regulację SEL plazmodesm w czasie rozwoju roślin [22, 48]. Endogennym białkiem, które porusza się poprzez dyfuzję, jest LFY. Jednak jego ruch ograniczony jest tylko do obszaru merystemu generatywnego.

Transport białek między komórkami lub we floemie zależy również od potranslacyjnych modyfikacji. Na przykład białko CmPP36 wielkości 36 kDa, należące do rodziny białek reduktaz cytochromu b5, ulega ekspresji w komórkach towarzyszących floemu dyni. Jednak w soku floemowym można odnaleźć tylko 31 kDa białko CmPP36, krótsze na N-końcu. Mikroiniekcje wykazały, że białko pełnej długości nie wykazuje zdolności do zwiększania SEL plazmodesm ani poruszania się między komórkami. Zdolności takich nabiera dopiero po proteolizie na N-końcu [85].

## 2. SYMPLASTOWY TRANSPORT RNA

Badania dotyczące międzykomórkowego ruchu wirusów roślinnych dostarczyły pierwszych dowodów, że plazmodesmy są zdolne do pośredniczenia w międzykomórkowym transporcie wirusowego RNA w postaci kompleksów rybonukleoproteinowych [17, 47, 64]. Dalsze badania wykazały, że wiele specyficznych endogennych RNA może również być transportowane między komórkami. Przykładami takich RNA są między innymi mRNA kukurydzowego czynnika transkrypcyjnego *KN1* [24] oraz mRNA kodujący transporter cukrów SUT1 [38, 39]. U dyni wykryto ponad 100 rodzajów mRNA transportowanych przez floem. Niektóre z tych RNA kodują białka zaangażowane w rozwój merystemów, odpowiedzi hormonalne czy też reakcje obronne [17, 47]. mRNA jest transportowany selektywnie do specyficznych miejsc np. do wierzchołka pędu (mRNA genu *CmNACP* [62]). Kim i wsp. [31] wykazali ponadto, że proces ten jest istotnym mechanizmem zaangażowanym w regulację wzrostu roślin. Autorzy przeprowadzili szereg zabiegów transplantacji (szczepienia), wykorzystując zjawisko zdolności regeneracyjnych roślin. Kim i wsp. [31] dowiedli, że fuzyjne transkrypty homologa genu *KN1 Lycopersicon esculentum* – *LeT6* i *PDPFK* (*Pyrophosphate Dependent PhosphoFructoKinase*) są długodystansowo transportowane z podkładek mutantu *Me* (*Mouse ear*) pomidora do zrazu tworzonego z roślin typu dzikiego, co jest skorelowane z zachodzącymi zmianami morfologicznymi. Kolejnym potwierdzeniem możliwości transportu cząsteczek RNA na dalekie dystanse dostarczają eksperymenty związane z procesem wyciszania genów. Zjawisko to określa się jako sekwencyjnie specyficzną degradację RNA rozprzestrzeniającą się systemowo w organizmach zwierząt i roślin [6, 32]. Ostatnio wykazano, że jest to być może wynik transportu siRNA długości 21 nt, który odnawiany jest w każdych kolejnych 10–15 komórkach [20].

### Przykłady mRNA transportowanego systemowo

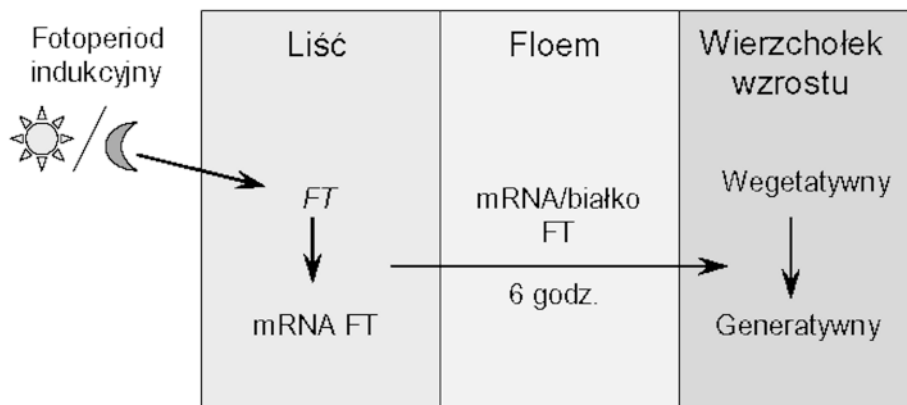
Haywood i wsp. [18] analizowali długodystansowy transport transkryptów dwóch homologicznych genów *CmGAIP Cucurbita maxima* i *GAI Arabidopsis thaliana* należących do rodziny genów *GRAS*. Oba geny kodują białka z domeną DELLA stanowiące negatywne regulatory odpowiedzi na działanie giberelin. Homologi te wybrano ze względu na już wcześniej opisaną ich obecność we floemie oraz łatwy do zaobserwowania fenotyp mutacji w genach kodujących. Wykazano, że mRNA *CmGAIP* jest transportowany floemem z dyni jako podkładki do zrazu tworzonego przez rośliny ogórka. Dodatkowo przeprowadzono doświadczenia z transformowanymi roślinami pomidora i rzodkiewnika, noszącymi zmutowane geny *Cmgaip* oraz  $\Delta$ *DELLAgai* (delecja w domenie DELLA). Mutacje te są semidominujące i prowadzą do zaburzenia szlaku odpowiedzi na działanie giberelin. Rośliny transgeniczne pomidora z tą mutacją wykazują charakterystyczny karłowaty fenotyp z ciemnozielonymi i mniejszymi liśćmi. Użycie mutantów *Cmgaip* lub  $\Delta$ *DELLAgai* jako podkładek powoduje pojawienie się zmian fenotypowych w częściach rośliny stanowiącej zraz typu dzikiego. Zmiany morfologii

