

MICHAŁ MICHALAK, TOMASZ SKRZYPCZAK, MICHALINA SMOLARKIEWICZ,
PRZEMYSŁAW WOJTASZEK

*Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Umultowska 89, 61-614 Poznań
E-mail: przemow@amu.edu.pl*

WYKORZYSTANIE TECHNIK MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ DO BADAŃ UKŁADU BŁON WEWNĘTRZNYCH KOMÓREK ROŚLINNYCH

SYSTEM BŁON WEWNĘTRZNYCH KOMÓREK ROŚLINNYCH

System błon wewnętrznych w komórkach roślinnych stanowi złożoną sieć przedziałów obłonionych, które są połączone wzajemnie dzięki krażeniu błon i przenoszonych materiałów (WOŹNY i współaut. 2006, WOŹNY 2007a). Do systemu zalicza się zwykle: retikulum endoplazmatyczne (ER), aparat Golgiego, sieć *trans* aparatu Golgiego (TGN), wakuole, błonę komórkową, otoczkę jądrową oraz różne przedziały pęcherzykowe, w tym endosomy. Transport różnego typu substancji, głównie polisacharydów, lipidów i białek, ku peryferiom komórki odbywa się w szlaku sekrecyjnym. Substancje z otoczenia komórki oraz składniki błony komórkowej są trans-

portowane do wnętrza komórki na drodze endocytozy. Pobrane cząsteczki mogą być skierowane ponownie do błony komórkowej, uczestnicząc w recyklingu, lub przeznaczone do degradacji w wakuoli. Te dwa szlaki główne mają wiele różnych odnóg funkcjonalnych, np. szlak prowadzący bezpośrednio z ER czy aparatu Golgiego do wakuoli. Komunikacja i transport w obrębie systemu zachodzą przede wszystkim przy udziale struktur błonowych o niewielkiej średnicy, rzędu kilkudziesięciu do ok. 200 nm, nazywanych pęcherzykami (WOŹNY 2007a, b; ROBINSON i współaut. 2008; BASIŃSKA i współaut. 2012, ŠAMAJ 2012).

CECHY SWOISTE KOMÓREK ROŚLINNYCH JAKO OBIEKTU BADAŃ MIKROSKOPOWYCH

W wielu aspektach badania komórek roślinnych i roślin są nieco opóźnione w stosunku do badań prowadzonych na modelach zwierzęcych czy drożdżowych. Jest tak również w odniesieniu do badań mikroskopowych. Z jednej strony, konstruowany sprzęt oraz opracowywane techniki badawcze są zwykle optymalizowane pod kątem zastosowań biomedycznych. Z drugiej zaś, komórki roślinne na tyle różnią się od komórek zwierzęcych (WOŹNY i współaut. 2006), że w większości przypadków koniecznym staje się wypracowanie swoistych podejść badawczych. Bardzo dobrym przykładem jest

system błon wewnętrznych, w którym np. aparat Golgiego funkcjonuje jako zespół kilkudziesięciu do kilkuset diktiosomów premieszczających się niezależnie w komórce. Mimo niezwykle istotnej roli w wielu procesach komórkowych, szczegóły budowy i funkcjonowania systemu wewnątrz błonowego w komórkach roślinnych są nadal stosunkowo słabo poznane. Jak się wydaje, główną przyczyną było powszechnie panujące przekonanie, że endocytoza w komórkach roślinnych nie zachodzi. Uważano bowiem, że ciśnienie osmotyczne, przyciskające błonę komórkową do otaczających ścian komórko-

wych, uniemożliwia jej wpuklanie, które zapoczątkowuje endocytozę (CRAM 1980, ŠAMAJ i współaut. 2005 i lit. tam cytowana). Dopiero liczne prace eksperymentalne na przestrzeni ostatnich 10 lat (zreferowane m.in. w ROBINSON i współaut. 2008) zmieniły tę opinię, udowadniając przy tym dużą wagę tego procesu u roślin. Podobnie, do niedawna szlaki transportowe systemu: sekrecyjny, kierujący białka do wakuoli oraz endocytotyczny, były traktowane jako oddzielne, niezależne byty, co także utrudniało znaczący postęp w rozumieniu ich funkcjonowania. Obecnie jednak szeroko akceptowany jest pogląd, że wszystkie te szlaki są wzajemnie powiązane nie tylko funkcjonalnie, ale także strukturalnie, a głównym zwornikiem jest sieć *trans* aparatu Golgiego, która może być traktowana zarówno jako wczesny przedział endosomalny, jak i składnik szlaku sekrecyjnego. Stwarza to pewne problemy badawcze, gdyż trudno odróżnić białka, które znalazły się w danym przedziale na drodze internalizacji z błony, od tych, które dotarły tam na drodze transportu wewnętrznego (OTEGUI i SPITZER 2008, ROBINSON i współaut. 2008).

W badaniach wykorzystujących techniki mikroskopii świetlnej, w tym fluorescencyjnej, należy wziąć pod uwagę jeszcze co najmniej dwa aspekty. Większość typów komórek roślinnych to takie, które są wypełnione dużą, centralną wakuolą. Powoduje to przemieszczenie pozostałych elementów budulcowych ku peryferiom komórki, co może utrudniać ich obserwację (SPARKES i BRANDIZZI 2012). Po drugie, w komórkach roślin wytwarzane są w dużych ilościach związki, przede wszystkim chlorofil oraz związki fenolowe, które w stanie pobudzenia mogą fluoryzować. Prowadzi to do znacznej autofluorescencji, która może być przyczyną trudności w interpretacji obrazu, a w niektórych przypadkach wręcz uniemożliwić wykorzystanie określonej techniki badawczej. Należy jednak podkreślić, że rozwój metod mikroskopii fluorescencyjnej, w tym zwłaszcza mikroskopii konfokalnej, umożliwił rozwiązanie wielu problemów technicznych i znaczący postęp w badaniach nad organizacją i funkcjonowaniem systemu błon wewnętrznych w komórkach roślinnych (ŠAMAJ 2012).

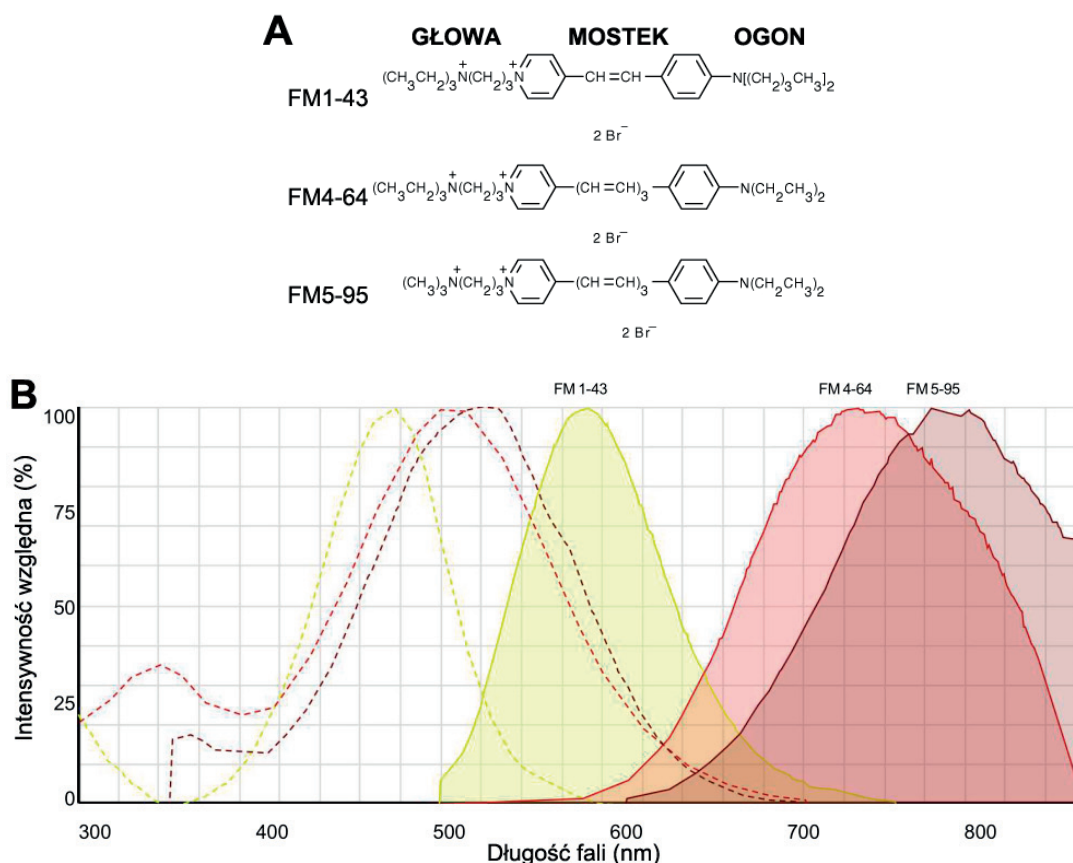
ZNACZNIKI WYKORZYSTYWANE W BADANIACH UKŁADU WEWNĄTRZBŁONOWEGO KOMÓREK ROŚLINNYCH

Najważniejszym, jak się wydaje, osiągnięciem technik mikroskopowych ostatnich dziesięcioleci jest umożliwienie prowadzenia obserwacji żywych komórek i tkanek, dzięki czemu coraz lepiej zdajemy sobie sprawę z dynamiki zdarzeń komórkowych. Aby to było możliwe, trzeba jednak dysponować narzędziami, które pozwalają precyzyjnie umiejscowić te zjawiska w czasie i przestrzeni. Jednym z podstawowych narzędzi są odpowiednie znaczniki (markery), które identyfikują określone składniki komórki. W najprostszej postaci wywodzą się one z barwników stosowanych od dziesięcioleci w technikach cyto- i histochemicznych. Rozpowszechnienie się mikroskopii fluorescencyjnej przyniosło również intensywny rozwój znaczników, które są stosunkowo mało toksyczne dla komórki, a zarazem coraz bardziej swoiste dla badanego przedziału lub przedziałów komórkowych.

