



## Ekspansyny – niezwykle białka roślin

Magdalena Łuczak<sup>1</sup>, Przemysław Wojtaszek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

<sup>2</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

### Expansins – unique plant proteins

#### Summary

Expansins are extracellular proteins which are able to loosen cell walls thus making possible the extension and stress relaxation of plant walls. Expansins are classified on the basis of sequence similarities and substrate specificity into two subfamilies of  $\alpha$ - and  $\beta$ -expansins. The expansins' mode of action is based on the weakening of hydrogen bonds between cellulose microfibrils and on interacting matrix polymers, especially hemicelluloses. However, they do not reveal any hydrolytic or proteolytic activity. The activity of expansins is decisive for the control of plant cells' shape, and thus these proteins are thought to be an important component of biochemical machineries controlling cell growth and differentiation, as well as plant morphogenesis and development. This article reviews the advances made since the discovery of expansins and describes their characteristic features, including protein structure and biochemical mode of action, molecular organisation of expansin-coding genes, and biological functions of these unusual proteins.

#### Key words:

cell wall, development, expansin (genes and proteins), growth, morphogenesis, plant.

#### Adres do korespondencji

Przemysław Wojtaszek,  
Instytut Chemii  
Bioorganicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań;  
e-mail:  
przemow@ibch.poznan.pl

### 1. Wstęp

Ściany komórkowe, obok plastydów i częściowo wakuol, są najbardziej charakterystycznym elementem komórek roślinnych. Jeszcze do niedawna uważane były za sztywne, martwe struktury otaczające żywe protoplasty, których jedyną funkcją jest do-

starczenie roślinom swoistego szkieletu. Tymczasem, według najnowszych danych uważa się je za integralny, metabolicznie aktywny składnik żywych komórek, ulegający dynamicznym zmianom w odpowiedzi na bodźce wewnętrzne i zewnętrzne. Ściany komórkowe nie tylko determinują kształt komórki, ale również biorą udział w procesach transportowych, uczestniczą w procesach komunikacji międzykomórkowej, są istotnym wyznacznikiem procesów rozwoju i morfogenezy oraz stanowią naturalną barierę przed patogenami (1). Dawne przekonania spowodowały jednak, że dopiero teraz ujawniane są największe tajemnice skrywane przez ściany komórkowe. Identyfikacja i charakterystyka ekspansyn należą bez wątpienia do najciekawszych odkryć ostatnich lat.

## 2. Udział ścian komórkowych w regulacji kształtu i wzrostu komórek

Zarówno komórki zwierzęce, jak i protoplasty roślin otoczone są strukturami, których budowa przypomina materiały kompozytowe, takie jak stosowane przez ludzi żelazobeton, czy szkło zbrojone. W pierwotnych ścianach komórkowych roślin rolę „prętów” zbrojeniowych spełnia sieć mikrofibryl celulozowych, natomiast bezpostaciowym „wypełniaczem” jest hydrofilna matriks złożona z cukrowych hemice-luloz i pektyn oraz białek i związków fenolowych. Elementy ścian powiązane są ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi i/lub wodorowymi oraz stabilizowane oddziaływaniami jonowymi i hydrofobowymi. Liczba i zasięg tych powiązań międzycząsteczkowych, a także lokalne warunki fizykochemiczne, decydują o właściwościach mechanicznych ścian.

Ściany komórkowe tworzą w roślinie strukturalne i funkcjonalne kontinuum zwane apoplastem. Aby mogły one wypełniać swoje funkcje w tkankach roślinnych, muszą spełniać pozornie sprzeczne wymagania. Z jednej strony muszą być wystarczająco sztywne, aby odgrywać rolę szkieletu roślinnego, a z drugiej muszą być na tyle elastyczne, aby umożliwić wzrost pojedynczych komórek (2). Nowe komórki powstające w tkance merystematycznej mają początkowo bardzo niewielkie rozmiary (około 5  $\mu\text{m}$  średnicy) i gęsto upakowaną cytoplazmę. Przejście komórek do fazy wzrostu i różnicowania zaznacza się m.in. wielokrotnym zwiększeniem ich rozmiarów. Skrajnym przykładem są przewodzące wodę komórki ksylemu, które mogą wydłużyć się nawet milionkrotnie. Wzrost komórek jest wypadkową dwóch różnych procesów: pobierania wody, powodującego zwiększanie turgoru (wewnętrznego ciśnienia hydrostatycznego) komórki oraz rozluźniania strukturalnie stabilnych ścian komórkowych (3). Jedną z możliwości jest rearanżacja skomplikowanej sieci powiązań międzycząsteczkowych ścian. Jeśli jednak procesowi temu nie będzie towarzyszyć włączanie do ścian nowych cząsteczek polisacharydów wydzielanych przez protoplast, wówczas wraz ze wzrostem komórek ściany komórkowe będą stawać się coraz cieńsze i w końcu ulegną zerwaniu. To zaś oznacza, że równolegle z przebudowaniem wzajemnych powiązań między cząsteczkami, w ścianach muszą zostać



utworzone wolne przestrzenie, w obrębie których może nastąpić inkorporacja nowych polisacharydów. Te mechanizmy regulujące procesem rozluźniania ścian jeszcze do niedawna były zupełnie nie znane.