liści pomidora są widoczne od drugiego powstającego na zrazie liścia i dotyczą kolejnych dwóch, trzech liści. Kolejne liście nie wykazują zmian morfologicznych. Zaobserwowano także wyraźną gradację zmian fenotypowych wzdłuż osi liścia złożonego pomidora. Najsilniejszy fenotyp *gai* jest widoczny na szczycie liścia, u nasady występuje morfologia prawie typu dzikiego. Autorzy tłumaczą to rozcieńczeniem ilości transgenicznego mRNA przez endogenne mRNA *GAI* obecne w komórkach zrazu. Reakcje *in situ* RT-PCR potwierdziły obecność transkryptu tego transgenu w komórkach sitowych i towarzyszących floemu liści zrazu wykazujących objawy mutacji oraz jego brak w liściach o fenotypie dzikim. Podobne wyniki otrzymano u *A. thaliana* [18].

Eksperymenty te potwierdzają istnienie specyficznego transportu RNA poprzez floem do konkretnych komórek, w tym wypadku komórek merystemu wierzchołkowego i primordiów, gdzie powodują powstanie specyficznych zmian fenotypowych. Świadczy to także, że sygnał transportu długodystansowego może być konserwatywny ewolucyjnie i funkcjonować podobnie w różnych gatunkach roślin.

Zastanawiający jest natomiast brak mRNA *gai* w tkankach owocu pomidora, które są odbiorcą asymilatów floemowych, powinny więc zawierać duże ilości transportowanego floemem RNA. Transportowane RNA są jednak albo specyficznie degradowane, lub w ogóle nie wnikają do komórek tych tkanek [18].

Transport mRNA poprzez floem jest również istotnym procesem uczestniczącym w regulacji fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. Wiadomo, iż induktor kwitnienia zwany florigenem powstaje w liściach bądź liścieniach i następnie jest transportowany do wierzchołka pędu [1, 21]. U *Arabidopsis* odpowiedź na długość dnia zależy od aktywacji genu *FT* (*Flowering Locus T*). W 2005 r. Huang i wsp. [21] wykazali, że lokalna indukcja genu *FT* w pojedynczym liście jest wystarczająca do zakwitnięcia rośliny. Wykazano, że mRNA genu *FT* jest transportowany do wierzchołka wzrostu, gdzie w kompleksie z czynnikiem transkrypcyjnym FD [1] aktywuje kolejne geny kwitnienia.



RYCINA 3. Transport mRNA lub białka FT z tkanki liści do wierzchołka wzrostu indukuje przekształcenie wegetatywnego merystemu wierzchołkowego *A. thaliana* w generatywny (za [21], zmienione)

Eksperyment Huang i wsp. [21] polegał na transformowaniu roślin konstruktem genu *FT* z promotorem transkrypcji genu kodującego białko szoku cieplnego HSP z soi. Podgrzanie pojedynczego liścia do temperatury 37°C powodowało aktywację promotora *HSP* i pojawienie się transkryptu genu *FT*. Sześć godzin po pojawieniu się mRNA *FT* w liściu, można było wykryć obecność transkryptu w wierzchołku pędu (ryc. 3). Potem następował dalszy wzrost poziomu mRNA *FT* zarówno w liściu, jak i wierzchołku już poprzez aktywność endogennego genu *FT*. Świadczy to o pozytywnej autoregulacji tego genu. Huang i wsp. [21] są przekonani, że mRNA jest transportowany floemem, jednakże nie można wykluczyć również transportu białka FT do wierzchołka pędu, gdzie mogłoby indukować ekspresję genu *FT*.