ZNACZNIKI CHEMICZNE

W badaniach systemu błon wewnętrznych powszechnie wykorzystuje się kilka znaczników chemicznych. Warto na pewno wspomnieć filipinę, która jest markerem

domen błony komórkowej bogatych w sterole (GREBE i współaut. 2003, KLEINE-VEHN i współaut. 2006). Dużą popularność zyskały znaczniki, które umożliwiają badania endocytozy, takie jak żółcień lucyferowa (ang. lucifer yellow, LY) i styrylowe barwniki FM, których nazwa pochodzi od nazwiska badacza, Fei Mao, który pierwszy dokonał ich syntezy (BOLTE i współaut. 2004 i lit. tam cytowana, ANIENTO i ROBINSON 2005). Dla badań pobierania płynów przez komórki roślinne ważne jest, by barwnik nie był zatrzymywany przez ścianę komórkową, nie był pobierany przez transportery błonowe oraz nie przenikał przez samą błonę komórkową. Nieuniknioną konsekwencją nieselektywnego pobierania płynu w tym procesie jest kinetyka liniowa zależna od stężenia barwnika (ANIENTO i ROBINSON 2005). Warto też od razu wspomnieć, że stosowanie markerów chemicznych jest obarczone pewnymi wadami. Barwniki są stosunkowo mało specyficzne i nie pozwalają na precyzyjne rozróżnienie wielu przedziałów komórkowych. W wielu przypadkach wykazano także ich potencjalnie toksyczny wpływ na komórki (BOLTE i współaut. 2004).



Ryc. 1. Budowa (A) oraz widma wzbudzenia (linia przerywana) i emisji (linia ciągła) (B) barwników FM omówionych w tekście.

LY jest pochodną naftalimidu i ma zastosowanie jako barwnik w przemyśle spożywczym. Dzięki właściwościom fluorescencyjnym stała się także rozpowszechnionym markerem endocytozy fazy płynnej (OPARKA i HAWES 1992, ŠAMAJ i współaut. 2005). Niewątpliwymi zaletami LY są jej stabilność w zróżnicowanym pH, odporność na fotobłaknięcie, nieprzenikliwość przez błony biologiczne i brak cytotoksyczności w standardowo używanych stężeniach. Należy jednak pamiętać, iż ujemny ładunek cząsteczki oraz jej wielkość rzędu 440 Da powodują, że może ona być rozpoznawana przez mniej specyficzne transportery anionów. Cecha ta dotyczy szczególnie komórek o wysokim tempie wymiany jonów z otoczeniem (ANIENTO i ROBINSON 2005).

Żółcień lucyferowa jest barwnikiem wykorzystywanym w badaniach pobierania płynów przez komórki roślinne. Pobrana z roztworem nie przenika przez błony i wobec tego znakuje fluorescencyjnie światło pęcherzyków endocytotycznych. Umożliwia to śledzenie ich przemieszczania się w komórce. Dotychczasowe badania wykazały

zróżnicowanie tkankowe i gatunkowe zdolności do pobierania LY oraz silną zależność tego zjawiska od warunków eksperymentalnych. W niektórych przypadkach nie udało się zaobserwować internalizacji LY nawet po długim czasie inkubacji, a w innych obserwowano barwnik w strukturach pęcherzykowych lub cytozolu, lecz nie w wakuoli, gdzie powinna kończyć się endocytoza fazy płynnej. Przypuszcza się, że przyczyną może być podobieństwo strukturalne LY do sulfonowanych flawonoidów, co może sprawiać, że LY niekoniecznie jest pobierana do komórek wraz z fazą płynną (ANIENTO i ROBINSON 2005). Według innych badaczy, niewielki rozmiar pinosomów wymuszany wysokim ciśnieniem turgorowym powoduje, że pęcherzyki zawierające barwnik nie są widoczne, ponieważ LY cechuje się relatywnie słabą fluorescencją. Tezę tę potwierdza obserwacja, że jak dotąd nie udało się wykazać pobierania LY w komórkach o wysokim turgorze, np. w komórkach szparkowych (GALL i współaut. 2010).

Drugim podejściem do badania endocytozy jest znakowanie pobieranych w tym pro-

cesie błon. Barwniki serii FM są pochodnymi sondy potencjału błonowego DASPMI, wykorzystywanej w badaniach mitochondriów. Rdzeń cząsteczki stanowi układ dipirydynowy (Ryc. 1A). Łańcuch alifatyczny ogona cząsteczki odpowiada za lipofilność barwnika. Wydłużanie ogona wzmacnia charakter lipofilowy, w krańcowym przypadku prowadząc do nieodwracalnego wiązania z błoną komórkową. Głowa cząsteczki, naładowana dodatnio, zapobiega przenikaniu barwnika przez błonę na drodze ruchów flip-flop (GRIFFING 2008). Konfiguracja mostka łączącego ogon i głowę determinuje spektrum fluorescencji barwnika; im więcej wiązań podwójnych w tym rejonie, tym bardziej widmo emisji przesunę się ku czerwieni (BOLTE i współaut. 2004, JELÍNKOVÁ i współaut. 2010).

Dzięki swojej budowie barwniki te są amfifilowe, co oznacza niepełną rozpuszczalność w dwóch różnych rozpuszczalnikach. Są one rozpuszczalne w wodzie, a także wnika do zewnętrznego listka dwuwarstwowej lipidowej błony komórkowej. Tak więc, do komórki dostają się jedynie w wyniku aktywnego transportu na drodze endocytozy, kolejno znakując poszczególne przedziały systemu błon wewnętrznych (BOLTE i współaut. 2004). Wysoki kontrast fluorescencji między wyznakowanymi błonami, cytoplazmą a środowiskiem, jaki zapewniają barwniki FM, wynika ze znacznie wyższej wydajności kwantowej znaczników w środowisku hydrofobowym. Umożliwia to pozostawienie barwnika w medium podczas obserwacji. Odpłukanie znacznika jest konieczne jedynie w doświadczeniach wymagających pomiarów ilościowych, co czyni barwniki FM idealnym markerem błon biologicznych (BOLTE i współaut. 2004, VAN GISBERGEN i współaut. 2008, JELÍNKOVÁ i współaut. 2010).

Najczęściej wykorzystywanymi barwnikami FM są: FM1-43, o zielonej fluorescencji, FM4-64, fluoryzujący na czerwono, oraz jego wariant strukturalny, FM5-95, który zresztą może być używany zamiennie (Ryc. 1B). Barwniki FM mają szerokie spektrum wzbudzenia, co umożliwia korzystanie z laserów 488, 514 lub 532 nm mikroskopu konfokalnego (BOLTE i współaut. 2004). Hydrofobowość barwników FM maleje od FM4-64 poprzez FM5-95 do FM1-43 (JELÍNKOVÁ i współaut. 2010). W badaniach roślin najczęściej stosowany jest FM4-64, charakteryzujący się największą jasnością, kontrastem, fotostabilnością, a przesunięte w stronę czerwieni spektrum emisji umożliwia jego kolokalizację z białkami flu-

orescencyjnymi. W komórkach zawierających chlorofil, którego spektrum pokrywa się z widmem emisji FM4-64, lepszym wyborem jest użycie barwnika o zielonej fluorescencji – FM1-43 (BOLTE i współaut. 2004). Intensywność fluorescencji FM4-64 zależy od pH, wraz ze wzrostem kwasowości spada siła sygnału i zmienia się maksimum absorpcji barwnika (VAN GISBERGEN i współaut. 2008).

W komórkach roślinnych barwniki FM znakują kolejne przedziały układu błon wewnętrznych w zależności od czasu inkubacji. Początkowo widoczna jest błona komórkowa, a ściana komórkowa nie wydaje się wpływać na kinetykę pobierania markerów. Nie zaobserwowano różnic między tempem barwienia błony w komórkach i protoplastach tej samej linii, a plazmoliza komórek traktowanych FM4-64 nie ujawniła obecności znacznika w ścianie komórkowej. Tempo pobierania może jednak różnić się zależnie od typu komórek. Protoplasty uzyskane z komórek czapeczki korzenia kukurydzy, które intensywnie wydzielają substancje na zewnątrz, pobierają FM1-43 znacznie wolniej od protoplastów niewydzielających tej samej linii (patrz BOLTE i współaut. 2004).