W latach siedemdziesiątych pojawiła się koncepcja „wzrostu kwasowego” (*acid growth*) tłumacząca wyniki badań nad rolą fitohormonów w indukcji wzrostu tkanek. Po potraktowaniu auksynami fragmentów hypokotyli lub koleoptyli obserwowano zwykle przyspieszenie tempa wydłużania się komórek i szybki wzrost tkanek. Kiedy izolowane i zinktywowane tkanki poddawano stałemu rozciąganiu w ekstensometrze, zauważono, że w kwaśnym pH (<5,5) wydłużanie ścian jest bardzo intensywne, podczas gdy w neutralnym pH jego tempo znacznie się obniża (4). Zaproponowano zatem, że jednym z efektów działania auksyn jest aktywacja pompy protonowej przenoszącej jony  $H^+$  do ściany komórkowej. Konsekwencją jest obniżenie pH ściany i uruchomienie mechanizmów rozluźniających (5). Pierwotną propozycję, że enzymami – „egzekutorami” procesu rozluźniania są różnego rodzaju glikozydazy, po dokładniejszych badaniach właściwie wykluczono, gdy stwierdzono, że ich działanie prowadzi do zniszczenia mechanicznej wytrzymałości ścian. Intensywne poszukiwania innych regulatorów białkowych zaowocowały w 1992 r. identyfikacją dwóch potencjalnych kandydatów: endotransglikozylaz ksyloglukanu (6,7) oraz ekspansyn (8). W ostatnich zaś latach odkryto też mechanizm nieenzymatycznego rozluźniania ścian, wykorzystujący działanie reaktywnych form tlenu (9). O tym, że odkrycia te nie wyczerpują katalogu sposobów regulacji właściwości mechanicznych ścian świadczy również informacja o scharakteryzowaniu nowych białek modulujących rozciągliwość ścian komórkowych. Białka te, określane mianem *yieldins*, wykazują zdolność do obniżania wartości progowej naprężenia ścian, powyżej której następuje rozluźnianie ich struktury. Innymi słowy, potrzeba mniej siły do ich rozciągnięcia. Co ciekawe, białka te wykazują podobieństwo sekwencji aminokwasowej do kwaśnych endochitynaz, ale pozbawione są takiej aktywności enzymatycznej (10).

### 3. Ekspansyny i zagadka mechanizmu ich działania

Zgodnie z definicją ekspansynami nazywamy białka, które indukują długotrwałe, zależne od pH, wydłużanie ścian oraz wzmagają relaksację naprężeń w izolowanych ścianach, również na drodze zależnej od pH. Warto zauważyć, że definicja nie określa precyzyjnie mechanizmu działania. Wieloletnie badania doprowadziły jedynie do ustalenia warunków, jakie musi spełniać białko, by uznać je za ekspansynę. Dopiero analiza molekularna genów kodujących ekspansyny pozwoliła zasugerować najbardziej prawdopodobny sposób ich funkcjonowania w ścianach.



### 3.1. Biochemiczne podstawy funkcjonowania ekspansyn

W odróżnieniu od endotransglikozylaz ksyloglukanu, które katalizują reorganizację polisacharydów ścian (11), działaniu ekspansyn nie towarzyszą żadne, wykrywalne współczesnymi technikami analitycznymi, zmiany w rozkładzie mas cząsteczkowych polimerów cukrowych ścian. Nie obserwuje się również osłabiania ścian i zmian strukturalnych. Do swego działania ekspansyny nie wymagają żadnych ligandów ani kofaktorów. Stwierdzono jedynie, że obecność reduktantów tiolowych podtrzymuje stabilną ekspresję ekspansyn. Początkowo, przez analogię do mechanizmu działania glikozydaz, przypuszczano, że białka te rozluźniają ściany komórkowe w wyniku hydrolizy polimerów hemicelulozowych lub pektynowych, oddziałujących z mikrofibrylami celulozowymi. Choć do końca nie udało się, jak dotąd, wykluczyć tej możliwości, wszystko wskazuje na to, że ekspansyny roślinne pozbawione są aktywności glikolitycznej lub proteolitycznej. Jedynym znanym wyjątkiem, potwierdzającym jednak tę regułę, jest podobne do ekspansyn białko ze ścian komórkowych grzyba *Trichoderma reesei* (12). Niezwykle cennych wskazówek dostarczyły badania w układach modelowych. Wykorzystanie bibuły, a zatem materiału zbudowanego z włókien celulozowych, powiązanych ze sobą wiązaniami wodorowymi, pokazało, że ekspansyny zrywały te wiązania osłabiając wytrzymałość bibuły, ale nie powodowały przy tym jej hydrolizy (13). Wykazano również, że działanie ekspansyn ułatwiało i wzmacniało hydrolityczną degradację celulozy przez celulazy. Co ciekawe, w przeprowadzonych analizach porównawczych udowodniono, że ekspansyny są mało aktywne wobec czystej, krystalicznej celulozy. Z kolei w badaniach układów mieszanych (kompleksów, w których mikrofibrylom celulozowym towarzyszyły inne polisacharydy) pokazano, że ekspansyny wykazują specyficzność substratową: są one wysoce aktywne wobec polimerów ksyloglukanu i słabo aktywne lub nieaktywne wobec glukomannanów lub galaktomannanów. Co więcej, w takich układach obserwowano również zwiększone powinowactwo ekspansyn do niekrystalicznych obszarów mikrofibryl (14,15). Tak zatem na podstawie analizy aktywności białek zaproponowano koncepcję mechanizmu dotyczącą działania ekspansyn polegającego na osłabianiu oddziaływań niekowalencyjnych pomiędzy polisacharydami ścian, a dokładniej powiązań pomiędzy mikrofibrylami celulozy a glikanami, które z nimi oddziałują. Umożliwia to „ślizganie się” polisacharydów wobec siebie i w efekcie następuje napędzany turgorem wzrost komórek (16).

### 3.2. Molekularne aspekty mechanizmu aktywności ekspansyn

Identyfikacja sekwencji genetycznej dwóch ekspansyn wyizolowanych ze ścian komórkowych hypokotyli ogórka (17) otworzyła drogę do identyfikacji genów ekspansyn w tkankach innych gatunków roślin wyższych takich jak rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana* L.), groch, ryż, pomidory, truskawka, tytoń, soja, bawełna, ryż czy ku-



kurydza (18-20). Dzięki temu można było przeprowadzić analizę porównawczą DNA ekspansyn, w której ujawniono, że są to białka różniące się sekwencją aminokwasów w zależności od typu tkanki i gatunku roślin, w których występują. Na tej podstawie wyróżniono dwie klasy białek:  $\alpha$ -ekspansyny i  $\beta$ -ekspansyny. Jako pierwsze scharakteryzowano  $\alpha$ -ekspansyny i nasza wiedza o ich biochemii i fizjologii jest o wiele większa niż w przypadku  $\beta$ -ekspansyn. Pamiętać jednak należy o tym, że do dzisiaj na poziomie białkowym opisano jedynie cztery  $\alpha$ -ekspansyny i jedną  $\beta$ -ekspansynę, natomiast większość danych pochodzi z badań molekularnych.