### Międzykomórkowy transport niskocząsteczkowych RNA

W 1993 roku pierwszy raz opisano obecność niskocząsteczkowych RNA (sRNA – ang. *small RNA*) pełniących istotną funkcję biologiczną. Te 19–25 nukleotydowe RNA tworzone są przez dwie grupy: si- i miRNA różniące się biogenezą i funkcjami [5, 6]. miRNA regulują specyficzne geny docelowe homologiczne w obszarze wiązania miRNA, lecz o niewielkiej homologii do reszty cząsteczki prekursorowego miRNA, podczas gdy siRNA zazwyczaj działają na wysoko homologiczne geny [50, 81]. miRNA roślinne zaangażowane są w regulację morfologii liści, tożsamości organów kwiatowych, odpowiedzi stresowych, a także wiele innych procesów postulowanych na podstawie identyfikacji ich prawdopodobnych genów docelowych [2, 8, 25, 26, 80]. siRNA natomiast pełnią ważną rolę w procesie transkrypcyjnego wyciszania (TGS – ang. *Transcriptional Gene Silencing*) sekwencji powtarzających się, takich jak transpozony i powtórzenia heterochromatynowe oraz w potranskrypcyjnym wyciszaniu (PTGS – ang. *Post Transcriptional Gene Silencing*) cząsteczek RNA pochodzenia egzogenego, takich jak wirusy i transgeny [32, 44, 45, 51, 81, 82]. Ostatnio wyróżniono nową grupę sRNA *trans-acting siRNA*, które są zaangażowane w regulację procesu przejścia roślin z młodocianej do dojrzałej fazy rozwoju [81].

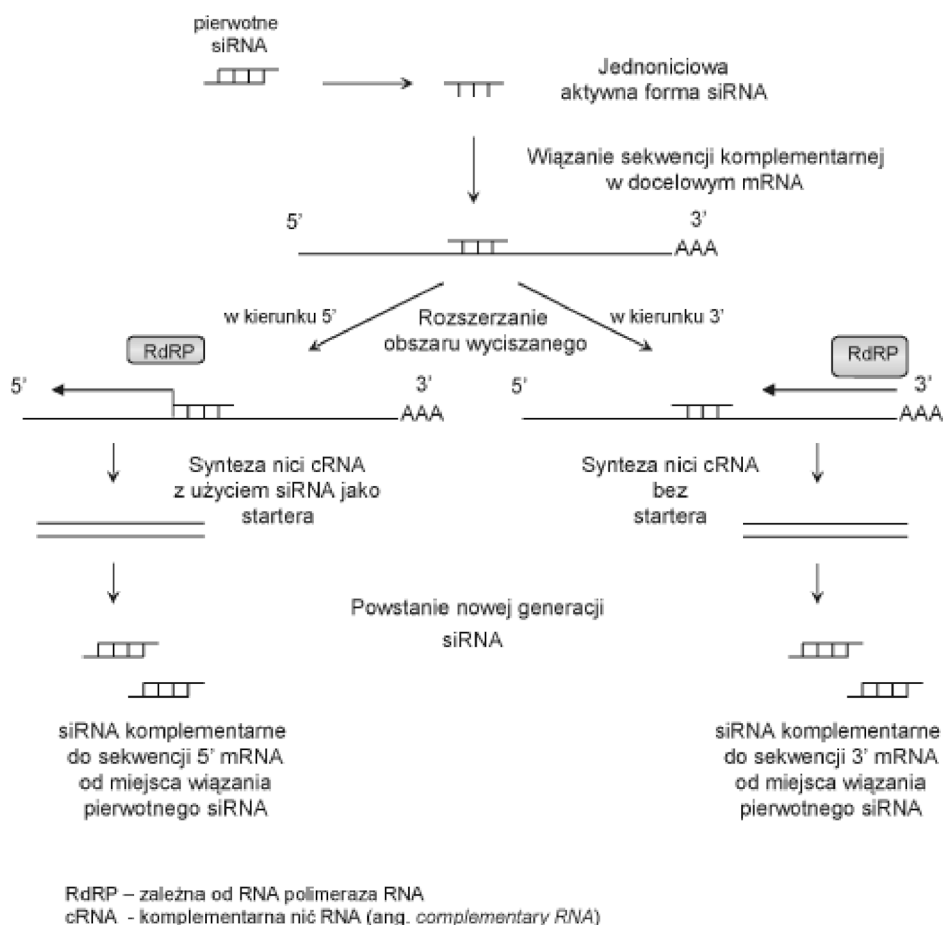
Systemowe rozprzestrzenianie się sygnału PTGS (wyciszanie RNA) poprzez floem jest stosunkowo dobrze opisanym zjawiskiem, które łatwo daje się zaobserwować w eksperymentach szczepienia roślin po lokalnej infekcji wirusem [43, 45, 51, 81]. Małe RNA były uważane za dobrego kandydata na sygnał wyciszania [51], lecz brakowało bezpośrednich dowodów, że są transportowane floemem. Dopiero Yoo i wsp. w 2004 roku [87] wykazali, że małe 18–25 nt RNA odpowiadające autentycznym, regulatorowym małym RNA, zarówno si- jak i miRNA, wnikają i są transportowane przez floem. Badacze ci zidentyfikowali w soku floemowym *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus*, *Lupinus albus*, *Ricinus communis*, *Yucca filamentosa* małe RNA o długości od 18 do 25 nt. Skonstruowana biblioteka sRNA z soku floemowego *C. maxima* zawiera sekwencje komplementarne do różnych genów docelowych, włączając *Transposon-like 1 (Tnl1)* i *Tnl2*, małe RNA identyczne z miRNA159 oraz komplementarne do genów kodujących dwufunkcyjną endonukleazę czy też helikazę RNA. Doświadczenia prowadzono również z użyciem linii transgenicznej *Cucurbita pepo* z ekspresją genu wirusowego kodującego białko płaszczka CP (ang. *Coat Protein*). U