Po około 10 min inkubacji z FM4-64 w komórkach stają się widoczne organelle identyfikowane przez markery wczesnego endosomu, różne od aparatu Golgiego. Już po 15 min barwnik zaczyna kolokalizować ze znacznikiem aparatu Golgiego, a całkowitą kolokalizację obserwuje się po 1 godz. inkubacji. FM4-64 dociera do późnego endosomu (przedziału PVC) w czasie 30-60 min. Znaczniki FM mogą docierać aż do tonoplastu, natomiast FM4-64 nie znakuje błon retikulum endoplazmatycznego ani otoczki jądrowej. Pobieranie barwników FM może zostać spowolnione, np. przez obniżenie temperatury, lub zahamowane, np. przez zastosowanie inhibitora metabolicznego, takiego jak azydek sodu (BOLTE i współaut. 2004; VAN GISBERGEN i współaut. 2008, ŠAMAJ 2012).

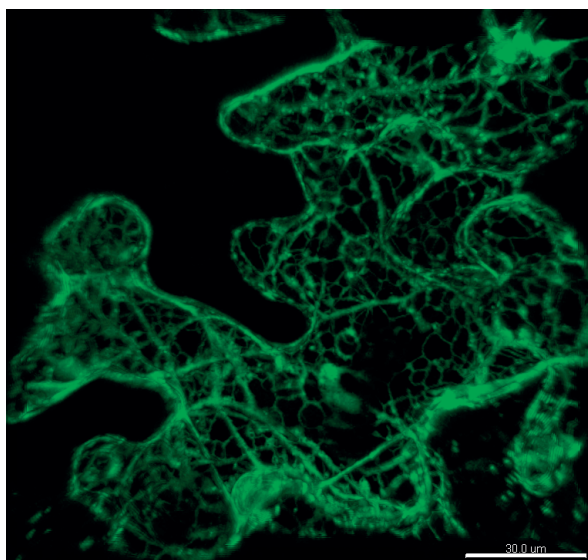
Jak dotąd nie stwierdzono, by barwniki FM były cytotoksyczne dla komórek roślinnych. Cykl komórkowy zawieszony tytoniu BY-2 traktowanej 32 μ M FM4-64 nie został zaburzony, a podziały komórek przebiegały prawidłowo (BOLTE i współaut. 2004). Z drugiej strony, wykazano, że barwniki styrylowe mają wpływ na płynność błony komórkowej, a także mogą blokować kanały związane z przekazem bodźców mechanicznych oraz receptory acetylocholino (JELÍNKOVÁ i współaut. 2010).

W komórkach zawiesiny tytoniu BY-2 niektóre białka błonowe (nośniki auksyn PIN1 i PGP4) są przejściowo internalizowane do cytoplazmy w wyniku znakowania błony przez FM4-64 i FM5-95, ale nie FM1-43, co wskazuje na pozytywną korelację między internalizacją białek błonowych a hydrofobowością zastosowanego barwnika. Efekt internalizacji jest przejściowy i występuje we wczesnych fazach oddziaływania barwników na błonę komórkową. Podobnego wyniku nie udało się powtórzyć w skórcie korzenia siewek rzodkiewnika z wyznakowanymi białkami PIN2, co wydaje się wskazywać na specyficzność tkankową lub nawet gatunkową tego zjawiska (JELÍNKOVÁ i współaut. 2010).

MARKERY GENETYCZNE

Zastosowanie markerów genetycznych w postaci białek fluorescencyjnych, takich jak białko zielonej fluorescencji, GFP, czy też białko czerwonej fluorescencji, DsRed, jak i ich różnobarwne pochodne, zrewolucjonizowało molekularną biologię komórki. Pierwsze białko o właściwościach fluorescencyjnych, GFP, zostało odkryte u parzydełkowca, *Aequoria victoria* (SHIMOMURA i współaut. 1962). Sekwencja DNA kodująca GFP została sklonowana (CHALFIE i współaut. 1994) i tak zmodyfikowana, by mogła być wykorzystana z powodzeniem w komórkach roślin (HASELOFF i współaut. 1997). Od tej pory zastosowanie wielobarwnych pochodnych białek fluorescencyjnych w fuzji z szeroką gamą białek markerowych dla różnych przedziałów komórkowych stało się jednym z podstawowych narzędzi biologii komórki i umożliwiło przezwyciężenie ograniczeń wynikających ze stosowania znaczników chemicznych czy też znakowania przeciwciałami (BRANDIZZI i współaut. 2004 i lit. tam cytowana). Swoiste oznakowanie określonego przedziału komórkowego uzyskuje się albo na drodze modyfikacji samego białka fluorescencyjnego, albo też poprzez połączenie z białkiem o znanej lokalizacji subkomórkowej (Ryc. 2). I tak, przyłączenie do białka fluorescencyjnego sygnału retencji w ER, H/KDEL, znakuje światło retikulum endoplazmatycznego, natomiast fuzja z białkiem Sec12 pozwala zobrazować błonę ER (HANTON i BRANDIZZI 2006). Białka z rodziny ATPaz typu Rab, takie jak Ara6, Ara7 czy Rha1, są powszechnie uznawane za białka markerowe wczesnego i późnego przedziału endosomalnego (ŠAMAJ i współaut. 2005). Tonoplast, z kolei, można uwidoczniać wykorzystując fuzję z białkiem TIP (BRANDIZZI i współaut. 2004).

Niedawno opracowano i udostępniono kompletny zestaw markerów białkowych dla różnych przedziałów systemu błon wewnętrznych komórek roślinnych. Jest to komercyjnie dostępny, znany pod nazwą WAVE, zestaw wektorów binarnych do transformacji roślin, oraz nasion pochodzących z homozygotycznych, stabilnie transformowanych roślin rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*). Zestaw zawiera 21 białek uznanych za markerowe dla różnych przedziałów systemu błon wewnętrznych w fuzji z 4 różnymi białkami fluorescencyjnymi: Cerulean, mTFP1, YFP oraz mCherry. Taka kombinacja umożliwiła określenie lokalizacji badanych białek o nieznannej funkcji i porównanie jej z miejscem występowania markerów białkowych (GELDNER i współaut. 2009). Choć jest to narzędzie niezwykle przydatne, to do interpretacji danych doświadczalnych należy podchodzić z dużą ostrożnością, gdyż określenie lokalizacji subkomórkowej jest tylko tak dokładne, jak precyzyjna i pewna jest lokalizacja markerów genetycznych. Tu jednakże, ze względu na stan zaawansowania badań, dokładna lokalizacja wielu białek uznanych za markerowe, zwłaszcza w obrębie przedziałów pęcherzykowych, nadal budzi liczne kontrowersje. Na przykład białko Ara7 uznane za marker przedziału prewakuolarnego, czyli późnego endosomu, według licznych obserwacji może być obecne także we wczesnym endosomie, czyli sieci TGN (ŠAMAJ i współaut. 2005).



Ryc. 2. Rekonstrukcja przestrzenna rozmieszczenia retikulum endoplazmatycznego i frakcji pęcherzyków w komórce epidermy tytoniu, wyznakowanych genetycznie konstrukcją PEN2::GFP (fot. S. Smolarkiewicz i M. Michalak).

SUBSTANCJE CHEMICZNE ZABURZAJĄCE FUNKCJONOWANIE UKŁADU BŁON WEWNĘTRZNYCH

Jednym z możliwych podejść w badaniach biologii komórki są doświadczenia farmakologiczne, w których wykorzystuje się egzogenne drobnocząsteczkowe substancje chemiczne, które umożliwiają manipulowanie procesami zachodzącymi w komórce. Dzięki temu można poznać mechanizmy i zidentyfikować makrocząsteczki odpowiedzialne za różne procesy biologiczne. Do tego celu używa się zarówno substancji pochodzenia naturalnego, jak i związków syntetycznych. Taką procedurę nazywa się niekiedy genetyką chemiczną. Podobnie, jak w przypadku klasycznej genetyki, genetykę chemiczną możemy podzielić na genetykę chemiczną „forward” i „reverse” (ROBERT i współaut. 2009, MISHEV i współaut. 2013). Podejście „forward” stosuje się wtedy, gdy znamy fenotypowy efekt działania substancji chemicznej, a poszukujemy makrocząsteczek, które są celem molekularnym dla użytej substancji chemicznej. W podejściu „reverse” poszukuje się substancji, które hamują aktywność znanego wcześniej białka, a następnie analizuje efekty fenotypowe wywołane obecnością wykrytego związku (MISHEV i współaut. 2013). Dzięki krócej trwającej i łatwiejszej procedurze genetyka chemiczna może śmiało konkurować z mutagenезą, jako metodą poznania mechanizmów molekularnych procesów biologicznych. Genetyka chemiczna umożliwia obserwowanie działania danej substancji niejako w czasie rzeczywistym. Dzięki kontrolowanemu dozowaniu substancji chemicznych można również ominąć problemy wynikające z badania genów, które są niezbędne do życia organizmu, a więc których mutacje są letalne. Natomiast uzyskanie wysoce swoistych inhibitorów pozwala analizować efekty poszczególnych genów z, niekiedy bardzo dużych, rodzin genowych. Dodatkowym atutem jest także to, że działanie substancji drobnocząsteczkowych jest często odwracalne, co pozwala powrócić do fenotypu dzikiego po usunięciu substancji czynnej. Wreszcie, substancje chemiczne zidentyfikowane w badaniach np. systemu błon wewnętrznych modeli roślinnych mogą być potencjalnymi kandydatami na leki chorób u ludzi (MISHEV i współaut. 2013).