$\alpha$ -ekspansyny występują głównie w tkankach wegetatywnych roślin dwuliściennych, zarówno u okryto-, jak i nagozalążkowych (18), natomiast  $\beta$ -ekspansyny dominują w ścianach komórkowych pyłku i tkanek wegetatywnych traw. To zróżnicowane występowanie ekspansyn odzwierciedla rzeczywiste różnice w budowie ścian komórkowych obu grup roślin. W porównaniu do typowych ścian roślin dwuliściennych (określanych mianem ścian typu I), ściany komórkowe traw (tzw. typu II) zawierają znacznie więcej hemiceluloz i związków fenolowych, co zmienia ich podatność na działanie wielu enzymów. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, występowanie ekspansyn ograniczone jest wyłącznie do roślin lądowych. Białko podobne do ekspansyn wykryto, jak dotąd, jedynie w przewodzie pokarmowym ślimaka ogrodowego *Helix pomatia*, gdzie prawdopodobnie spełnia pomocniczą rolę w trawieniu tkanek roślinnych, stanowiących podstawę jego diety (16). Drugim jest, wspomniane już, białko ze ścian *Trichoderma reesei*. Podobnie jak ekspansyny indukuje ono rozciąganie zainaktywowanych wysoką temperaturą ścian komórkowych typu I, jednak w odróżnieniu od ekspansyn białko to wykazuje też aktywność endo 1,4  $\beta$ -glukanazy i to zarówno w stosunku do ścian typu I, jak i II (12).

Zarówno  $\alpha$ -, jak i  $\beta$ -ekspansyny podane *in vivo* stymulują wzrost komórek, jednak aktywność ich jest swoista w stosunku do ścian komórkowych tych grup roślin, w których występują. Przykładowo,  $\beta$ -ekspansyny izolowane z pyłku kukurydzy wykazują niską aktywność wobec ścian komórkowych hypokotyli ogórka, a preparaty  $\alpha$ -ekspansyn nie działają na tkanki kukurydzy i ryżu (21). Na uwagę zasługuje fakt, że  $\alpha$ -ekspansyny występują w ścianach komórkowych w ilościach katalitycznych, a ich aktywność jest rzeczywiście czynnikiem ograniczającym i kontrolującym tempo wzrostu tkanek. U ogórka stwierdzono, że na 10 000 części suchej masy ścian występują tylko 2 części ekspansyn (22). W odróżnieniu od nich,  $\beta$ -ekspansyny występują w tkankach w znacznie większych ilościach, przy czym niezbyt silnie wiążą się ze ścianą komórkową.  $\beta$ -ekspansyny wykazują pewne podobieństwo do tzw. alergenów grupy I. Białka rodziny  $\alpha$ -ekspansyn wykazują duży stopień zachowawczości. W sekwencji wszystkich  $\alpha$ -ekspansyn występuje około 75% aminokwasów identycznych i około 90% podobnych. Z kolei porównanie obu rodzin ujawnia dość odległe, bo sięgające jedynie 20-25%, podobieństwo sekwencyjne.

O ile poznanie sekwencji genów ekspansyn u różnych gatunków roślin umożliwiło wyróżnienie rodzin ekspansyn, o tyle rozszyfrowanie genomu *Arabidopsis* oraz częściowe zsekwencionowanie genomu ryżu dało do ręki narzędzie analizy molekularnej.



larnej genów kodujących izoformy ekspansyn. W genomie rzodkiewnika zidentyfikowano 26 genów kodujących  $\alpha$ -ekspansyny (At-EXP1-26) i 5 genów  $\beta$ -ekspansyn (At-EXPB1-5) oraz co najmniej 4 geny kodujące białka podobne do ekspansyn (<http://www.bio.psu.edu/expansins/>). Na podstawie przeprowadzonej analizy genomu ryżu ujawniono, jak dotąd, obecność 26 genów  $\alpha$ - i 14 genów  $\beta$ -ekspansyn. Całkowite rozszyfrowanie sekwencji ukaże być może większą liczbę genów (21). Poza tym zidentyfikowano 6 cDNA  $\alpha$ -ekspansyn z owoców truskawki (23), 7 cDNA  $\alpha$ -ekspansyn u ogórka (24), 5 cDNA  $\alpha$ - i 8 cDNA  $\beta$ -ekspansyn u kukurydzy (25) oraz kilka u tytoniu (26) i pomidora (27).

Wysoka konserwatywność sekwencji genów  $\alpha$ - i  $\beta$ -ekspansyn pozwala przypuszczać, że wyewoluowały one z jednego genu. Organizacja eksonów i intronów wykazuje duże podobieństwo w obu klasach białek, a także w genach białek podobnych do ekspansyn u wielu gatunków roślin. Różnią się one jedynie liczbą intronów i ich długością (21). Większość genów  $\alpha$ -ekspansyn u *A. thaliana* zawiera 2 introny o długości 90-500 pz. Niektóre z nich (At-EXP17-26) nie posiadają intronu drugiego, natomiast At-EXP10 posiada dodatkową sekwencję niekodującą w rejonie końca 5', nie ulegającego translacji. Geny  $\beta$ -ekspansyn *Arabidopsis* zawierają trzy introny, z których dwa są podobne do tych występujących w genach  $\alpha$ -ekspansyn. Podobną sytuację obserwuje się w genomie ryżu: większość genów  $\alpha$ -ekspansyn zawiera dwa introny, choć niektóre nie posiadają jednego (Os-EXP1, 8, 9 i 17) lub obu intronów (Os-EXP11). Geny  $\beta$ -ekspansyn zwykle zawierają trzy introny, choć są również takie, które posiadają ich pięć (Os-EXPB12), dwa (Os-EXPB2, 6 i 9) lub zero (Os-EXPB1, 10 i 13) (21). Mimo tych różnic zauważyć można, że te same sekwencje niekodujące (jeśli występują) znajdują się dokładnie w tym samym miejscu w różnych genach, co sugeruje, że początkowo geny ekspansyn posiadały tylko dwa ( $\alpha$ -ekspansyny) lub trzy ( $\beta$ -ekspansyny) introny. Podobny obraz uorganizowania intronów w ryżu i *Arabidopsis* wskazuje, że  $\alpha$ - i  $\beta$ -ekspansyny w różnych gatunkach powstały z jednego przodka. Wiele genów ekspansyn u *Arabidopsis* i ryżu jest tandemowo powtórzonych w genomie, sugerując możliwość wielokrotnych duplikacji. Prawdopodobnie są to geny młode ewolucyjnie (21).