części roślin transgenicznych nastąpiło spontaniczne wyciszenie ekspresji transgenu. W soku floemowym roślin, u których wystąpiło wyciszenie genu *CP*, wykryto akumulację 23 nt siRNA komplementarnego do sekwencji tego genu. Te siRNA można również wykryć w roślinach typu dzikiego będących zrazami na podkładkach z roślin transgenicznych. Podobnie udało się wykryć w soku floemowym *C. maxima* po infekcji wirusem CuYV (ang. *Cucumber Yellow closteroVirus*) obecność siRNA długości 20–21 nt komplementarnego do genomu wirusa [87].

W przeszłości opisywano obecność w soku floemowym białek zaangażowanych w transport mRNA [62], co skłoniło Yoo i wsp. [87] do poszukiwań białek specyficznie wiążących małe RNA i pośredniczących w ich międzykomórkowym transporcie. Badania zaowocowały zidentyfikowaniem białka 27 kDa występującego u dyni, ogórka i łubinu. Białko CmPSRP1 (*Phloem Small RNA binding Protein 1*) jest kodowane u dyni przez gen obecny w jednej kopii i nie wykazuje wysokiej homologii z żadnym znanym genem. Wiąże się ono specyficznie z jednoliciowym ssRNA (ang. *single stranded RNA*) umożliwiając jego transport przez plazmodesmy. Jednakże białko CmPSRP1 pośredniczy w transporcie małych RNA jedynie pomiędzy komórkami towarzyszącymi a rurkami sitowymi floemu. W związku z tym wciąż trwają poszukiwania białka pośredniczącego w długodystansowym transporcie małych RNA [87].

Rozprzestrzenianie się sygnału wyciszania na większe odległości jest możliwe prawdopodobnie dzięki istnieniu zjawiska przejściowego wyciszania RNA (ang. *transitive RNA silencing*) [20, 76]. siRNA wiąże się do homologicznej sekwencji mRNA docelowego i prowadzi do cięcia w miejscu wiązania, wyciszając w ten sposób aktywność genu [82]. Wiele obserwacji wskazuje jednak, że wyciszanie może rozszerzać się na sekwencje nieobecne w sekwencji siRNA indukcyjnego. Przykładowo, wyciszanie transgenu *GFP* poprzez wstrzeliwanie dwuniciowych cząsteczek siRNA homologicznych do rejonu centralnego transgenu powodowało syntezę siRNA z obu 5' i 3' stron od miejsca wiązania początkowego siRNA (ryc. 4) [32]. Rozprzestrzenianie się wyciszania poza sekwencję pierwotną nazwano przejściowym wyciszaniem RNA. Do zajścia tego procesu niezbędna jest obecność komórkowej polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRP), używającej siRNA jako startera i homologicznego transkryptu jako matrycy do syntezy cRNA (ang. *complementary RNA*). RdRP pośredniczy w namnażaniu sygnału wyciszania i produkcji kolejnej generacji siRNA. Użycie jako startera siRNA wyjaśnia rozszerzanie się wyciszania w kierunku 3'–5'. Obserwacje rozchodzenia się wyciszania w kierunku 5'–3' można tłumaczyć zdolnością roślinnej RdRP do inicjowania syntezy cRNA bez użycia starterów na 3' końcu docelowego mRNA [58]. Doświadczenia Petersena i wsp. [58] odnośnie wyciszania transgenu *GUS* tytoniu sugerują, że rozprzestrzenianie się w kierunku 5'–3' przebiega właśnie w wyniku działalności RdRP od strony 3' końca transkryptu bez użycia siRNA jako startera. Nie udało się rozszerzyć wyciszenia endogennych genów, takich jak *ChlI* (*magnesium Chelatase subunit I*) czy *RLIh* (*RNAse L Inhibitor homologue*) [58, 59]. Świadczy to, że proces przejściowego wyciszania RNA może dotyczyć tylko pewnych grup genów.