Funkcjonowanie systemu wewnątrz błonowego można zaburzyć w dwojaki sposób: bezpośrednio, działając na składowe systemy, bądź też pośrednio, poprzez zmianę ak-

tywności białek cytoszkieletu i/lub białek oddziałujących z cytoszkieletem (Tabela 1). Już bardzo wcześnie zostały odkryte substancje pochodzenia naturalnego wpływające na cytoszkielet aktynowy i mikrotubule. Zimowit jesienny (*Colchicum autumnale*) był wykorzystywany co najmniej od XVIII w. w leczeniu podagry, a w latach 40. XX w. wyizolowano z niego kolchicynę, jako substancję aktywną. Ponieważ kolchicina wpływa destrukcyjnie na cytoszkielet mikrotubulowy, a przez to m.in. blokuje mitozę na etapie metafazy, zaczęto ją powszechnie wykorzystywać w badaniach nad cyklem komórkowym, a także przy otrzymywaniu nowych odmian roślin oraz w terapii antynowotworowej. Warto też wspomnieć, że właśnie efektem badań mających wyjaśnić mechanizm działania kolchicyny było odkrycie białek tworzących mikrotubule: tubuliny α i β . Przeciwnie działa, odkryty w 1971 r., paklitaksel z kory cisu krótkolistnego (*Taxus brevifolia*), który stabilizuje mikrotubule przez wiązanie tubuliny, co utrudnia depolimeryzację. Jako taksol jest dziś stosowany w leczeniu nowotworów. Oprócz paklitakselu i kolchicyny znane są również inne substancje zaburzające tworzenie się mikrotubul, jak oryzalina, stosowana jako herbicyd, czy nokodazol (współzawodniczy o miejsce wiązania do tubuliny z kolchicyną). Poprzez wpływ na funkcjonowanie mikrotubul, związki te działają również pośrednio na system błon zewnętrznych, zwłaszcza w trakcie podziałów komórki roślinnej, czy budowę i składanie ścian komórkowych.

Odmienne niż w komórkach zwierząt, zdecydowana większość procesów transportowych, oraz ruch cytoplazmy w komórkach roślinnych są zależne od cytoszkieletu aktynowego. Mikrofilamenty zapewniają również organizację przestrzenną komórki roślinnej oraz zmiany tejże w reakcji na bodźce środowiska. Stąd też działanie chemiczne na procesy polimeryzacji i/lub depolimeryzacji mikrofilamentów znajduje bardzo szybko odzwierciedlenie w zmianie funkcjonowania np. systemu błon wewnętrznych. Wszystkie najpowszechniej wykorzystywane w badaniach substancje zaburzające działanie cytoszkieletu aktynowego są pochodzenia naturalnego (patrz PETERSON i MITCHINSON 2002). Poprzez wiązanie wolnej aktyny la-trunkuliny uniemożliwiają polimeryzację fila-

Tabela 1. Charakterystyka wybranych związków chemicznych zaburzających transport wewnątrzkomórkowy oraz funkcjonowanie cytoszkieletu. Częściowo na podstawie WOJTASZEK (2006).

Związek chemiczny	Pochodzenie	Mechanizm działania
Substancje zaburzające transport wewnątrzkomórkowy		
Brefeldyna A (BFA)	<i>Penicillium brefeldianum</i>	Działa na czynniki wymiany nukleotydów; blokuje egzocytozę i transport wsteczny do wakuoli
Wortmannina	<i>Penicillium funiculosum</i>	Działa na kinazy fosfatydyloinozytoli; blokuje transport do wakuoli, ciał wielopęcherzykowych, endocytozę
Konkanamycyna A	<i>Streptomyces</i> sp.	Oddziałuje na V ATPazę; zakwasza endosomy, blokuje transport przez TGN
Bafilomycyna A	<i>Streptomyces</i> sp.	
Kantarydyna	m.in. <i>Lytta vesicatoria</i> i inne chrząszcze z rodziny majkowatych	Działa na fosfatazę PP2A; blokuje endocytozę zależną od ligandu
Tyrfostyna A23	Syntetyczne, pochodna tyrozyny	Wiąże się z receptorami błonowymi; blokuje powstawanie pęcherzyków z błony komórkowej oraz TGN
Endozydyna 1 (ES1)	Syntetyczne	Blokuje endocytozę; docelowy obiekt działania nieznany
Endozydyna 3 (ES3)	Syntetyczne	
Endozydyna 7 (ES7)	Syntetyczne	Blokuje szlak sekrecyjny; docelowy obiekt działania nieznany
Sortyna 1, 2	Syntetyczne	Zaburza transport białek do wakuoli; mechanizm nieznany
Grawacyna	Syntetyczne	Zaburza transport białek z ER do wakuoli oraz grawitropizm; mechanizm nieznany
Substancje działające na tubulinę i mikrotubule		
Kolchicyna	<i>Colchicum autumnale</i>	Utrudnia polimeryzację
Oryzalina	Herbicyd	Utrudnia polimeryzację; bardziej efektywny niż kolchicyna
Taksol (paklitaksel)	<i>Taxus</i> sp.	Stabilizuje mikrotubule utrudniając depolimeryzację
Nokodazol	Syntetyczny	Hamuje polimeryzację mikrotubul przez wiązanie z β -tubuliną w dimerach $\alpha\beta$
Winkrystyna	<i>Catharanthus roseus</i>	Wiąże dimery tubulinowe uniemożliwiając polimeryzację
Substancje działające na aktynę i mikrofilamenty		
Cytochalazyna B/D	B – <i>Helminthosporium dermatodeum</i>	Blokuje końce kolczaste mikrofilamentów
	D – <i>Zygosporium mansonii</i>	
Latrunkulina A/B	<i>Latrunculia magnifica</i>	Wiąże monomeryczną aktynę uniemożliwiając polimeryzację
Falloidyna	<i>Amanita phalloides</i>	Wiąże się boczenie do mikrofilamentów i je stabilizuje

mentów, natomiast cytochalazyny, wiążąc się z filamentami aktynowymi zapobiegają ich wydłużaniu. Z kolei falloidyna, wyizolowana z muchomora sromotnikowego (*Amanita phalloides*), wykazuje działanie odwrotne i

stabilizuje cytoszkielet aktynowy. Falloidyna, po uprzedniej koniugacji z barwnikiem fluorescencyjnym, jest od dawna wykorzystywana do znakowania cytoszkieletu aktynowego. Jasplakinolid – cyklodepsipeptyd otrzymywa-

ny z gąbki *Jaspis johnstoni*, ma właściwości podobne do falloidyny, jednak łatwiej przenika do komórek i ma większe zastosowanie w badaniach przyżyciowych jako czynnik stabilizujący mikrofilamenty.

Brefeldyna A (BFA) jest lipofilną toksyną wyizolowaną po raz pierwszy z *Penicillium brefeldianum* w połowie XX w. Jest substancją szczególnie pomocną w badaniu organizacji oraz działania systemu błon wewnętrznych. BFA hamuje szlak sekrecyjny białek, ale jest to związane z zablokowaniem retrogradowego transportu pęcherzyków, tzn. w stronę ER. Przejawia się to m.in. wyraźnymi efektami morfologicznymi, takimi jak powstanie przedziałów hybrydowych między ER i Golgi, a także powstanie nowych, bardzo swoistych struktur, znanych pod nazwą przedziałów BFA. Dzięki tym badaniom doceniono rolę, jaką ma równowaga między szlakami transportowymi przebiegającymi w przeciwnych kierunkach w obrębie systemu wewnątrz błonowego. Na poziomie molekularnym udowodniono, że BFA unieruchamia białko działające jako czynnik wymiany nukleotydów (GEF) w kompleksie z białkiem, w którym nukleotyd ma być wymieniony, i w ten sposób blokuje dalszą aktywność białka GEF. Ponieważ białka te są regulatorami transportu pęcherzykowego, ten ostatni w obecności BFA przestaje działać prawidłowo (patrz MŁYNKOWIAK i WOJTASZEK 2006).

Inhibitorem o szerokim zastosowaniu jest wortmannina, wyizolowana z *Penicillium funiculosum*. Hamuje działanie 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K), a w większych stężeniach także PI4K, i w rezultacie m.in. blokuje endocytozę i transport pęcherzyków do wakuoli. Powoduje także patologiczne puchnięcie przedziału prewakuolarnego (PVC/MVB). Ów nadmierny rozrost przedziału prewakuolarnego jest swoistą dla komórek roślinnych reakcją na wortmanninę. Z kolei po-

chodna tyrozyny, tyrfostryna A23, przeszkadza w rozpoznawaniu motywu aminokwasowego w receptorach błonowych przez kompleks adaptorowy AP-2 i blokuje w ten sposób powstawanie pęcherzyków endocytotycznych (patrz ROBINSON i współaut. 2008).