Ekspansyny występują w bardzo dużej liczbie izoform. Każda z nich może być kontrolowana przez różne sygnały hormonalne i rozwojowe (20). Izofornie ekspansyn mogą różnić się nieco optimum pH i wywoływanym efektem działania w zależności od typu tkanki i gatunku, w którym występują. Obrazy ekspresji genów kodujących różne izoformy są bardzo swoiste organowo. Mimo to, wszystkie ekspansyny wykazują wysoką konserwatywność sekwencji aminokwasowej. Pierwotne transkrypty ekspansyn kodują białka zbudowane z trzech różnych domen. Pierwszą domenę stanowi peptyd sygnałny zwykle o długości 22-25 aminokwasów, kierujący powstające białko do retikulum endoplazmatycznego, gdzie jest on odcinany. W aparacie Golgiego wszystkie ekspansyny poddawane są obróbce potranslacyjnej, jednak N-glikozyłacji ulegają jedynie  $\beta$ -ekspansyny. Dojrzałe białko o masie 25-27 kDa zbudowane jest z dwóch domen. Na końcu karboksylowym znajduje się domena wiążąca polisacharydy o wielkości około 10 kDa, bogata w reszty tryptofanowe,



a od końca aminowego, bogata w cysteiny, sekwencja podobna do sekwencji aminokwasowych endoglukanaz z rodziny 45 (20).

Mimo że  $\alpha$ - i  $\beta$ -ekspansyny wykazują jedynie około 25% podobieństwa sekwencji, mechanizm ich działania jest bardzo podobny. Wynika z tego, że sekwencje istotne dla aktywności ekspansyn w ścianach komórkowych zawarte są w rejonach konserwatywnych dla obu klas białek. Przypuszcza się, że są to, występujące we wszystkich ekspansynach, niektóre pary cysteinowe na N-końcu, sekwencje tryptofanowe na C-końcu oraz segmenty HFD (His-Phe-Asp) w domenie centralnej (20).

Na podstawie analiz porównawczych stwierdzono, że bogata w tryptofan domena na C-końcu ekspansyn wykazuje duże podobieństwo sekwencji aminokwasowej do niektórych bakteryjnych celulaz. Prawdopodobnie domena ta jest odpowiedzialna za przyłączenie białka do mikrofibryli celulozowych, i z tego względu nazwano ją domeną wiążącą polisacharydy. Natomiast bogata w cysteiny, domena na N-końcu wykazuje podobieństwo do wiążących chitynę domen aglutyniny z kielków pszenicy (WGA). Reszty cysteinowe WGA stabilizują strukturę białka dzięki wytworzonym mostkom disiarczkowym. Na tej podstawie uważa się, że domena na końcu aminowym ekspansyn bierze udział w stabilizacji struktury białka podczas rozluźniania ścian komórkowych (20). Wskazuje na to również fakt podtrzymywania stabilnej aktywności ekspansyn przez reduktanty tiolowe. W przeprowadzonych próbach ekspresji  $\alpha$ -ekspansyn w systemach bakteryjnych i bakulowirusowych wykazano, że wymagają one obecności czynników redukujących w buforze ekstrakcyjnym dla uzyskania aktywności zbliżonej do aktywności natywnych ekspansyn. Ich brak powodował, że białka te zbijały się w nierozpuszczalne agregaty w wyniku nieprawidłowego formowania struktury drugo- i trzeciorzędowej (20).

Centralny region domeny bogatej w cysteinę wykazuje podobieństwo do rdzenia katalitycznego endoglukanaz rodziny 45 i z tego względu uważa się go za region katalityczny ekspansyn, biorący bezpośredni udział w osłabianiu wiązań pomiędzy polimerami ściany komórkowej. Zgodnie z taką propozycją, ekspansyny przyłączają się do mikrofibryl celulozowych ścian za pomocą domeny wiążącej polisacharydy, a następnie domena o funkcji katalitycznej rozluźnia strukturę ściany komórkowej na drodze zerwania wiązań wodorowych pomiędzy mikrofibrylami celulozowymi a przyłączonymi do nich polisacharydami, głównie hemicelulozami. Aktywność ta jest stabilizowana mostkami disiarczkowymi utworzonymi przez cysteiny zlokalizowane na N-końcu domeny. Mimo że podobieństwo sekwencji ekspansyn i endoglukanaz jest raczej niewielkie, reszty, które są zachowane u wszystkich  $\alpha$ - i  $\beta$ -ekspansyn, a mianowicie kwas asparaginowy w segmencie HFD i kwas asparaginowy na końcu aminowym są również głównymi aminokwasami miejsca katalitycznego endoglukanaz. W dodatku konserwatywność niektórych par cystein w tej domenie sugeruje, że tworzenie wiązań disiarczkowych w prawidłowo złożonym białku, umożliwi resztom kwasu asparaginowego właściwe połączenie się z substratem (20). Wspomniano już, że mimo tego podobieństwa, ekspansyny roślinne nie wykazują ani aktywności endoglukanaz, ani transglikolaz.