Badania Hamiltona i wsp. [16] wskazały na istnienie dwu różniących się długością rodzajów siRNA pełniących różne funkcje. Sugerowano, że siRNA długości 21 nt, pośredniczy w cięciu RNA docelowego, natomiast 25 nt siRNA związane jest z metylacją



RYCINA 4. Mechanizm przejściowego wyciszania genów, szczegóły w tekście (na podstawie [16, 58])

DNA i transmisją sygnału wyciszania go w roślinie [16, 72]. Himber i wsp. [20] stwierdzili, że krótkodystansowy ruch sygnału wyciszania zaczyna się od niewielkiej grupy komórek i rozprzestrzenia się na niemal stałą liczbę 10–15 komórek, bez amplifikacji. W ruchu tym uczestniczą cząsteczki siRNA długości 21 nt, nie jest natomiast wymagana obecność 25-nukleotydowego siRNA. Transport na większe odległości wymaga udziału białek SDE1, domniemanej RdRP oraz SDE3, domniemanej helikazy RNA. Ten długodystansowy transport powiązany jest z syntezą nowej generacji siRNA produkowanych we wcześniej opisanym procesie przejściowego wyciszania RNA. W wyniku tego procesu powstają również 21 nt siRNA. Nowa generacja siRNA rozprzestrzenia się znowu na 10–15 komórek, gdzie ponownie następuje synteza nowych cząsteczek [20] (ryc. 1b).

Badano również transport sygnału wyciszania w obrębie całej rośliny. Infekcja roślin zmodyfikowanym wirusem obecnym tylko we flocie powodowała, że wyciszenie w

kolejnych liściach w przypadku transgenu *GFP* było całkowite, natomiast w przypadku genu *RbcS* (*Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit*) ograniczało się tylko do 10–15 komórek wokół nerwów liściowych [20]. Okazało się, że mRNA *GFP* podlega przejściowemu wyciszaniu w przeciwieństwie do *RbcS*, który z bliżej nieznanymi powodów, nie ma takiej zdolności. W związku z tym nie jest tworzona nowa generacja siRNA, która mogłaby przemieszczać się do kolejnych komórek [74]. Wyniki Himbera [20] nie wykluczają jednak uczestnictwa 25-nukleotydowego siRNA we floemowym transporcie sygnału wyciszenia, gdyż nie badali oni długości cząsteczek transportowanych przez tkankę przewodzącą. Jak już wcześniej wspomniano, we floemie roślin transgenicznym dyni charakteryzujących się spontanicznym wyciszeniem transgenu *CP* wykryto siRNA o długości 23 nt [87], tak więc możliwe jest, że długość transportowanych siRNA może być również specyficzna gatunkowo.

Biorąc pod uwagę, że nie wszystkie geny wydają się podlegać przejściowemu wyciszaniu RNA, które niezbędne jest do amplifikacji siRNA oraz fakt istnienia różnej długości cząsteczek siRNA niezbędnych do rozprzestrzeniania się PTGS, wciąż nie wiadomo, czy proponowany przez Himbera i wsp. [20] mechanizm rozprzestrzeniania sygnału wyciszania RNA jest uniwersalny, czy dotyczy tylko pojedynczych przypadków.

### Mechanizm międzykomórkowego transportu RNA

Systemowy transport RNA wymaga przekroczenia szeregu granic komórkowych. W związku z tym powstaje pytanie, jakie czynniki decydują, czy określone RNA pozostają w obrębie danych komórek czy też są transportowane do innych oraz w jaki sposób RNA jest rozpoznawany i transportowany przez sieć symplastyczną do komórek docelowych.

Dotychczas brak danych o sekwencjach nukleotydowych biorących udział w transporcie międzykomórkowym mRNA. Jedyne doniesienia dotyczą sekwencji RNA wiroida. Wiroidy to małe, jednoniciowe, koliste cząsteczki RNA infekujące rośliny. Ich szczególną cechą jest to, że RNA nie koduje żadnych białek funkcjonalnych. Jednakże wiroidowy RNA może się replikować na terenie jądra komórek gospodarza i poruszać systemowo infekując całą roślinę. Jest to prosty model do badań nad rolą struktury i sekwencji RNA potrzebnej do transportu międzykomórkowego [60].

Qi Y i wsp. [60] poszukiwali motywu w sekwencji RNA wiroida PSTVd (ang. *Potato Spindle Tuber Viroid*) odpowiedzialnego za specyficzny transport RNA wiroida z komórek pochwy okołowiązkowej do komórek mezofilu. Eksperymenty dowiodły istotności czterech par zasad w cząsteczce wiroida niezbędnych do tego transportu. Te cztery zasady tworzą dwuczęściowy (jedna zasada znajduje się w jednej z pętli cząsteczki RNA, pozostałe w obrębie domeny infekcyjnej) sygnał transportowy. Motyw ten nie jest już natomiast potrzebny do transportu w drugą stronę – z mezofilu do komórek pochwy okołowiązkowej. Dodatkowo wykazano, że wiroid łatwiej wnika do komórek mezofilu liści starszych, co potwierdza rozwojową regulację transportu między komórkami [60].