Zainteresowanie inhibitorami transportu pęcherzykowego w komórce roślinnej zaowocowało przeprowadzeniem szeroko zakrojonych poszukiwań substancji drobno-cząsteczkowych o takiej aktywności w zestawach zawierających łącznie 46 418 związków chemicznych (DRAKAKAKI i współaut. 2011). Do przeszukania wykorzystano model kiełkujących ziaren pyłku tytoniu. Łągiówki pyłkowe cechują się wzrostem szczytowym i szybko ulegają wydłużeniu, a to wymaga intensywnego transportu pęcherzyków w kierunku rosnącego wierzchołka łągiówki. Zidentyfikowano 360 związków hamujących w różny sposób ten proces. W drugiej rundzie procedury przesiewowej obserwowano wpływ wyselekcjonowanych związków na endocytozę w komórkach korzenia *A. thaliana*. Ostatecznie, dzięki zastosowaniu zautomatyzowanej platformy mikroskopii konfokalnej, wyselekcjonowano 123 związki chemiczne zaburzające zarówno kiełkowanie pyłku, jak i endocytozę w komórkach korzenia. Jak dotąd, wstępnie opisano 4 związki:

- endozydynę 3 (ES3), która blokuje transport z błony komórkowej, zaburzając działanie wczesnych endosomów i TGN;
- endozydynę 5 (ES5), która okazała się inhibitorem transportu wstecznego;
- endozydynę 7 (ES7) – inhibitor szlaku sekrecyjnego, którego działanie zaburza m.in. formowanie ściany komórkowej oraz przegrody pierwotnej podczas cytokinezy;
- endozydynę 1 (ES1), która blokuje endocytozę niektórych receptorów obecnych w błonie komórkowej (ROBERT i współaut. 2008).

NOWE PODEJŚCIA I TECHNIKI MIKROSKOPOWE W BADANIACH UKŁADU WEWNĄTRZBŁONOWEGO

SWOISTE TYPY BIAŁEK MARKEROWYCH, TECHNIKI WIELKOSKALOWE

Ciekawe możliwości badania dynamiki systemu błon wewnętrznych daje zastosowanie nowej grupy białek fluorescencyjnych o zmiennym widmie fluorescencji, określanym mianem białek fotokonwertowalnych lub fotoprzełączalnych. Ich działanie polega na

nieodwracalnej zmianie długości fali emisji, np. z zielonej na czerwoną, pod wpływem światła o określonej długości fali, np. ultrafioletu. Zastosowanie białka markerowego dla aparatu Golgiego, transferazy sialowej, w fuzji z fotokonwertowalnym białkiem Kaede pozwoliło określić dynamikę wymiany białek w błonie aparatu Golgiego oraz powstawania przegrody pierwotnej (BROWN i współaut.

2010). Fotoprzełączalne białko EoS zostało wykorzystane do badania endocytozy i krążenia białek przenośnikowych auksyn – PIN1 (DHONUKSHE i współaut. 2007) oraz PIN3 (KLEINE-VEHN i współaut. 2010). W ostatnim czasie stworzono zestaw białek markerowych dla wybranych przedziałów subkomórkowych, w tym systemu błon wewnętrznych, w fuzji z białkiem Eos, co otwiera możliwość podobnych badań w znacznie szerszej skali (MATHUR i współaut. 2010).

Wykorzystanie fluorescencyjnych fuzji białek markerowych, w połączeniu z techniką losowej mutagenyzy i analizą mutantów w mikroskopie fluorescencyjnym lub konfokalnym pod kątem zaburzeń w organizacji systemu błon wewnętrznych, umożliwiło identyfikację nowych genów regulujących szlak sekrecyjny oraz endocytotyczny na wielu poziomach (SPARKES i BRANDIZZI 2012). Przykładowo, dzięki temu określono rolę białka SEC24 w transporcie pęcherzyków między ER i aparatem Golgiego (FASO i współaut. 2009, NAKANO i współaut. 2009), czy udział białek kompleksu adaptyn AP-3 w procesie endocytozy (FERARU i współaut. 2010, ZWIEWKA i współaut. 2011). Z kolei, analiza przesiewowa mutantów *A. thaliana* pod kątem zaburzeń polarnej lokalizacji białka PIN1 i jego relokacji do wnętrza komórki pod wpływem BFA umożliwiła identyfikację białka BIG5 zaangażowanego w kontrolę recyklingu białek do błony komórkowej (TANAKA i współaut. 2009). Choć technika losowej mutagenyzy jest niezwykle czasochłonna, to jednak wraz z rozwojem zautomatyzowanych systemów mikroskopowych, które pozwalają na szybką analizę dużych zasobów danych i identyfikację mutantów o interesującym fenotypie, znajduje ona coraz szersze zastosowanie (DRAKAKAKI i współaut. 2011).

BIĄŁKA FLUORESCENCYJNE W BADANIACH ODDZIAŁYWAŃ MIĘDZYCZĄSTECZKOWYCH

Z badań komórek zwierzęcych wynika, że skład fosfolipidów błonowych jest charakterystyczny dla danego przedziału subkomórkowego oraz, że różne fosfatydyloinozytyle mogą być rozpoznawane i wiązane przez określone białka, np. zaangażowane w kaskady przekazywania sygnałów (HALET 2005). Liczne doświadczenia wskazują, że fosfatydyloinozytyle mogą pełnić podobną rolę w komórkach roślin (MUNNIK i NIELSEN 2011). Doskonałymi markerami błon zawierających poszczególne typy fosfolipidów są opracowane niedawno fuzje białek fluorescencyjnych z

domenami białkowymi, które swoiście wiążą zdefiniowane fosfatydyloinozytyle. I tak, białko fluorescencyjne w fuzji z domeną FYVE znakuje swoiście błony bogate w 3-fosforany fosfatydyloinozytolu i jest zlokalizowane w późnych endosomach, w przedziale MVB. Ten sam fosfolipid jest także rozpoznawany przez domenę PX. Jej obecność wykazano np. w neksynie sortującej SNX2b, która jest zaangażowana w transport pęcherzykowy między endosomami a wakuolą (MUNNIK i NIELSEN 2011). Z kolei, 4-fosforany fosfatydyloinozytolu (PtdIns4P) mogą być związane przez białka zawierające domenę PH, czyli homologiczną do plekstryny. U roślin stanowią one ok. 80% całkowitej puli fosfatydyloinozytoli i są zlokalizowane głównie w błonach komórek o wzroście szczytowym. Istnieją zatem silne przesłanki, iż cząsteczki PtdIns4P są zaangażowane w utrzymywanie polarności komórek roślinnych. Wykorzystanie swoistego markera fluorescencyjnego, białka YFP w fuzji z domeną PH z ludzkiego białka FAPP1, umożliwiło obserwację znacznika w ruchomych strukturach punktowych w obrębie cytoplazmy oraz w błonie komórkowej. Kolokalizacja umiejscowiła białko fuzyjne w diktiosomach aparatu Golgiego. Obecność PtdIns4P wykazano także w przegrodzie komórkowej (VERMEER i współaut. 2009).

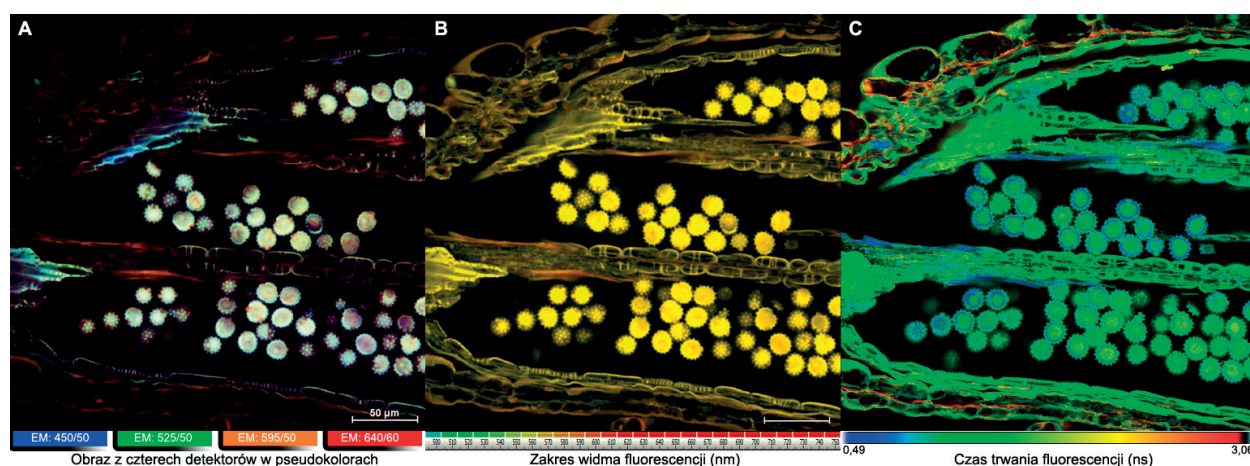
Zastosowanie białkowych znaczników fluorescencyjnych pozwoliło także na obserwację dynamiki zmian w składzie błon w różnych przedziałach komórkowych w odpowiedzi na zmieniające się warunki zewnętrzne. Tą drogą stwierdzono, że fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforany (PtdIns(4,5)P₂) są rozpoznawane przez białka zawierające domenę PH, np. fosfolipazę C. I tak, znacznik fluorescencyjny w fuzji z domeną PH z białka PLCδ1, który w normalnych warunkach jest obecny przeważnie w cytoplazmie, w odpowiedzi na stres solny przemieszcza się do błony komórkowej i pęcherzyków opłaszczonych klatryną. Z kolei, stres cieplny powoduje akumulację markera w błonie komórkowej, a następnie w punktowych strukturach w cytoplazmie, by ostatecznie ulokować się w otoczce jądrowej (MUNNIK i NIELSEN 2011). Jak dotąd nie ma jeszcze pełnego zestawu domen markerowych dla poszczególnych fosfatydyloinozytoli. Można jednak mieć nadzieję, że jego opracowanie znacznie przyspieszy prace nad poznaniem roli fosfatydyloinozytoli w błonach komórek roślinnych.