## 4. Rola ekspansyn w regulacji procesów życiowych roślin

Identyfikacja ekspansyn rzuciła nieco światła na wciąż mało znane procesy regulacji kształtu i wzrostu komórek. Ukazała też dobitnie jak istotne jest znaczenie ścian komórkowych dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania roślin. Ekspansyny, dzięki swojej aktywności, wpływają na przebieg wielu procesów w roślinie, a także biorą udział w adaptacji roślin do zmieniających się warunków środowiskowych. Odgrywają znaczącą rolę nie tylko w kontrolowaniu wzrostu całej rośliny, ale również uczestniczą w regulacji organogenezy oraz takich procesów rozwojowych jak dojrzewanie owoców, zapłodnienie, czy też przejście do pasożytniczego trybu życia.

### 4.1. Ekspansyny a kontrola wzrostu komórek

$\alpha$ -ekspansyny występują w ścianach komórkowych większości roślin wyższych, gdzie odpowiedzialne są za kontrolę wzrostu i kształtu komórek. Implikacje takiej aktywności dotyczą wielu procesów fizjologicznych roślin. Liczba i aktywność ekspansyn skorelowana jest, do pewnego stopnia, z szybkim wzrostem komórek. Nie dziwi zatem fakt, że ekspansyny wykrywa się przede wszystkim w tkankach, w których szybkie wydłużanie jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju rośliny. Co więcej, zaaplikowanie *in vitro* ekstraktu ekspansyn stymuluje wzrost komórek w wyizolowanych hypokotylach, epikotylach lub włośnikach korzeniowych (8). Funkcje ekspansyn sugerują, że ekspresja niektórych kodujących je genów regulowana jest przez auksyny, gibereliny, cytokiny i etylen. W przeprowadzonej analizie regionów promotorowych genów  $\alpha$ -ekspansyn ryżu ujawniono obecność sekwencji warunkujących indukcję ich ekspresji przez fitohormony (*hormone responsive elements*), takie jak: kwas abscysynowy, gibereliny i etylen (21). Podobne elementy, choć w mniejszej ilości, wykryto w genach  $\beta$ -ekspansyn. W międzywęźlach ryżu ekspresja 5 genów  $\beta$ -ekspansyn jest indukowana przez kwas giberelinowy i skorelowana z szybką elongacją tkanek (21).

Chociaż izoformy ekspansyn można wykryć prawie we wszystkich tkankach, ich aktywność jest zwykle precyzyjnie zlokalizowana (25) i w dużym stopniu zależna od warunków środowiska. Znakomitym modelem badawczym, jak się okazało, są niektóre odmiany ryżu, hodowane na polach głęboko zalewanych przez wodę. W takich warunkach wydostanie się ponad powierzchnię wody i dostęp do tlenu atmosferycznego są podstawowymi warunkami przeżycia roślin. Tymczasem, ściany komórkowe epidermy łodygi ryżu są o wiele grubsze niż ściany komórek w innych tkankach; szczególnie dobrze jest to widoczne w międzywęźlach. Stąd, wydłużanie łodygi jest ograniczone przez grubościenną tkankę okrywającą. Badanie aktywności ekspansyn i ich mRNA w takich roślinach ujawniło, że właśnie w ścianach komórkowych epidermy międzywęźli pojawia się największa liczba ekspansyn (28). Podwyż-



szony poziom ekspansyn obserwuje się również w innych tkankach o pogrubionych ścianach komórkowych, np. w tkance naczyniowej. Podobnie w korzeniu, silną ekspresję genów kodujących ekspansyny wykrywa się w korzeniowym stożku wzrostu oraz w tkance epidermalnej i przewodzącej (29).

Zwiększoną aktywność ekspansyn wywołuje nie tylko nadmiar wody, ale również jej niedobór. Zauważono, że utrzymanie wzrostu kukurydzy w takich warunkach związane jest ze zwiększeniem aktywności ekspansyn w rejonach szybkiej elongacji. Zmieniona tą drogą rozciągliwość ścian komórkowych pozwala na szybszy wzrost i wydłużanie korzeni, dzięki czemu rośliny łatwiej uniezależniają się od płytkich zasobów wody, szybko ulegających wyczerpaniu (30). Przypuszcza się, że w przyszłości da to możliwość wyhodowania roślin transgenicznych, które, poprzez manipulacje genami ekspansyn, będą odporne na niektóre warunki stresowe, takie jak susza, czy nadmiar wody w środowisku.

#### 4.2. Udział ekspansyn w organogenezie

W odróżnieniu od komórek zwierzęcych, komórki roślinne otoczone są przez ściany komórkowe. W rezultacie zdecydowana większość z nich pozostaje unieruchomiona, a formowanie nowych organów może być jedynie osiągnięte na drodze dodatkowych podziałów komórkowych oraz zmiany kształtu komórek, które nadal jeszcze znajdują się w fazie wzrostu. Wynika stąd, że modyfikacja właściwości mechanicznych ścian komórkowych, m.in. przez ekspansyny, jest jednym z głównych regulatorów procesu organogenezy (1).

Właściwością roślin, niespotykaną u innych organizmów, jest ich zdolność do cyklicznego tworzenia organów bocznych, takich jak liście, czy korzenie boczne. Najważniejszym chyba wnioskiem wypływającym z badań nad ekspansynami jest stwierdzenie, że powstawanie zawiązków organów bocznych oraz zmiany kierunku wzrostu komórek poprzedzone są okresem ich podwyższonej i precyzyjnie zlokalizowanej aktywności. Na podstawie analizy immunocytochemicznej ujawniono wysoką liczbę  $\alpha$ -ekspansyn w perycyklu korzenia ryżu, w strefie, gdzie tworzą się korzenie przybyszowe. Również same zawiązki korzeni przybyszowych zawierały znaczącą liczbę tych białek (29). Z kolei u sosny (*Pinus taeda* L.) stwierdzono, że tworzenie dodatkowych korzeni indukowane jest przez auksyny i skorelowane ze 100-krotnym wzrostem poziomu ekspansyn (18). Sugeruje to, że białka te funkcjonować mogą zarówno jako jeden z czynników inicjujących organogenezę, jak i podtrzymujących wzrost organów. We wszystkich tych przypadkach bowiem konieczne jest rozluźnienie struktury ścian dla podtrzymania szybkiego wydłużania się korzeni (29).