## PODSUMOWANIE

Sieć symplastyczna jest miejscem transportu różnorodnych makromolekuł oraz małych cząsteczek sygnalnych. Transport ten może zachodzić w obrębie sąsiadujących komórek, tkanek lub zachodzić systemowo. Transportowane są białka regulatorowe, same bądź też z kodującym je mRNA (np. KN1 [24]), mRNA kodujące specyficzne białka w kompleksach z uniwersalnymi nośnikami białkowymi (np. CmPP16 [86]) oraz małe niekodujące si/miRNA regulujące aktywność określonych genów, również w kompleksach ze specyficznymi białkami [14, 61, 87]. Zarówno zdolność sieci symplastycznej do określonego transportu oraz rodzaj transportowanych molekuł podlegają kontroli w czasie ontogenezy rośliny, a także w odpowiedzi na czynniki środowiskowe [11, 25]. Funkcja tego transportu nie jest do końca poznana, jednakże ścisła korelacja między transportem a przebiegiem procesów morfologicznych świadczy o jego podstawowym znaczeniu dla realizacji określonych programów rozwojowych rośliny.

## LITERATURA

- [1] ABE M, KOBAYASHI Y, YAMAMOTO S, DAIMON Y, YAMAGUCHI A, IKEDA Y, ICHINOKI H, NOTAGUCHI M, GOTO K, ARAKI T. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 2005; **309**: 1052–1056.
- [2] ADAIA A, JOHNSON C, MLOTSHWA S, ARCHER-EVANS S, MANOCHA V, VANCE V, SUNDARESAN V. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 2005; **15**: 78–91.
- [3] AOKI K, KRAGLER F, XOCONOSTLE-CÁZARES B, LUCAS WJ. A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 16342–16347.
- [4] BALACHANDRAN S, XIANG Y, SCHOBERT C, THOMPSON GA, LUCAS WJ. Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14150–14155.
- [5] BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**: 281–297.
- [6] BAULCOMBE D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; **431**: 356–363.
- [7] BOLLE C. The role of GRAS proteins in plant signaling transduction and development. *Planta* 2004; **218**: 683–692.
- [8] BONNET E, WUYTS J, ROUZE P, VAN DE PEER Y. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 11511–11516.
- [9] CARRINGTON JC, KASSCHAU KD, MAHAJAN SK, SCHAAD MC. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 1996; **8**: 1669–1681.
- [10] CHEN MH, SHENG J, HIND G, HANDA AK, CITOVSKY V. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J* 2000; **19**: 913–920.
- [11] CRAWFORD KM, ZAMBRYSKI PC. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1802–1812.
- [12] CRAWFORD KM, ZAMBRYSKI PC. Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr Biol* 2000; **10**: 1032–1040.
- [13] DEOM CM, OLIVER MJ, BEACHY RN. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic-virus potentiates virus movement. *Science* 1987; **237**: 389–394.