Oddziaływania białko-białko są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek. Badania biochemiczne takich oddziaływań przyniosły ogromną ilość informacji. Jednak stosowane tam metody mogą być obciążone błędami, które są spowodowane przede wszystkim procedurami izolacji białek, które uwalniają makrocząsteczki z ich naturalnego mikrośrodowiska określonego przedziału subkomórkowego. Stąd, w ostatnich latach coraz częściej sięga się po metody *in vivo* badania oddziaływań międzycząsteczkowych (OSTERRIEDER i współaut. 2009). Jak się wydaje, obecnie najlepszą techniką badań oddziaływań białko-białko w żywych komórkach jest rezonansowy transfer energii Förstera (ang. Förster resonance energy transfer, FRET). Jest to zjawisko bezpromienistego przeniesienia energii fluoroforu donora na znajdujący się w bezpośredniej bliskości akceptor. Zjawisku FRET towarzyszy spadek intensywności fluorescencji donora oraz skrócenie czasu pozostawania barwnika w stanie wzbudzonym. Jeśli ponadto akceptor jest fluoroforem, to obserwuje się wzrost intensywności jego emisji (BAYLE i współaut. 2008). Aby zjawisko FRET zaszło, konieczne jest spełnienie kilku warunków: (i) spektrum emisji donora musi pokrywać się przynajmniej częściowo ze spektrum wzbudzenia akceptora; (ii) wzajemna orientacja dipolowa obu barwników jest prawidłowa i (iii) dystans między nimi nie przekracza 10 nm (OSTERRIEDER i współaut. 2009). W ży-

wych komórkach FRET może zachodzić między dwoma białkami lub domenami jednego polipeptydu wyznakowanymi właściwymi fluoroforami tworzącymi parę FRET (BAYLE i współaut. 2008). Obliczenie wydajności transferu energii może być oparte o intensywność, spektrum lub czas trwania fluorescencji donora (LAPTENOK i współaut. 2010).

Najpopularniejszą parę FRET tworzą białka CFP i YFP charakteryzujące się szerokimi spektrami wzbudzenia i emisji oraz niewielkim przesunięciem Stokesa. Wydajność kwantowa CFP wynosi 0,4 i jest wyraźnie mniejsza niż YFP (0,61). To sprawia, że konieczne jest dostarczenie większej energii potrzebnej dla wzbudzenia białka i transferu energii FRET, a to z kolei może prowadzić do efektu fototoksyczności. Ponadto CFP wykazuje wielowykładniczy spadek czasu życia fluorescencji, co może być przyczyną błędnej interpretacji krzywych spadku czasu fluorescencji. Białko GFP ma znacznie lepsze właściwości fotofizyczne, wykazuje monowykładniczy spadek czasu fluorescencji oraz wyższą wydajność kwantową i fotostabilność. Jednakże wykorzystanie GFP z jego wariantem spektralnym YFP jako pary FRET jest niemożliwe ze względu na nakładające się spektra wzbudzenia obu białek. Stąd idealnymi partnerami dla GFP są białka o spektrum emisji przesuniętym w stronę widma czerwonego (BAYLE i współaut. 2008).

Mikroskopia obrazowania czasu trwania fluorescencji (ang. fluorescence lifetime ima-



Ryc. 3. Obraz utrwalonego pyłku stokrotki.

(A) mikroskop konfokalny w standardowym trybie pracy 4 detektorów (wzbudzenie laserami 405 nm, 488 nm, 561 nm, 641 nm, zakres detekcji widoczny pod zdjęciem); (B) mikroskop konfokalny w trybie detekcji spektralnej (wzbudzenie laserem 488 nm, zakres widma detekcji widoczny pod zdjęciem); (C) obraz czasu trwania fluorescencji (wzbudzenie laserem pulsacyjnym 485 nm, czas trwania fluorescencji zobrazowany w pseudokolorach) (fot. M. Michalak).

ging microscopy, FLIM) jest coraz szerzej stosowaną techniką pozwalającą na obrazowanie czasu trwania fluorescencji barwników (Ryc. 3) w skali nanosekund z rozdzielczością przestrzenną ograniczoną limitem dyfrakcji do ok. 250 nm (LAPTENOK i współaut. 2010). Nadaje się znakomicie do ilościowej analizy zjawiska FRET, w którym obserwuje się spadek czasu trwania wzbudzonego fluoroforu donora w wyniku przeniesienia energii na pobliski fluorofor akceptora (BAYLE i współaut. 2008). Zaletą pomiaru FLIM jest całkowita niezależność od stężenia barwnika, intensywności fluorescencji czy przenikania emisji donora do akceptora, ponieważ pomiar odbywa się tylko w oparciu o czas trwania fluorescencji donora. Każdy barwnik fluorescencyjny charakteryzuje się swoistym czasem trwania fluorescencji, na który mogą mieć wpływ temperatura, środowisko, stężenie jonów wapnia lub właśnie udział w zjawisku FRET (OSTERRIEDER i współaut. 2009).

Zastosowanie techniki FLIM umożliwia także pomiar czasu wzbudzenia fluorescencji akceptora. Zaletą takiego podejścia jest eliminacja z pomiarów cząsteczek, które nie są zaangażowane w bezpośredni transfer energii. Pomiar czasu wzbudzenia akceptora skonfrontowany z klasycznym pomiarem czasu spadku trwania fluorescencji donora mogą znacznie polepszyć jakość opartej na statystyce analizy obrazu FLIM. Prawidłowa interpretacja wyników pomiarów FRET-FLIM wymaga dobrze dopracowanych metod i protokołów analizy danych. Można pokusić się o jednoczesną analizę danych z wielu pomiarów, co znacząco wpływa na dokładność obliczeń (LAPTENOK i współaut. 2010).

Badania oddziaływań białko-białko z użyciem FRET-FLIM wykonano jak dotąd w komórkach *wsięgi*, *petunii*, *tytoniu*, *kukurydzy*, *rzodkiewnika*, czy *jęczmienia* (omówione w OSTERRIEDER i współaut. 2009). Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, że analizy oddziaływań międzycząsteczkowych z użyciem markerów fluorescencyjnych w roślinach mogą być problematyczne ze względu na autofluorescencję spowodowaną obecnością takich związków, jak chlorofil, ligniny, czy inne związki fenolowe. Widmo emisji cząsteczek naturalnie występujących w komórkach roślinnych może nakładać się z widmem białek fluorescencyjnych. Dla przykładu, spektrum fluorescencji lignin w ścianach korzeni i tkanek przewodzących zawiera się między 490 a 620 nm (BAYLE i współaut. 2008). Stąd warianty spektralne białka GFP, jak i CFP,

czy YFP, mogą być trudne do zlokalizowania w komórkach o ścianach silnie z lignifikowanych nawet z użyciem wąskich filtrów dla detekcji emisji (BAYLE i współaut. 2008, ELGASS i współaut. 2010). Najczęstszym sposobem przezwyciężenia problemu autofluorescencji jest nadekspresja białek fluorescencyjnych na takim poziomie, który umożliwi ustawienie poziomu detekcji powyżej tła. Trzeba jednak pamiętać, że zbyt wysoka nadekspresja białek może prowadzić do zmian lokalizacji białek i funkcjonowaniu szlaków sygnałowych, co prowadzi do zafałszowania rzeczywistego obrazu żywej komórki (ELGASS i współaut. 2010).