Prawdziwie sensacyjne okazały się badania procesów organogenezy zachodzących w merystemie wierzchołkowym pędu, ponieważ ukazano w nich dobitnie znaczenie właściwości mechanicznych ścian i sił biofizycznych w regulacji rozwoju. U roślin kolejne zawiązki liściowe powstają na merystemie wierzchołkowym w stałych od-



stępach, w określonej kolejności i w pozycjach, które z góry da się przewidzieć, tworząc, charakterystyczny dla każdego gatunku, obraz filotaksji. Kiedy na merystemach pomidora umieszczono kuleczki nośnika nasączone preparatem  $\alpha$ -ekspansyn, stwierdzono, że zabieg ten inicjował powstawanie wybrzuszeń na powierzchni merystemu. Niektóre z nich wykształcały się następnie w struktury przypominające funkcjonalne zawiązki liściowe; zmieniał się także kierunek filotaksji (31). W dokładniejszej analizie ujawniono, że ekspansyny, uwalniane z kuleczek nośnika, gromadzą się i są aktywne w ścianach komórek epidermy (32). W ten sposób udowodniono, że egzogennie podane ekspansyny symulują sytuację, jaka ma miejsce w rzeczywistości. We wcześniejszych obserwacjach hybrydyzacji *in situ* wykazano bowiem, że formowanie zawiązków liściowych poprzedzone jest zwiększoną ekspresją genów kodujących ekspansyny w odpowiednich miejscach powierzchniowej warstwy komórek merystemu wierzchołkowego (33). Wykorzystanie techniki przejściowej, lokalnej mikroindukcji ekspresji genów kodujących ekspansyny u tytoniu pozwoliło również wykazać, że aktywacja genów ekspansyn w pobliżu powstającego zawiązka liściowego wywołuje formowanie dodatkowej blaszki liściowej, zmieniając ostateczny kształt liścia (34). Wyniki tych badań stanowią mocny dowód na poparcie hipotezy, że w merystemie wierzchołkowym pędu lokalne zmiany naprężeń, wywołane np. rozluźnieniem ścian komórkowych przez ekspansyny, są czynnikiem koniecznym, lecz nie wystarczającym, do inicjacji organogenezy (35).

Znaczenie ekspansyn, choć niejednoznacznie, ujawniono w przeprowadzonych eksperymentach z wykorzystaniem roślin transgenicznych. Tak jak można się było spodziewać, zablokowanie techniką antysensu genu *At-EXP10*, ulegającego u *Arabidopsis* swoistej ekspresji w rozwijających się liściach, spowodowało powstawanie roślin o mniejszych rozetach i, bardzo często, poskręcanych liściach. Rośliny, w których gen ten ulegał nadekspresji miały z kolei nieznacznie większe liście. Odpowiednio zmieniała się również łatwość, z jaką liście obu grup roślin ulegały abscysji (36). Z kolei fenotypy transgenicznych linii pomidora odbiegały dość znacznie od oczekiwań. Rośliny, w których gen  $\alpha$ -ekspansyny ulegał nadekspresji, były karłowate i miały mniejsze liście. Częściowo zrekompensowane to było znacznym wzrostem radialnym tkanek. Przypuszczać można jedynie, że w tym przypadku u pomidorów wystąpiła swoista „nadreakcja obronna” i uruchomione zostały mechanizmy ochrony integracji mechanicznej tkanek (37).

Ekspansyny są niezbędne do zainicjowania formowania włośników korzeniowych. Najczęściej włośniki rozwijają się z komórek epidermalnych korzenia, na drodze zlokalizowanej zmiany kierunku i sposobu wzrostu. W określonym miejscu komórki powstaje wybrzuszenie, dające początek włośnikowi, który dalej rośnie na drodze wzrostu wierzchołkowego, a nie dyfuzyjnego – charakterystycznego dla większości komórek roślinnych. Zastosowanie analizy immunocytochemicznej u kukurydzy pozwoliło wykazać, że powstawanie pierwotnego wybrzuszenia poprzedzone jest zlokalizowaną aktywnością ekspansyn. Podobnie jednak jak w przypadku zawiązków liściowych, nie jest to czynnik wystarczający do zainicjowania rozwoju



włośników. Zastosowanie latrunkuliny B pokazało, że postępująca za tym przebudowa cytoszkieletu aktynowego jest czynnikiem niezbędnym dla utrzymania stabilności mechanicznej rosnącego włośnika korzeniowego (38).

Jednym z bardziej zadziwiających odkryć było stwierdzenie, że podwyższoną aktywność ekspansyn obserwuje się także w trakcie rozwoju roślin pasożytniczych. *Striga asiatica* – pasożyt sorgo – do swojego rozwoju wymaga dwóch różnych sygnałów pochodzących od rośliny-gospodarza. Uruchamiają one kolejno: program kiełkowania nasion, a następnie program rozwoju haustoriów (ssawek), czyli organów, za pomocą których pasożyt pobiera substancje odżywcze. Zauważono wyraźną korelację pomiędzy wzrostem poziomu mRNA  $\alpha$ -ekspansyn a indukcją tworzenia haustoriów w odpowiedzi na pojawienie się właściwego sygnału. Przypuszcza się, że ekspansyny, rozluźniając ściany komórek korzeniowych umożliwiają tworzenie i dalszy rozwój haustoriów (39).

### 4.3. Rola ekspansyn w procesach rozwojowych

Ekspresja genów kodujących ekspansyny jest swoista tkankowo (a nawet komórkowo) oraz zależna od etapu rozwoju rośliny i jej organów. U *Arabidopsis* stwierdzono na przykład, że jeden z genów  $\alpha$ -ekspansyn ulega swoistej ekspresji jedynie w komórkach przysparkowych, drugi z nich tylko w niektórych komórkach korzenia, np. w czapeczce korzeniowej, a jeszcze kolejny aktywowany jest tylko w powstających włośnikach korzeniowych. Spośród genów ekspansyn aktywnych w tkankach naczyniowych, występowanie dwóch z nich ograniczone jest tylko do wiązek naczyniowych, a trzeciego wyłącznie do komórek korykalnych. Takie wyniki pokazują, że choć niektóre geny ekspansyn rzeczywiście ulegają ekspresji wyłącznie w wydłużających się komórkach, to wiele z nich koduje syntezę ekspansyn w komórkach otoczonych ścianami o niezwykłych właściwościach mechanicznych, jak na przykład komórki aparatu szparkowego, lub w miejscach, w których prawidłowy przebieg procesów morfogenetycznych wymaga luźniejszej struktury ścian komórkowych (19).