- [14] DING B, ITAYA A, QI Y. Symplasmic protein and RNA traffic: regulatory points and regulatory factors. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 596–602.
- [15] GIESMAN-COOKMEYER D, LOMMEL SA. Alanine scanning mutagenesis of a plant virus movement protein identifies three functional domains. *Plant Cell* 1993; **5**: 973–982.
- [16] HAMILTON AJ, VOINNET O, CHAPPELL L, BAULCOMBE DC. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 2002; **21**: 4671–4679.
- [17] HAYWOOD V, KRAGLER F, LUCAS WJ. Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell Supplement* 2002; S303–S325.
- [18] HAYWOOD V, YU TS, HUANG NC, LUCAS WJ. Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J* 2005; **42**: 49–68.
- [19] HEESE-PECK A, RAIKHEL NV. A glycoprotein modified with terminal *n*-acetylglucosamine and localized at the nuclear rim shows sequence similarity to aldose-1-epimerases. *Plant Cell* 1998; **10**: 599–612.
- [20] HIMBER C, DUNOYER P, MOISSIARD G, RITZENTHALER C, VOINNET O. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 2003; **22**: 4523–4533.
- [21] HUANG T, BOHLENIUS H, ERIKSSON S, PARCY F, NILSSON O. The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 2005; **309**: 1694–1696.
- [22] IMLAU A, TRUERNIT E, SAUER N. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 1999; **11**: 309–322.
- [23] ISHIWATARI Y, FUJIWARA T, MCFARLAND KC, NEMOTO K, HAYASHI H, CHINO M, LUCAS WJ. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* 1998; **205**: 12–22.
- [24] JACKSON D. Double labeling of KNOTTED1 mRNA and protein reveals multiple potential sites of protein trafficking in the shoot apex. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1423–1429.
- [25] JONES-RHOADES MW, BARTEL DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 2004; **14**: 787–799.
- [26] KIDNER CA, MARTIENSEN RA. The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 38–44.
- [27] KIM JY, RIM Y, WANG J, JACKSON D. A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes Dev* 2005; **19**: 788–793.
- [28] KIM JY, YUAN Z, CILIA M, KHALFAN-JAGANI Z, JACKSON D. Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 4103–4108.
- [29] KIM JY, YUAN Z, JACKSON D. Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*. *Development* 2003; **130**: 4351–4362.
- [30] KIM JY. Regulation of short-distance transport of RNA and protein. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 45–52.
- [31] KIM M, CANIO W, KESSLER S, SINHA N. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* 2001; **293**: 287–289.
- [32] KLAHRE U, CRETE P, LEUENBERGER SA, IGLESIAS VA, MEINS FJ. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11981–11986.
- [33] KOPCEWICZ J. Rozwój generatywny. [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] Fizjologia roślin. Warszawa, PWN 2002: 520–557.
- [34] KOPCEWICZ J. Rozwój wegetatywny. [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] Fizjologia roślin. Warszawa, PWN 2002: 498–520.
- [35] KRAGLER F, CURIN M, TRUTNYEVA K, GANSCH A, WAIGMANN E. MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein1. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1870–1883.
- [36] KRAGLER F, MONZER J, SHASH K, XOCONOSTLE-CAZARES B, LUCAS WJ. Cell-to-cell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J* 1998; **15**: 367–381.
- [37] KRAGLER F, MONZER J, XOCONOSTLE-CAZARES B, LUCAS WJ. Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J* 2000; **19**: 2856–2868.
- [38] KUHN C, FRANCESCHI VR. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve element. *Science* 1997; **275**: 1298–1300.

- [39] KUHN C, HAJIREZAEI MR, FERNIE AR, ROESSNER-TUNALI U, CZECHOWSKI T, HIRNER B, FROMMER WB. The Sucrose Transporter *StSUT1* localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol* 2003; **131**:102–113.
- [40] KURATA T, OKADA K, WADA T. Intercellular movement of transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 600–605.
- [41] KWIATKOWSKA M. Zmiany ultrastruktury i rozmieszczenia plazmodesm a proces dyferencjacji na przykładzie anterydiostanów glonów z rodziny *Chara*. *Post Biol Kom* 2004; Supplement **22**: 157–174.
- [42] LEE JY, YOO BC, LUCAS WJ. Parallels between nuclear-pore and plasmodesmal trafficking of information molecules. *Planta* 2000; **210**: 177–187.
- [43] LEE JY, YOO BC, ROJAS MR, GOMEZ-OSPINA N, STAEHELIN LA, LUCAS WJ. Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science* 2003; **299**: 392–396.
- [44] LEHMAN P. Wyciszanie RNA: naturalny system obronny roślin przeciw infekcji wirusowej. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 75–86.
- [45] LIAVE C, KASSCHAU KD, RECTOR MA, CARRINGTON JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 2002; **14**:1605–1619.
- [46] LUCAS WJ, LEE JY. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 712–726.
- [47] LUCAS WJ, YOO BC, KRAGLER F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 849–857.
- [48] MARTENS HJ, HANSEN M, SCHULZ A. Caged probes: a novel tool in studying symplasmic transport in plant tissues. *Protoplasma* 2004; **223**: 63–66.
- [49] MATSUSHITA Y, DEGUCHI M, YOUNDA M, NISHIGUCHI M, NYUNOYA H. The tomato mosaic tobamovirus movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KELP. *Mol Cells* 2001; **12**: 57–66.
- [50] MEISTER G, TUSCHL T. Mechanisms of gene silencing by doublestranded RNA. *Nature* 2004; **431**: 343–349.
- [51] MLOTSHWA S, VOINNET O, METTE MF, MATZKE M, VAUCHERET H, DING SW, PRUSS G, VANCE VB. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell Supplement* 2002; S289–S301.
- [52] NAGASAKI H, SAKAOTO T, SATO Y, MATSUOKA M. Functional analysis of the conserved domain of a rice KNOX homeodomain protein, OSH15. *Plant Cell* 2001; **13**: 2085–2098.
- [53] NAKAJIMA K, SENA G, NAWY T, BENFEY PN. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 2001; **413**: 307–311.
- [54] OPARKA KJ, CRUZ SS. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **51**: 323–347.
- [55] OPARKA KJ. Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 33–41.
- [56] OWENS RA, BLACKBURN M, DING B. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; **14**: 905–909.
- [57] PERBAL MC, HAUGHN G, SAEDLER H, SCHWARZ-SOMMER Z. Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* 1996; **122**: 3433–3441.
- [58] PETERSEN BO, ALBRECHTSEN M. Evidence implying only unprimed RdRP activity during transitive gene silencing in plants. *Plant Mol Biol* 2005; **58**: 575–583.
- [59] PETERSEN BO, JØRGENSEN B, ALBRECHTSEN M. Isolation and RNA silencing of homologues of the RNaseL inhibitor in *Nicotiana* species. *Plant Sci* 2004; **167**: 1283–1289.
- [60] QI Y, PELISSIER T, ITAYA A, HUNT E, WASENEGGER M, DING B. Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. *Plant Cell* 2004; **16**:1741–52.
- [61] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-CÁZARES B, KRAGLER F. The plasmodesmal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 641–650.
- [62] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-CÁZARES B, LUCAS WJ. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 1999; **126**: 4405–4419.
- [63] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-CÁZARES B, LUCAS WJ. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 202–209.
- [64] RYABOV EV, ROBINSON DJ, TALIANSKY ME. A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1212–1217.
- [65] SENA G, JUNG JW, BENFEY PN. A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development* 2004; **131**, 2817–2826.