Zaobserwowano, że kształt krzywej zaniku fluorescencji pochodzącej ze znanych fluoroforów różni się znacząco od krzywej pochodzącej z autofluorescencji komórek roślinnych. Na tej podstawie jest możliwe stworzenie „filtra” do analizy obrazu, który oddzieli znaczący sygnał fluorescencyjny od tła. Umożliwia to wykrycie niewielkich ilości białek fluorescencyjnych w błonie komórkowej roślin, gdzie bezpośrednia bliskość ściany komórkowej i jej autofluorescencja utrudniają odróżnienie wyznakowanych błon sąsiadujących komórek przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Technika ta została nazwana analizą kształtu krzywej zaniku intensywności fluorescencji (ang. fluorescence intensity decay shape analysis microscopy, FIDSAM) (SCHLEIFENBAUM i współaut. 2010). Połączenie FIDSAM i FLIM umożliwia ilościowy pomiar oddziaływań z wysoką rozdzielczością przestrzenną i czasową, nawet w sytuacjach, gdy intensywność fluorescencji tła jest czterokrotnie większa od markera GFP (ELGASS i współaut. 2010). FRET-FLIM stanowi doskonałe narzędzie do weryfikacji *in vivo* wyników uzyskanych metodami *in vitro*. Umożliwia również identyfikację nieznanych dotąd oddziaływań białko-białko. Niewątpliwą zaletą stosowania FRET-FLIM jest otrzymywanie informacji o sile oddziaływań, dzięki rejestracji niewielkich zmian czasu trwania fluorescencji znaczników. Ponadto można obserwować zmiany w wybranych strukturach subkomórkowych, uzyskując informacje o przestrzennym i czasowym charakterze badanych oddziaływań (OSTERRIEDER i współaut. 2009).

NOWE TECHNIKI MIKROSKOPOWE

Techniką, która w istotny sposób zmieniła badania nad dynamiką błony komórkowej w komórkach zwierzęcych jest mikro-

skopia wykorzystująca zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM). Do wzbudzenia fluorescencji w badanym preparacie wykorzystuje ona falę zanikającą, która powstaje na skutek całkowitego wewnętrznego odbicia promienia wzbudzającego. Odbicie następuje na granicy faz o różnym współczynniku refrakcji, najczęściej od powierzchni szkiełka nakrywkowego. Fala zanikająca ma tę samą częstotliwość, co wiązka wzbudzająca, a więc może wzbudzać fluorescencję określonych cząsteczek. Jednak w przeciwieństwie do klasycznego oświetlenia epifluorescencyjnego, fala ta może wnikać do preparatu jedynie na bardzo ograniczoną głębokość, ok. 100–400 nm. W praktyce umożliwia to wzbudzenie fluorescencji jedynie w cząsteczkach znajdujących w lub tuż przy błonie komórkowej. Unika się w ten sposób wysokiego tła, wynikającego ze wzbudzenia fluoroforów w głębi komórki, a dzięki temu uzyskuje się obraz o znacznie lepszej rozdzielczości. Z uwagi na obecność ściany komórkowej, zwykle o grubości ok. 200–400 nm, przez wiele lat uważano, że technika ta nie znajdzie zastosowania w badaniach roślin (patrz SPARKES i współaut. 2011). W chwili obecnej uznaje się jednak, że z uwagi na różne współczynniki refrakcji, powierzchnią od-

bicia wiązki wzbudzającej może być obszar między ścianą komórkową a błoną komórkową (SPARKES i współaut. 2011, VIZCAY-BARRERA i współaut. 2011). Zastosowanie techniki TIRFM pozwoliło do tej pory uwidocznić m.in. białka markerowe błony komórkowej (LTI6b oraz PIP2a) oraz mikrotubule przybłonowe (MAP4) w rozdzielczości znacznie przekraczającej obraz uzyskiwany dotąd w mikroskopie epifluorescencyjnym (VIZCAY-BARRERA i współaut. 2011). Pewną alternatywą dla TIRFM jest mikroskopia zmiennego kąta oświetlenia (ang. variable-angle epifluorescence microscopy, VAEM) wykorzystująca do oświetlenia preparatu wąską wiązką światła wzbudzającego. Wiązka kierowana jest pod różnym kątem, jak najbardziej równoległym do powierzchni preparatu, tak by uzyskać wzbudzenie fluorescencji jak najmniejszej puli fluoroforów (KONOPKA i BEDNAREK 2008). Wykorzystując technikę VAEM opisano m.in. dynamikę białka podobnego do dynaminy 1C oraz łańcucha lekkiego klatryny w błonie komórek korzenia oraz epidermy *Arabidopsis thaliana* (KONOPKA i współaut. 2008). Z całą pewnością dalszy rozwój tych technik pozwoli w niedługiej przyszłości śledzić dynamiczne procesy zachodzące w błonie komórkowej i jej pobliżu ze znacznie większą dokładnością.

WYKORZYSTANIE TECHNIK MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ DO BADAŃ UKŁADU BŁON WEWNĘTRZNYCH KOMÓREK ROŚLINNYCH

Streszczenie

Gwałtowny rozwój technik mikroskopii fluorescencyjnej, w tym konfokalnej, w połączeniu z wykorzystaniem metod biologii molekularnej znacząco zdynamizowały rozwój molekularnej biologii komórki. Z wielu różnych względów, zwłaszcza znaczącej odmienności strukturalnej i funkcjonalnej, badania komórek roślinnych są nieco opóźnione. Artykuł podsumowuje stan badań systemu błon wewnętrznych komórek roślinnych z wykorzystaniem różnicowanych podejść i metod badawczych biologii komórki. Wskazuje na użycie różnego typu znac-

ników, tak chemicznych, jak i genetycznych, które umożliwiają lokalizację makrocząsteczek i procesów biologicznych. Omawia substancje chemiczne, które zaburzają funkcjonowanie systemu wewnątrz błonowego, a więc pośrednio pozwalają wnioskować o roli uczestniczących w tych procesach białek. Wreszcie, pokazuje wykorzystanie nowych podejść i technik mikroskopowych do badań komórek roślinnych. Gdzie to jest stosowne, omawia także trudności wynikające ze swoistości składu, struktury i funkcji komórek roślinnych.

FLUORESCENCE MICROSCOPY TECHNIQUES IN THE RESEARCH ON THE ENDOMEMBRANE SYSTEM OF PLANT CELLS

Summary

Rapid development of fluorescence microscopy, including confocal microscopy, combined with the utilization of the methodologies of molecular biology, significantly accelerated the development of molecular cell biology. Research in plant cell biology slightly lags behind, mainly due to marked struc-

tural and functional dissimilarity of plant cells. This paper summarizes the current state of research on plant endomembrane system with respect to the utilization of differentiated approaches and methods of cell biology. The use of markers, both chemical and genetic, which enable localization of macromol-

ecules and biological processes is indicated. Chemical substances perturbing the functioning of the endomembrane system and thus enabling to draw conclusions on the role of specific proteins are listed and discussed. Finally, use of novel approaches

and microscopic techniques to the research of plant cells is demonstrated. Where applicable, problems arising due to the specific composition, structure and function of plant cells, are also considered.