Ekspansyny pojawiają się nie tylko w tkankach ulegających szybkiemu wydłużaniu, ale także biorą udział, np. w dojrzewaniu owoców. Dogodnym modelem badawczym okazały się w tym przypadku rośliny pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.). W rozwoju ich owoców wyróżnić można dwie główne fazy. W fazie wzrostu dochodzi do powiększania się komórek, natomiast w fazie dojrzewania rozmiary komórek pozostają bez zmian, następuje jednak rozluźnienie struktury, w tym również ścian komórkowych (40). Okazało się, że u pomidora niektóre geny  $\alpha$ -ekspansyn (np. Le-EXP3 i 4) ulegają selektywnej ekspresji jedynie w fazie wzrostu i na początku fazy dojrzewania. W momencie przejścia do fazy dojrzewania, w dużych ilościach pojawia się transkrypt genu Le-EXP1, a ekspresja pozostałych genów kodujących  $\alpha$ -ekspansyny zanika lub znacznie słabnie (41). Ten obraz aktywności transkrypcyjnej



znajduje również swoje potwierdzenie w analizie białek ekspansyn i ich aktywności. Co więcej, w mutantach *rin* i *Nr* pomidora, charakteryzujących się opóźnionym lub osłabionym dojrzewaniem owoców, nie wykrywa się wymiernych ilości ekspansyn. Stwierdzono przy tym, że ekspansyny obecne w rosnących owocach podobne są strukturalnie i rozpoznawane przez przeciwciała swoiste dla ekspansyn z wydłużających się pędów. Ekspansyna Le-EXP1 nie jest przez te przeciwciała wykrywana, co wskazuje, że pomimo podobieństwa sekwencji, jej struktura wyraźnie różni się od pozostałych ekspansyn (42). Znaczenie ekspansyny Le-EXP1 potwierdzono również analizując rośliny transgeniczne. Rośliny, w których akumulacja ekspansyny została prawie całkowicie zahamowana miały twarde owoce przez cały okres dojrzewania. Z kolei rośliny, u których gen Le-EXP1 ulegał nadekspresji charakteryzowały się miękkimi owocami już na etapie w pełni rozwiniętego zielonego owocu, jeszcze przed rozpoczęciem fazy dojrzewania.

$\beta$ -ekspansyny wykazują wiele cech wspólnych z alergenami grupy-1. Podobnie jak one,  $\beta$ -ekspansyny pojawiają się w znacznych ilościach w ścianach komórek generatywnych, jak i tkanek wegetatywnych traw. Obserwuje się przy tym zróżnicowanie swoistości tkankowej, tzn. obecność izoform o szerokim spektrum występowania (np. Zm-EXPB2 u kukurydzy), jak i izoform o ściśle ograniczonej swoistości, np. Zm-EXPB1, wykrywanej wyłącznie w ścianach pyłku (25). Podobnie też jak alergeny,  $\beta$ -ekspansyny związane są dość luźno ze ścianami komórkowymi (19).  $\beta$ -ekspansyny wykazują znaczną aktywność w tkankach wegetatywnych, podobną do typowej aktywności  $\alpha$ -ekspansyn (21). Choć białka obu klas często występują razem, to przypuszcza się, że obecność  $\beta$ -ekspansyn w trawach ma szczególne znaczenie, zwłaszcza w procesie rozmnażania. Przenieszone wraz z pyłkiem,  $\beta$ -ekspansyny mogą rozluźniać ściany komórkowe znamienia i tkanek otaczających umożliwiając w ten sposób łagiewce pyłkowej penetrację w głąb znamienia (19).

Ekspansyny odgrywają również znaczącą rolę w różnicowaniu komórek tkanki przewodzącej. Komórki te, otoczone początkowo pierwotną ścianą komórkową, po osiągnięciu swych ostatecznych rozmiarów wytwarzają ściany wtórne i najczęściej zamierają. Modelem do badania tych procesów jest zawieszina komórek mezofilu cynii zdobnej (*Zinnia elegans* L.), które w ciągu 96 godzin, w odpowiednich warunkach hormonalnych, ulegają najpierw odróżnicowaniu, a następnie tzw. trans-różnicowaniu, formując dojrzałe komórki naczyniowe. W tym właśnie układzie modelowym stwierdzono pojawianie się transkryptów trzech genów (*Ze-EXP1-3*) kodujących  $\alpha$ -ekspansyny (43). Przeniesienie tych obserwacji do siewek *Zinnia* ukazało, że wszystkie trzy transkrypty występują w różnicujących komórkach ksylemu, ale w różnym okresie ich rozwoju, np. *Ze-EXP3* przez cały czas, a *Ze-EXP1* jedynie do momentu rozpoczęcia syntezy ścian wtórnych. Co więcej, mRNA różnych ekspansyn wykazywały spolaryzowaną lokalizację, występując jedynie na apikalnych bądź bazypetalnych końcach komórek. Wskazuje to na uczestnictwo ekspansyn w precyzyjnie umiejscowionym, intruzyjnym wzroście komórek naczyń, a równocześnie stanowi dowód, jeden z niewielu w świecie roślinnym, na wewnątrzkomór-



kową lokalizację mRNA, wykorzystywanego do syntezy białek w określonym miejscu i czasie (43).