- [66] SESSIONS A, YANOFSKY MF, WEIGEL D. Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* 2000; **289**: 779–782.
- [67] SOELLICK T, UHRIG JF, BUCHER GL, KELLMANN JW, SCHREIER PH. The movement protein NSm of Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 2373–2378.
- [68] SOKOŁOWSKA K. Regulacja łączności symplastycznej w procesie wzrostu i rozwoju roślin. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 603–6016.
- [69] SOWIŃSKI P. Plazmodesmy, jako element systemu komunikacji w roślinach. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 613–626.
- [70] SOWIŃSKI P. Rurki sitowe – fenomen funkcjonalności. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 619–633.
- [71] STARCK Z. Transport floemowy i dystrybucja substancji pokarmowych. [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] Fizjologia roślin. Warszawa, PWN 2002: 434–462.
- [72] TANG G, REINHART BJ, BARTEL DP, ZAMORE PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Develop* 2003; **17**: 49–63.
- [73] TRETYN A. Podstawy strukturalno-funkcjonalne komórki roślinnej. [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] Fizjologia roślin. Warszawa, PWN 2002: 43–52.
- [74] VAISTIJ FE, JONES L, BAULCOMBE DC. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 2002; **14**: 857–867.
- [75] VAN BEL AJ, EHLERS K, KNOBLAUCH M. Sieve elements caught in the act. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 126–132.
- [76] VAN HOUTD H, BLEYS A, DEPICKER A. RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. *Plant Physiol* 2003; **131**: 245–253.
- [77] WADA T, KURATA T, TOMINAGA R, KOSHINO-KIMURA Y, TACHIBANA T, GOTO K, MARKS MD, SHIMURA Y, OKADA K. Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 2002; **129**: 5409–5419.
- [78] WAIGMANN E, LUCAS WJ, CITOVSKEY V, ZAMBRYSKI P. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1433–1437.
- [79] WALZ C, GIAVALISCO P, SCHAD M, JUENGER M, KLOSE J, KEHR J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* 2004; **65**: 1795–1804.
- [80] WANG XJ, REYES JL, CHUA NH, GAASTERLAND T. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol* 2004; **5**: 65–80.
- [81] WILLMANN MR, POETHIG RS. Time to grow up: the temporal role of small RNAs in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 548–552.
- [82] WIŚNIEWSKA A, FILIPECKI M. Wyciszenie genów jako strategia badania ich funkcji w roślinach. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 339–358.
- [83] WOLF S, DEOM CM, BEACHY RN, LUCAS WJ. Movement protein of tobacco mosaic-virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 1989; **246**: 377–379.
- [84] WU X, DINNENY JR, CRAWFORD KM, RHEE Y, CITOVSKEY V, ZAMBRYSKI PC, WEIGEL D. Modes of intercellular transcription factor movement in the *Arabidopsis* apex. *Development* 2003; **130**: 3735–3745.
- [85] XOCONOSTLE-CÁZARES B, RUIZ-MEDRANO R, LUCAS WJ. Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b5 reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J* 2000; **24**: 735–747.
- [86] XOCONOSTLE-CÁZARES B, XIANG Y, RUIZ-MEDRANO R, WANG HL, MONZER J, YOO BC, MCFARLAND KC, FRANCESCHI VR, LUCAS WJ. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 1999; **283**: 94–98.
- [87] YOO BC, KRAGLER F, VARKONYI-GASICE, HAYWOOD V, ARCHER-EVANS S, LEE YM, LOUGH TJ, LUCAS WJ. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* 2004; **16**: 1979–2000.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 31.03.2006 r.

Przyjęto: 29.05. 2006 .

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń,

e-mail: pnowa@uni.torun.pl