LITERATURA

- ANIENTO F., ROBINSON D. G., 2005. *Testing for endocytosis in plants*. Protoplasma 226, 3–11.
- BASIŃSKA A., KRZESŁOWSKA M., WOŹNY A., 2012. *Nowe fakty dotyczące transportu pęcherzykowego w komórkach roślinnych*. Kosmos 61, 363–370.
- BAYLE V., NUSSAUME L., BHAT R., 2008. *Combination of novel green fluorescent protein mutant TSapphire and DsRed variant mOrange to set up a versatile in planta FRET-FLIM assay*. Plant Physiol. 148, 51–60.
- BOLTE S., TALBOT C., BOUTTE Y., CATRICE O., READ N. D., SATTIAT-JEUNEMAITRE B., 2004. *FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells*. J. Microsc. 214, 159–173.
- BRANDIZZI F., IRONS S. L., JOHANSEN J., KOTZER A., NEUMANN U., 2004. *GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system*. J. Microsc. 214, 138–158.
- BROWN S. C., BOLTE S., GAUDIN M., PEREIRA C., MARION J., SOLER M. N., SATTIAT-JEUNEMAITRE B., 2010. *Exploring plant endomembrane dynamics using the photoconvertible protein Kaede*. Plant J. 63, 696–711.
- CHALFIE M., TU Y., EUSKIRCHEN G., WARD W. W., PRASHER D. C., 1994. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 263, 802–805.
- CRAM W. J., 1980. *Pinocytosis in plants*. New Phytol. 84, 1–17.
- DHONUKSHE P., ANIENTO F., HWANG I., ROBINSON D. G., MRAVEC J., STIERHOF Y.-D., FRIML J., 2007. *Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis*. Curr. Biol. 17, 520–527.
- DRAKAKAKI G., ROBERT S., SZATMARI A. M., BROWN M. Q., NAGAWA S., VAN DAMME D., LEONARD M., YANG Z., GIRKE T., SCHMID S. L., RUSSINOVA E., FRIML J., RAIKHEL N. V., HICKS G. R., 2011. *Clusters of bioactive compounds target dynamic endomembrane networks in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 17850–17855.
- ELGASS K., CAESAR K., WANKE D., HARTE K., MEIXNER A. J., SCHLIEFENBAUM F., 2010. *Application of FLIM-FIDSAM for the in vivo analysis of hormone competence of different cell types*. Analyt. Bioanal. Chem. 398, 1919–1925.
- FASO C., CHEN Y. N., TAMURA K., HELD M., ZEMELIS S., MARTI L., SARAVANAN R., HUMMEL E., KUNG L., MILLER E., HAWES C., BRANDIZZI F., 2009. *A missense mutation in the Arabidopsis COPII coat protein Sec24A induces the formation of clusters of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus*. Plant Cell 21, 3655–3671.
- FERARU E., PACIOREK T., FERARU M. I., ZWIEWKA M., DE GROODT R., DE RYCKE R., KLEINE-VEHN J., FRIML J., 2010. *The AP-3 β adaptin mediates the biogenesis and function of lytic vacuoles in Arabidopsis*. Plant Cell 22, 2812–2824.
- GALL L., STAN R. C., KRESS A., HERTEL B., THIEL G., MECKEL T., 2010. *Fluorescent detection of fluid phase endocytosis allows for in vivo estimation of endocytic vesicle sizes in plant cells with sub-diffraction accuracy*. Traffic 11, 548–559.
- GELDNER N., DENERVAUD-TENDON V., HYMAN D. L., MAYER U., STIERHOF Y.-D., CHORY J., 2009. *Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set*. Plant J. 59, 169–178.
- GREBE M., XU J., MÖBIUS W., UEDA T., NAKANO A., GEUZE H. J., ROOK M. B., SCHERES S. B., 2003. *Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes*. Curr. Biol. 13, 1378–1387.
- GRIFFING L. R., 2008. *FRET analysis of transmembrane flipping of FM4-64 in plant cells: is FM4-64 a robust marker for endocytosis?* J. Microsc. 231, 291–298.
- HALET G., 2005. *Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains*. Biol. Cell. 97, 501–518.
- HANTON S. L., BRANDIZZI F., 2006. *Fluorescent proteins as markers in the plant secretory pathway*. Microsc. Res. Tech. 69, 152–159.
- HASELOFF J., SIEMERING K., PRASHER D., HODGE S., 1997. *Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2122–2127.
- JELÍNKOVÁ A., MALÍNSKÁ K., SIMON S., KLEINE-VEHN J., PAREZOVÁ M., PEJCHAR P., KUBES M., 2010. *Probing plant membranes with FM dyes: tracking, dragging or blocking?* Plant J. 61, 883–892.
- KLEINE-VEHN J., DHONUKSHE P., SWARUP R., BENNETT M., FRIML J., 2006. *Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1*. Plant Cell 18, 3171–3181.
- KLEINE-VEHN J., DING Z., JONES A. R., TASAKA M., MORITA M. T., FRIML J., 2010. *Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 22344–22349.
- KONOPKA C. A., BEDNAREK S. Y., 2008. *Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex*. Plant J. 53, 186–196.
- KONOPKA C. A., BACKUES S. K., BEDNAREK S. Y., 2008. *Dynamics of Arabidopsis dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane*. Plant Cell 20, 1363–1380.
- LAPTENOK S. P., BORST J. W., MULLEN K. M., VAN STOKKUM I. H. M., VISSER A. J., VAN AMERONGEN H., 2010. *Global analysis of Förster resonance energy transfer in live cells measured by fluorescence lifetime imaging microscopy exploiting the rise time of acceptor fluorescence*. Phys. Chem. Chem. Phys. 12, 7593–7602.
- MATHUR J., RADHAMONY R., SINCLAIR A. M., DONOSO A., DUNN N., ROACH E., RADFORD D., MOHAGHEGH P. S., LOGAN D. C., KOKOLIC K., MATHUR N., 2010. *mEosFP-based green-to-red photoconvertible subcellular probes for plants*. Plant Physiol. 154, 1573–1587.
- MISHEV K., DEJONGHE W., RUSSINOVA E., 2013. *Small molecules for dissecting endomembrane trafficking: a cross system view*. Chem. Biol. 20, 475–487.

- MŁYŃKOWIAK P., WOJTAŚZEK P., 2006. *Brefeldyna A – wgląd w funkcjonowanie systemu błon komórek roślinnych*. Post. Biol. Kom. 33, 19–33.
- MUNNIK T., NIELSEN E., 2011. *Green light for polyphosphoinositide signals in plants*. Curr. Opin. Plant Biol. 14, 489–497.
- NAKANO R. T., MATSUSHIMA R., UEDA H., TAMURA K., SHIMADA T., LI L., HAYASHI Y., KONDO M., NISHIMURA M., HARA-NISHIMURA I., 2009. *GNOM-LIKE1/ERMO1 and SEC24a/ERMO2 are required for maintenance of endoplasmic reticulum morphology in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 21, 3672–3685.
- OPARKA K. J., HAWES C., 1992. *Vacuolar sequestration of fluorescent probes in plant cells – a review*. J. Microsc. 166, 15–27.
- OSTERRIEDER A., CARVALHO C. M., LATIJNHOUWERS M., JOHANSEN J. N., STUBBS C., BOTCHWAY S., HAWES C., 2009. *Fluorescence lifetime imaging of interactions between Golgi tethering factors and small GTPases in plants*. Traffic 10, 1034–1046.
- OTEGUI M. S., SPITZER C., 2008. *Endosomal functions in plants*. Traffic 9, 1589–1598.
- PETERSON J. R., MITCHINSON T. J., 2002. *Small molecule, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton*. Chem. Biol. 9, 1275–1285.
- ROBERT S., CHARY S. N., DRAKAKAKI G., LI S., YANG Z., RAIKHEL N. V., HICKS G. R., 2008. *Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 8464–8469.
- ROBERT S., RAIKHEL N. V., HICKS G. R., 2009. *Powerful partners: Arabidopsis and chemical genomics*. Arabidopsis Book 7, e0109.
- ROBINSON D. G., JIANG L., SCHUMACHER K., 2008. *The endosomal system of plants: charting new and familiar territories*. Plant Physiol. 147, 1482–1492.
- ŠAMAJ J. (red.), 2012. *Endocytosis in Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- ŠAMAJ J., READ N. D., VOLKMAN D., MENZEL D., BALUŠKA F., 2005. *The endocytic network in plants*. Trends Cell Biol. 15, 425–433.
- SCHLEIFENBAUM F., ELGASS K., SACKROW M., CAESAR K., BERENDZEN K., MEIXNER A. J., HARTE K., 2010. *Fluorescence intensity decay shape analysis microscopy (FIDSAM) for quantitative and sensitive live-cell imaging: a novel technique for fluorescence microscopy of endogenously expressed fusion-proteins*. Mol. Plant 3, 555–562.
- SHIMOMURA O., JOHNSON F., SAIGA Y., 1962. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea*. J. Cell. Comp. Physiol. 59, 223–239.
- SPARKES I., BRANDIZZI F., 2012. *Fluorescent protein-based technologies: shedding new light on the plant endomembrane system*. Plant J. 70, 96–107.
- SPARKES I. A., GRAUMANN K., MARTINIÈRE A., SCHOBERRER J., WANG P., OSTERRIEDER A., 2011. *Bleach it, switch it, bounce it, pull it: using lasers to reveal plant cell dynamics*. J. Exp. Bot. 62, 1–7.
- TANAKA H., KITAKURA S., DE RYCKE R., DE GROODT R., FRIML J., 2009. *Fluorescence imaging-based screen identifies ARF GEF component of early endosomal trafficking*. Curr. Biol. 19, 391–397.
- VAN GISBERGEN P. A. C., ESSELING-OZDOBA A., VOS J. W., 2008. *Microinjecting FM4-64 validates it as a marker of the endocytic pathway in plants*. J. Microsc. 231, 284–290.
- VERMEER J. E., THOLE J. M., GOEDHART J., NIELSEN E., MUNNIK T., GADELLA T. W., JR., 2009. *Imaging phosphatidylinositol 4-phosphate dynamics in living plant cells*. Plant J. 57, 356–372.
- VIZCAY-BARRERA G., WEBB S. E., MARTIN-FERNANDEZ M. L., WILSON Z. A., 2011. *Subcellular and single-molecule imaging of plant fluorescent proteins using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)*. J. Exp. Bot. 62, 5419–5428.
- WOJTAŚZEK P., 2006. *Cytoszkielek*. [W:] *Biologia komórki roślinnej*. Tom 1: *Struktura*. WOJTAŚZEK P., WOŹNY A., RATAJCZAK L. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 194–226.
- WOŹNY A., RATAJCZAK L., WOJTAŚZEK P., 2006. *Ogólne zasady budowy i funkcjonowania komórki roślinnej*. [W:] *Biologia komórki roślinnej*. Tom 1: *Struktura*. WOJTAŚZEK P., WOŹNY A., RATAJCZAK L. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1–37.
- WOŹNY A., 2007a. *Komunikacja w obrębie systemu*. [W:] *Biologia komórki roślinnej*. Tom 2: *Funkcja*. WOJTAŚZEK P., WOŹNY A., RATAJCZAK L. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 202–220.
- WOŹNY A., 2007b. *Endocytoza i egzocytoza*. [W:] *Biologia komórki roślinnej*. Tom 2: *Funkcja*. WOJTAŚZEK P., WOŹNY A., RATAJCZAK L. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 221–228.
- ZWIEWKA M., FARARU E., MÖLLER B., HWANG I., FERARU M. I., KLEINE-VEHN J., WEIJERS D., FRIML J., 2011. *The AP-3 adaptor complex is required for vacuolar function in Arabidopsis*. Cell Res. 21, 1711–1722.