## 5. Podsumowanie

W badaniach dotyczących identyfikacji i charakterystyki ekspansyn ujawniono istnienie białek o niezwykłych właściwościach i mechanizmie działania. Badania te przyczyniły się również do pogłębienia naszej wiedzy o ścianach komórkowych i ich znaczeniu dla funkcjonowania komórek i całych roślin. Potencjalne zastosowanie zdobytej wiedzy o ekspansynach, jak się wydaje, jest ogromne. Manipulacje genami ekspansyn dają możliwość wyhodowania roślin o zmodyfikowanej strukturze ścian komórkowych, a zatem, np. odpornych na niekorzystne warunki środowiskowe oraz roślin o polepszonych walorach hodowlanych i przemysłowych. Na uwagę zasługuje przede wszystkim fakt, że mechanizm działania ekspansyn oraz ich aktywność odróżniają je zdecydowanie od innych białek występujących w świecie żywym. Poszukując sposobów na pokonanie ograniczeń narzuconych przez środowisko, w którym rozwijają się rośliny lądowe, Natura stworzyła ekspansyny – unikatowe, niezwykle białka roślinne.

## Literatura

1. Wojtaszek P., (2000), *Biol. Rev. (Cambridge)*, 75, 437-475.
2. Wojtaszek P., (2000), w: *Podstawy biologii komórki roślinnej*, red. Woźny A., Michejda J., Ratajczak L., 431-487, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
3. Peters W. S., Hagemann W., Tomos A. D., (2000), *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 125, 151-167.
4. Cosgrove D. J., (1997), *Plant Cell*, 9, 1031-1041.
5. Shieh M. W., Cosgrove D. J., (1998), *J. Plant Res.*, 111 149-157.
6. Fry S. C., Smith R. C., Renwick K. F., Martin D. J., Hodge S. K., Mathews K. J., (1992), *Biochem. J.*, 282, 821-828.
7. Nishitani K., Tominaga T., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 21058-21064.
8. McQueen-Mason S., Durachko D. M., Cosgrove D. J., (1992), *Plant Cell*, 4, 1425-1433.
9. Fry S. C., (1998), *Biochem. J.*, 332, 507-515.
10. Okamoto-Nakazato A., Nakamura T., Okamoto H., (2000), *Plant Cell Environ.*, 23, 145-154.
11. Thompson J. E., Fry S. C., (2001), *Plant Journal*, 26, 23-34.
12. Yuan S., Wu Y. J., Cosgrove D. J., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 324-333.
13. McQueen-Mason S. J., Cosgrove D. J., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6574-6578.
14. Whitney S. E. C., Gothard M. G. E., Mitchell J. T., Gidley M. J., (1999), *Plant Physiol.*, 121, 657-663.
15. Whitney S. E. C., Gidley M. J., McQueen-Mason S. J., (2000), *Plant J.*, 22, 327-334.
16. Cosgrove D. J., (2000), *Nature*, 407, 321-326.
17. Shcherban T. Y., Durachko S. J., Guiltinan M. J., McQueen-Mason S. J., Shieh M. W., Cosgrove D. J., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9245-9249.
18. Hutchison K. W., Singer P. B., Diaz-Sala C., Greenwood M. S., (1999), *Plant Physiol.*, 120, 827-832.
19. Cosgrove D. J., (2000), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 73-78.
20. Darley C. P., Forrester A. M., McQueen-Mason S. J., (2001), *Plant Mol. Biol.*, 47, 179-195.
21. Lee Y., Choi D., Kende H., (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 527-532.



22. McQueen-Mason S. J., Cosgrove D. J., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 87-100.
23. Harrison E. P., McQueen-Mason S. J., Manning K., (2001), *J. Exp. Bot.*, 52, 1437-1446.
24. Link B. M., Wagner E. R., Cosgrove D. J., (2001), *Physiol. Plant.*, 113, 292-300.
25. Wu Y. J., Meeley R. B., Cosgrove D. J., (2001), *Plant Physiol.*, 126, 222-232.
26. Link B. M., Cosgrove D. J., (1998), *Plant Physiol.*, 118, 907-910.
27. Brummell D. A., Harpster M. H., Dunsmuir P., (1999), *Plant. Mol. Biol.*, 39, 161-169.
28. Cho H. T., Kende H., (1997), *Plant Cell*, 9, 1661-1671.
29. Cho H. T., Kende H., (1998), *Plant J.*, 15, 805-812.
30. Wu Y., Cosgrove D. J., (2000), *J. Exp. Bot.*, 5, 1543-1553.
31. Fleming A. J., McQueen-Mason S. J., Mandel T., Kuhlemeier C., (1997), *Science*, 276, 1415-1418.
32. Fleming A. J., Caderas D., Wehrli E., McQueen-Mason S. J., Kuhlemeier C., (1999), *Planta*, 208, 166-174.
33. Reinhardt D., Wittwer F., Mandel T., Kuhlemeier C., (1998), *Plant Cell*, 10, 1427-1437.
34. Pien S., Wyrzykowska J., McQueen-Mason S. J., Smart C., Fleming A. J., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11812-11817.
35. Green P. B., (1997), *Trends Plant Sci.*, 2, 365-366.
36. Cho H. T., Cosgrove D. J., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 9783-9788.
37. Rochange S. F., Wenzel C. L., McQueen-Mason S. J., (2001), *Plant Mol. Biol.*, 46, 581-589.
38. Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Samaj J., Chua N., Barlow P. W., Volkmann D., (2000), *Dev. Biol.*, 227, 618-632.
39. O'Malley R. C., Lynn D. G., (2000), *Plant Cell*, 12, 1455-1465.
40. Rose J. K. C., Bennett A. B., (1999), *Trends Plant Sci.*, 4, 176-183.
41. Brummell D. A., Harpster M. H., Civello P. M., Palys J. M., Bennett A. B., Dunsmuir P., (1999), *Plant Cell*, 11, 2203-2216.
42. Rose J. K. C., Cosgrove D. J., Albersheim P., Darvill A. G., Bennett A. B., (2000), *Plant Physiol.*, 123, 1583-1592.
43. Im K. H., Cosgrove D. J., Jones A. M., (2000), *Plant Physiol.*, 123, 463-470.